

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞŞEFTALİ'SİNDEN (*Prunus persica* L.) POLİFENOL  
OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**AYŞE TÜRKHAN**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ**

**II. DANIŞMAN**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ ELİF DUYGU KAYA**

**TEZ JÜRİLERİ**

**PROF. DR. AHMET ÇOLAK**

**PROF. DR. AHMET ADIGÜZEL**

**DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ BARBAROS DİNÇER**

**DOKTORA TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

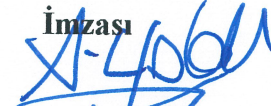
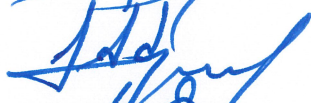



**RİZE- 2018**


**Her Hakkı Saklıdır**


T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AĞŞEFTALİ'SİNDEN (*Prunus persica* L.) POLİFENOL OKSİDAZIN  
SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Özlem FAİZ danışmanlığında, Ayşe TÜRKHAN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/07/2018 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK	
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL	
Üye	: Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Doç. Dr. Özlem FAİZ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER	

  
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



## ÖNSÖZ

“Ağşeftali’sinden (*Prunus persica* L.) Polifenol Oksidazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlandı.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarım boyunca desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Özlem Faiz ve II. danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu Kaya’ya şükranlarımı sunarım. Doktora çalışmalarım boyunca önerilerini aldığım tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Sayın Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında, enzim immobilizasyonu destek materyali olarak kullandığım SnO<sub>2</sub>: Sb ince film yapımında yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Adem Koçyiğit’e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan anneme, babama, kardeşlerime, sevgili eşime ve canım oğluma en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Ayşe TÜRKHAN**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Ağşeftali’sinden (*Prunus persica* L.) Polifenol Oksidazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 13/07/2018

  
Ayşe TÜRKHAN

*Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

## ÖZET

### AĞŞEFTALİ'SİNDEN (*Prunus persica* L.) POLİFENOL OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Ayşe TÜRKHAN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi  
Danışmanı: Doç. Dr. Özlem FAİZ

Türkiye'de Iğdır İli ekolojik şartları altında yetişen Ağşeftali (*Prunus persica* L.) olarak adlandırılan yerel şeftalisi çeşitinden elde edilen polifenol oksidaz enzimi (PFO), afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve saflaştırılan PFO enzimi yeni matriks antimon katkılı kalay oksit ( $\text{SnO}_2$ : Sb) ince film üzerine ilk kez adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Burada, filmler, sprey piroliz tekniği ile laboratuvar koşullarında kolaylıkla sentezlenmiştir. PFO'ların  $\text{SnO}_2$ : Sb ince film üzerine immobilizasyonu, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ve X-Işını Difraksiyon (XRD) ile doğrulanmıştır. Elde edilen serbest ve immobilize PFO enzimleri  $\text{SnO}_2$ : Sb ince film üzerine en uygun pH ve sıcaklık gibi bazı enzim optimizasyon noktalarına göre karşılaştırılmıştır. Serbest ve immobilize PFO'ların optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur. PFO'ların optimum sıcaklığı,  $\text{SnO}_2$ : Sb ince film üzerinde immobilizasyon ile 20 °C'den 30 °C'ye yükselmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin 4-metil katekol substratı varlığında, Km değerleri sırasıyla 2,0 mM ve 1,4 mM olarak tespit edilmiştir. Immobilize enzimin pH ve ısıl kararlılığı serbest enzime göre daha iyi olduğu bulunmuştur. Immobilize enzimi 4 °C'de 24 saatte bir aktivite ölçümleri 15 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %59,13 koruduğu görülmüştür. Immobilize enzimin tekrarlanabilirliği incelendiğinde 3 ardışık operasyonlar sonrasında ilk aktivitesinin %80,56 koruduğu ve 18 kere tekrarlanmadan sonra aktivitesinde yaklaşık %50 koruduğu görülmüştür. PFO'nun immobilizasyonu ile enzimin L-Tirosin oksidasyonunu katalizleme potansiyelinin arttığı belirlenmiştir.

2018, 90 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Polifenol Oksidaz, Ağşeftali (*Prunus persica* L.),  $\text{SnO}_2$ : Sb İnce Film, Immobilizasyon, Karakterizasyon.

## ABSTRACT

### PURIFICATION, IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM AĞŞEFTALİ (*Prunus persica L.*)

Ayşe TÜRKHAN

Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Ph. D. Thesis  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem FAİZ

Polyphenol oxidase enzymes (PPO) obtained from Ağşeftali (*Prunus persica L.*), which was native peach genotypes under Iğdir province ecological condition in Turkey, was purified by affinity chromatography and then, PPO immobilized on new matrix antimony doped tin oxide (SnO<sub>2</sub>: Sb) thin films by adsorption method for the first time. In here, the films were synthesized by spray pyrolysis technique in laboratory condition, easily. The immobilization of PPO onto SnO<sub>2</sub>: Sb thin films was confirmed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Atomic Force Microscope and X-Ray Diffractometer (XRD). Obtained free and immobilized PPOs onto thin film were compared according to some enzyme optimization points such as optimum pH and temperature. The optimum pH of the free and immobilized PPOs was found as 6.0. The optimum temperature of PPOs increased from 20 °C to 30 °C with immobilization on the thin film. Km values of the free and immobilized enzymes were obtained as 2 mM and 1.4 mM, respectively. The pH and the thermal stability of the immobilized enzyme are found to be better than the free enzyme. Activity measurements of the immobilized enzyme at 4 °C for 24 hours, At the end of 15 days, initiation activity was found to be 59,13%. When the reproducibility of the immobilized enzyme was examined, it was found that after the first 3 consecutive operations, the initial activity retained 80,56% and was retained approximately 50% of its activity after 18 repetitions. L-Tyrosine oxidation of the enzymes enhanced with immobilization of PPOs onto SnO<sub>2</sub>: Sb thin films.

**2018, 90 pages**

**Keywords:** Polyphenol Oxidase, Ağşeftali (*Prunus persica L.*), SnO<sub>2</sub>: Sb Thin Film, Immobilization, Characterization.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	2
1.3. Çalışmada Kullanılan Polifenol Oksidaz Kaynağı Hakkında Genel Bilgi.....	4
1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyası.....	5
1.4.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması.....	5
1.4.2. Polifenol Oksidazın Doğadaki Dağılımı.....	6
1.4.3. Polifenol Oksidazın, Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması.....	6
1.4.4. Polifenol Oksidazın Substratları.....	13
1.4.5. Polifenol Oksidazın Aktivitesinin Belirlenmesi.....	15
1.4.6. Polifenol Oksidazın Kullanım Alanları.....	17
1.5. İmmobilizasyon.....	19
1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	21
1.5.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....	21
1.5.1.1.1. Bağlama.....	21
1.5.1.1.2. Tutuklama.....	25
1.5.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon.....	26
1.6. İnce Film.....	27
1.7. Polifenol Oksidaz ile İlgili Literatürde Yapılan Bazı Çalışmalar.....	29
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	34
2.1. Materyal.....	34
2.2. Kullanılan Cihazlar ve Çözeltiler.....	34
2.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	34

2.2.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	35
2.2.3.	Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler.....	35
2.2.3.1.	Tampon Çözeltiler .....	36
2.2.3.2.	Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	36
2.2.3.3.	Substrat Çözeltileri .....	37
2.2.3.4.	Protein Tayininde kullanılan Çözeltiler.....	37
2.2.3.5.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (PAGE) Kullanılan Çözeltiler.....	37
2.2.3.6.	SnO <sub>2</sub> : Sb İnce Film Hazırlama Çözeltileri.....	39
2.2.3.7.	Diğer Çözeltiler.....	39
2.2.4.	Yöntem.....	39
2.2.4.1.	Ham Ekstraktın Hazırlanması ve Aseton Çöktürmesi .....	39
2.2.4.2.	Polifenol Oksidazın Aktivite Tayini .....	40
2.2.4.3.	Enzimin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	41
2.2.4.3.1.	Afinite Jelinin sentezi .....	41
2.2.4.3.2.	Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	42
2.2.4.4.	Protein Tayini.....	43
2.2.4.5.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	43
2.2.4.6.	SnO <sub>2</sub> : Sb İnce Film Üzerine Polifenol Oksidazın İmmobilizasyonu .....	44
2.2.4.6.1.	SnO <sub>2</sub> : Sb İnce Film Jeli Hazırlanışı .....	44
2.2.4.6.2.	SnO <sub>2</sub> : Sb İnce Film .....	44
2.2.4.7.	Enzim İmmobilizasyonu.....	45
2.2.4.8.	Enzim İmmobilizasyonunun karakterizasyonu.....	45
2.2.4.9.	Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu.....	46
2.2.4.9.1.	Substrat Özgünlüğü.....	46
2.2.4.9.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	46
2.2.4.9.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	46
2.2.4.9.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	46
2.2.4.9.5.	pH Kararlılığının İncelenmesi .....	47
2.2.4.9.6.	Isıl Kararlılığın İncelenmesi.....	47
2.2.4.9.7.	İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı .....	47
2.2.4.9.8.	İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi .....	48
3.	BULGULAR.....	49



3.1.	Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	49
3.2.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektoroforezi .....	50
3.3.	Polifenol Oksidaz Enziminin SnO <sub>2</sub> : Sb İnce Film Üzerine İmmobilizasyonu.....	51
3.4.	Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Substratların Etkisi.....	56
3.5.	Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	57
3.6.	Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	57
3.7.	Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	58
3.8.	Serbest ve İmmobilize Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	60
3.9.	İmmobilize Enzimin Isıl Kararlılığın İncelenmesi.....	61
3.10.	İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı.....	61
3.11.	İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	62
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	63
5.	ÖNERİLER.....	73
	KAYNAKLAR.....	74
	ÖZGEÇMİŞ.....	90

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Ağşeftali'sinin ( <i>Prunus persica</i> L.) görüntüsü.....	4
Şekil 2.	Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi) .....	7
Şekil 3.	<i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu.. .....	7
Şekil 4.	<i>Malus domestica</i> L. PFO'sunun üç boyutlu görüntüsü. . . . .	8
Şekil 5.	PFO'nun bakır merkezleri. . . . .	8
Şekil 6.	<i>Malus domestica</i> L.'nin PFO'sunun bakır bağlanma bölgeleri.. . . . .	9
Şekil 7.	<i>Malus domestica</i> L. PFO'sunun aktif bölgesi ve substrat molekülünün yerleşmesi.....	9
Şekil 8.	PFO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması. ....	11
Şekil 9.	PFO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.....	11
Şekil 10.	Polifenol oksidaz için önerilen monofenoloz ve difenolaz mekanizmaları...12	
Şekil 11.	PFO'nun (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri.....	16
Şekil 12.	Farklı matrisler a.boncuk, b.lif, c.kapsül, d.film ve e.membran....	19
Şekil 13.	Enzim immobilizasyon yöntemleri. . . . .	21
Şekil 14.	Çapraz bağlama ile immobilizasyon. ....	22
Şekil 15.	Kopolimerizasyon yöntemi. ....	22
Şekil 16.	Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi. . . . .	23
Şekil 17.	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi.. . . .	25
Şekil 18.	Polimer bir matris içerisinde enzim molekülünün tutuklanması.....	26
Şekil 19.	Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu. . . . .	26
Şekil 20.	Kalay oksit kristal yapısı. . . . .	28
Şekil 21.	Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları. ....	42
Şekil 22.	PFO'nun saflaştırılmasına ait afinite kromatografisi grafiği.....	49
Şekil 23.	Doğal-PAGE. ....	50
Şekil 24.	SDS – PAGE. ....	51
Şekil 25.	Ağşeftali'sinden saflaştırılan PFO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	51
Şekil 26.	SnO <sub>2</sub> : Sb ince filminin SEM görüntüsü.....	52
Şekil 27.	SnO <sub>2</sub> : Sb ince filminin AFM görüntüsü. . . . .	53
Şekil 28.	PFO'nun immobilizasyonu sonrası SnO <sub>2</sub> : Sb ince filminin AFM görüntüsü.....	53
Şekil 29.	PFO immobilizasyonu öncesi ve sonrası SnO <sub>2</sub> : Sb ince filmin XRD analizi.....	54

<b>Şekil 30.</b>	PFO immobilizasyonu öncesi ve sonrası SnO <sub>2</sub> : Sb ince filminin FTIR.....	55
<b>Şekil 31.</b>	PFO'nun SnO <sub>2</sub> : Sb ince filmine immobilizasyonun şematik gösterimi.....	56
<b>Şekil 32.</b>	Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	57
<b>Şekil 33.</b>	Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi. ....	58
<b>Şekil 34a.</b>	Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği... ..	59
<b>Şekil 34b.</b>	İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği (U/dak.cm <sup>2</sup> ).....	59
<b>Şekil 34c.</b>	İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği (U/mg protein).....	59
<b>Şekil 35.</b>	pH Kararlılığı. ....	60
<b>Şekil 36.</b>	Isıl kararlılığı.....	61
<b>Şekil 37.</b>	İmmobilize enzimin depolama kararlılığı.....	62
<b>Şekil 38.</b>	İmmobilize enzimin tekrarlanabilirliği.....	62

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	PFO'nun substratları.....	13
<b>Tablo 2.</b>	Kalay oksitin temel özellikleri.....	27
<b>Tablo 3.</b>	Kullanılan cihazlar.....	33
<b>Tablo 4.</b>	Kullanılan kimyasal maddeler.....	34
<b>Tablo 5.</b>	Ağşeftali'sinden ( <i>Prunus persica</i> L.) saflaştırılan polifenol oksidaza ait saflaştırma tablosu.....	49
<b>Tablo 6.</b>	Serbest ve immobilize enzimin substrat özgünlüğü..	57



## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
DMF	Dimetilformamid
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
EC	Enzim Kod Numarası
EU	Enzim Ünitesi
kDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten Sabiti
mA	Miliamper
MBTH	3-metil-2-benzotiyozolinon
mM	Milimolar
PAGE	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PFO	Polifenol Oksidaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
FWHM	Maksimum Yükseklikteki Yarı Pık Genişliği
Tris	Tris (hidroksimetil) Aminometan
Vmaks	Maksimum Hız
µg	Mikrogram
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
XRD	X-Işını Difraksiyon
His	Histidin
Met	Meta
DHPPA	3,5-Dihidroksifenilpropionoik Asit
nm	Nanometre
PEG	Polietilen Glikol
RMS	Ortalama Yüzey Pürüzlülük Değeri
Ra	Aritmetik Ortalama Sapma
KO	Kalay Oksit

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Günümüzde enzimler gıda, tıp, eczacılık ve endüstri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler doğanın katalizörleridir ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olduğu düşünülemez (Sağlam Ertunga, 2006). Enzimlerin, diğer biyokimyasal katalizlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını  $10^{20}$ 'ye kadar arttırırken, diğer katalizörler  $10^2$ - $10^4$  kadar arttırabilmektedir (Ziyan, 1998). Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon açısından spesifik olmaları, reaksiyon sonucunda yan ürün oluşturmamaları, %100 verimle çalışmaları enzimleri diğer katalizörlerden ayıran en önemli özellikleridir.

Endüstri ve biyoteknoloji gibi birçok alanda enzimlerin kullanılmaya başlanması, bilim insanlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme yollarını araştırmaya sevk etmiştir. Serbest enzimlerin kullanılmasından doğacak olan sorunları olumlu yönde çözmek ve enzimleri endüstri de daha kullanışlı ve cezbedici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır (Telefoncu, 1997).

Serbest enzimler immobilize enzimler gibi ortamdan istenildiği anda uzaklaştırılmadığından reaksiyon kontrolü güçleşmektedir. Reaksiyonu durdurmak için inhibitör katılabilir, ancak ortama inhibitör eklenmesiyle birlikte yeni kirlilik söz konusu olacaktır. Ortama katılan kirlilikleri uzaklaştırmak zahmetli ve pahalı bir işlemdir. Serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden reaksiyon ortamından geri kazanılması ve enzimin tekrar tekrar kullanılması olanaksızdır. Bu durum enzimlerin pahalı olmasından dolayı maliyeti artıran önemli bir etkidir (Ersöz ve Bilgin, 2012).

Enzimler endüstriden tıba kadar çok geniş bir alanda kimyasal prosesler için kullanılan önemli potansiyele sahip katalizörlerdir. Spesifiteleri, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etkinlikleri, biyobozunur olmaları nedeniyle önemli avantajlar

sağlarlar. İmmobilize enzimler reaksiyon ortamından istenildiği anda kolaylıkla ayrılabilmeleri, tekrar tekrar kullanılabilmeleri sayesinde üretim maliyetlerini azaltırlar (Munjal ve Sawhney, 2002). Enzimlerin özelliklerini bu istenen şartları gerçekleştirecek şekilde değiştirmek için uygun destek materyalleri kullanılarak immobilizasyon yöntemleri geliştirilmekte ve kullanılmaktadır.

Ayrıca son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılacak organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlardan çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelmektedir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konmasıyla çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanımları mümkün olmaktadır. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır (Ikeda vd., 1996).

## **1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi**

Enzimler yüksek özgünlük, yüksek katalitik verim ve biyo-bozunabilirlik özelliklerine sahip olan biyokatalizörlerdir. Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyon hızını arttırlar ve bu nedenle, endüstriyel uygulamalarda ve tıbbi bilimlerde kullanılabilirler (John Kennedy vd., 2007). Enzimlerin bazı süreçlerle immobilize edilmesinin, ticari olarak birçok avantajı vardır (Ahmad ve Sardar, 2015). İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre yüksek stabiliteye sahip olmaları, reaksiyon karışımından kolayca ayrılabilmeleri ve tekrar tekrar kullanılabilir olmaları enzim tüketimini önemli ölçüde azaltmaktadır (Tischer ve Kasche, 1999; Sirin vd., 2016).

Enzim immobilizasyon materyalleri endüstriyel prosesler için önemlidir ve endüstri alternatif immobilizasyon materyallerine ihtiyaç duyar.  $TiO_2$  (Li vd., 2001; Sarauli vd., 2012),  $SnO_2$  (Ansari vd., 2008; Kemp vd., 2009; Frasca vd., 2013),  $ZnO$  (Gupta, 2010; Topoglidis vd., 2001a) ve indiyum katkılı kalay oksit (ITO) (Cherry vd., 1998; Kasmi vd., 2002; Fang vd., 2003; Frasca vd., 2010; Frasca vd., 2011; Frasca vd.,

2013) dahil olmak üzere iletken metal oksitler, enzim immobilizasyonu için artan ilgiye sahip destek materyalleridir (Topoglidis vd., 2001b; Marritt vd., 2008; Astuti vd., 2009). Metalik veya karbonlu elektrot materyallerinin aksine, metal oksit yüzeyindeki yüksek oksijen işlevleri, protein dostu bir ortam sağlar (Frasca vd., 2013). Kullanılabilir iletken metal oksitler arasında indiyum katkılı kalay oksit (ITO) enzim immobilizasyonları için en yaygın kullanılanıdır (Granqvist ve Hultaker, 2002), ancak indiyum pahalıdır ve doğada sınırlı kullanılabilirliğe sahiptir (Frasca vd., 2013). Bu nedenle, yeni ITO'larda In / Sn molar oranını azaltma girişiminin yanı sıra (Aksu ve Driess, 2009), SnO<sub>2</sub> bazlı iletken oksitler umut verici alternatifler olarak sunulmuştur (Batzill ve Diebold, 2005; Wang vd., 2009). SnO<sub>2</sub>, geniş bant aralık enerjisine sahip (n = 300 K'da 3.6 eV) bir n-tipi yarıiletken olduğundan, güneş hücreleri, elektrokimya sensörleri ve biyosensör gibi çeşitli uygulamalar için kullanılabilirler (Kafi vd., 2017). Özellikle, antimon katkılı kalay oksit (ATO), yüksek yüzey alanı, toksit olmaması, iyi biyo-uyumluluk, katalitik aktivite ve kimyasal stabilite nedeniyle çok umut verici bir destek materyaldir (Kafi vd., 2017). Kalay oksit ince filmlerin hazırlanmasında, spreylendirme (Battal vd., 2015), spin kaplama (Zhang vd., 2006), kimyasal buhar birikmesi (Outemzabet vd., 2007) vb. gibi bazı teknikler araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Bunlar arasında, spreylendirme katkılı veya katkısız kalay oksit ince film elde etmek için basit ve ucuz bir yöntemdir (Kim vd., 2008).

PFO'ların immobilizasyonu için bazı destek materyalleri olarak, ZnO Nanorods (Gu vd., 2009), grafit elektrotlar (Yaropolov vd., 1995), iletken polimer olarak indirgenmiş grafit oksit ve metal oksitler (Sethuraman vd., 2016) kullanılmıştır. Bununla birlikte, antimon katkılı kalay oksit (SnO<sub>2</sub>: Sb) sadece biyomoleküller ile kombinasyon halinde kullanılmıştır (Stambouli vd., 2006a; Stambouli vd., 2006b) ve proteinler için sadece birkaç rapor vardır (Reipa vd., 1997; Kwan vd., 2011; Frasca vd., 2013). Ağışeftali PFO'larının SnO<sub>2</sub>: Sb ince film üzerine immobilizasyonuna literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmanın temel amacı, Ağışeftali'sinden (İğdır İli ekolojik koşullarında yetişen) polifenol oksidazı saflaştırmak, immobilizasyon için yeni bir matris hazırlamak ve endüstriyel işlemler için immobilizasyondan önce ve sonra PFO'nun aktivitesi için optimum koşullarını karşılaştırmaktır.



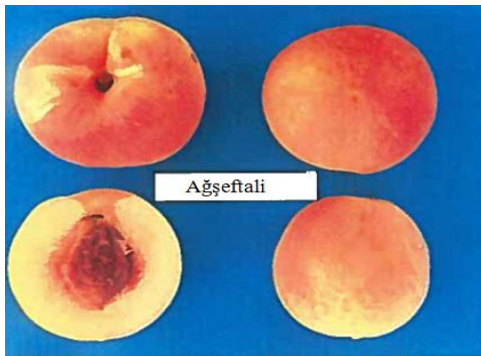
### 1.3. Çalışmada Kullanılan Polifenol Okidaz Kaynağı Hakkında Genel Bilgi

Şeftali *Rosales* takımının *Rosaceae* familyasının, *Prunoidea* alt familyasına bağlı olan *Prunus* cinsine girmekte (Altay, 2016) ve latince adı *Prunus persica* L. olan şeftalinin anavatanının Doğu Asya ve Çin olduğunu ortaya konmuştur (Westwood, 1978).

Şeftali türleri, Tüylü şeftaliler = (*P.persica vulgaris*), Tüysüz Şeftaliler =(Nektarinler (*P. Persica* var. *nectarina*), Domates Şeftalisi=(*P.Persica* var. *Platycarpa*) olmak üzere üç kültür formu vardır. Bu kültür formlarının ayrılmasında birinci ve ikinci grupta, meyve kabuğunun tüylü ve tüysüz oluşu, üçüncüde ise meyvenin şekil itibariyle basık oluşu, baz alınmıştır (Ülkümen, 1973).

Yapısında protein, yağ ve karbohidrat bulunduran şeftali, kalsiyum, fosfor ve demir yönünde de önemli bir besin kaynağıdır. Ayrıca; A, B1, B2 ve C vitaminlerini bulundurmaktadır (Ağaoğlu vd., 1997).

Dünya’da sert çekirdekli meyve türleri içerisinde, üretimi en fazla olan tür şeftalidir. Meyvesi herkes tarafından sevilerek yenilen bir türdür. İnsan sağlığı açısından önemli faydaları olan şeftali meyvesi taze sofralık olarak tüketildiği gibi çok değişik alternatif tüketim şekilleri bulunmaktadır (Özçağırın vd., 2005).



**Şekil 1.** Ağşeftali’sinin (*Prunus persica* L.) görüntüsü (Altay, 2016).

İğdır, çevresindeki diğer illere göre mikro klima iklim özelliğine sahip olduğu için birçok ılıman iklim meyve türünün yetiştirilmesine olanak sağlamaktadır. Ovada şeftali,

kayısı, kiraz, elma, üzüm, ceviz, vişne ve armut gibi birçok meyve yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunlardan özellikle kayısı başta olmak üzere, şeftali ve elma yetiştiriciliği yöre çiftçisi için önemli gelir kaynağıdır (Altay, 2016).

Iğdır ilinde şeftali bahçeleri mevcut olup, standart çeşitlerin üretimi yanında Ağşeftali ismiyle anılan yerel şeftali çeşiti ile de üretim gerçekleştirilmektedir. Ağşeftali yıllardan beri tohumdan üretilerek zengin bir şeftali genotik kaynağının oluşmasına vesile olmuştur. Ayrıca standart türlerin üretimi Temmuz ayı ortalarında son bulurken Ağşeftali hasat dönemi Eylül ayı başından başlar ve Ekim ayına kadar devam eder.

#### **1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyası**

##### **1.4.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması**

Polifenol oksidaz, reaksiyonda kullanılan substrata göre isimlendirilir. Bu isimlerden bazıları krezolaz, katekol oksidaz, katekolaz, tirozinaz, polifenol oksidaz, difenol oksidaz, dopa oksidaz ve *o*-oksidoredüktazdır. 1981 yılından itibaren bunların tümü "Fenolazlar" veya "Polifenol oksidazlar" adı altında toplanmıştır (Çimen, 2007). Polifenol oksidaz (PFO) ya da tirozinaz (E.C.1.14.18.1) meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikleri, moleküler oksijenin de bulunması halinde, yükseltgeyerek bitkilerde enzimatik esmerleşmeye sebep olan, aktif merkezinde bakır ( $Cu^{+2}$ ) bulunduran, oksidoredüktaz sınıfı bir metaloenzimdir. Polifenol oksidazlar doğada çok yaygın olarak bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da bulunmaktadır (Özen vd., 2004; Colak vd., 2007; Kumar vd., 2008). PFO'lar oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilirler. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi veya tirozinaz aktivitesi), diğeri ise *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi). Krezolaz ve katekolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler oluşturur (Whitaker, 1972; Kuyumcu, 2014).

Son yıllarda enzim isimlerindeki karışıklığını giderebilmek amacı ile uluslararası terminolojide bitki polifenol oksidazlarının adlandırılmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Tirozinaz (monofenol monooksijenaz) (E.C.1.14.18.1) enzim kodu ile

katekol oksidaz (difenoloksidaz, difenol oksijen oksidoredüktaz) (E.C.1.10.3.2) enzim kodu ile lakkaz ise (E.C.1.10.3.1) enzim kodu ile belirtilmiştir. Ancak bu yeni sınıflandırma aynı enzimin önceleri krezolaz ve katekolaz aktiviteleri olarak bilinen iki reaksiyon arasında ayrımı getirdiği için pek tercih edilmemektedir (Kuyumcu, 2014).

#### **1.4.2. Polifenol Oksidazın Doğadaki Dağılımı**

Polifenol oksidaz ilk kez 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Bazı turuncgiller hariç, pek çok meyve ve sebzede PFO belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Laurila, 1998).

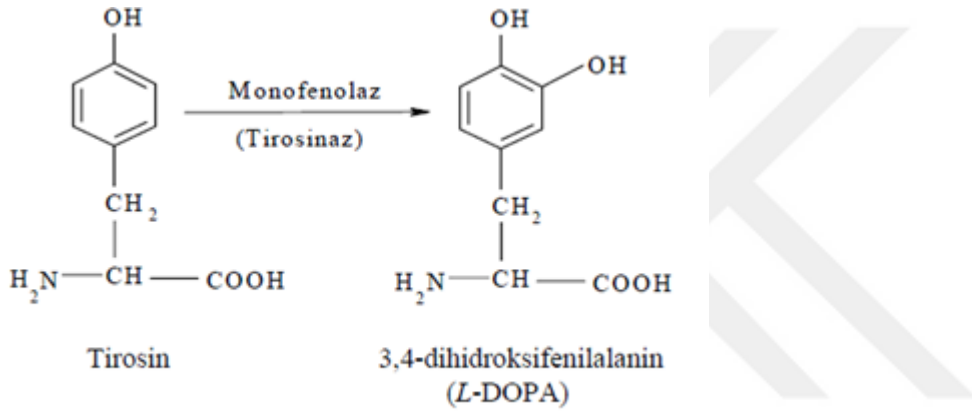
Tirosinaz doğada çok yaygın olmasıyla beraber yapılan araştırmalar özellikle mantar, yumru patates, şeftali, elma, muz, avokado, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine göre daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir. Ayrıca kayısı, yabani gül, enginar, yabani pirinç, ıspanak, yonca, bugday, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları, üzüm, armut, zeytin gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (Vamos Vigyazo, 1981; Owusu Ansah, 1989; Oktay vd., 1995; Arslan vd., 1998; Zawitowski vd., 1998; Özçelik, 2005).

Polifenol oksidazların doğada çok geniş yelpazede bulunuyor olmaları canlı hücrelerde hayati işlemler için ne denli önemli olduklarını göstermektedir. PFO ayrıca mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı toprak türlerinde PFO varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar vd., 1989; Mos'ko vd., 1992; Gul'ko ve Khaziyev, 1993). Farklı bitkilerin PFO içeriği türe ve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta, aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir (Dedeoğlu, 2009).

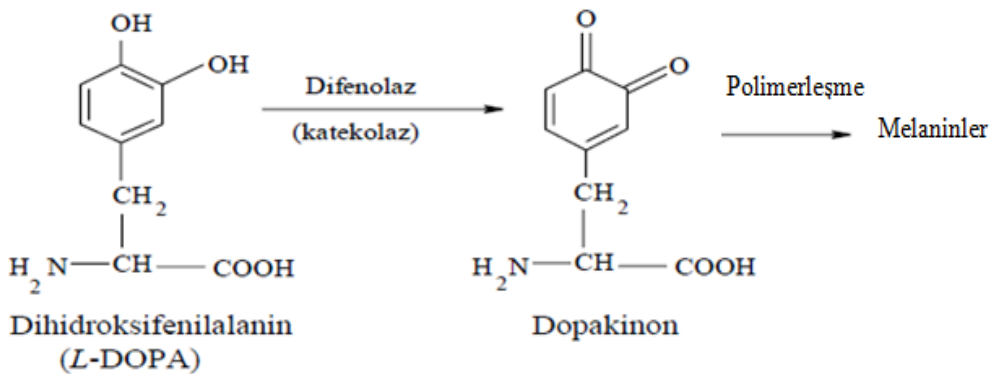
#### **1.4.3. Polifenol Oksidazın, Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması**

Uluslararası Biyokimya Derneği'ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün PFO'ların, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını

katalizledikleri için, birinci sınıf enzim oldukları belirlenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre yapısında bakır içeren PFO enzimi moleküler oksijen varlığında birbirinden tamamen farklı iki aktivite göstermektedir. Bunlardan biri, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1) ve enzimin bu aktivitesi, tirozinaz, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak bilinir. Diğeri ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinir (Şekil 2 ve Şekil 3) (Rodriguez Lopez vd., 1994; Espin vd., 1997; Fenoll vd., 2000; Espin vd., 2001; Brooks vd., 2004).



**Şekil 2.** Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi) (Kuyumcu, 2014).

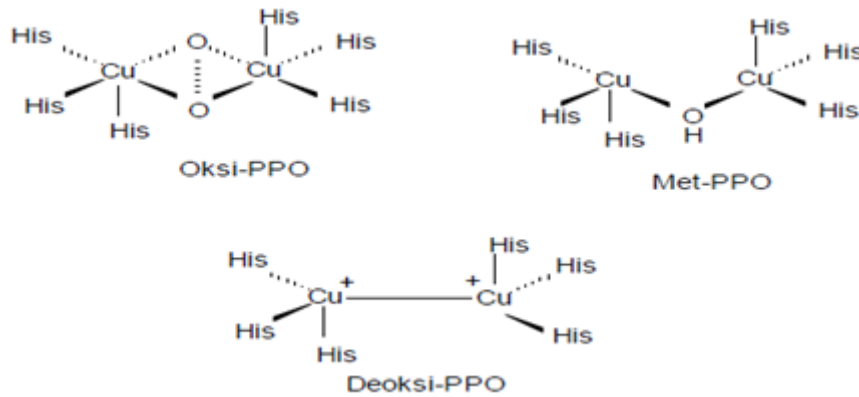


**Şekil 3.** *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi) (Kuyumcu, 2014).

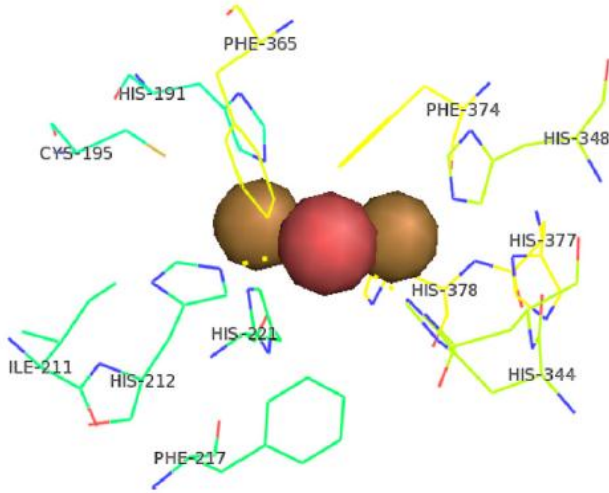


**Şekil 4.** *Malus domestica* L. PFO'sunun üç boyutlu görüntüsü (Liu vd., 2015).

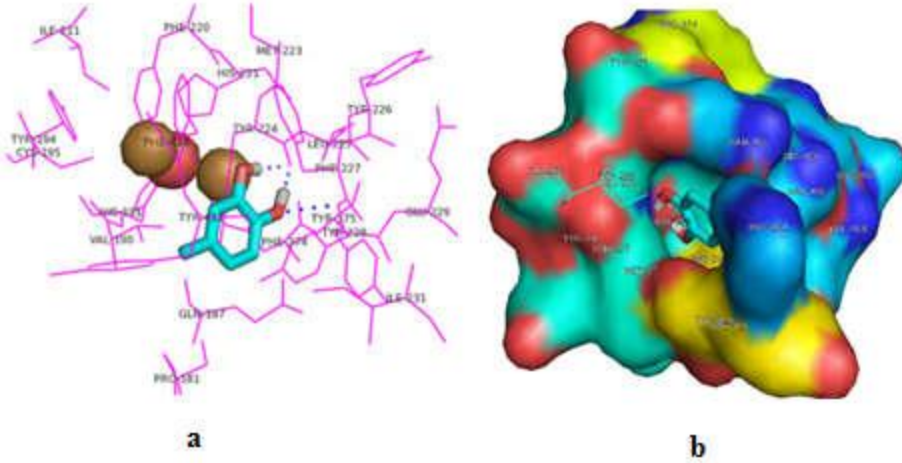
PFO aktif merkezi ile ilgili yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aktif bölgenin iki binükleer bakır merkezine sahip olduğunu ve tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir. Bakır atomunu merkezde bulunuşları "met" ( $E_m$ ,  $Cu^{2+} Cu^{2+}$ ), "deoksi" ( $E_d$ ,  $Cu^+-Cu^+$ ), "oksi" ( $E_o$ ,  $Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}$ ) şeklindedir. Oksijenlenmiş form (oksi-PFO), her biri iki kuvvetli ekvatoryal ve bir zayıf aksiyal N-His ligandlarıyla koordine olmuş iki tetragonal Cu(II) atomundan oluşmuştur. Eksojen oksijen molekülü peroksit olarak bağlanır ve iki bakır atomu arasında köprü oluşturur. Met-PFO formu oksit-form gibi endojen köprüyle antiferromagnetik şekilde çiftleşmiş iki tetragonal Cu(II) atomu içerir. deoksi-PFO, bir [Cu(I)-Cu(I)] yapısına sahiptir. PFO'nun aktif bölgesindeki bu bakır durumları, monofenollerin orto-hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonunda gereken reaksiyon mekanizmaları için yapısal bir modeli önerir (Sanchez Ferrer vd., 1995; Fenoll vd., 2004).



**Şekil 5.** PFO'nun bakır merkezleri (Kuyumcu, 2014).



**Şekil 6.** *Malus domestica* L.'nin PFO'sunun bakır bağlanma bölgeleri (bakır atomları kahverengi ile gösterilmiştir) (Liu vd., 2015).



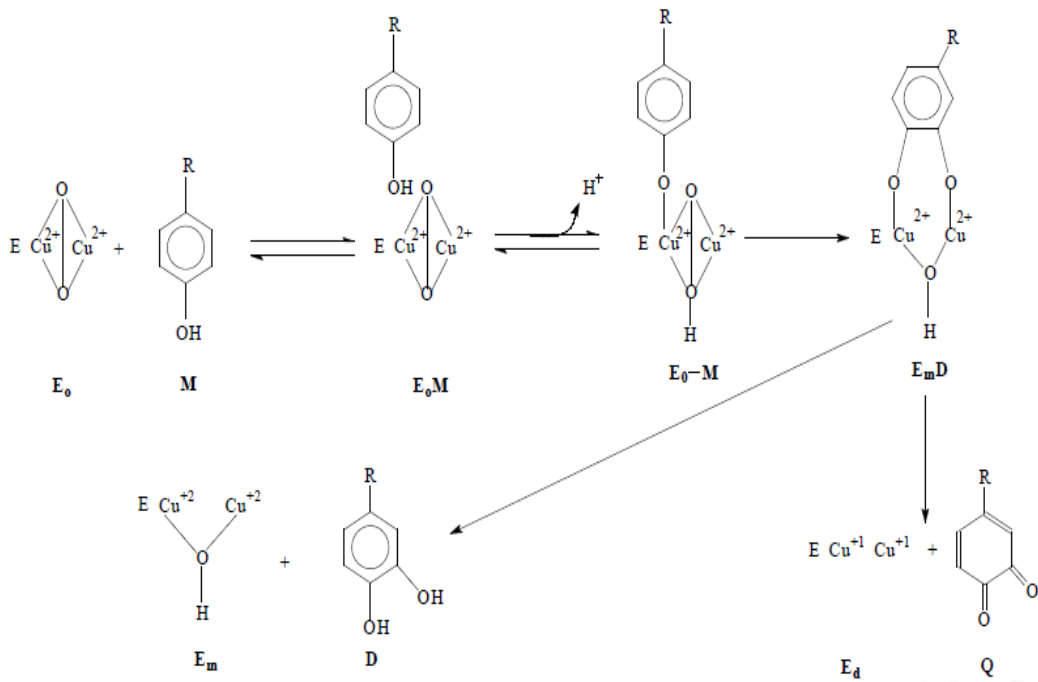
**Şekil 7.** *Malus domestica* L. PFO'sunun aktif bölgesi ve substrat molekülünün yerleşmesi (Liu vd., 2015). (a) *Malus domestica* L PFO 4-metil katekol bağlanma yeri, (b) *Malus domestica* L. PFO' sunun üç boyutlu 4-metil katekol bağlanma bölgesi (Liu vd., 2015).

Yukarıdaki Şekil 7'de *Malus domestica* L.'nin substrat molekülünün yerleştiği aktif bölgenin görüntüsü verilmiştir. Birinci durumda *Malus domestica* L. PFO'sunun 4-metil katekolun bağlanma yeri, ikinci durumda ise üç boyutlu bağlanma yeri gösterilmiştir (Pakyıldız, 2016).

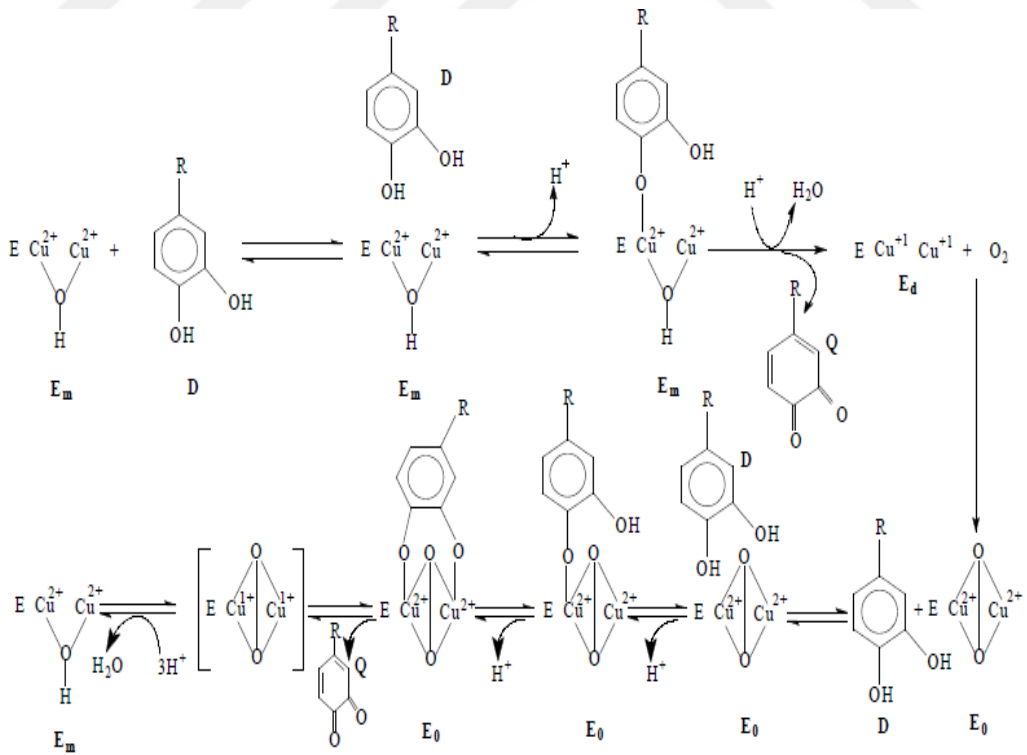
Enzimin deoksi formu önce oksijen ile oksî-PFO formunu oluşturur ve fenolik substrat bu oksî-PFO formundaki bakır atomlarının birine aksiyal olarak koordine olur. Oluşan beş koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesinden sonra, fenolik substratın *o*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir. Moleküllü elektron transferi sonucu, *o*-benzokinin ürünü oluşur ve bu sırada enzimin deoksi-PFO hali böylece yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelmiş olur (Siegbahn, 2003).

İlk olarak, monofenolik substrat, E<sub>o</sub>'ın aksiyal pozisyonundaki iki bakır atomundan birine koordine olur (Wilcox vd., 1985). Üçgen bipiramid ara bileşiğindeki yeniden düzenleme; peroksit vasıtasıyla monofenolun hidroksilasyonuna, su çıkışına ve E<sub>m</sub>D kompleksinin oluşumuna yol açar (Solomon ve Lowery, 1993; Solomon vd., 1996). Oluşan E<sub>m</sub>D kompleksi ya  $E_mD + 2H^+ \rightarrow E_m + D$  dengesini yerine getirerek katekolaz döngüsündeki ilk adım olan serbest difenolu verebilir ya da aktif bölgeye bağlı difenolat ara bileşiği oksidasyona uğrayarak bir kinon ve bir indirgenmiş binükler bakır enzim bölgesi (E<sub>d</sub>) verir. E<sub>d</sub>'ye moleküler oksijen bağlandıktan sonra, oksî PFO (E<sub>o</sub>) tekrar rejenere edilir.

PFO tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve *o*-dihidroksi fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 8 ve 9'da verilmektedir (Espin vd., 1998).



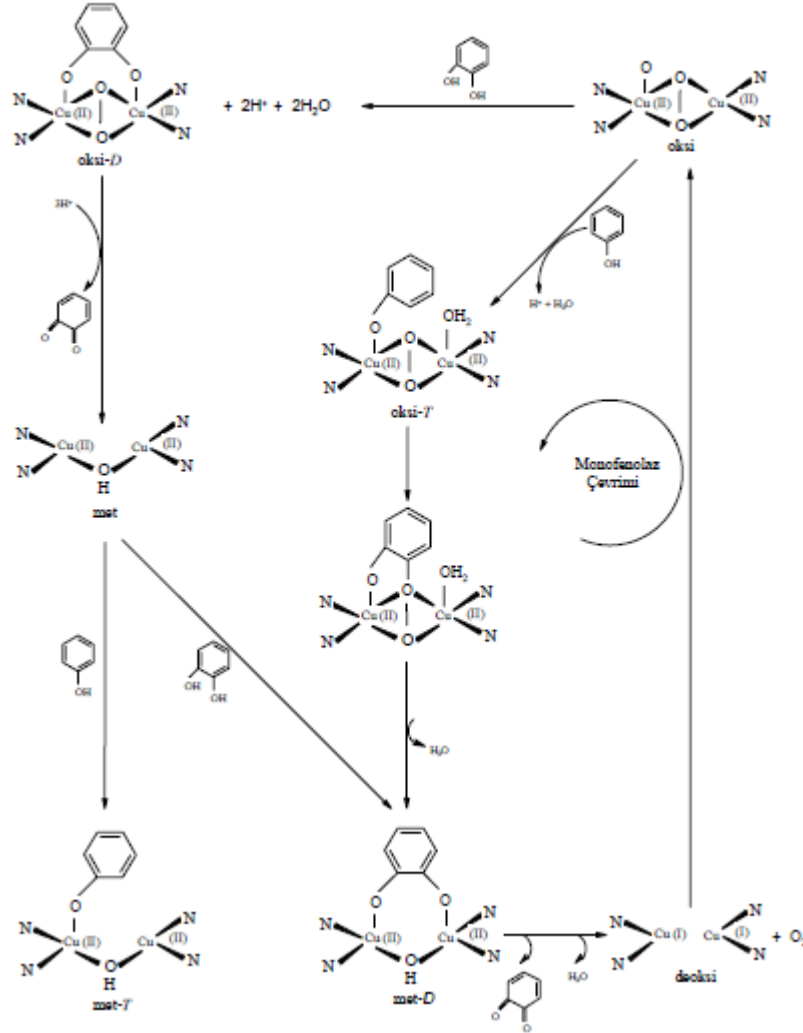
Şekil 8. PFO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması (Espin vd., 1998).



Şekil 9. PFO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması (Espin vd., 1998).



Monofenolaz ve difenolaz katalitik çevrimlerinin birleştirilmesiyle tam bir mekanizma basit olarak Şekil 10'daki gibi gösterilebilir.



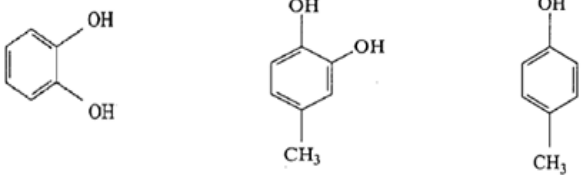

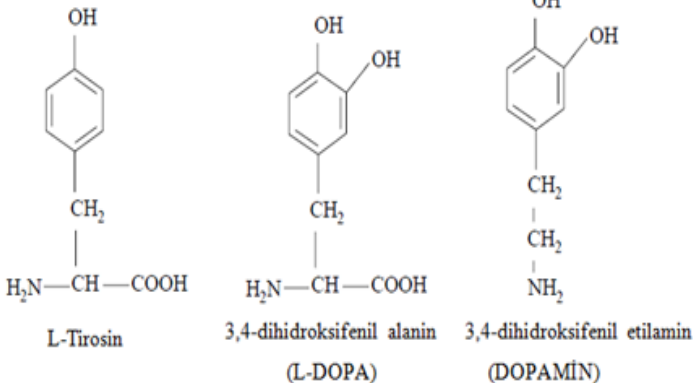
Şekil 10. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz ve difenolaz mekanizmaları (Özel, 2008).

Böyle bir mekanizmayla substratlar önce *o*-difenollere ve *o*-difenollerde, *o*-kinon bileşiklerine dönüşür. Oluşan *o*-kinon bileşikleri enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı ve kolayca polimerleşerek koyu kahve renkli suda az çözünen polimerik yapılar oluşur ki böylece, esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşmuş olur.

#### 1.4.4. Polifenol Oksidazın Substratları

Meyve ve sebzeler oldukça çeşitli fenolik bileşik ihtiva ederler. Ancak bunların çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olarak uygundur. PFO'nun en yaygın substratları basit yapıları fenoller, klorojenik asit ve türevleri ile flavonoid tipi fenollerdir.

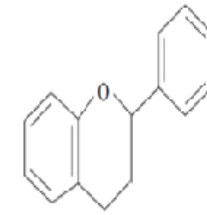
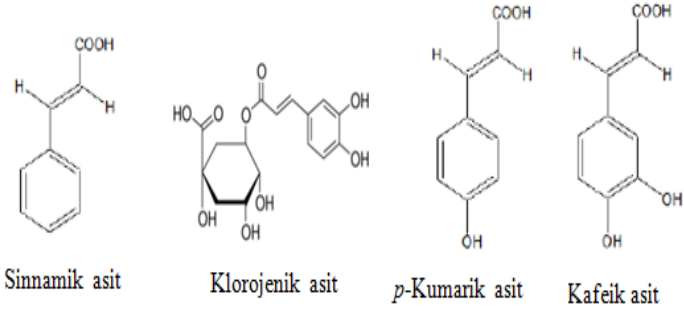
**Tablo 1.** PFO'nun substratları.

PFO'nun substratları	
PFO'nun yaygın olarak kullanılan basit fenolik substratları.	 Katekol      4-metil katekol <i>p</i> -kresol
	 4-nitrokatekol      DHPPA
PFO'nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları. Birçok besin maddesinde bulunabilen tirozin, enzimatik oksidasyon sonucu 3,4 dihidroksifenil alanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan substratlardandır.	 L-Tirosin      3,4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA)      3,4-dihidroksifenil etilamin (DOPAMİN)

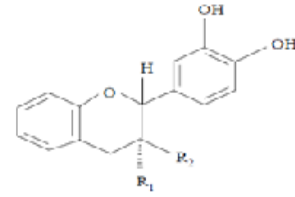
**Tablo 1 (devamı). PFO'nun substratları**

PFO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden biri olan klorojenik asittir. Klorojenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının p-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PFO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir (Sato, 1969).

Flavonoidler; bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunurlar. (Kuyumcu, 2014). Katekinler, flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir ve doğada (+)-katekin ve onun stereoisomeri olan (-)-epikatekin olarak bulunurlar (Ganguly ve Seshado, 1958).



Flavonoid yapı



(+)-Kateşin : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH

(-)-Epikateşin : R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H

Substrat özgünlüğü meyve ve sebzenin cinsine, enzim özütüne, meyve ve sebzenin hazırlandığı kısımlara bağlıdır. Enzim aktivitesi bakılırken kullanılan pH değeri de substratın kullanılabilirliğini etkiler (Lavollay vd., 1963; Vamos Vigyazo ve Gejzago, 1978).

#### 1.4.5. Polifenol Oksidazın Aktivitesinin Belirlenmesi

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli manometrik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler yardımıyla, substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilmektedir.

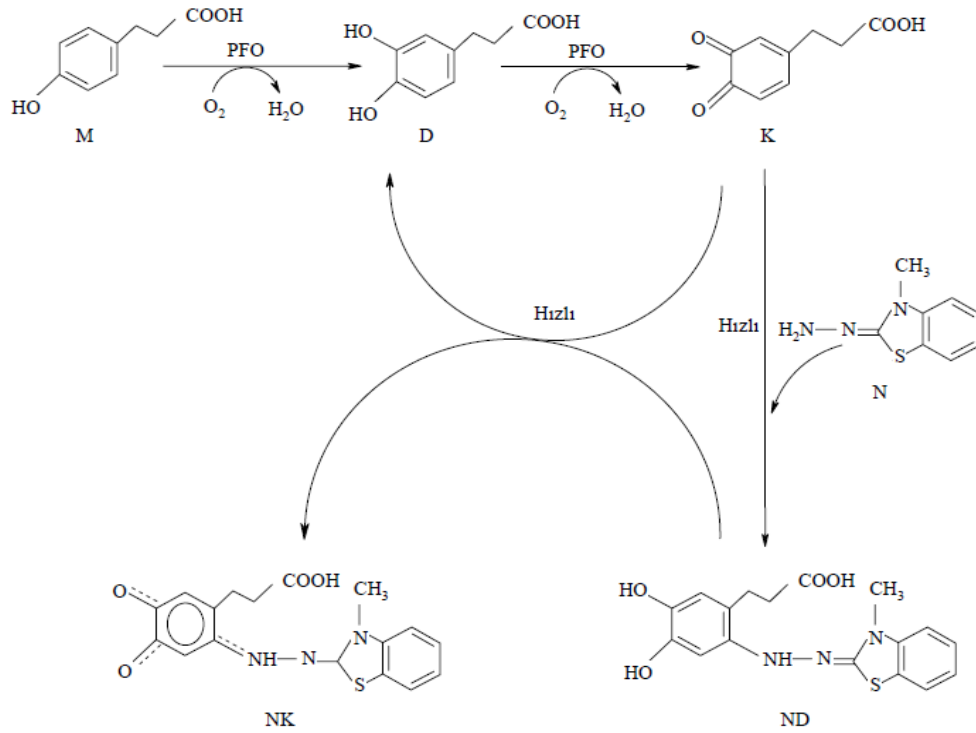
Fenolik substratların oksidasyonu sırasında kullanılan  $O_2$ , bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülebilir. Fakat bu iki metot aynı sonucu vermez. Aynı şartlar altında elde edilen  $O_2$  adsorpsiyon değerleri polarografik metotta daha yüksek çıkmaktadır (Mayer vd., 1966).

Aktivite ölçümleri esnasında, PFO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden birinde, reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen, hidrokinon veya askorbik asit gibi negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir ve sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bir diğer yöntemde, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorbans verdiği 265 nm'de konsantrasyonundaki azalma ölçülür (Walker, 1970). Askorbik asidin tükenme hızı enzim aktivitesi ile direkt olarak orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon substrat transformasyonudur. Askorbik asit oksidaz elde edilen sonuçlara tesir eder. Bu metodun diğer bir uygulamasına göre, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki askorbik asidin tamamının tükenmesi için gereken zaman yerine, renkli kinon ürünlerinin oluşumu ölçülür. Bu kronometrik metot olarak isimlendirilir (Dedeoğlu, 2009).

Askorbik asit yerine, 420 nm'de absorbans veren potasyum hegzasiyanoferrat trihidrat ( $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ ) kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm'de absorbans veren bitki materyalleri sonuca etki etmez. Bu metodun diğer avantajları ise, hegzasiyanoferratın özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre, daha az hassas olması ve çözeltide daha kararlı olmasıdır (Vamos Vigyazo, 1981).

Spekrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızını ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972).

PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil varlığında, oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşturulan *o*-kinon, nükleofil ile renkli katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm ve civarındaki karakteristik absorpsiyonları ile belirlenir (Şekil 11). Bu reaksiyonun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuştur (Rodriguez Lopez vd., 1994).



**Şekil 11.** PFO'nun (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: Monofenol, D: Difenol, K: *o*-kinon, N: Kromojenik nükleofil, ND: Nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: Nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü) (Özel, 2008).

3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon yerine, her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz kondenzasyon ürünü oluşturan, sarı renkli bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit de kullanılabilir. Enzim aktivitesi, 2-nitro-5-tiyobenzoik

asidin 412 nm'de absorbansındaki azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edilebilir (Esterbauer vd., 1977).

Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmakla birlikte bu yöntemler oldukça pahalı cihazları ve uzmanlığı gerektirir.

#### **1.4.6. Polifenol Oksidazın Kullanım Alanları**

PFO sebze ve meyvelerde enzimatik kararmaya neden olarak gıdaların pazar değerini düşürdüğünden öncelikle gıda sektörünün ilgisini çekmiş ve buna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu alandaki çalışmalar enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek şeklindedir. PFO'nun tabiattaki en önemli görevi bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır. PFO-polifenol sisteminin bitki patolojisindeki rolü hakkında çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Tatlı patates dokularının *Ceratocystis fimbriata* mantarından elde edilen patojenik veya patojenik olmayan bir izolatla aşılınması, dokularda PFO aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Tatlı patates köklerinin düşük konsantrasyonlardaki etilene maruz bırakılması da aynı şekilde *Ceratocystis fimbriata* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığı gibi PFO aktivitesini de arttırmaktadır (Weber ve Stahmann, 1964).

Bitkilerin enfeksiyona karşı olan dirençlerinde PFO'nun görevi basitçe şudur; enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek su da çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi üstlenirler. Bu olay bazı araştırmacılar tarafından PFO'nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir.

PFO'nun *o*-dihidroksifenollerini oksidasyonu ile oluşan kinonlar, triptofan ile reaksiyona girerek, indolpirüvik asit üzerinden, indol asetik asidi oluştururlar. Bundan dolayı PFO, bitki büyüme regülasyonunda rol alabilir (Mazzocco ve Pifferi, 1976).

Polifenol oksidaz, melanin oluşumunda rol oynadığından dolayı tıbbi alanda ilgi çekmiştir. Melanin özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretimi yapılmaktadır. Bazı kanser çeşitlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı belirlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden yararlanılabileceği kanısı dikkat çekmiştir (Çiçek, 2000).

PFO, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA üretiminde kullanılmaktadır. L-DOPA üretimi skalada knowles metoduyla kimyasal olarak sentezlenmektedir. Ancak bu yöntemle L-DOPA üretim maliyeti yüksek olmaktadır. L-DOPA'nın yüksek ticari değerine sahip olmasından dolayı araştırmacılar bu ilacın alternatif üretim yollarını araştırmaktadırlar. Bu yollardan biride immobilize polifenol oksidaz (PFO, tirozinaz) ile L-tirozin'den L-DOPA'nın üretimidir. Polifenol oksidaz pahalı bir enzim olduğundan enzimi tekrar tekrar kullanmak amacıyla immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Ates vd., 2007).

İmmobilize polifenol oksidaz (tirozinaz) biyosensör olarak fenol ve türevlerinin tayini için, endüstriyel atık suların fenol ve aromatik amin gibi zehirli kimyasallarca zehirsizleştirilmesinde (defenolizasyon), kirlenmiş toprakların biyoyileştirilmesinde kullanılması enzimin endüstriyel olarak önemli bir biyomolekül olduğunu göstermektedir (Kocatürk, 2008).

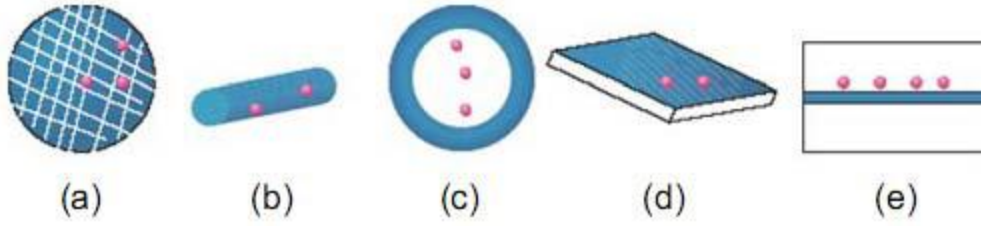
PFO'nun biyosentetik bir reaksiyonda, enantiyomer seçici bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, PFO, sadece (+)-larreatrisini (+)-3-hidroksilarreatrisine hidroksillerken, enantiyomeri olan (-)-3-hidroksilarreatrisine hidroksilleyememiştir. Bu da PFO'nun yüksek substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermektedir (Cho vd., 2003).

İmmobilize polifenol oksidaz enzimi kullanılarak teaflavin ve teaflavin-3,3-digallat (TF3) sentezi gerçekleştirilmiştir. Teaflavin ve TF3'ün anti-oksidan, obeziteyi önlemede yardımcı olma, anti-inflamatuar etkiye sahip olma, kanser karşı koruma, karaciğer yağlanmasının önlenmesi, kolesterol düzenleme ve kardiyovasküler hastalıklarına iyi gelme gibi özelliklere sahiptir (Sharma vd., 2009; Lei vd., 2017).

## 1.5. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon kelime olarak ‘çözünmez hale getirilmiş, tutuklanmış, bağlanmış, hareketi sınırlandırılmış’ anlamına gelmektedir (Bickerstaff, 1997). İmmobilize enzimler için kullanılan “suda çözünmeyen enzim”, “matrikse bağlı enzim”, “tutuklanmış enzim” gibi terimler karmaşıklığa neden olmuştur. 1971 yılında gerçekleştirilen 3. Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1. Enzim Mühendisliği Konferansı’nda bu terimler yerine “immobilize enzim” terimi önerilmiş, böylece modifiye enzimlerin adlandırılması netlik kazanmıştır (Telefoncu, 1997).

Enzimler farklı matriks üzerine immobilize edilebilir. Bunlardan bazıları Şekil 12’de gösterilen boncuklar, lifler (elyaf), filmler, membranlar ve kapalı kapsüllerdir. (Twyman, 2005).



**Şekil 12.** Farklı matriksler a.boncuk, b.lif, c.kapsül, d.film ve e.membran (pembe küreler enzim ifade etmektedir) (Twyman, 2005).

Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı kimyasal birleşimlerine göre inorganik veya organik materyaller kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı inorganik maddeler; cam, kil, bentonit, silika jel, hidroksiapatit, titan dioksit, nikel oksit, pomza taşı, zirkonyum dioksit, aktif karbon, metallerdir, metal oksitler vb. malzemelerdir. Organik taşıyıcılar doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılır (Cabral ve Kennedy, 1991). Doğal polimerler; nişasta, selüloz, agar ve agaroz, karraagenan, dextran, kollajen, jelatin, albümin, kitin, kitosan, ipek, alginat vb. malzemelerdir. Sentetik polimerler; poliakrilamid, polistiren, vinil ve allil polimerler, naylon, metakrilat, oksiranlar, iyon değiştirici reçineler ve maleik anhidrid polimeri vb. malzemeler olarak gösterilebilirler (Telefoncu, 1997).



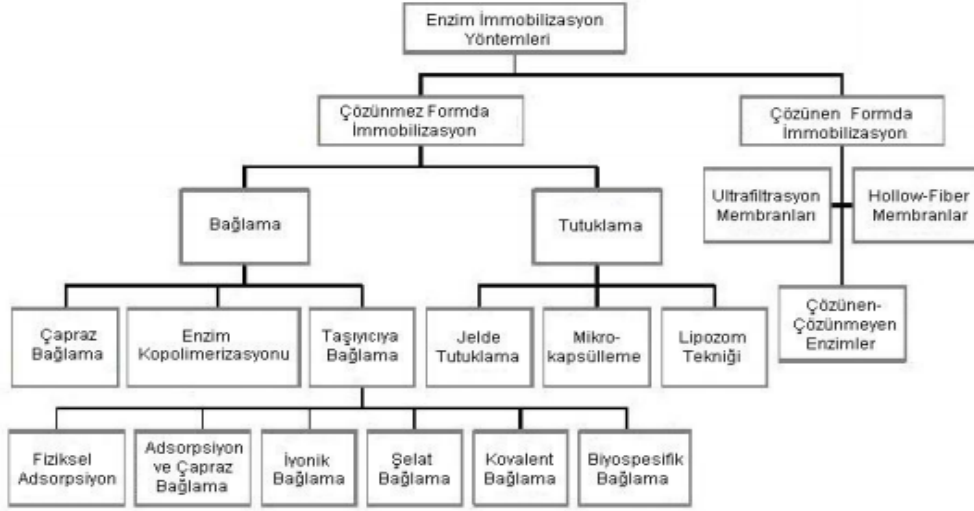
İmmobilize enzimin serbest enzime göre avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

- Serbest enzimler reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması zordur. İmmobilize enzimlerin ise süzme santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler.
- Serbest enzimler ürünlerde azda olsa kirlilik yaparlar. İmmobilize enzimler ortamdan alındığından kirlilik yapmazlar.
- Serbest enzimler buldukları ortamdan kolay etkilenirler. İmmobilize enzimler buldukları ortamda daha dayanıklıdır.
- Serbest enzimler kararsız ve dayanıksızdır. İmmobilize enzimler daha kararlı ve dayanıklıdır.
- Serbest enzimler birkez kullanılabilirler. İmmobilize enzimler birçok kez kullanılabilirler.
- Serbest enzimler birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılamazlar. İmmobilize enzimler çok adımlı reaksiyonlarda kullanılabilirler.
- Serbest enzimler aktivitesini çabuk kaybederler. İmmobilize enzimlerin aktivitesi basit immobilizasyon yöntemleriyle artırabilirler.
- Serbest enzimler kendi kendini parçalayabilir. İmmobilize enzimler kendi kendini parçalamayı minimuma indirir. Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar, üretim kaybı azalır.

İmmobilize enzimlerin, immobilizasyon işlemleri sırasında enzim aktivitesinin azalması veya kaybolması, çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığının sınırlı olması ve enzimin immobilize edildiği materyalin maliyetinin yüksek olabilmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır.

### 1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemleri için farklı yaklaşımlar mevcuttur (Şekil 13).



Şekil 13. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu, 1997).

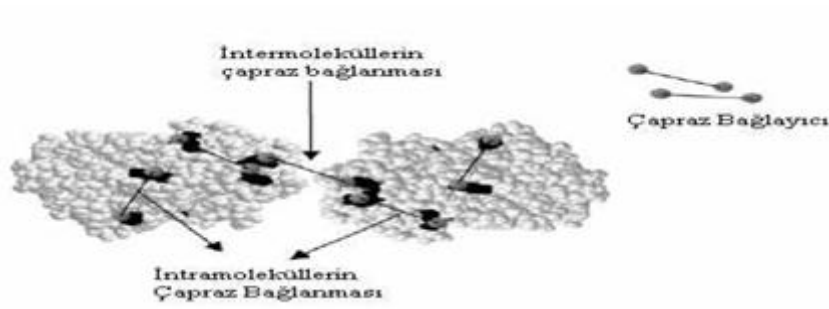
#### 1.5.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon metodları bağlama ve tutuklama olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

##### 1.5.1.1.1. Bağlama

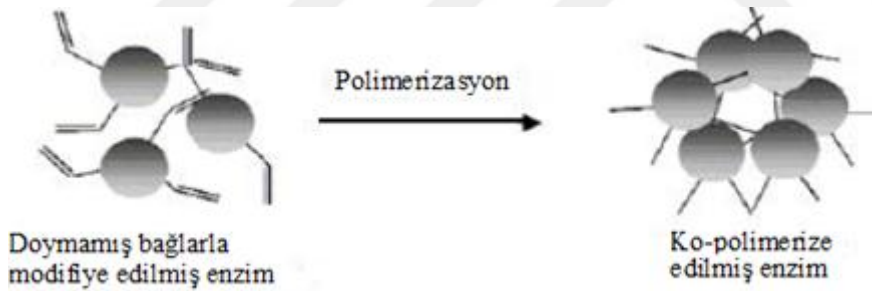
Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Çapraz bağlama yönteminde herhangi bir taşıyıcıya gerek yoktur. İki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirine çapraz bağlanması ve bu şekilde suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanır (Şekil 14). Moleküller içi ve moleküller arası bağlanmalar söz konusudur. Glutaraldehit ucuz ve ticari olarak yaygın bulunmasından dolayı en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajandır. Diğer kullanılan ajanlara bisizosiyanat, bis-diazobenzidin, geçiş metal iyonları, bovine serum albümin (BSA), dekstran verilebilir (Gorecka ve Jastrzebska, 2011).



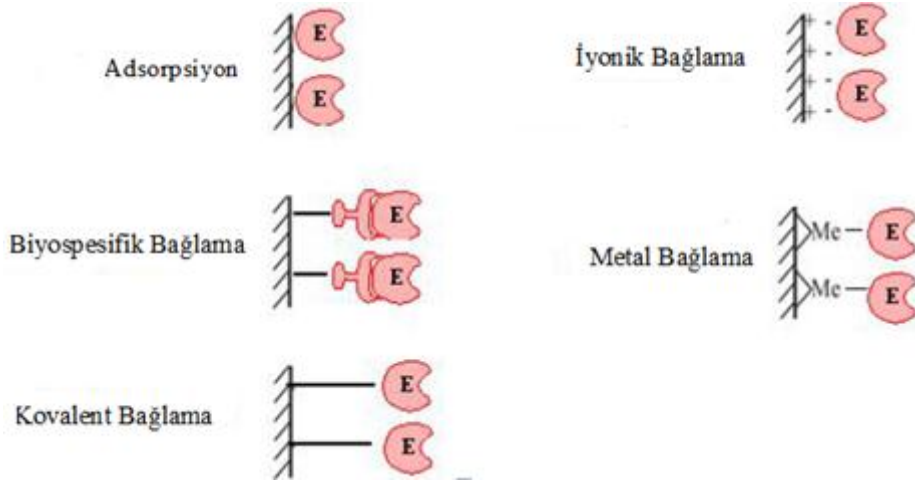
**Şekil 14.** Çapraz bağlama ile immobilizasyon (Kocabay, 2011).

Polimerizasyon, reaktif çift bağlar içeren aynı veya farklı monomerlerin ışık, ısı veya katalizörler yardımıyla farklı yapılarıdaki kimyasal bileşiklerin oluşturdukları işleme verilen isimdir. Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Enzim kopolimerizasyonu polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle beraber enzim kaçışının önlenmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Telefoncu, 1997). Kopolimer oluşumu içinde kimyasal olarak katılmış olan enzim böylece immobilize edilir (Abdelmajeed vd., 2012).



**Şekil 15.** Kopolimerizasyon yöntemi (Cao, 2005).

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri ise kendi arasında biyospesifik bağlama, şelat bağlama, iyonik bağlama, kovalent bağlama ve adsorpsiyon olmak üzere beş gruba ayrılır (Şekil 16).



**Şekil 16.** Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi.

Biyospesifik bağlama komplementer biyomoleküller arasında enzim immobilizasyonu meydana gelmektedir. Aktifleştirilmiş taşıyıcı ile protein yüzeyinde bulunan spesifik grup arasındaki biyospesifik (biyoafinite) bağlar oluşması esasına dayanmaktadır (Andreescu vd., 2006). Bu yöntemde etkileşimlerin biyospesifik olması metodun en önemli özelliğidir (Solomon vd., 1987). Bu immobilizasyon yöntemiyle enzimlerin lektinler ve antikorlar arasındaki biyospesifik etkileşimlerle immobilizasyon işlemi yapılmaktadır (Linquiu, 2006).

Şelat Bağlama yönteminde, Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV) gibi bazı geçiş metallerinin şelat yapma özellikleri kullanılarak enzimlerin inorganik ve organik taşıyıcılara bağlanması esasına dayanır (Kennedy vd., 1983).

İyonik bağlamada esas, iyon değiştirme yeteneğine bulunan suda çözünemeyen taşıyıcılara enzimlerin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır. İyonik bağlanmada reaksiyonlar ılımlı şartlarda gerçekleşmekte olduğundan enzim fiziksel konformasyonlarında ve enzim aktif bölgelerinde değişikliklere neden olmadığından enzim aktivitesi oldukça yüksektir (Cao, 2005).

Kovalent bağlama ile immobilizasyon yönteminin temeli, enzimler ile taşıyıcılar arasında kovalent bağ oluşmasına dayanmaktadır (Cao, 2005). Genelde taşıyıcı matrikse ait ( $-S^-$ ,  $-SH$ ,  $-OH$ ,  $-COO^-$ ,  $-NH_3$  gibi) fonksiyonel gruplar ve enzimin yapısında bulunan aminoasitlerin yan zincirlerindeki lizin (amino grubu), sistein (tiyol grubu),

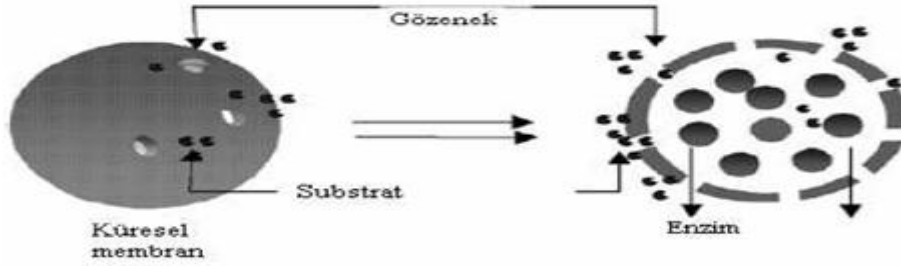
aspartik asit ve glutamik asit (karboksilik gruplar) kovalent bağlanma için önemlidir. Kovalent bağlanmada öncelikle destek materyal aktifleştirilir (siyanojen bromür, karbodiimit ve glutaraldehit gibi kimyasal reaktiflerle) ve sonrasında enzim kovalent olarak bağlanır. Bu yöntemde enzim destek materyaline aktif bölgesinden bağlanırsa enzim aktivite kaybı meydana gelebilir (Varian vd., 1996; Mateo vd., 2000).

Adsorpsiyon, kullanılan en eski ve en kolay immobilizasyon yöntemidir. Aktif kömür, alümina, iyon değiştirici reçineler, gözenekli cam, silikajel, bentonit, nişasta ve gluten enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar malzemelerdir. Yüze aktif ve suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdaki ayrılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916). İşlemin basit olması, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi açısından adsorpsiyon yöntemi oldukça avantajlı bir yöntemdir. Enzim ve matriksin yüzeyi arasında birbirini etkileyen kuvvetler van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler olduğu gibi en çok da iyonik elektrostatik etkileşimlerdir. Bu kuvvetler zayıftır, ancak bağlanma için yeterlidir. Bir destek materyalinin adsorpsiyon kapasitesi, materyalin toplam yüzey alanına ve yüzeydeki aktif gruplarının sayısına bağlıdır. Bu immobilizasyon metodunun avantajları: (1) kimyasal bir aktivasyon veya modifikasyon olmadığından enzimin doğal yapısı daha az zarar görür; (2) basit, ucuz ve hızlı bir immobilizasyon yöntemidir; (3) enzim ve destek materyali kimyasal değişikliğe uğramaz ve (4) etkileşim, destek materyalinin taze enzim ile rejenerasyonuna izin verecek şekilde tersinirdir. Diğer yandan iyon değiştirici bir destek materyali kullanmanın ana dezavantajı enzimin destek materyalinden sızmasıdır. Enzimin destek materyalinden desorpsiyonu, iyon konsantrasyonuna, pH değerine ve immobilize enzimin mikroçevresinin sıcaklığına bağlıdır. Bu yüzden bu parametrelerin üretim, depolanma ve katalizi içeren işlem süresince olabildiğince sabit tutulması gerekir.

### 1.5.1.1.2. Tutuklama

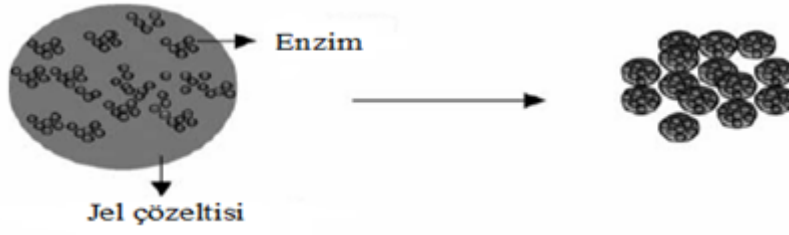
Tutuklama enzimi belirli bir hacimde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu ortamdan dışarıya çıkması mümkün olmamaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlarda da gerçekleştirilebilir. Bu immobilizasyon yöntemini diğer yöntemlerden ayıran en önemli özelliği bu teknikte enzim molekülünün diğer tekniklerde olduğu gibi herhangi bir taşıyıcıya kovalent veya kovalent olmayan bağlarla bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997). Tutuklama yöntemi, mikrokapsülleme, polimer matrikste tutuklama ve lipozom tekniği olarak üç gruba ayrılmaktadır.

Mikrokapsülleme yönteminde enzim yarı geçirgen membran içerisine hapsedilir ve hareket edemez (Şekil 17). Yarı geçirgen membranın gözenekli yapılarından substrat geçerek enzime ulaşır ve ürüne dönüşür. Bundan dolayı gözeneklerin boyutu substratın girişi ve ürünün çıkışı için uygun olmalıdır. Enzimin zar içinden kaçma olasılığı ve kütle giriş çıkışlarının sınırlı olması bu yöntemin avantajlarından (Batista Viera ve Brena Beatriz, 2006).



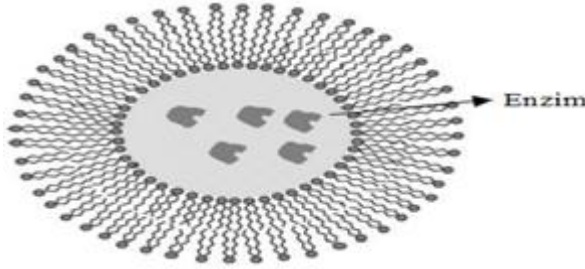
Şekil 17. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi (Kocabay, 2011).

Polimer matrikste tutuklama, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın meydana geldiği ortama enzimin de dahil edilmesi durumunda da çapraz bağlanma sonucu meydana gelen yapıda enzimin tutulmasıdır (Şekil 18). Enzim tutuklamak için en çok kullanılan destek materyaller poliakrilamit, silika jel ve polivinil alkoldür (Cao, 2005).



**Şekil 18.** Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünün tutuklanması (Cao, 2005).

Lipozom tekniği yönteminin esası sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır (Şekil 19). Fosfolipitlerden oluşan lipozomların toksik olmaması, kimyasal içeriklerinin araştırmacı tarafından belirlenebilmesi, yapı ve içerik olarak hücre zarına benzerlik göstermeleri nedeni ile bilim adamları tarafından yıllarca model membran olarak kullanılmıştır. Bu yapılar büyük bir temas yüzeyi, birçok enzimi aynı anda immobilize edebilme kabiliyeti olmasının avantajlarının yanında substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, enzim aktivite yitirmesi ve membrandan enzimin sızma olasılığı gibi dezavantajları bulunmaktadır (Luisi ve Magid, 1986).



**Şekil 19.** Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

### 1.5.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir metoddur (Weethall, 1976). Enzimler öncelikle yüksek veya düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilerek daha kullanışlı ve kararlı hale getirilebilirler. Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle enzimin açılmesi enzimlerin kararlılığını artırmaktadır (Hürrem, 2010).

Oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon gibi yarı geçirgen özellik gösteren membranların kullanımı çözünür formda immobilizasyon yöntemlerindedir. Bu immobilizasyon yönteminin herhangi bir işlem gerektirmediği için son derece kolay bir metoddur. Ürün ve substratlar, membran sayesinde seçimli olarak kontrol edilebilir. Kütle transferinde önemli bir engel oluşu ve membranda zamanla tabakalaşma gözlenmesi bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir (Yıldırım, 2010).

## 1.6. İnce Film

Kalay oksit (KO), formülü  $\text{SnO}_2$  olan inorganik bir bileşiktir. KO mineral formu *kasiterit* diye isimlendirilir, bu kalayın ana madeni olarak kabul edilir ve kalayın kimyasında bulunan en önemli ham maddedir. Ayrıca bu ham madde renksiz ve diamanyetik katı bir amfoterdir (bazen asit, bazen baz gibi davranır). KO, madde olarak kokusuz ve toz haldedir (Koçyiğit, 2014). Yüksek kimyasal ve mekanik dayanıklılığa sahip, saydam bir malzemedir. Tablo 2’de  $\text{SnO}_2$ ’nin temel özellikleri verilmiştir.

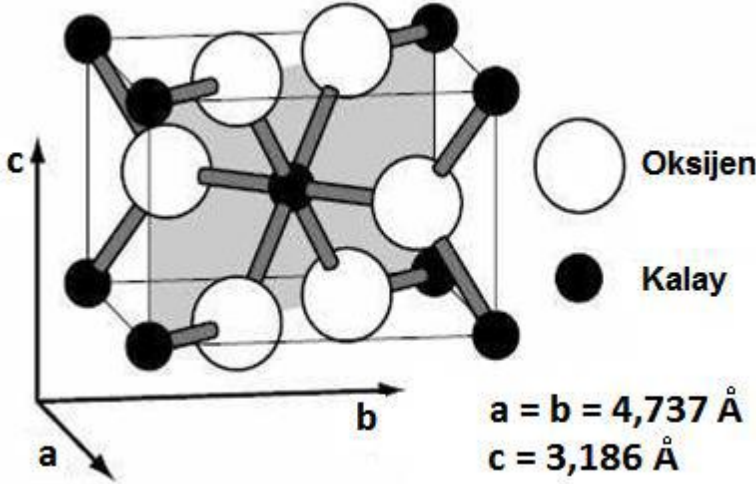
**Tablo 2.** Kalay oksitin temel özellikleri (Kocyiğit, 2014).

<b>Kalay oksitin bazı özellikleri</b>	
Molekül formülü	$\text{SnO}_2$
Molekül ağırlık	150,71 g/mol
Yoğunluğu	6,95 g/cm <sup>3</sup>
Erime noktası	1630 °C
Kaynama noktası	1800 °C -1900 °C
Kristal yapısı	Tetragonal (rutile)
Bant aralığı	3.5-4.2.eV
Görünümü	Beyaz ya da gri
Mineral ismi	Cassiterite
Latis parametreleri (nm)	a=b=0,474 c=0,319
Kırılma indisi	2.0006

$\text{SnO}_2$ , geniş bant aralığına sahip n-tipi bir yarıiletkenidir. Tetragonal rutil yapıda olan kalay oksidin kafes yapısı, 2 kalay ve 4 oksijen atomu içermektedir. Kalay atomu düzgün oktahedranların köşelerindeki 6 oksijen atomunun merkezindedir. Her oksijen



atomu eşkenar üçgenin köşelerindeki 3 kalay atomu tarafından çevrelenmiştir (Koçyiğit, 2014). O-O mesafesi 4,6646 Å ve O-Sn mesafesi 3,7662 Å dur. Latis parametreleri  $a=b=4,738$  Å ve  $c=3,187$  Å dur. Şekil 20'de, KO kristal yapısı gösterilmiştir (Sinner Hettenbach, 2000).



Şekil 20. Kalay oksit kristal yapısı (Sinner Hettenbach, 2000).

Tamamen stokiyoemrik KO yalıtkandır, ancak kristal yapısının mükemmel olmayışı ve oksijen boşluklarının bulunmasından dolayı iletkenlik özelliği kazanabilir. KO'nun iletkenliği, mükemmel olmayan kristal yapısından dolayı çeşitli elementlerin katkılanmasıyla artırılabilir (yarıiletken özelliği). Bu katkılanan elementler In, Nb, Sb, F gibi elementlerdir (Alaf, 2007).

KO, düşük maliyeti, kimyasal kararlılığı, yarıiletken özelliği ve atmosferik şartlara karşı uygunluğundan dolayı çokça tercih edilen bir materyaldir. KO, optik geçirgenliği yaklaşık %90 civarında olan, kızıl ötesi yansıtıcılığı %90'nın üzerine çıkan ve yüksek iletkenliğe sahip bir malzemedir (Alaf, 2007).

KO filmlerin katkı maddesi olarak, antimon (Sb), arsenik (As), flor (F), indiyum (In), molibden (Mo) ve fosfor (P) kullanılmaktadır. Bunlar arasında Sb'nin en yaygın kullanılan katkı maddesi olduğu bulunmuştur (Kim vd., 2008).  $SbCl_3$ 'ten elde edilen antimon, yapısı katkılamağa müsait olan KO'ya, fiziksel özelliklerini değiştirmek amacıyla katkı maddesi olarak ilave edilmektedir. Böylece Sb atomlarının katkılanmasıyla latisteki bazı  $Sn^{+4}$  iyonlarıyla yaklaşık aynı iyonik çapa sahip  $Sb^{+5}$

iyonlarının yer değiştirilmesi sağlanmaktadır (Ravichandran vd., 2009a; Ravichandran vd., 2009b).

Teknolojik ve bilimsel araştırmalarda önemli olan, malzeme endüstrisinin temelini oluşturan yarıiletken ince filmler, günümüzde çokca çalışılmakta olan güncel araştırma konuları içindedir. Yarıiletken ince filmler, sensörlerde, kimyasal özelliklerinden dolayı oksidasyon veya korozyona karşı korumada ve bunlar gibi daha birçok uygulama alanında kullanılmaktadır (Sönmezoğlu vd., 2012).

### **1.7. Polifenol Oksidaz İle İlgili Literatürde Yapılan Bazı Çalışmalar**

*Lamium purpureum* (eflatun çiçekli ballıbaba) bitkisinden elde edilen serbest ve immobilize PFO'nun kinetik özellikleri incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzim için 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları kullanılmıştır. Serbest enzim için en iyi aktivite gösteren substrat kafeik asit olarak bulunmuştur. Serbest enziminin optimum pH değerleri 6,0-8,0; optimum sıcaklık değerleri ise 10-20 °C aralığında olduğu tespit edilmiştir. PFO enzimi kitin (CHT), kitosan (CTS) ve hidroksiapatite (HAP) immobilize edilmiştir. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratına karşı ilgisi en fazladır. Optimum pH değerleri 6,0-7,0; optimum sıcaklık değerleri ise 5-50 °C aralığında bulunmuştur. CTS'a immobilize edilen enzim için katekol en yüksek substrat spesifikliğine sahiptir. Optimum pH değerleri 4,0-8,0; optimum sıcaklık değerleri ise 5-40 °C aralığında bulunmuştur. HAP'e immobilize edilen enzimin ise kafeik aside olan ilgisi en fazladır. Optimum pH değerleri 6,0-8,0, optimum sıcaklık değerleri ise 5-50 °C olarak bulunmuştur. Serbest PFO'nun optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur. Serbest enzimin oda sıcaklığında enzim aktivitesini 12 saat sonunda %40,7; +4 °C' de 120 saat sonunda %27,91 koruduğu tespit edilmiştir. CHT, CTS, HAP'a immobilize edilen enzimin oda sıcaklığında ve +4 °C' de serbest enzime göre daha uzun süre aktivitesini koruduğu görülmüştür. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği çalışmasında 4. kullanımda CTS %5,16 değerinde aktivite göstermeye devam ederken, CHT ve HAP için aktivite görülmemiştir (Cerrahoğlu, 2014).

Hapsetme ve adsorpsiyon yöntemleri kullanılarak tirozinaz enzimi tutturulmuş jelatin filmler elde edilmiştir. Hapsolma metodunda, jelatin yüzeyde çapraz bağlama yapmak için glutaraldehit kullanılmıştır. Fouier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM), temas açılma ölçer cihazları ile filmler karakterize edilmiştir ve UV spektrofotometre yardımıyla katekol oksidasyon reaksiyonunda, tirozinaz immobilize olmuş filmlerin katalitik aktivitesi ölçülmüştür. pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Enzimin jelatin yüzeye tutturulması yapısal sertlik ve uygun esneklik sağladığından enzimin pH, sıcaklık ve depolama kararlılığı serbest enzime göre artmıştır. Jelatin hapsolmuş filmlerin tekrar kullanılabilirliği de incelenmiştir ve beşinci kullanımdan sonra enzim aktivitesinde neredeyse %60'lık bir kayıp görülmüştür (Tetik, 2015).

PFO Sakarya ilinde yetişen roka (*Eruca vesicaria*) bitkisinden karakterize edilmiş ve bu enzim Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilmiştir. Bunun için roka bitkisinden izole edilen PFO'nun optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri beş farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pyrogallol, gallik asit, L-Tirosin) belirlenmiştir. PFO'nun en iyi substratı 4-metil katekol olarak bulunmuştur. Bu substrat için optimum pH 5,0 optimum sıcaklık ise 20 °C olarak belirlenirken,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 3,68 mM ve  $16,6 \cdot 10^{-3}$  EÜ/dak olarak bulunmuştur. Karakterizasyon işleminin ardından immobilizasyon çalışmalarına geçilmiş ve roka PFO'nun Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin kinetik özellikleri karşılaştırılmıştır. Buna göre Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid ile immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratına karşı  $K_m$  değerleri sırasıyla 4,33 mM, 1,45 mM, 2,41 mM, 2,93 mM,  $V_{maks}$  değerleri ise  $3,2 \cdot 10^{-3}$  EÜ/dak,  $4,0 \cdot 10^{-3}$  EÜ/dak,  $9,2 \cdot 10^{-3}$  EÜ/dak,  $10,0 \cdot 10^{-3}$  EÜ/dak olarak belirlenmiştir. Immobilize edilen PFO'nun optimum pH ve sıcaklıkları serbest enzim çalışmaları ile paralellik göstermiştir. Immobilize enzimin depolama kararlılığı serbest enzime göre oldukça artış göstermiştir. Immobilize edilen PFO enziminin tekrar kullanılabilirliği ölçülmüş ve 12 kullanım sonunda enzimin aktifliğini %26 oranında koruduğu görülmüştür (Köse, 2010).

Polifenol oksidaz iletken kopolimer poli(N-(4-(3-tiyenil metilen)-oksikarbonilfenil)maleimid)-pirol (P(MBThi-co-Py)) matriksine immobilize edilmiştir. Kopolimer, sodyum dodesil sülfat destek elektroliti kullanarak elektrokimyasal olarak sentezlenmiş ve FTIR, SEM ve iletkenlik ölçümü yoluyla karakterize edilmiştir. PFO iletken P(MBThi-co-Py) matrislerinde elektropolimerleşme yoluyla tutuklanmıştır. Serbest ve immobilize enzim elektrotlarının, sıcaklık ve pH,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  gibi parametreleri araştırılmıştır. Enzim elektrotlarının kullanım kararlılıkları belirlenmiştir. PFO elektrodu, kırmızı şarapta fenolik yapıların miktarını belirlemede kullanılmıştır (Çil, 2006).

PFO polipirol (PPy) ve pirol uçlu polistirenin pirol ile oluşturulan kopolimerinde (P(PStPy-co-Py) tutuklanmıştır. Elde edilen kopolimerin karakterizasyonu FTIR, SEM ile incelenmiştir. Immobilize enzim elektrotları  $V_{maks}$  ve  $K_m$  kinetik parametreleri ile karakterize edilmiş, enzim elektrotlarının sıcaklık ve pH değişimine göre davranışları incelenmiştir. PFO şarapta polifenolik bileşiklerin tayini için kullanılmıştır (Ekinci, 2006).

*Agaricus bisporus* özütünden çapraz bağlanmış enzim çökeltisi (ÇBEÇ) hazırlamıştır. Serbest enzimin ve immobilize enzim ÇBEÇ'ler için, sıcaklık ve katekolun oksitlenme aktivasyon enerjisi sırasıyla 32 °C ve 13 kcal/mol, Optimum 34 °C ve 17 kkal/mol olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ÇBEÇ'lerin ısıl dayanıklılıkları serbest enzime göre çok daha yüksektir. Ham mantar özütünden hazırlanan ÇBEÇ'ler 4 °C'de sekiz aylık bir depolamadan sonra maksimum aktivitelerinin %70'sini korumuşlardır. Ayrıca, depolama sıcaklığını 4 °C'den oda sıcaklığına değiştirmek ÇBEÇ'lerin dayanıklılığını azaltmamıştır (Aytar ve Bakır, 2008).

Karboksimetilselüloz (CMC) boncukları üç değerlikli demir iyonları varlığında sıvı kütleme yöntemiyle hazırlanmış ve epiklorohidrin CMC boncuklarına kovalent olarak bağlanmıştır. PFO daha sonra CMC boncuklarına kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0,65 mM ve 1.890 U/mg, immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0,87 mM ve 760 U/mg olarak bulunmuştur. Optimum pH serbest enzim için 6,5 ve immobilize enzim için 7,0 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklıkları sırasıyla 40 °C ve 45 °C olarak

tespit edilmiştir. CMC boncuklarına kovalent immobilize edilen PFO ısıya ve depolamaya daha kararlı hale gelmesi enzimin daha yüksek konformasyon stabilitesi kazandığını göstermiştir (Arıca, 2000).

PFO iki farklı aktif karbon matriksi olan MAC400 ve MAC200 üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon kapasitesi 10 °C - 40 °C sıcaklığın artmasıyla artarken pH artmasıyla azalmıştır. Serbest enzim, MAC400 immobilize edilen PFO ve MAC200 immobilize edilen PFO'lar için  $K_m$  and  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,49 mM, 0,41 mM ve 0,65 mM olarak bulunmuştur. PFO'nun karbon matrislerde immobilizasyonu FTIR ve SEM kullanılarak doğrulanmıştır (John Kennedy vd., 2007).

Tiyofen ile kaplanmış politetrahidrofuran ve pirol destekleyici elektrolit olarak sodyum dodesil sülfat kullanılarak sabit potansiyel elektroliz ile kopolimerleştirilmiştir. FTIR ve SEM ile karakterizasyonu yapılmıştır. Elektrik iletkenlikleri dört-prob tekniği ile ölçülmüştür. Pirolün tiyofen ile kaplanmış politetrahidrofuran ile elektropolimerizasyonu, PFO iletken kopolimerlere immobilize edilerek fenolik bileşikler için yeni bir biyosensör elde edilmiştir. İmmobilize enzimin  $K_m$  and  $V_{maks}$  değerleri, optimum pH ve sıcaklık gibi özellikleri belirlenmiştir. Enzim elektrotlarının operasyonel stabilitesi ve raf ömrü araştırılmıştır. İki tür Türk kırmızı şaraplarında fenolik bileşiklerin miktarını belirlemek için PFO elektrotları kullanılmış ve çalışma aralığı yüksek kinetik parametreleri ve geniş pH'ları nedeniyle çok yararlı bulunmuştur (Böyükbayram vd., 2006).

Patates (*Solanum tuberosum*) PFO'su amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilmiş ve bir absorband olan Celite 545 maddesine doğrudan immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi pH 7,0 maksimum olmuştur. İmmobilize PFO'nun pH, sıcaklık, üre, deterjan karşı direnci anlamlı derecede artmıştır. Triton X 100 ve Tween 20 gibi iyonik olmayan deterjanların artan konsantrasyonlarında immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime göre belirgin olarak artmıştır (Khan vd., 2006).

Tiyofene fonksiyonelleştirilmiş metil monomerinin (MM) pirol ile birlikte kullanılmasıyla kopolimer elde edilmiş ve elde edilen kopolimere PFO immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonu, pirol elektrokimyasal polimerizasyonu sırasında

kopolimerlerin iletilmesinde tutuklama yoluyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, pH, sıcaklık, enzim elektrotlarının çalışma kararlılığı,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri araştırılmıştır. Türkiye'nin kırmızı şaraplarındaki toplam fenol tayini bu elektrotlar kullanılarak analiz edilmiştir (Kıralp vd., 2003).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak Iğdır İlinde yetişen yerel çeşit olan Ağşeftali (*Prunus persica L.*) kullanıldı.

### 2.2. Kullanılan Cihazlar ve Çözeltiler

#### 2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Marka	Model
Spektrofotometre	Agilent Technologies	Cary 60 UV-Vis
Protein elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
Güç kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL
Santifüj	Termo Scientific	Heraeus Multifugure X3R
pH Metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Su banyosu	WiseClean	WUC-DO6H
Terazi	Precisa	Precisa
Buzdolabı	Arçelik	5796 NH
FTIR	Agilent	Cary 630
XRD	Rigaku	SmartLab
SEM	ZEISS	EVO LS10
AFM	VEECO	Multi mod 8
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heldolph Instrument	MR Hei-Standart

### 2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız kimyasallar Tablo 4’te verilmektedir.

**Tablo 4.** Kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı
Afinite Jeli Sentezinde Kullanılanlar kimyasal malzemeler	
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, NaOH, NaHCO <sub>3</sub> , L-Tirosin, <i>p</i> -aminobenzoik asit, NaNO <sub>2</sub>	Sigma
Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	Sigma
Polietilen glikol (PEG)	
Kullanılan Substratlar	Sigma
Katekol, 4-metilkatekol, L-Tirosin Kullanılan Tampon Çözeltiler	
Glisin-HCl, Sodyum asetat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Tris Bazı	Sigma
İnce Film Yapımında Kullanılan Malzemeler	Merck
SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, SbCl <sub>3</sub> Kullanılan Çözücüler	Merck, Sigma
HCl, Asetik asit, Metanol, Aseton	

### 2.2.3. Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler

Deneysel çalışmalarımız esnasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları şu şekildedir.



### 2.2.3.1. Tampon Çözeltiler

- Glisin-HCl Tamponu (50 mM, pH 2,0): 0,375 g glisin 90 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'sı 2,0'a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-HCl Tamponu (50 mM, pH 3,0): 0,375 g glisin 90 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'sı 3,0'a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50 mM, pH 4,0): 0,6804 g sodyum asetat saf suda çözüldükten sonra asetik asit çözeltisi ile pH'sı 4,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50 mM, pH 5,0): 0,6804 g sodyum asetat saf suda çözüldükten sonra asetik asit çözeltisi ile pH'sı 5,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 Mm, pH 6,0): 0,4164 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,3379 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  saf suda çözüldükten sonra sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'sı 6,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 Mm, pH 7,0): 0,4164 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,3379 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  90 mL saf suda çözüldükten sonra sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'sı 7,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,6056 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,6056 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### 2.2.3.2. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar

- $\text{NaHCO}_3$  Tamponu (0,1 M pH 10,0): 8,4 g  $\text{NaHCO}_3$  900 mL saf suda çözülerek 1 M NaOH ile pH'sı 10,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

- NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (0,2 M pH 8,8): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub> 900 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH'sı 8,8 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Tamponu (0,01 M pH 6,0): 1,78 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 900 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH'sı 6,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Afinite Jelini Yıkama ve Dengeleme Tamponu (50 mM pH 5,0 asetat tamponu): 6,8 g sodyum asetat tamponu 900 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8,0 fosfat tamponu içinde 1 M NaCl): 6,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 58,5 g NaCl 900 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8,0 ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

#### **2.2.3.3. Substrat Çözeltileri**

- 4-Metil Katekol Substratı (100 mM): 1,24 g 4-metil katekol 90 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Katekol Substratı (100 mM): 1,1 g katekol 90 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- L-Tirosin (100 mM): 1,81 g L-Tirosin 90 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

#### **2.2.3.4. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

- Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 200 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 önce 100 mL %95'lik etanolde çözüldükten sonra bu çözeltiliye 200 mL %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin son hacmi saf su ile 2 litreye tamamlandı.

#### **2.2.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektroferezinde (PAGE) Kullanılan Çözeltiler**

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı ve son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak 4 °C'de saklandı.

- Yıgma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı ve son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak 4 °C'de saklandı.
- SDS (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid 80 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 750 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 2000 µL %10'luk SDS, 500 µL %0,1'lik bromofenol mavisi, 1250 µL %80'lik gliserol ve 300 µL β-merkaptotanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 14,4 g glisin ve 3 g Tris yaklaşık 900 mL saf su ile çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi ve pH 8,3'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 750 µL 1 M Tris-HCl ( pH 6,8), 500 µL %0,1'lik bromofenol mavisi, 1250 µL %80'lik gliserol ve 2300 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 14,4 g glisin ve 3 g Tris yaklaşık 900 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3 ayarlandı ve çözeltinin son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 200 mL glasiyal asetik asit, 800 mL metanol ve 1200 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

- 3,4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA) (24 mM): 1,97 g L-DOPA 90 ml saf suda biraz ısıtılarak ve karıştırılarak çözüldü ve son hacmi saf su ile 100 mL tamamlandı.

#### 2.2.3.6. SnO<sub>2</sub>: Sb İnce Film Hazırlama Çözeltileri

- SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Çözeltisi: 8,370 g SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 120 mL etanolde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 80 °C’de 1 saat karıştırılarak hazırlandı.
- SbCl<sub>3</sub> Çözeltisi: 0,278 g SbCl<sub>3</sub> tartılıp 20 mL etanolde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 80 °C’de 1 saat karıştırılarak hazırlandı.

#### 2.2.3.7. Diğer Çözeltiler

- Ham Ekstrak Hazırlama Çözeltisi: 0,6804 g sodyum asetat (50 mM), %1’lik polietilen glikol (PEG) 90 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asitle pH’sı 5,0’a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.
- 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) (10 mM): 0,022 g MTBH 8 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf su ile 10 mL’ye tamamlandı.
- Dimetil foramid (DMF): Orijinal şişeden kullanıldı.

#### 2.2.4. Yöntem

##### 2.2.4.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması ve Aseton Çöktürmesi

Araştırmamızda kullanılan Ağşeftali (*Prunus persica* L.) çeşiti, Iğdır ilinden temin edildi ve çalışmada kullanılıncaya kadar -20 °C’de depolandı. Ham ekstrak aşağıdaki işlemler uygulanarak hazırlandı.

- Ağşeftali numunesinden alınan 25 gr’lık örnekler dondurup çözme yöntemi uygulandı ve örnekler havanda dövüldü.
- Havanda dövülen numuneye %1’lik PEG içeren 50 mM asetat (pH 5,0) tamponundan, 50 mL ilave edildi (Aydemir, 2004).

- Numune 4 katlı tülbentten süzöldü ve elde edilen süzöntü 4 °C’de, 10.000 rpm’de 30 dakika santriföj edilip, elde edilen süpernatana ham enzim ekstraktı olarak kullanıldı.

Elde edilen süpernatana, hacmi kadar soğuk aseton, buz banyosunda, karıştırılarak yavaş yavaş ilave edildi. Bir gece 4 °C’de bekletilip ham enzim ekstraktı, 4 °C’de 10,000 rpm’de 30 dakika santriföj edildi. Süpernatana kısım atılıp, elde edilen çökelekler 10 mL pH 5 asetat tamponunda tamponda çözüldü (Özen vd., 2004).

#### 2.2.4.2 Polifenol Oksidazın Aktivite Tayini

PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 4-metil katekol için 496 nm’de ve diğere tüm substratlar için 500 nm’de, absorbanstaki artışın ölçölmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995). Enzim aktivitesi bakılırken, 100 µL enzim + 100 µL substrat (100 mM) + 100 µL MBTH (10mM) + 20 µL DMF + 680µL tampon (50 mM) çözültisi ilave edilerek reaksiyon karışımının son hacmi 1000 µL olacak şekilde hazırlandı. Enzim çözültisinin konulmadığı reaksiyon karışımında kör olarak kullanıldı. Bir ünite PFO aktivitesi; 1 mL reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0,001 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak belirlendi. PFO'nun spesifik aktivitesi, miligram protein başına enzim aktivitesi olarak hesaplandı (Kolcuoğlu, 2012).

Bir ünite immobilize PFO’nun aktivitesi; ince filmin yüzey alanına göre hesaplandı. Immobilize enzim aktivitesi ( $U/dak.cm^2$ ) = Immobilize enzim aktivitesi (1 mL reaksiyon karışımında bir dakikada 0,001 absorbans artış değeri) / Enzim aktivitesi bakılırken kullanılan ince film yüzey alanı ( $cm^2$  olarak) olarak belirlendi. Immobilize PFO’nun spesifik aktivitesi, 1 mL reaksiyon karışımı içinde bir dakika 0.001 artışa neden olan  $cm^2$  başına enzim miktarı olarak tanımlandı (Aydın, 2012).

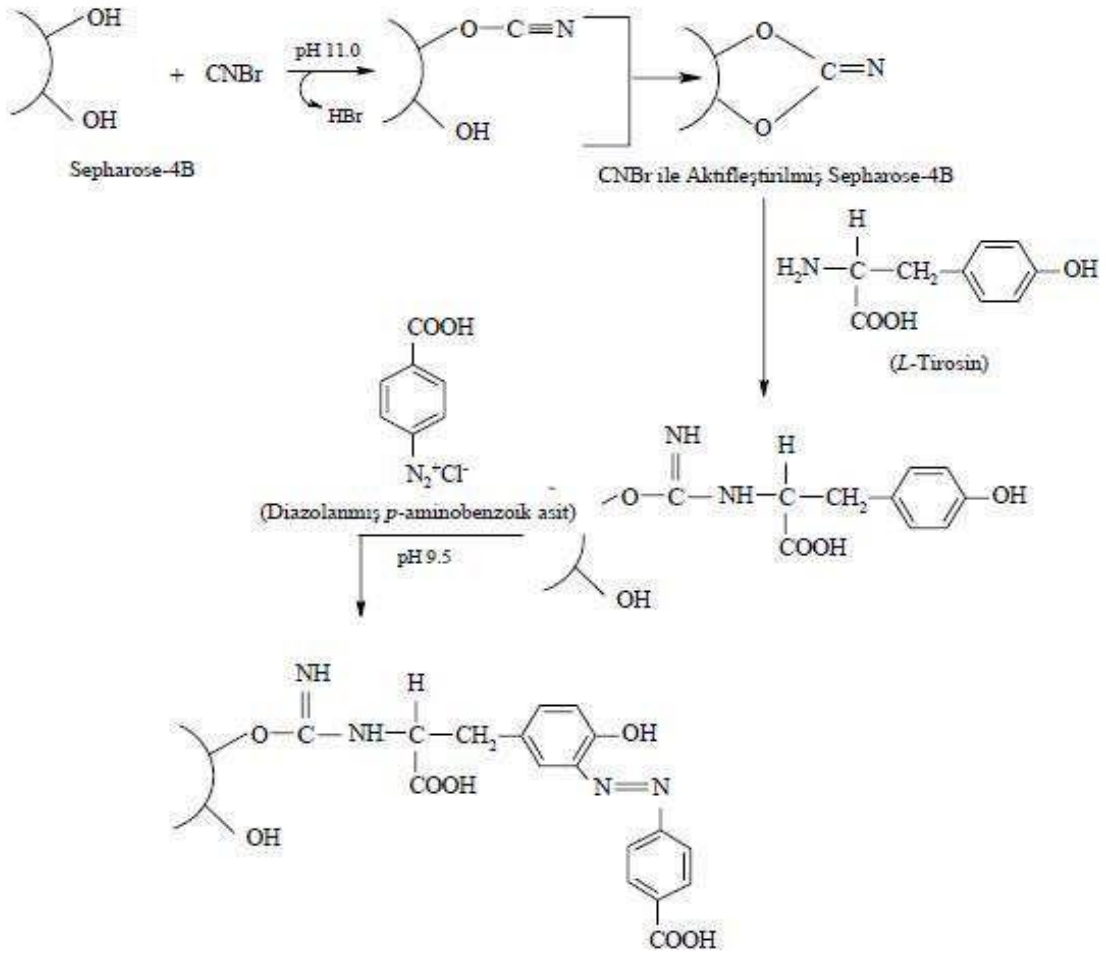
### 2.2.4.3. Enzimin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

#### 2.2.4.3.1. Afinite Jelinin Sentezi

Bu çalışmada kullanılan afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibi (2004) tarafından literatüre kazandırılan yönteme göre sentezlendi (Şekil 21). Bu yönteme göre CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi, uzantı kolunu oluşturmak üzere tirosinle kovalent olarak modifiye edildi. Ligand olarak polifenol oksidaz (PFO) enziminin spesifik bir inhibitörü olan *p*-aminobenzoik asit seçildi. Bu şekilde elde edilen jel, afinite kromatografisi ile Ağşeftali çeşitinden PFO'nun saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı.

5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bir beher içerisinde 10 mL saf su ilave edildi. Süspansiyonun pH'sı 2 M NaOH ile hemen 11,0'a çıkarılarak, pH sabit kalana kadar takip edildi. İçine küçük buz parçaları atılan karışım, su trombu yardımıyla mavi banttardan süzüldü. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan kısım, 0,1 M pH 10,0 NaHCO<sub>3</sub> tamponunu 250 mL'siyle yıkanıp, süzülerek bir beher içerisine alındı. Süspansiyonun üzerine 20 mL'sinde 10 mg L-Tirosin içeren 0,1 M pH 10,0 olan soğuk NaHCO<sub>3</sub> tamponundan ilave edilerek, 90 dakika boyunca karıştırıldı. Bu işlemden sonra süspansiyon, 4 °C'de 16 saat bekletildi. Süre sonunda tekrar mavi banttardan süzülen süspansiyon bol saf su ile yıkandı. Mavi bant üzerinde kalan kısım, 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun 100 mL'siyle yıkandı ve aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

Buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözülen 75 mg NaNO<sub>2</sub>, 10 mL 1 M soğuk HCl içerisinde çözülen 25 mg *p*-aminibenzoik asit üzerine damla damla ilave edildi. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen karışım, 40 mL sepharose-4B-L-tirosinsüspansiyonuna ilave edildi ve 2 M NaOH ile pH'ı 9,5'e ayarlanarak 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Mavi bant üzerine alınan süspansiyon önce 1 L saf suyla, ardından 200 mL 0,01 M pH 6,0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan vd., 2004).



Şekil 21. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.

#### 2.2.4.3.2. Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Sentezlenen afinite jeli,  $1 \times 15$  cm boyutlarındaki kolona, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde damla damla yüklendi ve 50 mM pH 5,0 asetat tamponu ile yıkandı (kolonun üstünden ilave edilen ve kolonun altından toplanan tamponun 280 nm'de absorbans değerleri eşit oluncaya kadar). Bu şekilde dengelenen kolona, enzim özütü tatbik edildi ve jel tekrar 50 mM pH 5,0 asetat tamponu ile yıkandı. Böylece afinite jeline tutunmayan diğer tüm proteinler ve maddeler ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Jele tutunan enzimler ise, 1 M NaCl içeren 50 mM pH 8,0 fosfat tamponuyla tüplere 4'er mL halinde elüe edildi. Enzim elüatlarının toplandığı her bir tüpte 280 nm'de protein tayini ve belirlenen substrat ile aktivite tayini yapıldı.

#### **2.2.4.4. Protein Tayini**

Saflaştırılan enzim çözeltisinde, aseton çöktürmesi sonrası ve ham ekstrattaki protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleksin en yüksek absorbans değeri 595 nm'de okunur. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı bir şekilde olur. Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre muhafaza edilir. Bu yöntemin hassasiyeti 1–100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine son konsantrasyonu 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olacak şekilde konuldu. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. Tüplerin hacmi Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile 5 mL'ye tamamlandı ve vortex ile karıştırıldı. Proteine boyanın tam olarak bağlanabilmesi için 10 dakika beklendi ve sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL'ye renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Numune çalışmaları için, ham enzim ekstraktı, aseton çöktürmesi ve saf enzim çözeltilerinden üç ayrı tüpe sırasıyla 100 µl alınarak üzerlerine 5 mL olacak şekilde renklendirme reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılıp 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

#### **2.2.4.5. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektoroforezi**

Doğal-PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yükleme jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak yapıldı. Jeller hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank, doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içerisine yerleştirilerek, boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık 15



2 dakika 20 mA’de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA’de yürütüldü.

Doğal elektroforez sonrası sistemden çıkartılan, jel ikiye bölündü. İkiye bölünen jelin bir tarafı, substrat çözeltisi (24 mM, L-DOPA), diğer tarafı da Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı. Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan jel, boyama uzaklaştırma çözeltisi içerisinde (destaining) 2-3 saat çalkalandı. Bantlar görünür hale getirildi. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

SDS-PAGE, yükleme jeli %5’lik ve ayırma jeli %8’lik olacak şekilde hazırlandı ve cam plakalar arasına döküldü. Saflaştırma basamağının her aşamasından bir örnek SDS yürütme boyasıyla karıştırıldı ve 90 °C’de 5 dakika bekletildikten sonra, molekül ağırlığı bilinen standart proteinler ve örnekler ayrı ayrı kuyucuklara Hamilton şırıngası yardımıyla yüklendi. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA’de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA’de yürütüldü. Elektroforez işlemi sona erdikten sonra, jel sisteminden dikkatlice alınarak, gümüş boyama işlemleri gerçekleştirildi. Bantlar görünür hale getirildi. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

#### **2.2.4.6. SnO<sub>2</sub>: Sb İnce Film Üzerine Polifenol Oksidazın İmmobilizasyonu**

##### **2.2.4.6.1. SnO<sub>2</sub>: Sb İnce Film Jeli Hazırlanışı**

8,370 gr SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 120 mL etanolde 80 °C’de 1 saat karıştırıldı. 0,278 gr SbCl<sub>3</sub> tartılıp, 20 mL etanolde 80 °C’de 1 saat karıştırıldı. Bu iki çözelti birleştirildi ve 80 °C’de 1 saat karıştırıldı. Homojen jel elde edildi (Terrier vd., 1997; Kocyigit vd., 2012).

##### **2.2.4.6.2. SnO<sub>2</sub>: Sb İnce Film**

Mikroskop camlar 1 cm x 1 cm ebadında kesildi. Sırasıyla saf su, metanol, asetonla ultrasonik su banyosunda temizlendi. Etüvde 120 °C’de kurutuldu. Isıtıcı manyetik karıştırıcıda 270 °C ısıtılan camlar hazırlanan SnO<sub>2</sub>: Sb ince film jeli ile 60

cm'den püskürtülerek kaplandı (Ravichandran vd., 2009a). Kül fırınına koyularak 1 saat 500 °C bekletildi. Kül fırını kapağı açılmadan soğumaya bırakıldı.

#### **2.2.4.7. Enzim İmmobilizasyonu**

SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmleri Ağşeftali'sinden saflaştırılan PFO çözeltilisine eklendi ve 4 °C, 1 gece bekletildi. Sonrasında örnekler tamponla 3 kez yıkanarak tutunmayam proteinler uzaklaştırıldı ve immobilize enzim kullanılıncaya kadar tamponda saklandı.

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası süzüntülerde bulunan enzimin aktivite tayinleri yapılarak %verim hesaplandı. İmmobilizasyon verimi (%)= (A-B)/A x 100 için denklem kullanıldı. Burada A immobilizasyon öncesi enzimin başlangıç aktivitesi, B immobilizasyon sonrası süzüntülerdeki enzimin toplam aktivitesidir (Hou vd., 2015).

Ayrıca immobilizasyon öncesi ve sonrası süzüntülerde protein tayinleri yapılarak da %verim hesaplandı. İmmobilizasyon verimi (%)= (X-Y)/X x 100 için denklem kullanıldı. Burada X immobilizasyon öncesi toplam protein miktarı, Y immobilizasyon sonrası yıkama çözeltilerindeki toplam protein miktarıdır (Yağar ve Sarıoğlu, 2002b).

#### **2.2.4.8. Enzim İmmobilizasyonunun Karakterizasyonu**

SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzey morfolojisi enzim immobilizasyon öncesi ve sonrası AFM (VEECO, Multi mod 8) ve SEM (ZEISS, EVO LS10) ile analiz edildi.

SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin kristal yapısı enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası XRD (Rigaku SmartLab) cihazıyla incelendi.

SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin enzim immobilizasyon öncesi ve sonrası 650-4000 cm<sup>-1</sup> oda sıcaklığında FTIR spektrum (PerkinElmer) analizi yapıldı.

## **2.2.4.9. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu**

### **2.2.4.9.1. Substrat Özgünlüğü**

Serbest ve immobilize enzimin substrat özgünlüğünü belirlemek amacı ile 4-metil katekol, katekol ve L-Tirosin substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Böylece enzimin en etkin çalıştığı substrat belirlendi.

### **2.2.4.9.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Serbest ve immobilize PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla 50 mM glisin-HCl (pH 2,0 ve 3,0), 50 mM sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0 ve 7,0), ve 50 mM Tris- HCl ( pH 8,0 ve 9,0) tamponları kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak pH-%bağlı aktivite grafiği çizildi. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri, optimum pH olarak tespit edildi. Bundan sonraki çalışmalarda aktivite tayinleri optimum pH değerlerinde gerçekleştirildi (Kolcuoğlu, 2012).

### **2.2.4.9.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi**

Serbest ve immobilize PFO enzim üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 0-70 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım 0-10 °C aralığında soğutmalı inkübatörde, 20-70 °C aralığında ise su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımına MBTH, DMF ve saf enzim elüatı ilave edildikten sonra enzim aktivitesi, mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ölçüldü. Sıcaklığa karşı %bağlı aktiviteler grafiğe geçirilerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi (Kolcuoğlu, 2012).

### **2.2.4.9.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin belirlenebilmesi için optimum şartlar altında 4-metil katekolün farklı konsantrasyonlarda (serbest enzim için 0,1-10 mM ve immobilize enzim için 0,5-10 mM) enzim aktivitesi tayinleri yapıldı.

1/V ve 1/S değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Km ve Vmaks değerleri grafik denkleminde yararlanılarak hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

#### **2.2.4.9.5. pH Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize enzimin pH kararlılığını belirlemek amacıyla, 50 mM glisin-HCl tamponu (pH 3,0), 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,0-5,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-7,0) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C 24 saat inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktivitelerine bakılarak bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Kolcuoğlu, 2012).

#### **2.2.4.9.6. Isıl Kararlılığın İncelenmesi**

Serbest ve immobilize enzimin ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim çözeltisi, 50 °C, 60 °C ve 70 °C, 15, 30, 45 ve 60 dakika bekletildi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Herhangi bir ön işlem uygulanmamış enzimin aktivitesi %100 kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Arslan vd., 2004).

#### **2.2.4.9.7. İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı**

İmmobilize enzimin depolama kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4 °C de saklanan immobilize enzimlerden 24 saatte bir alınan örnekler kullanılarak 15 gün boyunca enzim aktivite tayinleri yapıldı. İlk gün ölçülen enzim aktivitesi %100 kabul edilerek sonuçlar değerlendirildi (Arıca vd., 2004).

#### **2.2.4.9.8. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi**

İmmobilize enzimin tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile alınan immobilize enzim örneği ile aktivite tayini yapıldı. İmmobilize enzim her aktivite ölçümünden sonra 50 mM pH 6,0 fosfat tamponuyla yıkandı ve tekrar aktivite tayini gerçekleştirildi. İlk ölçüm değeri %100 kabul edilerek sonuçlar değerlendirildi (Milani vd., 2015).



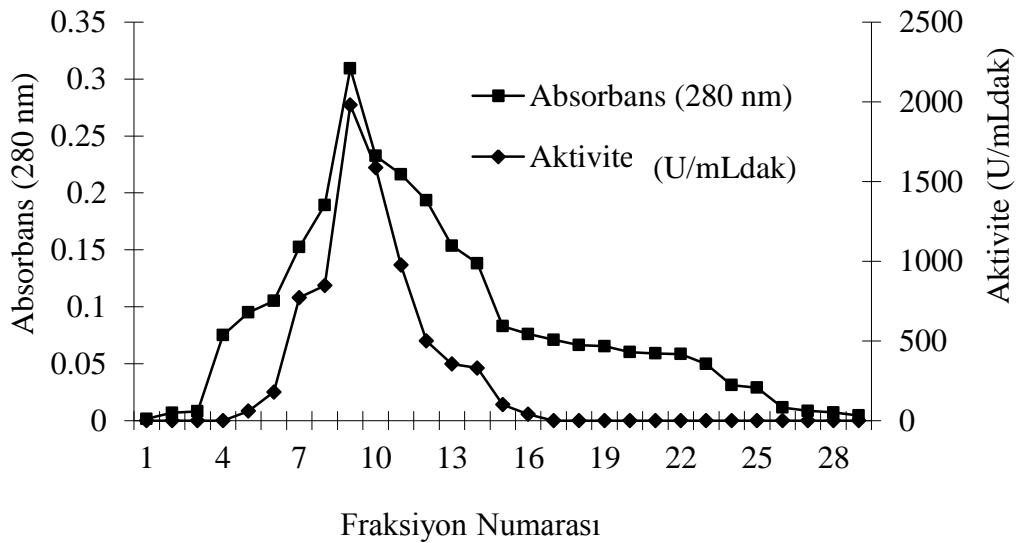
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Polifenol Oksidazın Afinitite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sepharose 4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit jeli sentezlenerek yapılan afinitite kromatografisi sonucu, toplanan elüatlerden oluşturulan fraksiyonlar için, 280 nm’de protein miktarı ve 496 nm’de 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. 1’den 29’e kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine gelen elüatlar 4’er mL halinde toplandı (Şekil 22). Toplam elüatlarda PFO aktivitesi en iyi olan fraksiyon saf enzim elüatı olarak belirlendi. Saf enzim elüatında, aseton çöktürmesi sonrası özütte ve ham ekstrak çözeltilerinde Bradford yöntemiyle toplam protein tayini yapılarak saflaştırma tablosu hazırlandı (Tablo 5).

**Tablo 5.** Ağşeftali’sinden (*Prunus persica* L.) saflaştırılan polifenol oksidaza ait saflaştırma tablosu.

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	50	4480	224000	3,74	187	1197,86	100	1
Aseton Çöktürmesi	10	9720	97200	0,49	4,9	19836,73	43,39	16,56
Afinitite	4	2040	8160	0,02	0,08	102000,00	3,64	85,15



**Şekil 22.** PFO'nun saflaştırılmasına ait afinitite kromatografisi grafiği.

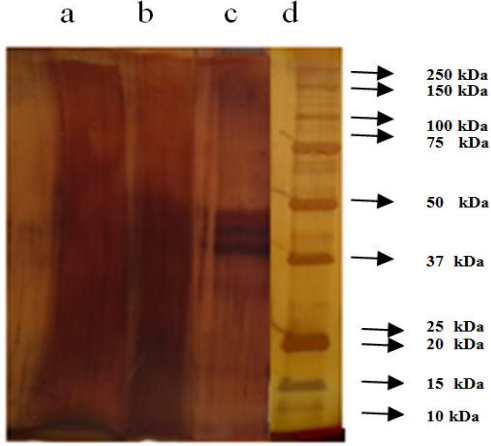
### 3.2. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Afinite kromatografisi sonucu elde edilen saf enzim elüatında, PFO'nun varlığı yapılan doğal elektrofözezele ortaya konuldu. Soğuk ortamda yapılan doğal elektrofözeze, jelin her iki tarafına saf enzim elüatı yüklendiği için, doğal elektrofözeze sonrasında jel ortadan ikiye bölündü. İkiye bölünen jelin, bir tarafı substrat boyama çözeltisi (24 mM L-DOPA) ve diğere tarafı ise Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisiyle boyandı. Oluşan bantlar jel görüntüleme cihazında kaydedildi (Şekil 23).

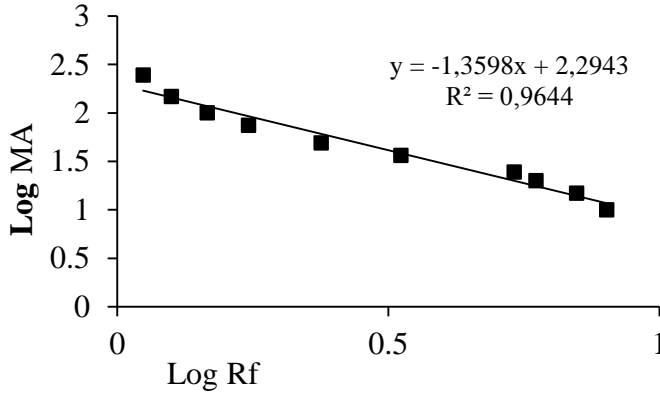


**Şekil 23.** Doğal-PAGE (a: Substrat boyama (24 mM L-DOPA), b: Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama).

Doğal elektrofözeze sonucunda, Şekil 23b'de Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama ile saf enzim elüatında tek bir protein olduğu ve bunun da Şekil 23a'da substrat boyamasıyla PFO'ya ait olduğu ortaya konuldu.



**Şekil 24.** SDS - PAGE (a: Ham enzim ekstraktı, b: Aseton çöktürmesi, c: Saf enzim, d: Protein standartı).



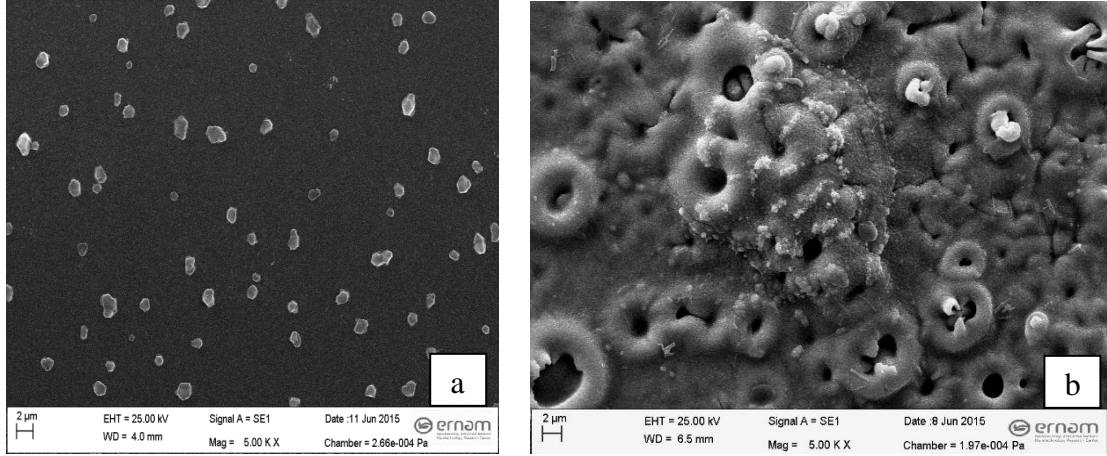
**Şekil 25.** Ağşeftali'sinden saflaştırılan PFO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.

SDS-PAGE sonucunda Ağşeftali'sinden saflaştırılan PFO'nun molekül ağırlığı log MA-R<sub>f</sub> grafiği çizilerek yaklaşık 41,0 ve 48,0 kDa ağırlığında iki band hesaplandı (Şekil 24, Şekil 25).

### 3.3. Polifenol Oksidaz Enziminin SnO<sub>2</sub>: Sb İnce Film Üzerine İmmobilizasyonu

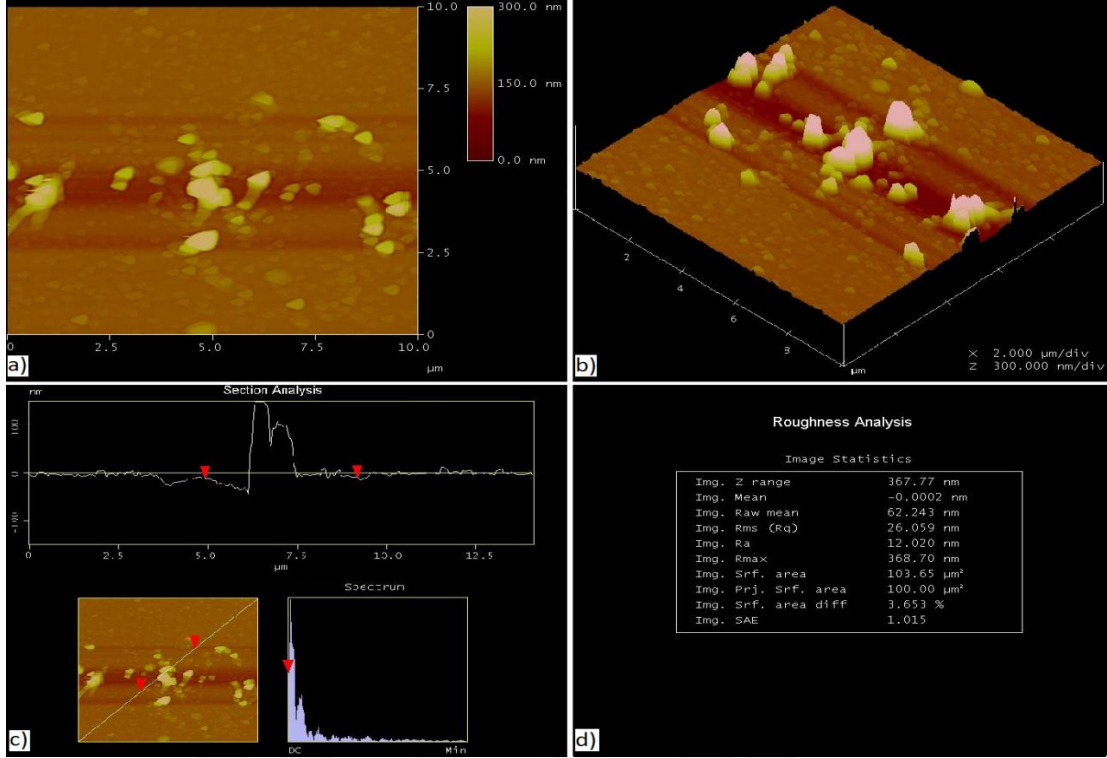
İmmobilizasyon işlemi 2.2.4.7. anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. İmmobilizasyon verimi iki farklı şekilde hesaplandı. İmmobilizasyon verimi immobilizasyon öncesi enzimin başlangıç aktivitesi ve immobilizasyon sonrası enzimin kalan toplam aktivitesine göre %23,75 olarak, immobilizasyon öncesi enzim çözeltisinde ve immobilizasyon sonrası yıkama çözeltilerinde toplam protein tayinleri yapılarak %32,50 olarak hesaplandı.



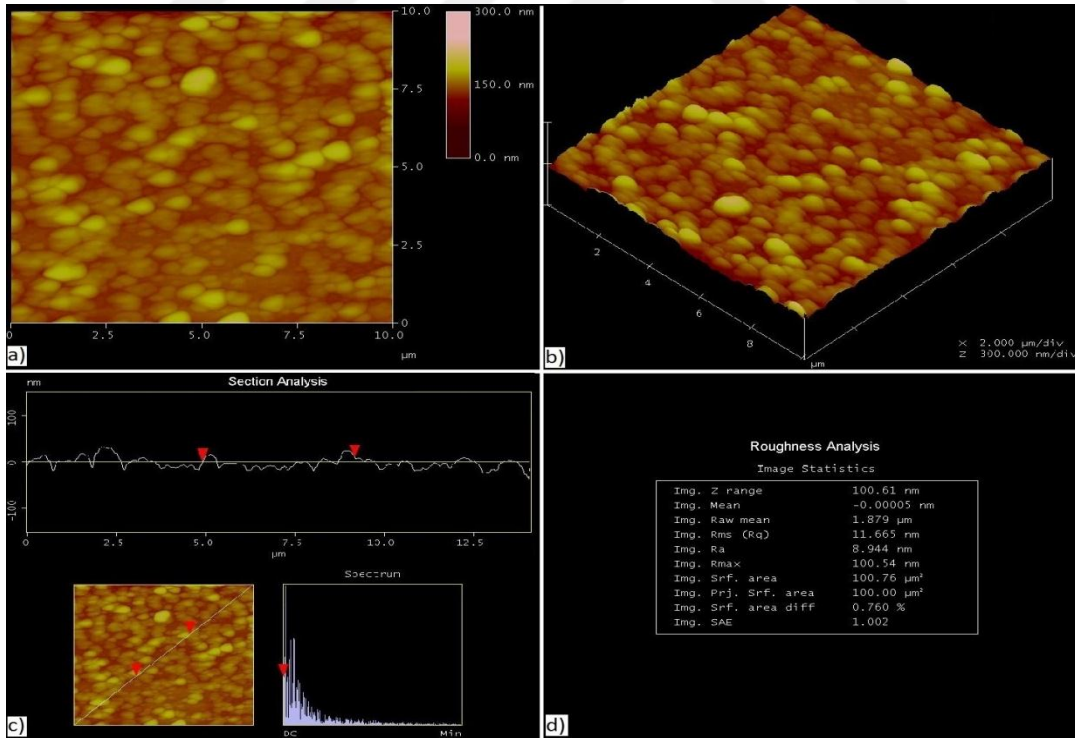


**Şekil 26.** SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin SEM görüntüsü a) SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzeyi b) PFO'nun immobilizasyonu sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzeyi.

Enzim immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzey morfolojisi SEM'de çekilen fotoğraflar Şekil 26a ve 26b'de gösterildi. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin ve enzim ile kaplanan SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin SEM fotoğraflarına bakıldığında ikisinin birbirinden çok farklı olduğu görüldü. İnce filmin doğal görüntüsü tanecikli yapıda olduğu ve immobilizasyon sonrası ince filmin tanecikli yapısı kaybolduğu ve küresel yapıların oluştuğu görüldü.

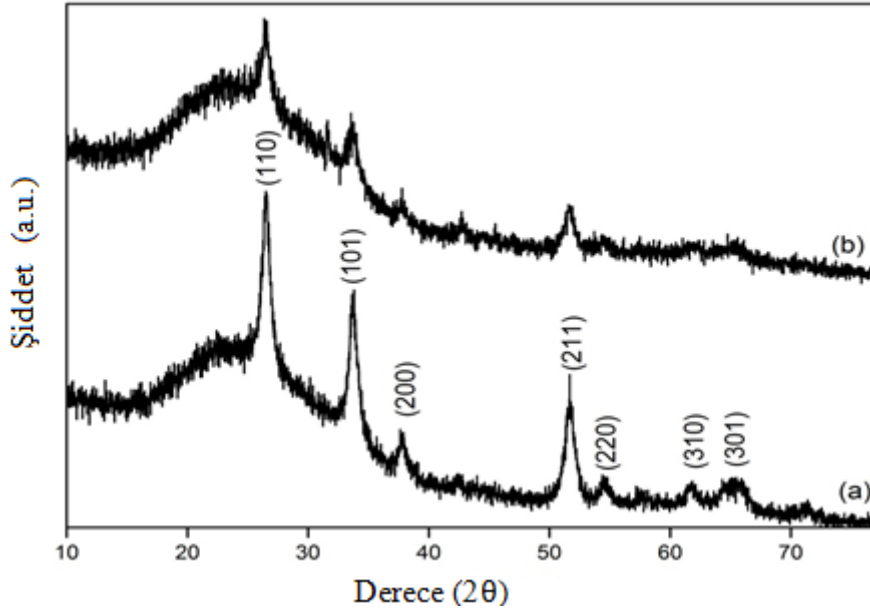


Şekil 27. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin AFM görüntüsü a) 2D grafikler b) 3D grafikler c) Kesit analizi d) Pürüzlülük analizi.



Şekil 28. PFO'nun immobilizasyonu sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin AFM görüntüsü a) 2D grafikler b) 3D grafikler c) Kesit analizi d) Pürüzlülük analizi

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin AFM görüntüsü Şekil 27 ve 28 verildi. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzeyi homojen olmadığı ve film yüzeyinin orta kısmında yığınların olduğu tespit edildi. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin ortalama yüzey pürüzlülük (RMS) ve aritmetik ortalama sapma (Ra) değerleri sırasıyla 26.059 nm ve 12.020 nm olarak bulundu. Enzim immobilize edilen SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin AFM görüntüsünde yüzeyinin daha homojen olduğu ve yığınların olmadığı görüldü. İmmobilizasyon sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin RMS ve Ra değerleri sırasıyla 11.665 nm ve 8.944 nm olarak bulundu. Bu sonuç SnO<sub>2</sub>: Sb ince film üzerine enzim immobilizasyonunun gerçekleştiğini gösterdi.



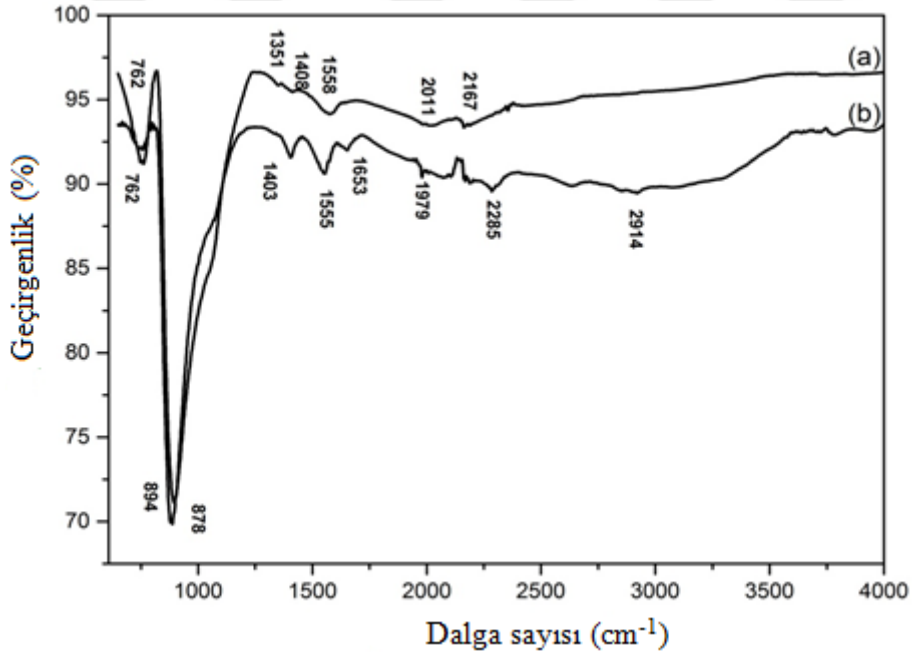
**Şekil 29.** PFO immobilizasyonu öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin XRD analizi  
a) SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin XRD analizi b) PFO'nun immobilizasyonu sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin XRD analizi.

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yapısal özellikleri XRD analizi ile incelendi. SnO<sub>2</sub> tetragonal yapısı (JCPDS41-1445) Şekil 29'da verilen XRD grafiğiyle gözlemlendi. SnO, Sn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi ikinci yapı pikleri tespit edilmedi. Sb elementinin katkılanmasıyla SnO<sub>2</sub> latisi homojen dağılmış sonucuna varılabilir (Moholkar vd., 2008). Ayrıca, SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin üzerine enzim immobilizasyonu ile SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin kristal yapısının azaldığı görüldü (Abacı ve Yıldız, 2009).

Kristal boyutu ortalaması Scherrer formülü kullanılarak en yüksek pikler için hesaplandı (Kocyigit vd., 2012).

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Bu denklemde D nanopartikülün kristal boyutudur.  $\beta$  maksimum pikin yarı genişlik değeri ( FWHM)'nin radian cinsinden değerine eşittir.  $\theta$  Bragg pik açısıdır. Bu formüle göre SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin D değeri 12,30 nm iken SnO<sub>2</sub>: Sb ince film üzerine enzim immobilizasyonuna ait D değeri 22,02 nm'dir. İmmobilizasyon işlemiyle D değeri artmıştır.

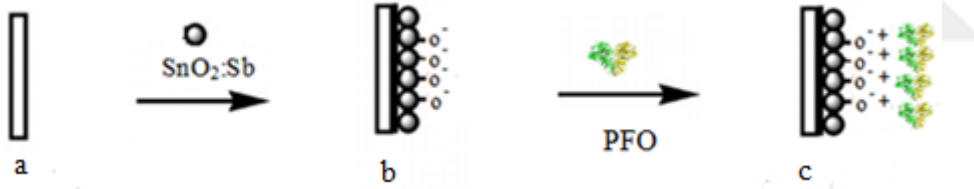


**Şekil 30.** PFO immobilizasyonu öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filminin FTIR spektrumu a) SnO<sub>2</sub>: Sb ince film b) PFO'nun immobilizasyonu sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmi.

FTIR spektroskopisi ölçümleri, yapıda meydana gelen bağ yapılarını, titreşimler sayesinde tespit etmektedir. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin FTIR spektrumları 650-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında analiz edildi. Şekil 30a ve 30b' deki 762, 878, and ~1408 cm<sup>-1</sup> bandlar sırasıyla Sn-O-Sn, Sn-OH and SnO<sub>2</sub> lattice gerilme titreşimlerine aittir (Zhang vd., 2010). SnO<sub>2</sub>: Sb ince film piklerine ek olarak 1558-2167 cm<sup>-1</sup> arasında değişen bandlar, kalıntı su ve alkol -OH grupları karşılık gelir (Van Tran

vd., 2010). Şekil 30a ile 30b karşılaştırıldığında  $1558\text{ cm}^{-1}$  geniş band kaybolduğu ve  $1555, 1653\text{ cm}^{-1}$  bandların oluştuğu görüldü. Şekil 30b'de  $1653$  ve  $1555\text{ cm}^{-1}$  bandlar sırasıyla, protein molekülünün eklenmesinden dolayı amid I bandına ait C=O gerilme titreşimlerine ve protein omurgasındaki amid II bağına ait N-H bağı ve C-N gerilme titreşimlerine aittir (Gu vd., 2009).  $2914\text{ cm}^{-1}$  geniş band C-H gerilme titreşimlerine atfedilebilir (John Kennedy vd., 2007).

Fiziksel metod ile immobilizasyon işlemlerinde protein yüzeye elektrostatik, hidrofobik/hidrofilik ve van der waals gibi çeşitli etkileşimlerle tutunurlar (Elağlı vd., 2014). İmmobilizasyon öncesi ve sonrası FTIR analizi incelendiğinde, piklerde genişlemeler ve kaymalar olduğu, bu piklerdeki farklılaşmanın  $\text{SnO}_2$ : Sb ince film ile enzim arasındaki elektrostatik, hidrofobik/hidrofilik ve van der waals gibi çeşitli etkileşimlerle iç çevrenin değiştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar bize adsorpsiyonla immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. PFO'nun  $\text{SnO}_2$ : Sb ince filme immobilizasyonun şematik görüntüsü Şekil 31'de verilmiştir.



**Şekil 31.** PFO'nun  $\text{SnO}_2$ : Sb ince filmine immobilizasyonun şematik gösterimi a) Mikroskopik camlar b)  $\text{SnO}_2$ : Sb ince film c)  $\text{SnO}_2$ : Sb ince filme immobilize edilen PFO.

#### 3.4. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Substratların Etkisi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini incelemek amacı ile 4-metil katekol, katekol ve L-Tirosin substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve %bağlı aktiviteleri hesaplandı.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisi incelendiğinde; aktivitenin 4-metil katekol varlığında en yüksek olduğu, katekol ve L-Tirosin varlığında 4-metil katekole göre daha düşük olduğu tespit edildi (Tablo 6). Bu

sonuçlar doğrultusunda gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol substratı kullanıldı.

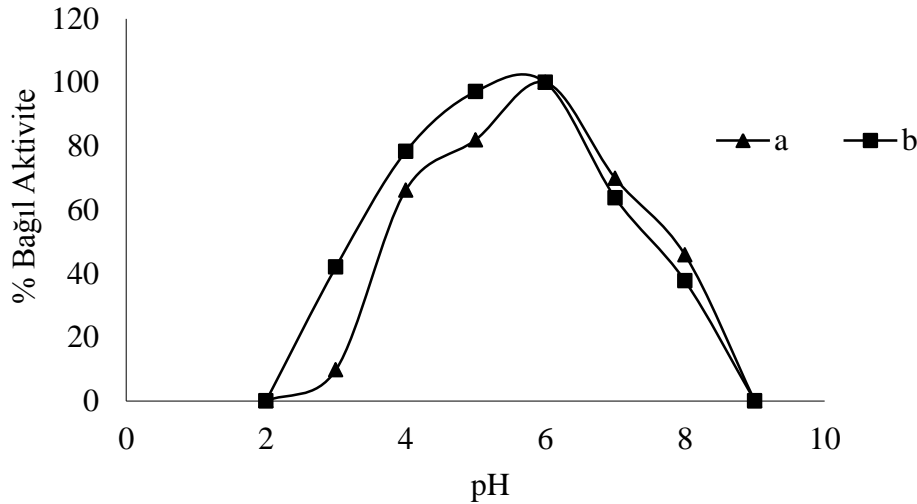
**Tablo 6.** Serbest ve immobilize enzimin substrat zgünlüğü.

Substrat adı	Serbest PFO bağıl aktivite (%)	İmmobilize PFO bağıl aktivite (%)
4-Metil katekol	100,00	100,00
Katekol	75,70	79,72
L-Tirosin	26,16	56,42

### 3.5. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek amacı ile farklı pH 2,0-9,0 değerleri arasında tamponları kullanılmasıyla ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı ve pH-%bağıl aktivite grafiği çizildi.

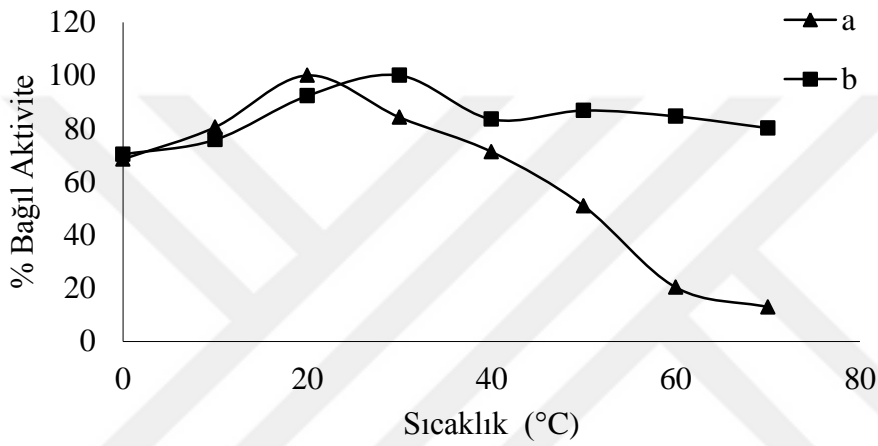
şekil 32'de verilen grafiklerden yararlanarak serbest ve immobilize enzimin fosfat tamponunun kullanıldığı pH 6,0 değerinde en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi ve gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında pH'sı 6,0 olan fosfat tamponu kullanıldı.



**şekil 32.** Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi a) Serbest enzim b) İmmobilize enzim

### 3.6. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

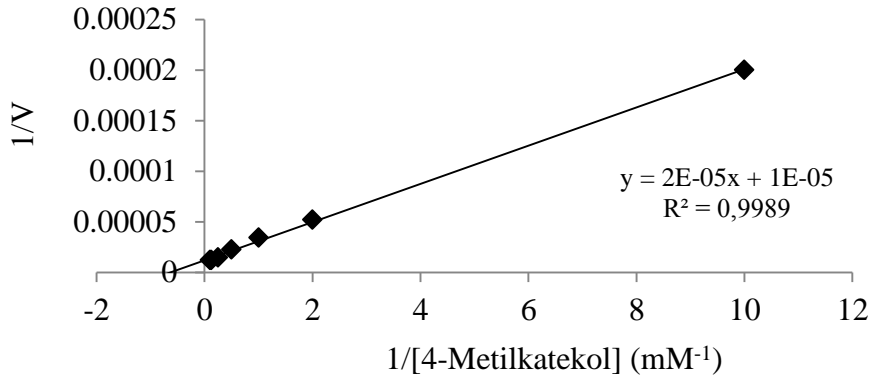
Serbest ve immobilize enzim aktivitesine ait optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için 0-70 °C aralığında 10'ar derecelik artışlarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği çizildi (Şekil 33). Elde edilen grafiklere göre, serbest ve immobilize enzim aktivitesine ait optimum sıcaklıklar sırasıyla 20 °C ve 30 °C olarak belirlendi.



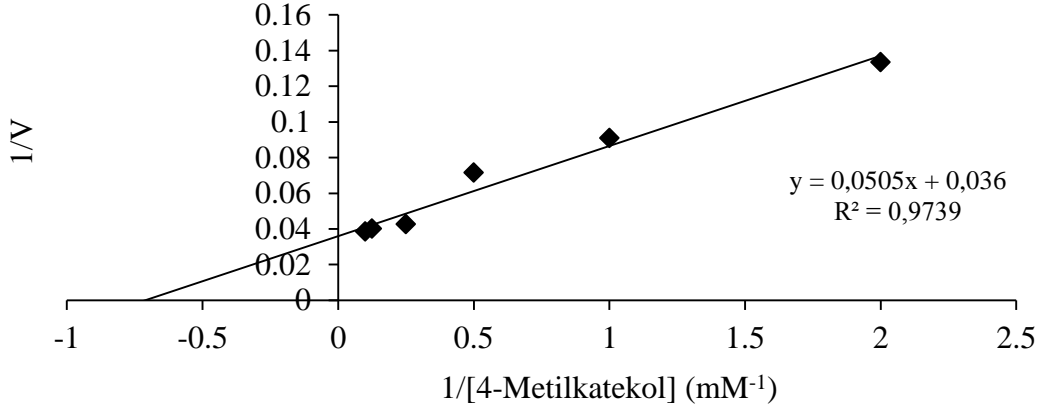
Şekil 33. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi a) Serbest enzim b) İmmobilize enzim.

### 3.7. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

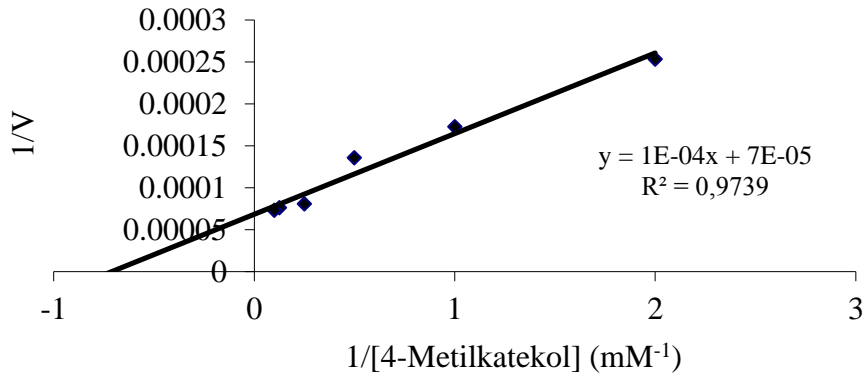
Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak, kinetik verilerin belirlenmesi amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 34a, 34b ve 34c). Serbest enzimin 4-metil katekol substratı varlığında  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 2 mM ve 100.000 U/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 34a), İmmobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri iki farklı şekilde hesaplandı. Bu sonuçlara göre Şekil 34b'de  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 1,4 Mm ve 27,78 U/dak.cm<sup>2</sup> olarak, Şekil 34c ise  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 1,4 mM ve 14.285,71 U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 34a. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 34b. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği (U/dak.cm<sup>2</sup>).



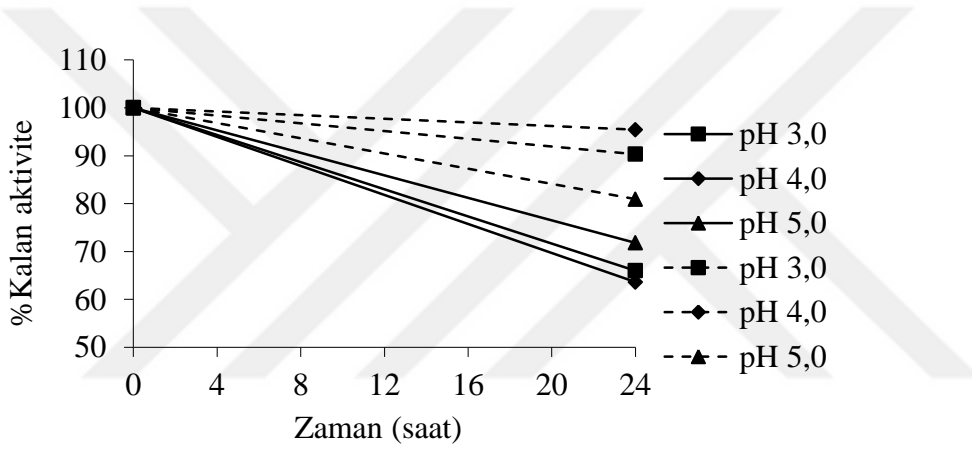
Şekil 34c. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği (U/mg protein).



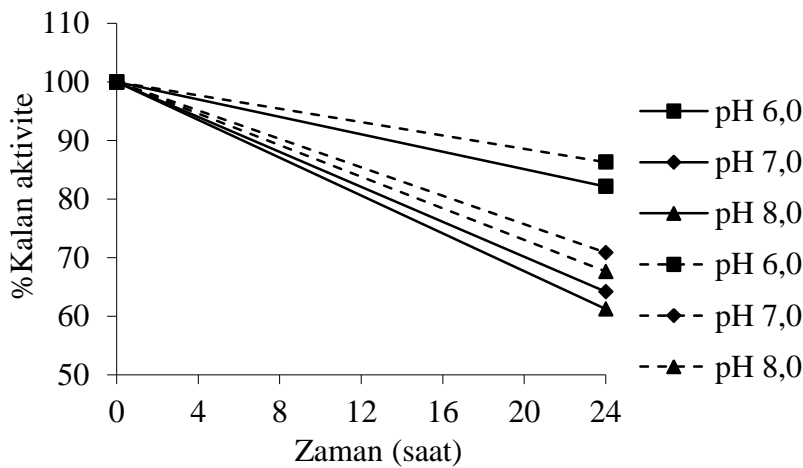
### 3.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzim ile farklı pH'lardaki (3,0-8,0) tamponlar karıştırıldı. 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra enzimlerden alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Başlangıç ve 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen aktiviteler karşılaştırılarak pH-%kalan aktivite grafikleri çizildi (Şekil 35).

Şekil 35a ve 35b'de serbest ve immobilize enzimin incelenen pH değerlerinde farklı aktivite profilleri sergilediği görüldü. İmmobilize enzim özellikle asidik koşullarda serbest enzimden daha kararlı bir profil sergiledi.



Şekil 35a. pH Kararlılığı a) Serbest enzim (düz çizgi) b) İmmobilize enzim (kesikli çizgi).

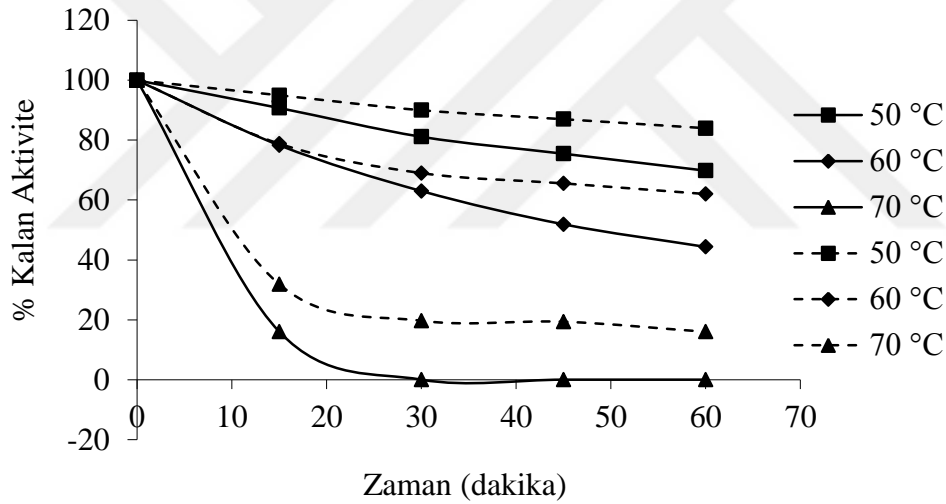


Şekil 35b. pH Kararlılığı a) Serbest enzim (düz çizgi) b) İmmobilize enzim (kesikli çizgi).

### 3.9. İmmobilize Enzimin Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzime ait ısıl kararlılık profilini belirlemek amacıyla saf enzim eluatu ve immobilize enzim, 15, 30, 45, 60 dakika zaman dilimleri ve 50-70 °C'lik (10 °C'lik artışlar) sıcaklık aralıklarında su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Serbest ve immobilize enzimler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. %kalan aktiviteler herhangi bir ön işlem uygulanmamış saf enzim eluatu ve immobilize enzim optimum şartlarda belirlenen aktivite değerleriyle karşılaştırılarak hesaplandı ve grafikler çizildi ( Şekil 36).

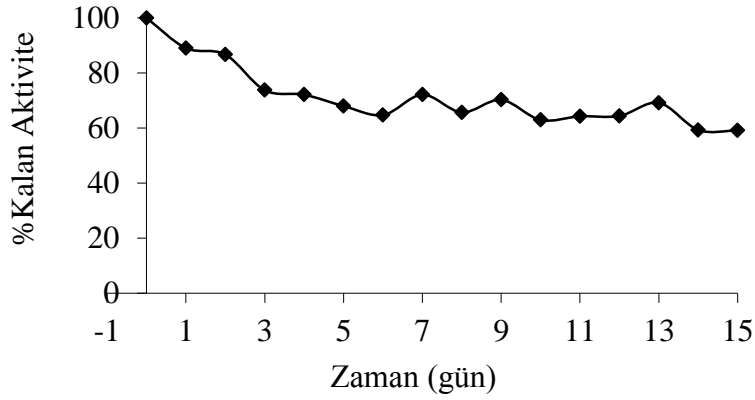
Elde edilen sonuçlarda immobilize enzimin ısıl kararlılığı serbest enzimininkinde daha iyi olduğu görüldü.



Şekil 36. Isıl kararlılığı a) Serbest enzimin (düz çizgi) b) İmmobilize enzimin (kesikli çizgi).

### 3.10. İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı

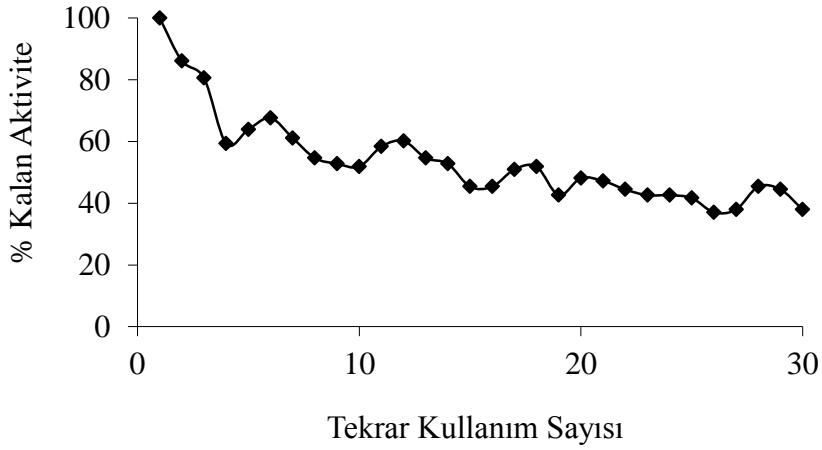
Enzim immobilizasyonunda depolama kararlılığı önemli parametrelerdendir. İmmobilize enzimin depolama kararlılığı fosfat tamponunda (50 mM, pH 6,0) 4 °C de 1 gün arayla 15 gün boyunca ölçüldü (Şekil 37). Sonuç olarak immobilize enzimin 15 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %59,13 koruduğu görüldü.



**Şekil 37.** İmmobilize enzimin depolama kararlılığı.

### 3.11. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Bir enzimin yeniden kullanılabilirliği endüstriyel uygulamalar için çok önemlidir. İmmobilize enzim 3 ardışık operasyon sonrasında ilk aktivitesinin %80,56'sını koruduğu ve 18 kere tekrarlanmadan sonra ise enzim aktivitesinin yaklaşık %50 koruduğu görüldü (Şekil 38).



**Şekil 38.** İmmobilize enzimin tekrarlanabilirliği.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışmada Iğdır ilinde yetişen Ağşeftali'sinden (*Prunus persica* L.) PFO afinite kromatografisi ile saflaştırılarak SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmine adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi. Immobilize enzim öncesi ve sonrası ince film yüzey yapısı SEM, AFM, FTIR ve XRD analizleri yapılarak değerlendirildi. Serbest ve immobilize enzimin substrat özgünlükleri, optimum pH'ları, optimum sıcaklıkları, K<sub>m</sub> ve V<sub>maks</sub> değerleri, pH kararlılıkları ve ısıl kararlılıkları belirlendi. Ayrıca immobilize enzimin depolama kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği araştırıldı.

Saflaştırma işleminde Arslan vd. (2004) jel sentezleme yöntemi kullanılarak Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli hazırlandı. Sentezlenen afinite jeli kullanılarak PFO Ağşeftali'sinden (*Prunus persica* L.) afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Ham enzim ekstraktının spesifik aktivitesi 1.197,86 U/mg protein olup, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 102.000,00 U/mg protein olarak bulundu. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde PFO'nun Ağşeftali'sinden (*Prunus persica* L.) %3,64 verimle 85,15 kat saflaştırıldığı belirlendi. Benzer çalışmalarda; PFO, afinite kromatografisi yöntemi ile Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak, dut meyvesinden (*Morus alba* L.) 74,20 kat (Arslan vd., 2004), *Boletus erythropus* mantarından 28,5 kat (Özel vd., 2010), *Lactarius piperatus* L. mantarından 13,9 kat (Öz vd., 2013), fesleğenden (*Ocimum basilicum* L.) 11,5 kat (Dogan vd., 2005), *Macrolepiota gracilentata* mantarından 65,3 kat (Kolcuoğlu, 2012) ve yaban armudundan (*Pyrus elaeagrifolia*) 31,50 kat (Ülker Yerlitürk vd., 2008) saflaştırıldığı rapor edilmiştir.

Ağşeftali'sinden (*Prunus persica* L.) afinite kromatografisiyle saflaştırılan PFO için doğal-PAGE yapıldı (Şekil 23). Jelin iki tarafına saf enzim elüatı yüklendi ve doğal-PAGE bittikten sonra jel ikiye bölündü. Jelin bir tarafı substrat boyama çözeltisi (L-DOPA) ve diğer tarafı ise Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama ile boyandı. Her iki boyamada da gözlenen tek bandın varlığı ile enzimin saflığı tespit edildi (Şekil 23).

SDS-PAGE'de ham enzim ekstraktı, aseton çöktürmesi, saf enzim ile birlikte molekül ağırlığı bilinen standart protein numuneleri aynı zamanda birlikte yürütüldü

(Şekil 24). Log MA-Rf standart grafiği çizildi (Şekil 25). Çizilen bu grafikten saf enzim için Rf değeri hesaplandı. Saf enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 41,0 ve 48,0 kDa olarak iki alt birimli belirlendi (Şekil 25). Literatürde PFO'nun SDS-PAGE sonucu molekül ağırlığı, *Malpighia glabara* L. PFO'su 52,0 ve 38,0 kDa olarak iki alt birimli (Kumar vd., 2008), kestane PFO'sunun molekül ağırlığı 32,5 kDa (Gong vd., 2015) ve *Lactarius piperatus* PFO'sunun molekül ağırlığı 40,0 kDa olarak (Öz vd., 2013) bildirilmiştir.

Enzimler endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu katalizörleri endüstri için daha çekici hale getirmek ve daha kapsamlı kullanmak için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır (Telefoncu, 1997). Bu çalışmada, enzim immobilizasyonu için destek materyali olarak SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmi kullanıldı. Immobilizasyon verimi iki farklı şekilde hesaplandı. Immobilizasyon verimi immobilizasyon öncesi enzimin başlangıç aktivitesi ve immobilizasyon sonrası enzimin kalan toplam aktivitesine göre %23,75 olarak, immobilizasyon öncesi enzim çözeltisinde ve immobilizasyon sonrası yıkama çözeltilerinde toplam protein tayinleri yapılarak %32,50 olarak hesaplandı. Bu iki verim arasındaki farkın protein denatürasyonundan kaynaklandığı sonucuna varıldı. Immobilizasyon öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzey morfolojisindeki değişimler SEM ve AFM ile analiz edildi (Şekil 26, Şekil 27 ve Şekil 28). SEM analizi sonucu immobilizasyon öncesi ve sonrası farklılıklar olduğu tespit edildi. Immobilizasyon öncesi SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzeyinde tanecikli yapılar olduğu immobilizasyon sonrası yapıda ise tanecikli yapılar kaybolup küresel yapıların oluştuğu görüldü (Şekil 26). Literatürde daha önce yapılan immobilizasyon çalışmalarında yüzey morfolojisindeki değişimler SEM ile analiz edildiği rapor edilmiştir (Arıca vd., 2004; Büyükbayram vd., 2006; John Kennedy vd., 2007; Çil vd., 2007; Dinçer vd., 2012). Immobilizasyon öncesi ve sonrası AFM analiz yapıldığında yine yapılar da değişim görüldü (Şekil 27 ve Şekil 28). AFM analizi yapılan SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin RMS değeri 26,059 nm ve Ra değeri 12,020 nm olarak bulundu (Şekil 27). Immobilizasyon sonrası ise RMS değeri 11,665 nm ve Ra değeri 8,944 nm olarak tespit edildi (Şekil 28). Bu sonuçlar PFO'nun immobilizasyonu yüzeyi daha pürüzsüz yaptığı tespit edildi. Literatürde daha önce yapılan enzim immobilizasyonu çalışmalarında immobilize yapıların yüzey değişimlerini incelemek için AFM kullanıldığı ve benzer sonuçlara

varıldığı görülmüştür (Wang vd., 2002; Bal, 2012; Karpuz, 2013). SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin kristal yapısı incelemek amacıyla immobilizasyon öncesi ve sonrası XRD analizi yapıldı (Şekil 29). Yapılan XRD analizi sonucunda Sb elementinin katkılanmasıyla SnO<sub>2</sub> latisi homojen dağılmış olduğu sonucuna varıldı (Moholkar vd., 2008). Ayrıca immobilizasyon öncesi ve sonrası piklerde belirgin farklılıklar olduğu görüldü. İmmobilizasyon sonrası pik şiddetlerinde belirgin azalmanın yüzeye tutunan enzimin amorf yapısından kaynaklandığı kanısına varıldı (Abacı ve Yıldız, 2009). Ayrıca XRD analizi ile D nanopartikülün kristal boyutu hesaplandı. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin D değeri 12,30 nm iken SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin üzerine enzim immobilizasyonuna ait D değeri 22,02 nm olarak hesaplandı. D değerinin enzim immobilizasyonu ile arttığı sonucuna varıldı. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin yüzeyinde meydana gelen bağ yapıları FTIR analizi ile belirlendi (Şekil 30). Yapılan analiz sonucunda Şekil 30'da 762, 878, and ~1408 cm<sup>-1</sup> bandlar sırasıyla Sn-O-Sn, Sn-OH and SnO<sub>2</sub> lattice gerilme titreşimlerine ait olduğu görüldü (Zhang vd., 2010). Bu sonuç istenilen SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmin oluştuğunu göstermektedir. İmmobilizasyon sonrası 1653 ve 1555 cm<sup>-1</sup> bandlar sırasıyla, protein molekülünün eklenmesinden dolayı amid I bandına ait C=O gerilme titreşimlerine ve protein omurgasındaki amid II bağına ait N-H bağı ve C-N gerilme titreşimlerine ait olduğu belirlendi (Gu vd., 2009). SEM, AFM, XRD ve FTIR analiz sonuçları incelendiğinde, Ağşetali'sinden (*Prunus persica* L.) saflaştırılan PFO'nun SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmine immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü.

Serbest ve immobilize enzimin substrat özgünlüğünü incelemek amacıyla 4-metil katekol, katekol, L-Tirosin substratları kullanıldı (Tablo 6). Bu substratlar için serbest ve immobilize PFO'nun en çok aktivite gösterdiği substrattan en az aktivite gösterdiği substrata doğru 4-metil katekol, katekol, L-Tirosin olduğu tespit edildi. Serbest enzim L-Tirosin substratı ile enzim aktivitesi gösterdi (Bağıl aktivite %26,16). Ancak serbest enzim 4-metil katekol ve katekol için daha yüksek enzim aktivite gösterdi. İmmobilize enzim de benzer substrat özgünlüğü profili gösterdi. Bu sonuçlara göre serbest ve immobilize enzimin difenolaz aktivitesinin monofenolaz aktivitesinden daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak PFO'nun immobilizasyonu ile enzimin L-Tirosin oksidasyonunu katalizleme potansiyelinin arttığı belirlendi. Yüksek ticari değerine sahip L-DOPA'nın enzimatik yolla L-Tirosinden sentezi ticari öneme sahiptir (Ates vd.,

2007). Çalışılan PFO'nun immobilizasyonu sonucu L-Tirosine etkisinin artması immobilize Ağşeftalisi (*Prunus persica* L.) PFO'sunun L-DOPA üretimi için kullanılabilir olabileceğini gösterdi. Köse tarafından yapılan bir çalışmada, PFO'yu Sakarya İlinde yetişen roka (*Eruca vesicaria*) bitkisinden karakterize etmiş, bu enzimi Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamit ve poliakrilamit destek materyallerine immobilize etmiş ve substrat özgünlüğünü incelemiştir. Serbest ve immobilize enzim için en iyi substratın 4- metil katekol olduğunu rapor etmiştir (Köse, 2010). Literatür de PFO için substrat özgünlüğü incelendiğinde *Macrolepiota mastoid* mantarı PFO'sunun (Kolcuoğlu vd., 2007), *Russula delica* (*Russulaceae*) PFO'sunun (Keskin, 2009), çağla badem (*Prunus dulcis*) bitki PFO'sunun (Güngör, 2008), *Lactarius salmonicolor* mantar PFO'sunun (Dedeoğlu, 2009) ve *Ocimum basilicum* L. PFO'sunun (Turan, 2005) en iyi substratının 4-metil katekol olduğu bildirilmiştir.

PFO'nu optimum pH'sı enzimin saflaştırma basamağına, substratına, enzimin kaynağına göre değişiklik gösterir. Genellikle PFO için optimum pH aralığı 4,0-7,0 arasındadır (Beena ve Gowda, 2000; Kocatürk, 2008). Immobilize enzimler serbest enzimlere göre ya daha geniş pH aralığında ya da aynı pH aralığında daha yüksek enzim aktivite gösterirler (Dinçer vd., 2012). Serbest ve immobilize enzimin optimum pH'sı incelendiğinde, immobilizasyon öncesi ve sonrası enzimlerin en yüksek aktiviteyi pH 6,0 gösterdiği tespit edildi (Şekil 32). Şekil 32'de görüldüğü gibi immobilize enzimin serbest enzime göre aktivitesi asidik pH'da daha yüksektir. Khan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, patates (*Solanum tuberosum*) PFO'sunu Celite 545 ile immobilize etmişler, immobilizasyon öncesi ve sonrası PFO'nun optimum pH'sını 6,0 bulmuşlar, pH profiline bakıldığında immobilize enzimin asidik pH'da enzim aktivitesinin serbest enzime göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Khan vd., 2006). Merck firmasından temin edilen ticari mantar tirozinaz (T3824) jelatin filme hapsolma ve adsorpsiyon yöntemleriyle immobilize edilmiştir. Serbest enzim ve jelatine hapsolma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin optimum pH'sı 6,0, jelatine adsorsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzim optimum pH'sı 5,5 olarak bulunmuştur (Tetik, 2015). Kitosan-kil kompozit boncukları ile immobilize edilen mantar tirozinazının (T7755) immobilizasyon öncesi ve sonrası optimum pH'sı değişmemiş ve pH 7,0 olarak bulunmuştur (Dinçer vd., 2012). *Eruca vesicaria* PFO'su Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat poliakrilamit ve poliakrilamit ile hapsolma yöntemiyle immobilize

edilmiş. Serbest ve 4 farklı malzeme ile immobilizasyon sonrası enzimlerin optimum pH'sı 5,0 olarak bulunmuştur (Köse, 2010). PFO'nun iletken kopolimer ile immobilizasyon çalışmasında serbest enzim optimum pH'sı 5,0 iken immobilize enzim pH'sı 7,0 olarak bulunmuştur (Böyükbayram vd., 2006). *Cydonia Oblonga* PFO serbest enzim optimum pH'sı 8,0 iken (Yağar ve Sarıoğlu, 2002a), kil ile immobilizasyonunda enziminin optimum pH'sı 9,0 olarak bulunmuştur (Yağar ve Sarıoğlu, 2002b).

Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı incelendiğinde sırasıyla 20 °C ve 30 °C olarak belirlendi (Şekil 33). İmmobilizasyon sonrası enzimin optimum sıcaklığı arttı. Ayrıca immobilize enzim 50 °C, 60 °C ve 70 °C'lerde serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdi (Şekil 33). Literatürdeki birçok çalışmada da immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek optimum sıcaklık gösterdiği bildirilmiştir. Merck firmasından temin edilen ticari mantar tirozinazı (T3824) jelatin filme hapsolma ve adsorpsiyon yöntemleriyle immobilize edilmiştir. Serbest ve jelatin filme hapsolma ve adsorpsiyon ile immobilizasyon sonrası enzimlerin optimum sıcaklıkları sırasıyla 25 °C, 30 °C ve 30 °C olarak bulunmuştur (Tetik, 2015). *Eruca vesicaria* PFO'su Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamit ve poliakrilamit ile hapsolma yöntemiyle immobilize edilmiştir. Serbest enzim, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamit ve poliakrilamit ile immobilize edilen enzim için optimum sıcaklık 20 °C iken Ca-aljinat ile immobilize edilmiş enzimin sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuştur (Köse, 2010). Kırılç ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Sigma firmasından temin edilen PFO kopolimerlere immobilize edilmiştir. Serbest enzim ve polipirol elektroduna immobilize edilen enzimin (PPy/PFO) optimum sıcaklığı 40 °C, pirol ile mentil grubunun kopolimerasyonu ile elde edilen elektroda immobilize edilen enzimin ((MM/PPy/PFO) optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur (Kırılç vd., 2003). Sigma firmasından temin edilen ticari mantar tirozinazı (T7755) kitosan-kile immobilize edilmiştir. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 25-30 °C arasında ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı 25 °C olarak bulunmuştur (Dinçer vd., 2012). *Cydonia oblonga*'dan PFO kısmi olarak saflaştırılmış ve bentonite adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Serbest enzim optimum sıcaklığı 40 °C (Yağar ve Sağıroğlu, 2002a), immobilize enzimin optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur (Yağar ve Sağıroğlu, 2002b). Sigma firmasından temin edilen ticari mantar PFO'su karboksimetilselulaz



hidrojel boncuklarına immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı sırasıyla 40 °C ve 45 °C olarak bulunmuştur (Arıca, 2000).

Serbest enzimin 4-metil katekol substratı varlığında  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 2 mM ve 100.000 U/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 34a). İmmobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri iki farklı şekilde hesaplandı. Ve bu sonuçlara göre Şekil 34b’de  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 1,4 mM olarak hesaplanırken ve 27,78 U/dak.cm<sup>2</sup> olarak, Şekil 34c ise  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 1,4 mM ve 14.285,71 U/mg protein olarak hesaplandı.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir.  $K_m$  değeri ne kadar küçük ise enzimin substrata olan ilgisinin o kadar büyük olduğunu gösterir. Katı destek maddesi üzerine yapılan immobilizasyon işlemlerinde  $K_m$  değeri genellikle artar. Literatürde immobilizasyon sonrası enzimin substrata olan ilgisi artarken  $V_{maks}$  değerinin genelde azaldığı rapor edilmiştir (Örnek Acar, 2009; Dinçer vd., 2012). Ağşeftalisi PFO’sunun immobilizasyon öncesi ve sonrası  $K_m$  değeri birbirine yakın olarak (*Prunus persica* L.) bulundu. İmmobilizasyon sonrası enzimin substrata olan ilgisinde azda olsa bir artış gözlemlendi. Bu sonuç için immobilizasyon işlemiyle enzimde oluşan yapısal değişikliklerin aktif merkezi daha uygun bir konuma getirdiğini söyleyebiliriz (Aytar ve Bakır, 2008). PFO’nun 4- metil katekol varlığında  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri incelendiğinde, *Boletus erythropus*’den saflaştırılan PFO için 2,8 mM ve 1.430 U/mg protein olarak bulunmuştur (Özel vd., 2010). *Cydonia oblonga*’dan PFO kısmi olarak saflaştırılmış ve enzim bentonite adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzim için  $K_m$  değerleri 7,5 mM ve 7,6 mM olarak bulunmuştur (Yağar ve Sağıroğlu, 2002a; Yağar ve Sağıroğlu, 2002b). Sigma firmasından temin edilen tirozinaz çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0,47±0,03 mM, 5,74±0,13 (U/mg) ve 0,28±0,03 mM, 5,70±0,22 (U/mg) olarak bulunmuştur (Aytar ve Bakır, 2008). Sigma firmasından temin edilen ticari PFO enzimi polipirol (PPy) ve iletken kopolimere (P(PSStPy-co-Py) immobilize edilmiştir. Serbest enzim  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0.14 mM ve 0.10 (µmol/dak.mL), enzimin pirol ile immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 17,0 mM ve 0,0064 (µmol/dak.elektrod), enzimin iletken kopolimere (P(PSStPy-co-Py) immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 23 mM ve 0,0064 (µmol/dak.elektrod) olarak bulunmuştur (Ekinci, 2006). Sigma firmasından temin edilen ticari mantar PFO’su

karboksimetilselulaz hidrojel boncuklarına immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0,62 mM, 1.890 (U/mg protein) ve 0,87 mM, 760 (U/mg protein) olarak bulunmuştur (Arıca, 2000). Sigma firmasından temin edilen PFO iletken kopolimere immobilize edilmiştir. Serbest enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 4,0 mM ve 11,2  $\mu\text{mol}/(\text{dak.mg protein})$ , enzimin PPy ile immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 62,0 mM ve 0,40  $\mu\text{mol}/(\text{dak.cm}^2)$ , enzimin MT1/PPy ile immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 74,0 mM ve 0,31  $\mu\text{mol}/(\text{dak.cm}^2)$ , enzimin MT2/PPy ile immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 88,0 mM ve 0,22  $\mu\text{mol}/(\text{dak.cm}^2)$ , enzimin MT3/PPy ile immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 100 mM ve 0,14  $\mu\text{mol}/(\text{dak.cm}^2)$  olarak bulunmuştur (Yıldız vd., 2006).

Serbest ve immobilize enzimin pH kararlılığı pH 3,0-8,0 aralığında 4 °C'de ve 24 saat inkübe edilerek belirlendi (Şekil 35). pH 6,0 değerinde serbest enzim aktivitesini %82,14 korurken immobilize enzim aktivitesini %86,3 koruduğu tespit edildi. Serbest enzim pH 7,0 değerinde enzim aktivitesini %60 üzerinde korurken immobilize enzim %70 üzerinde koruduğu görüldü. Immobilize enzimin serbest enzime göre asidik bölgede aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 35). Dinçer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından temin edilen ticari mantar tirozinazı (T7755) kitosan-kile immobilize edilmiştir. pH 4,5-8,0 aralığında serbest ve immobilize enzimin pH kararlılığı incelenmiş ve immobilize enzimin serbest enzime göre asidik bölgede aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Dinçer vd., 2012).

Serbest ve immobilize enzimin 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de 15, 30, 45, 60 dakikalık zaman aralıklarında ısıl kararlılığı incelendi (Şekil 36). Serbest enzimin 50 °C'de 60 dakika sonunda aktivitesini %70 koruduğu, 60 °C'de 60 dakika sonunda aktivitesini %44 koruduğu ve 70 °C'de 15 dakikada aktivitesinin yaklaşık %16 koruduğu 30 dakikada ise aktivitesini tamamen kaybettiği görüldü (Şekil 36). Immobilize enzimin 50 °C 60 dakika sonunda aktivitesini %84 koruduğu, 60 °C'de 60 dakika sonunda aktivitesini %62 koruduğu ve 70 °C'de 15 dakika sonunda aktivitesini %32, 30 dakika sonunda aktivitesini %20, 45 dakika sonunda aktivitesini %19, 60 dakikada sonunda aktivitesini %16 koruduğu görüldü (Şekil 36). Immobilize enzimin serbest enzime göre daha iyi bir ısıl kararlılık sergilediği tespit edildi. Immobilize enzimin daha yüksek ısıl stabilitesi, yüksek sıcaklıklarda konformasyonel denatürasyon önlenmesi yoluyla

enzimin stabilizasyonuna atfedilebilir. Bu sonuç enzimin endüstride kullanımını açısından önemlidir. Sigma-Aldrich firmasından temin edilen ticari mantar tirozinazın (T7755) kitosan-kile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin ısı kararlılıkları 40 °C altındaki sıcaklıklarda çok değişmemiş ve aktiviteleri %100 korunmuştur. Serbest enzim 40 °C’de 60 dakika sonunda aktivitesini %54 koruduğu, immobilize enzimin 40 °C’de 60 dakika sonunda aktivitesini %73 koruduğu görülmüştür. Serbest enzim 50 °C’de 60 dakika sonunda aktivitesini %14 koruduğu, immobilize enzimin 50 °C’de 60 dakika sonunda aktivitesini %52 koruduğu görülmüştür (Dinçer vd., 2012). *Solanum tuberosum* PFO’sunun Celite 545 immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin ısı kararlılığı 2 saat sonunda 60 °C’de incelenmiştir. Serbest enzim 2 saat sonunda 60 °C’de aktivitesini yaklaşık %58 koruduğu, immobilize enzimin 2 saat sonunda 60 °C’de aktivitesini %77 koruduğu görülmüştür (Khan vd., 2006). *Cydonia oblonga*’dan PFO kısmi olarak saflaştırılmış ve enzim bentonite adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin ısı kararlılığı incelendiğinde 10 °C ve 90 °C arasında 60 dakikalık inkubasyon sonrasında farklı oranlarda aktivitesini koruduğu görülmüştür (Yağar ve Sağıroğlu, 2002a; Yağar ve Sağıroğlu, 2002b). Sigma firmasından temin edilen ticari mantar PFO’su karboksimetilselulaz hidrojel boncuklarına immobilize edilmiştir. Serbest enzimin 50 °C’de 2 saat sonunda aktivitesini %44 koruduğu, immobilize enzimin 50 °C’de 2 saat sonunda aktivitesini %79 koruduğu görülmüştür. Serbest ve immobilize enzimin 55 °C’de 2 saat sonunda immobilize enzimin aktivitesini serbest enzime göre daha iyi koruduğu görülmüştür. Serbest enzimin 60 °C’de 30 dakika sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, immobilize enzimin 60 °C’de 75 dakika sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Arıca, 2000). *Agaricus bisporus* mantar PFO’su AGE-75( Hex) polimerine immobilize edilmiştir. Serbest enzimin 50 °C aktivitesini %20,7 koruduğu, immobilize enzimin 50 °C aktivitesini %55,12 koruduğu görülmüştür. Serbest enzimin 60 °C’de aktivitesini tamamen kaybettiği, immobilize enzimin 60 °C’de aktivitesini %20,39 koruduğu görülmüştür (Vaidya vd., 2007).

İmmobilize enzimin depolama kararlılığı fosfat tamponunda (50 mM, pH 6,0) 4 °C de 1 gün arayla 15 gün boyunca incelendi. İmmobilize enzimin 15 gün sonunda aktivitesini %59,13 koruduğu görüldü (Şekil 37). *Agaricus bisporus* mantar PFO’su AGE-75( Hex) polimerine immobilize edilmiştir. Depolama kararlılığı 14 gün boyunca

4 °C'de, immobilize enzim %5'lik glutaraldehit ile 3 saat muamele ve %5'lik glutaraldehit ile 6 saat muamele edilerek incelenmiştir. 14 gün sonunda serbest enzim aktivitesini %18,3 koruduğu, %5'lik glutaraldehit ile 3 saat muamele edilen immobilize enzimin aktivitesini %48,12 koruduğu, %5'lik glutaraldehit ile 6 saat muamele edilen immobilize enzimin aktivitesini %70,95 koruduğu görülmüştür (Vaidya vd., 2007). *Eruca vesicaria* PFO'su, poliakrilamid, aljinat poliakrilamid, Ca-aljinat ve Ba-aljinat destek materyallerine immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimler 4 °C'de depolanarak belirli aralıklarla enzim aktivitesi tayinleri gerçekleştirilmiştir. 30 günün sonunda; serbest enzim aktifliğini %42 korurken, Ca-aljinatlı %81, Ba-aljinatlı %83, aljinatlı polimer %60, aljinatsız polimer %64 oranında aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir (Köse, 2010). Sigma firmasından temin edilen ticari PFO enzimi polipirol (PPy) ve iletken kopolimere (P(PStPy-co-Py) immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimler 50 gün boyunca 4 °C tamponda belirli aralıklarla depolama kararlılığı incelenmiştir. PPy ve (P(PStPy-co-Py) immobilize edilen enzimler 10 günlük depolama kararlılığında enzim aktivitesinin %50 koruduğu görülmüştür (Ekinci, 2006). Merck firmasından temin edilen ticari mantar tirozinazın (T3824) jelatin filme hapsolme ve adsorpsiyon yöntemleriyle immobilize edilmiştir. Jelatin filme hapsolme yöntemiyle immobilize edilen enzimin 30 günlük depolama kararlılığı belirli aralıklarla incelenmiştir. 15 gün sonunda aktivitesinin açıkça düşmeye başladığı ve 30 gün sonunda immobilize enzimin aktivitesini %58 koruduğu görülmüştür (Tetik, 2015).

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği Şekil 38'de incelendi. İmmobilize enzimin 3 kez kullanım sonunda aktivitesini %80,56 koruduğu, 18 kez kullanım sonunda aktivitesini %50 koruduğu ve 30 kez kullanım sonunda aktivitesini %37 koruduğu görüldü (Şekil 38). İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinde ilk 3 ölçümden sonra enzim aktivitesindeki belirgin düşüşü SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmi üzerine zayıf bağlı olan enzimlerin ortamı terk etmesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. *Eruca vesicaria* PFO'su, poliakrilamid, aljinat poliakrilamid, Ca-aljinat ve Ba-aljinat kullanılarak immobilize edilmiştir. Ca-aljinat ve Ba-aljinat, aljinatlı poliakrilamid, poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PFO enziminin tekrar kullanım sayısını incelemek amacı aktivite tayinleri yapılmıştır. Ca-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %95, 7 kez kullanım sonunda %81, 12 kez kullanım sonunda ise yaklaşık %26, aktivite gösterirken; Ba-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda

%75, 12 kez kullanımın sonunda ise %24 aktivite gösterdiği bulunmuştur. Aljinatlı poliakrilamid için 3 kez kullanım sonunda %87, 10 kez kullanım sonunda %30 aktivite gösterdiği, poliakrilamid için ise 3 kez kullanım sonunda %97, 9 kez kullanım sonunda %36 aktivite gösterdiği bulunmuştur (Köse, 2010). PFO kopolimer ile immobilizasyon çalışmasında 10 kullanım sonrasında enzim aktivitesini %45 koruduğu görülmüştür (Böyükbayram vd., 2006). Sigma firmasından temin edilen ticari PFO enzimi polipirol (PPy) ve iletken kopolimere (P(PStPy-co-Py) immobilize edilmiştir. PPy ile immobilize edilen enzimin 40 kez kullanım sonunda aktivitesini %60 koruduğu, iletken kopolimer ile immobilize edilen enzimin 40 kez kullanım sonunda aktivitesini %40 koruduğu görülmüştür (Ekinci, 2006). Sigma firmasından temin edilen PFO kopolimerlere immobilize edilmiştir. Polipirol elektroduna immobilize edilen enzimin (PPy/PFO) 10 kullanıma kadar dereceli olarak aktivitesinin azaldığı ve sonrasında 40 kullanıma kadar aktivitesini %60 koruduğu, pirol ile mentil grubunun kopolimerasyonu ile elde edilen elektroda immobilize edilen enzimin ((MM/PPy/PFO) 40 kullanım sonunda aktivitesini %85 koruduğu görülmüştür (Kıralp vd., 2003).

## 5. ÖNERİLER

1. SnO<sub>2</sub>: Sb ince filmleri spin kaplama ve kimyasal buhar biriktirme gibi farklı yöntemlerle elde edilip, enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra enzim aktivitesi bakılarak fizibilitesi yapılabilir.
2. İmmobilize enzim kullanılarak L-DOPA üretimi endüstriyel anlamda fizibilitesi yapılabilir.
3. İmmobilize PFO enzimi kullanılarak, endüstriyel atık suların fenol ve aromatik amin gibi maddelerin uzaklaştırılmasında kullanımının fizibilitesi yapılabilir.
4. İmmobilize PFO enzimi kullanılarak, fenol ve türevlerinin tayini için biyosensör olarak kullanım olanağı araştırılabilir.
5. İmmobilize PFO enzimi kullanılarak teafavin ve teafavin-3,3-digallat (TF3) sentezinin fizibilitesi gerçekleştirilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abacı, S. and Yıldız, A., 2009.** The effect of electrocatalytic activity and crystal structure of PbO<sub>2</sub> surface on polyphenylene oxide (PPO) production in acetonitrile. *Turkish Journal of Chemistry*, 33, 215-222, DOI: 10.3906/kim-0708-5.
- Abdelmajeed, N.A., Khelil, O.A. and Danial, E.N., 2012.** Immobilization technology for enhancing bio-products industry. *African Journal of Biotechnology*, 11 (71), 13528-13539.
- Ağaoğlu, Y.S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Gülşen, Y., Günay, A., Halloran, N., Köksal, A.İ. ve Yanmaz, R., 1997.** Genel Bahçe Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı yayınları, No:4, Ankara, 369 s.
- Ahmad, R. and Sardar, M., 2015.** Enzyme immobilization: An overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4, 178, DOI: 10.4172/2161-1009.1000178.
- Aksu, Y. and Driess, M., 2009.** A low-temperature molecular approach to highly conductive tin-rich indium tin oxide thin films with durable electro-optical performance. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 7778-7782, DOI: 10.1002/anie.200901204.
- Alaf, M., 2007.** Kalay (Sn) ve Kalay oksit (SnO<sub>2</sub>) İnce Filmlerinin Üretim ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 84s., 30, 33.
- Altay, K., 2016.** Iğdır Ekolojik Koşullarında Yetiştirilen Bazı Şeftali Genotiplerinin Fenolojik, Pomolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Iğdır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Iğdır, Türkiye, 60 s., 1,5.
- Andreescu, S., Bucur, B. and Marty, J.L., 2006.** Affinity immobilization of tagged enzymes. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 9, 97–106, DOI: 10.1007/978-1-59745-053-9\_9.
- Ansari, S.G., Ansari, Z.A., Seo, H.K., Kim, G.S., Kim, Y.S., Khang, G. and Shin, H.S., 2008.** Ureasensor based on tin oxide thin films prepared by modified plasma enhanced CVD. *Sensors and Actuators B*, 132, 265-271, DOI: 10.1016/j.snb.2008.01.036.
- Arıca, M.Y., Bayramoğlu, G. and Bıçak, N., 2004.** Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochemistry*, 39, 2007–2017, DOI: 10.1016/j.procbio.2003.09.030.

- Arica, M.Y., 2000.** Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization. *Polymer International*, 49, 775-781, DOI: 10.1002/1097-0126(200007)49:7<775::AID-PI454>3.0.CO;2-O.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., 2004.** Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88, 479–484, DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.04.005.
- Arslan, O., Temur, A. and Tozlu, İ., 1998.** Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46 (4), 1239 – 1241, DOI: 10.1021/jf970599v.
- Astuti, Y., Topoglidis, E., Cass, A.G. and Durrant, J.R., 2009.** Direct spectroelectrochemistry of peroxidases immobilised on mesoporous metal oxide electrodes: Towards reagentless hydrogen peroxide sensing. *Analytica Chimica Acta*, 648, 2–6, DOI: 10.1016/j.aca.2009.06.031.
- Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E. and Mehmetoglu, U., 2007.** Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (4), 683-687, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.031.
- Aydemir, T., 2004.** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87, 59–67, DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.017.
- Aydın, Y., 2012.** İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklamasıyla Yapılan Biyosensörler. Yüksek Lisans Tezi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman, Türkiye, 66 s., 55.
- Aytar, B.S. and Bakır, U., 2008.** Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 43, 125-131, DOI: 10.1016/j.procbio.2007.11.001.
- Bal, Ö., 2012.** Biyolojik Sıvılardaki Glukozun Tayini İçin Polipirol Filme Glukoz Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 101s., 68.
- Batista Viera, F. and Brena Beatriz M., 2006.** Immobilization of enzymes. *Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology*, 22, 15-30.
- Battal, A., Tatar, D., Kocuyigit, A. and Duzgun, B., 2015.** Effect of substrate temperature on some properties doubly doped tin oxide thin films deposited by using spray pyrolysis. *Materials focus*, 4, 445-456, DOI: <https://doi.org/10.1166/mat.2015.1281>.
- Batzill, M. and Diebold, U., 2005.** The surface and materials science of tin oxide. *Progress in Surface Science*, 79, 47-154, DOI: 10.1016/j.progsurf.2005.09.002.



- Beena, P. and Gowda, L.R., 2000.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). Journal of Agriculture Food Chemistry, 48 (9), 3839-3846. DOI: 10.1021/jf000296s.
- Bickerstaff, G.F., 1997.** "Immobilization of Enzymes and cells", Humana press, Totowa, New Jersey.
- Böyükbayram, A.E., Kıralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., 2006.** Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine. Bioelectrochemistry, 69, 164–171, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.01.006.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W. and O'Conner, K.E., 2004.** Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. Applied Microbiology and Biotechnology, 64 (4), 486-492, DOI: 10.1007/s00253-003-1488-z.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F., 1991.** Covalent and coordination immobilization of proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R.F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp.73–138.
- Cao, L., 2005.** Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design. Wiley-Vch Verlag GmbH&Co. Kga, Weinheim, 580p.
- Cerrahoğlu, E., 2014.** Eflatun Çiçekli Ballıbaba (*Lamium purpureum*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyon ve İmmobilizasyonunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 106 s., xiii.
- Cherry, R.J., Bjornsen, A.J. and Zapien, D.C., 1998.** Direct electron transfer of ferritin adsorbed at tin- doped indium oxide electrodes. Langmuir, 14 (8), 1971–1973, DOI: 10.1021/la970685p.
- Cho, M.H., Moinuddin, S.G.S., Helms, G.L., Hishiyama, S., Eichinger, D. and Davin, L.B., 2003.** (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantiospecific polyphenol oxidase from creosote bush (*Larrea tridentata*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 10641-10646, DOI: 10.1073/pnas.1934562100.
- Colak, A., Sahin, E., Yildirim, M. and Sesli, E., 2007.** Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon. Food Chemistry, 103, 1426–1433, DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.10.059.

- Çiçek, H., 2000.** Beyaz-çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 68s.
- Çil, M., 2006.** Immobilization of glucose oxidase and polyphenol oxidase in poly(N-(4-(3-thienylmethylene)-oxycarbonylphenyl)maleimide)-Co-pyrrole) matrice. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 65 s., vi-vii.
- Çil, M., Büyükbayram, A.E., Kıralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., 2007.** Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix. International Journal of Biological Macromolecules, 41, 49–55, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.12.005.
- Çimen, Ç., 2007.** Iğdır Kayısısından (*Şalak*) Saflaştırılan Polifenol Okidaz Enzimi Üzerinde Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Kinetiğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncüyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye, 75 s., 9.
- Dedeoğlu, N., 2009.** Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye, 210s., 3, 36.
- Dinçer, A., Becerik, S. and Aydemir, T., 2012.** Immobilization of trosinase on chitosan-clay composite beads. International Journal of Biological Macromolecules, 50, 815-820, DOI: :10.1016/j.ijbiomac.2011.11.020.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Arslan, O. and Alkan, M., 2005.** Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (26), 10224–10230, DOI: 10.1021/jf051646j.
- Ekinci, O., 2006.** Immobilization Of Glucose Oxidase And Polyphenol Oxidase In Conducting Copolymer Of Pyrrole Functionalized Polystyrene With Pyrrole. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 94 s., vi-vii.
- Elaglı, A., Belhacene, K., Vivien, C., Dhulster, P., Froidevaux, R. And Supiot, P., 2014.** Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 110, 77–86, DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.09.014.
- Ersöz, H. ve Bilgin, R., 2012.** Alkoldehidrogenaz (ADH) enziminin tavuk karaciğerinden saflaştırılması ve florisil üzerine immobilizasyonu. Çukurova Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 28 (4), 127-135.

- Espin, C.E., Garcia Ruiz, P.A., Varon R. and Garcia Canovas, F., 1998.** Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear oxidases. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (8), 2968-2975, DOI: 10.1021/jf971045v.
- Espin, J. C., Morales. M., Varon, R., Tudela, J. and Garciacanovas, F., 1995.** A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231, 237–246, DOI: doi.org/10.1006/abio.1995.1526.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia Ruiz, P.A., Tudela, J. and Garcia Canovas, F., 1997.** Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oksidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1084-1090, DOI: 10.1021/jf960428a.
- Espin, J.C., Soler Rivas, C., Cantos, E., Tomas Barberan, F.A., and Wichers, H.J., 2001.** Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1187-1193, DOI: 10.1021/jf001258b.
- Esterbauer, H., Schwarzl, E. and Hayn, M., 1977.** A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid. *Analytical Biochemistry*, 77, 486-494, DOI: 10.1016/0003-2697(77)90262-7.
- Fang, A., Ng, H.T. and Li, S.F.Y., 2003.** A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium-tin oxide surface. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 43-49, DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00133-7.
- Fenoll, L.G., Penalver, M.J., Rodriquez Lopez, J.N., Varon, R., Garcia Canovas, F. and Tudela, J., 2004.** Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 235–246, DOI: 10.1016/S1357-2725(03)00234-6.
- Fenoll, L.G., Rodriguez Lopez, J.N., Varon, Garcia Ruiz, P.A., Garcia Canovas, F. and Tudela, J., 2000.** Action mechanism of tyrosinase on *meta*- and *para*-hydroxylated monophenols. *Biological Chemistry*, 381, 313-320, DOI: 10.1515/BC.2000.041.
- Frasca, S., Milan, A.M., Guiet, A., Goebel, C., Pérez Caballero, F., Stiba, K., Leimkühler, S., Fischer, A. and Wollenberger, U., 2013.** Bioelectrocatalysis at mesoporous antimony doped tin oxide electrodes—Electrochemical characterization and direct enzyme communication. *Electrochimica Acta*, 110, 172– 180, DOI: 10.1016/j.electacta.2013.03.144.

- Frasca, S., Richter, C., Von Graberg, T., Smarsly, B.M., and Wollenberger, U., 2011.** Electro-chemical switchable protein-based optical device. *Engineering in Life Sciences*, 11 (6), 554-558, DOI: 10.1002/elsc.201100079.
- Frasca, S., Von Graberg, T., Feng, J.J., Thomas, A., Smarsly, B.M., Weidinger, I.M., Scheller, F.W., Hildebrandt, P. and Wollenberger, U., 2010.** Mesoporous indium tin oxide as a novel platform for bioelectronics. *ChemCatChem*, 2, 839-845, DOI: 10.1002/cctc.201000047.
- Ganguly, K. and Seshado, T.R., 1958.** Isolation of the more commonly occurring leucoanthocyanidins of plants. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 17, 168-173.
- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A. and Wang, W., 2015.** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 1095–1099, DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.012.
- Gorecka, E. and Jastrzebska, M., 2011.** Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75, 65-86.
- Granqvist, C.G. and Hultaker A., 2002.** Transparent and conducting ITO films: New developments and applications. *Thin Solid Films*, 411, 1-5, DOI: 10.1016/S0040-6090(02)00163-3.
- Gu, B.X., Xu, C.X., Zhu, G.P., Liu, S.Q., Chen, L.Y. and Li, X.S., 2009.** Tyrosinase immobilization on ZnO nanorods for phenol detection. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113 (1), 377–381, DOI: 10.1021/jp808001c.
- Gul'ko, A.Y. and Khaziyev, F.K., 1993.** Soil polyphenol oxidase; their production, immobilization and activity. *Eurasian Soil Science*, 25, 101-103.
- Gupta, V., 2010.** ZnO based third generation biosensor. *Thin Solid Films*, 519, 1141-1144, DOI:10.1016/j.tsf.2010.08.058.
- Güngör, K., 2008.** Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflastırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 91s., x.
- Hou, C., Wang, Y., Zhu, H. and Wei, H., 2015.** Construction of enzyme immobilization system through metal-polyphenol assisted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan hybrid microcapsules. *Chemical Engineering Journal*, 283, 397–403, DOI: 10.1016/j.cej.2015.07.067.
- Hürrem, F., 2010.** Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (CLEA) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 76 s., 10.

- Ikeda, R., Uyama, H. and Kobayashi, S., 1996.** Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide) laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules*, 29 (8), 3053-3054, DOI: 10.1021/ma951810b.
- John Kennedy, L., Selvi, P.K., Padmanabhan, A., Hema, K.N. and Sekaran, G., 2007.** Immobilization of polyphenol oxidase onto mesoporous activated carbons- isotherm and kinetic studies. *Chemosphere*, 69 (2), 262-270, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.04.001.
- Kafi, A.K.M. Wali, Q., Jose, R., Kumar Biswas, T. and Yusoff, M.M., 2017.** A glassy carbon electrode modified with SnO<sub>2</sub> nanofibers, polyaniline and hemoglobin for improved amperometric sensing of hydrogen peroxide. *Microchim Acta*, 184, 4443-4450, DOI: 10.1007/s00604-017-2479-6.
- Karpuz, G., 2013.** Polipirol-paratoluensülfonat (ppy-pts) Filme Ürikaz Enziminin Immobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 91s., 63.
- Kasmi, A.E., Leopold, M.C., Galligan, R., Robertson, R.T., Saavedra, S.S., Kacemi, K.E. and Bowden, E.F., 2002.** Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide(ITO): Electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes. *Electrochemistry Communications*, 4, 177-181, DOI: 10.1016/S1388-2481(01)00299-5.
- Kemp, G.L., Marritt, S.J., Xiaoe, L., Durrant, J.R., Cheesman, M.R. and Butt, J.N., 2009.** Opportunities for mesoporous nanocrystalline SnO<sub>2</sub> electrodes in kinetic and catalytic analyses of redox proteins. *Biochemical Society Transactions*, 37 (2), 368-372, DOI: 10.1042/BST0370368.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. and Scouten, W.H., 1983.** Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry, New York: John Wiley and Sons, 253-392.
- Keskin, Ş., 2009.** *Russula delica* (russulaceae)' dan Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 62s., v.
- Khan, A.A., Akhtar, S. and Husain, Q., 2006.** Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, 58-63, DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.03.001.
- Kıralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., 2003.** Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 37-41, DOI: 10.1016/S0141-8130(03)00062-X.

- Kim, H., Auyeung, R.C.Y. and Piqué, A., 2008.** Transparent conducting F-doped SnO<sub>2</sub> thin films grown by pulsed laser deposition. *Thin Solid Films*, 516, 5052–5056, DOI: 10.1016/j.tsf.2007.11.079.
- Kocabay, Ö., 2011.** Jelatin-Karboksümetilselüloz-Süperoksit Dismutaz Biyosensörünün Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 91 s., 17.
- Kocatürk, S., 2008.** Enginar Polifenol Oksidazının Alginat ve Karragenan Jellerde İmmobilizasyonu Ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye, 86s., 2, i-ii.
- Kocayigit, A., Tatar, D., Battal, A., Ertuğrul, M. and Duzgun, B., 2012.** Highly efficient optoelectronic properties of doubly doped SnO<sub>2</sub> thin film deposited by spin coating technique. *Journal of Ovonic Research*, 8, 171–178.
- Koçyiğit, A., 2014.** Spray Pyrolysis ve Spin Coating Metotlarıyla Elde Edilen SnO<sub>2</sub>:Sb:F İnce Filmlerin Bazı Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 193 s., 39.
- Kolcuoğlu, Y., 2012.** Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentata*). *Process Biochemistry*, 47, 2449–2454, DOI: 10.1016/j.procbio.2012.10.008.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yıldırım, M. and Saglam, N., 2007.** Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101, 778–785, DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.02.035.
- Köse, H., 2010.** Polifenol Oksidaz Enziminin Farklı Maddelerle İmmobilizasyonu Ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 66 s., x.
- Kumar, V.B.A., Mohan, T.C.K. and Murugan, K., 2008.** Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110, 328–333, DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.02.006.
- Kuyumcu, İ., 2014.** Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Lactarius eucalypti* O. K. Mill & R. N. Hilton'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 87 s., 10,17.
- Kwan, P., Schmitt, D., Volosin, A.M., McIntosh, C.L., Seo, D.K. and Jones, A.K., 2011.** Spectroelectrochemistry of cytochrome c and azurin immobilized innanoporous antimony-doped tin oxide. *Chemical Communications*, 47 (45), 12367-12369, DOI: 10.1039/c1cc14881h.

- Laurila, E., Kervinen, R. and Ahvenainen, R., 1998.** The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News and Information*, 9 (4), 53-66, 1998.
- Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre, G. and Neumann, J., 1963.** Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase. *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, 33-36, DOI: 10.1016/B978-0-08-009946-0.50008-0.
- Lei, S., Xie, M., Hu, B., Zhou, L., Sun, Y., Saeeduddin, M., Zhang, H. and Zeng, X., 2017.** Effective synthesis of theaflavin-3,3'-digallate with epigallocatechin-3-O-gallate and epicatechin gallate as substrates by using immobilized pear polyphenoloxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 709–718, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.072.
- Li, Q., Luo, G. and Feng, J., 2001.** Direct electron transfer for heme proteins assembled on nanocrystalline TiO<sub>2</sub> film. *Electroanalysis*, 13, 359-363.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934.** The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–666, DOI: 10.1021/ja01318a036.
- Linquiu, C., 2006.** Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design. Wiley Online Library, 475– 481, DOI: 10.1002/3527607668.
- Liu, F., Zhao, J.H., Wen, X. and Ni, Y.Y., 2015.** Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from fuji apple. *Food Chemistry*, 183, 72-77, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.027.
- Luisi, P.L. and Magid, L.J., 1986.** Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20 (4), 409–474.
- Marritt, S.J., Kemp, G.L., Xiaoe, L., Durrant, J.R., Cheesman, M.R. and Butt, J.N., 2008.** Spectro-electrochemical characterization of a pentaheme cytochrome in solution and as electrocatalytically active films on nanocrystalline metal-oxide electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 130 (27), 8588-.8589, DOI: 10.1021/ja802641a.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez Lafuente, R. and Guizan, J.M., 2000.** Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 509-515, DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00188-X.
- Mayer, A.M., Harel, E. and Ben Shaul, R., 1966.** Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Photochemistry*, 5, 783-789, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)83660-2.

- Mazzocco, F. and Pifferi, P.G., 1976.** An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn's hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 72, 643-647, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90578-9.
- Milani, M.M., Lotfi, A.S., Mohsenifar, A., Mikaili, P., Kamelipour, N. and Dehghan, J., 2015.** Enhancing organophosphorus hydrolase stability by immobilization on chitosan beads containing glutaraldehyde. *Research Journal of Environmental Toxicity*, 9 (1), 34-44, DOI: 10.3923/rjet.2015.34.44.
- Moholkar, A.V., Pawar, S.M., Rajpure, K.Y., Almari, S.N., Patil, P.S. and Bhosale, C.H., 2008.** Solvent-dependent growth of sprayed FTO thin films with mat-like morphology. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 92, 1439-1444, DOI: 10.1016/j.solmat.2008.06.010.
- Mos'ko, A.A., Shcherbakova, T.A., Glushko, N.A. and Klenitskaya, I.A., 1992.** Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus. *Eurasian Soil Science*, 5, 60-65.
- Munjal, N. and Sawhney, S.K., 2002.** Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 613-619, DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00019-4.
- Nelson, J.M. and Griffin Edward G., 1916.** Adsorption of invertase. *Journal of The American Chemical Society*, 38 (5), 1109-1115, DOI: 10.1021/ja02262a018.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçaliskan, I., and Sakiroğlu, H., 1995.** Polyphenoloxidase from Amasya apple. *Journal of food Science*, 60 (3), 494 - 496, DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb09810.x.
- Outemzabet, R., Bouras, N. and Kesri, N., 2007.** Microstructure and physical properties of nanofaceted antimony doped tin oxide thin films deposited by chemical vapor deposition on different substrates. *Thin Solid Films*, 515, 6518-6520, DOI: 10.1016/j.tsf.2006.11.069.
- Owusu Ansah, Y.J., 1989.** Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 901 - 904, DOI: 10.1021/jf00088a015.
- Örnek Acar, D., 2009.** Ureaz Enziminin Ca-Alginat Uzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 68s.
- Öz, F., Colak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N. and Sesli, E., 2013.** Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 36-44, DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00604.x.



- Özçagıran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyoğlu, M., 2005.** Ilıman İklim Meyve Türleri (Sert Çekirdekli Meyve Türleri, Cilt 1). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 553.
- Özçelik, D., 2005.** Mantardan (*Agaricus Bisporus*) Tirozinaz Enziminin İzole Edilmesi ve Fenol Giderilmesinde Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 65 s., 27.
- Özel, A., 2008.** *Boletus Erythropus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 110 s., 17, 24.
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. and Yildirim, M., 2010.** Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. Food Chemistry, 119, 1044–1049, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.011.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B. and Güner, S., 2004.** A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). Food Chemistry, 85, 431–437, DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.022.
- Pakyıldız, S., 2016.** Gövem Eriği (*Prunus Spinosa* L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 79 s., 9.
- Ravichandran, K., Muruganatham, G. and Sakthivel, B., 2009b.** Highly conducting and crystalline doubly doped tin oxide films fabricated using a low-cost and simplified spray technique. Physica B: Condensed Matter, 404 (21), 4299-4302, DOI: 10.1016/j.physb.2009.08.017.
- Ravichandran, K., Muruganatham, G., Sakthivel, B. and Philominathan, P., 2009a.** Nanocrystalline doubly doped tin oxide films deposited using a simplified and low-cost spray technique for solar cell applications. Journal of Ovonic Research, 5 (3), 63-69.
- Reipa, V., Mayhew, M.P. and Vilker, V.L., 1997.** A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 13554–13558.
- Rodriguez Lopez, J.N., Escribano, J. and Garcia Canovas, F., 1994.** A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. Analytical Biochemistry, 216 (1), 205-212, DOI: 10.1006/abio.1994.1026.
- Sağlam Ertunga, N., 2006.** Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 Suşunun Fruktöz-1,6-Bifosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 111 s.

- Sanchez Ferrer, A., Rodriguez Lopez, J.N., Garcia Canovas, F. and Garcia Carmona, F., 1995.** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247, 1-11, DOI: 10.1016/0167-4838(94)00204-T.
- Sarauli, D., Riedel, M., Wettstein, C., Hahn, R., Stiba, C., Leimkühler, S., Schmuki, P., Wollenberger, U. and Lisdat, F., 2012.** Semimetallic TiO<sub>2</sub> nanotubes: new interfaces for bio-electrochemical enzymatic catalysis. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 4615-4618, DOI: 10.1039/c2jm16427b.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A. and Bollog, J.M., 1989.** Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 223-230, DOI: 10.1016/0038-0717(89)90098-9.
- Sato, M., 1969.** The conversion by phenolase of *p*-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. *Phytochemistry*, 8 (2), 353-362, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)85431-X.
- Sethuraman, V., Muthuraja, P., Anandha Raj, J. and Manisankar, P., 2016.** A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide–metal oxide enzyme, modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 84, 112–119, DOI: 10.1016/j.bios.2015.12.074.
- Sharma, K., Bari S.S. and Singh H.P., 2009.** Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 253–258, DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.05.016.
- Siegbahn, P.E.M., 2003.** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 567-576, DOI: 10.1007/s00775-003-0449-4.
- Sinner Hettenbach, M., 2000.** SnO<sub>2</sub> (110) and Nano-SnO<sub>2</sub>: Characterization By Surface Analytical Techniques. Ph.D. Thesis. Tubigen University, Germany, 65, 19.
- Sirin, Y., Yildirim Akatin, M., Colak, A. and Saglam Ertunga, N., 2016.** Dephytinization of food stuffs by phytase of *Geobacillus* sp. TF16 immobilized in chitosan and calcium-alginate. *International Journal of Food Properties*, 20, 2911–2922, DOI: 10.1080/10942912.2016.1261151.
- Solomon, B., Hollaander, Z., Koppel, R. and Katchalski Kazir, E., 1987.** Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes. *Methods in Enzymology*, 135, 160-170, DOI: 10.1016/0076-6879(87)35074-8.
- Solomon, E.I. and Lowery, M.D., 1993.** Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 259, 1575-1581, DOI: 10.1126/science.8384374.

- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E., 1996.** Multi copper-peroxidaes and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2606, DOI: 10.1021/cr950046o.
- Sönmezoğlu, S., Koç, M. ve Akın, S., 2012.** İnce film üretim teknikleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 28 (5), 389-401.
- Stambouli, V., Labeau, M., Matko, I., Chenevier, B., Renault, O., Guiducci, C., Chaudouet, P., Roussel, H., Nibkin, D. and Dupuis, E., 2006a.** Development and functionalisation of Sb doped SnO<sub>2</sub> thin films for DNA biochipapplications. *Sensors Actuators B-chemical*, 113, 1025-1033, DOI: 10.1016/j.snb.2005.03.108.
- Stambouli, V., Zebda, A., Appert, E., Guiducci, C., Labeau, M., Diard, J.P., Le-Gorrec, B., Brack, N. and Pigram, P.J., 2006b.** Semi-conductor oxide based electrodes for the label-free electrical detection of DNA hybridization: comparison between Sb doped SnO<sub>2</sub> and CdIn<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. *Electrochimica Acta*, 51, 5206-5214, DOI: 10.1016/j.electacta.2006.03.045.
- Telefoncu, A., 1997.** İmmobilize Enzimler. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası Aydın, 446s.
- Terrier, C., Chatelon, J.P. and Roger J.A., 1997.** Electrical and optical properties of Sb:SnO<sub>2</sub> thin films obtained by the sol-gel method. *Thin Solid Films*, 295, 95–100, DOI: 10.1016/S0040-6090(96)09324-8.
- Tetik, İ., 2015.** Preparation and Characterization of Tyrosinase İmmobilized Geletin Films. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü/ Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 48 s., v.
- Tischer, W. and Kasche, V., 1999.** Immobilized Enzymes: Crystals or Carriers?, *Trends in Biotechnology*, 17, 326–335.
- Topoglidis, E., Cass, A.E.G., O'Regan, B., Durrant, J.R., 2001a.** Immobilisation and bio-electrochemistry of proteins on nanoporous TiO<sub>2</sub> and ZnO films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 517, 20-27, DOI: 10.1016/S0022-0728(01)00673-8.
- Topoglidis, E., Campbell, C.J., Cass, A.E.G. and Durrant, J.R., 2001b.** Factors that affect pro-teın adsorption on nanostructured titania films. A novel spectroelectrochemical application to sensing. *Langmuir*, 17 (25), 7899-7906, DOI: 10.1021/la010309b.
- Turan, P., 2005.** *Ocimum basilicum* L.'den Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye, 123s., ii.
- Twyman, R.M., 2005.** Immobilized Enzyme. University of York, UK. This article is a revision of the previous-edition article by G A Marko-Varga, pp.1182–1187.

- Ülker Yerlitürk, F., Arslan, O., Sinan, S., Gencer, N. and Özensoy Ö., 2008.** Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Pyrus elaeagnifolia*). *Journal of Food Biochemistry* 32, 368–383, DOI: 10.1111/j.1745-4514.2008.00174.x.
- Ülkümen, L., 1973.** Bağ-bahçe ziraatı, Atatürk Üniversitesi yayınları No:275. Ziraat Fakültesi yayınları:128.
- Vaidya, B.K., Karale, A.J., Suthar, H.K., Ingavle, G., Pathak, T.S., Ponrathnam, S. and Nene, S., 2007.** Immobilization of mushroom polyphenol oxidase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous beaded copolymers. *Reactive & Functional Polymers*, 67, 905-915, DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2007.05.015.
- Vamos Vigyazo, L. and Gejzago, L., 1978.** Substrate specificity of the enzymatic browning of apples. *Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 7, 79.
- Vamos Vigyazo, L., 1981.** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 15 (1), 49-127, DOI: 10.1080/10408398109527312.
- Van Tran, T., Turrell, S., Eddafi, M., Capoen, B., Bouazaoui, M., Roussel, P., Berneschi, S., Righini, G., Ferrari, M., Bhaktha, S.N.B., Cristini, O. and Kinowski, C., 2010.** Investigations of the effects of the growth of SnO<sub>2</sub> nanoparticles on the structural properties of glass-ceramic planar waveguides using Raman and FTIR spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 976, 314-319, DOI: 10.1016/j.molstruc.2010.04.010.
- Varian, A.R., Sansen, W., Van-Loey, A. and Hendrickx, M., 1996.** Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads. *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 443-448.
- Walker, J.R.L., 1970.** Phenolase inhibitor from cultures of *Penicillium expansum* which may play a part in fruit rotting. *Nature*, 227, 298-299, DOI: 10.1038/227298a0.
- Wang, G., Xu, J.J., Ye, L.H., Zhu, J.J. and Chen, H.Y., 2002.** Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. *Bioelectrochemistry*, 57, 33– 38, DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00174-8.
- Wang, Y., Brezesinski, T., Antonietti, M. and Smarsly, B., 2009.** Ordered mesoporous Sb-, Nb-, and Ta-doped SnO<sub>2</sub> thin films with adjustable doping levels and high electrical conductivity. *ACS Nano*, 3 (6), 1373-1378, DOI: 10.1021/nn900108x.
- Weber, D.J. and Stahmann, M.A., 1964.** Ceratocystis infection in sweet potato; its effect on proteins, isozymes and acquired immunity. *Science*, 146, 929-931.
- Weethall, H.H., 1976.** Covalent coupling methods for inorganic support materials. *Methods of Enzymology*, 44, 134-148.

- Westwood, M.N., 1978.** Temperate-Zone Pomology. W.H. Freeman and company, San Francisco, USA, 428 s.
- Whitaker, J.R., 1972.** Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker, New York, Chapters 22 and 24.
- Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. and Solomon, E.I., 1985.** Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. Journal Of The American Chemical Society, 107, 4015-4027, DOI: 10.1021/ja00299a043.
- Yağar, H. and Sağıroğlu, A., 2002a.** Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. Turkish Journal of Chemistry, 26, 97-103.
- Yağar, H. and Sağıroğlu, A., 2002b.** Non-covalent immobilization of quince (*cydonia oblonga*) polyphenol oxidase. Turkish Journal of Chemistry, 26, 751-758.
- Yaropolov, A.I., Kharybin, A.N., Emneus, J., Marko Varga, G. and Gorton, L., 1995.** Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilized laccase and tyrosinase. Analytica Chimica Acta, 308, 137–144, DOI: 10.1016/0003-2670(94)00404-A.
- Yıldırım, D., 2010.** *Mucor miehei* ve *pseudomonas* sp. Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu Ve İmmobilize Lipazın Esterleşme Reaksiyonlarında Kullanımı. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 279 s., 12-13.
- Yıldız, H.B., Toppare, L., Hepuzer Gursel, Y. and Yagcı, Y., 2006.** Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes. Enzyme and Microbial Technology, 39, 945-948, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.026.
- Zawitowski, J., Biliaderis, C.G. and Murray, E.D., 1998.** Isolation and some properties of an acidic fraction of polyphenol oxidase from jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.). Journal of Food Biochemistry, 12, 23 – 35, DOI: 10.1111/j.1745-4514.1988.tb00134.x.
- Zhang, B., Tian, Y., Zhang, J.X. and Cai, W., 2010.** Structural, optical, electrical properties and FTIR studies of fluorine doped SnO<sub>2</sub> films deposited by spray pyrolysis. Journal of Materials Science, 46 (6), 1884–1889, DOI: 10.1007/s10853-010-5021-3.
- Zhang, D., Deng, Z., Zhang, J. and Chen, L., 2006.** Microstructure and electrical properties of antimony- doped tin oxide thin film deposited. Materials Chemistry and Physics, 98 353-357, DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.09.038.

**Ziyan, E., 1998.** Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus communis*)'ndan İzole Edilmesi, Safılaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 83 s., 4.



## ÖZGEÇMİŞ

01.01.1985 yılında Rize’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Rize’de tamamladı. 2003-2008 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2011 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda tezli yüksek lisans programını tamamladı. 2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda başladığı doktora öğrenimine halen devam etmektedir. Ağustos 2013 yılında Iğdır Üniversitesinde Öğretim görevlisi olarak göreve başladı ve halen devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

