ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hasan KARADAĞ

112458

SOYA FASULYESİ LİPOKSİJENAZININ POLİAKRİLAMİD JEL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

112458

ADANA, 2001

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOYA FASULYESİ LİPOKSİJENAZININ POLİAKRİLAMİD JEL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

Hasan KARADAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 11../09/2001 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza:	İmza:	İmza:
Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN	Prof.Dr.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Mustafa CANLI
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 1866

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Prof. Dr. Melih BORAL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FBE.2001.YL.15

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve foğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ.....I

ABSTRACT.....II

TEŞEKKÜR.....III

SİMGELER VE KISALTMALAR.....IV

ÇİZELGELER DİZİNİ.....V

ŞEKİLLER DİZİNİ.....VI

1.GİRİŞ.....1

1.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....1

1.1.1.Taşıyıcı.....3

1.1.1.1.Kovalent Bağlama.....4

1.1.1.2.Adsorpsiyon.....5

1.1.1.3.İyonik Bağlanma.....6

1.1.1.4.Şelat Bağlama.....6

1.1.1.5.Biyospesifik Bağlanma.....6

1.1.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri.....7

1.1.2.1.Kopolimerizasyon Yöntemleri.....7

1.1.2.2.Tutuklama Yöntemleri.....7

1.1.2.3.Polimer Matrikste Tutuklama.....8

1.1.2.4.Mikrokapsülleme.....9

1.2.1.Lipoksijenaz.....9

1.2.2.Lipoksijenazın Biyolojik İşlevi.....13

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....14

3.MATERYAL VE METOT.....18

3.1.Materyal.....18

3.1.1. Kimyasallar.....18

3.1.2.Kullanılan Cihazlar.....19

3.2.Metod.....19

3.2.1.İmmobilize Lipoksijenazın Hazırlanması.....19
3.2.1.1.Jel Kürelerinin Elde Edilişi.....20
3.2.1.2.Jel Kürelerinin Glutataraldehid İle Aktifleştirilmesi.....20
3.2.1.3.Enzimin jele bağlanması.....21
3.2.2.Enzim Aktivite Tayini.....21
3.2.3. Hidroperoksioktadekadienoik Asit Oluşturulması.....22
3.2.3.1. Serbest enzim ile hidroperoksioktadekadienoik asit oluşturulması.....22
3.2.3.2. İmmobilize enzim ile hidroperoksioktadekadienoik asit oluşturulması.....22
3.2.4. Xylenol Orange Metodu.....23
3.2.5.Protein Tayini.....24
3.2.6.Michaelis-Menten Katsayısı (Km) Ve Maksimum
Hızın(Vmax) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi.....25
3.2.7.Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması.....27
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....29
4.1. Bulgular.....29
4.1.1. İmmobilizasyon İle İlgili Bulgular.....29
4.1.1.1 Poliakrilamid jel Küresi Eldesi.....29
4.1.1.2. İmmobilizasyon İçin Optimum pH' ın Belirlenmesi.....29
4.1.2. İmmobilize ve Serbest LOX İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....30
4.1.2.1. İmobilize Enzim İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....30
4.1.2.2. Serbest Enzim İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....31
4.1.3. Serbest Enzim İçin Optimum pH' ın Belirlenmesi.....33
4.1.4. İmmobilize ve Serbest LOX İçin Aktivasyon
Enerjisinin Hesaplanması.....34
4.1.4.1.İmmobilize LOX için Aktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi.....34
4.1.4.2.Serbest LOX İçin Aktivasyon Enerjisinin Bulunması.....35
4.1.5. İmmobilize Ve Serbest Enzim İçin Maksimum Hız (Vmax)
Ve Michaelis-Menten Katsayısının (Km) Belirlenmesi.....36
4.1.5.1. İmmobilize LOX İçin Vmax Ve Km' nin Belirlenmesi.....36
4.1.5.2. Serbest LOX İçin Vmax Ve Km'nin bulunması.....38
4.1.6. İmmobilize LOX'ın Tekrar Kullanımı İle İlgili Çalışmalar.....39

4.1.7. İmmobilize Ve Serbest LOX'ın Depolama Kararlılığı.....40
4.1.7.1. İmmobilize LOX'ın Depolama Kararlılığı.....40
4.1.7.2.Serbest LOX'ın Depolama Kararlılığı.....41
4.1.8. İmmobilize LOX İçin % 3 ve % 7'lik Poliakrilamid
Jel Küreleri Hazırlanması.....42
4.2.Tartışma.....47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....51
5.1.Sonuçlar.....51
5.2.Öneriler.....52
KAYNAKLAR.....53
ÖZGEÇMİŞ.....57
EKLER.....58

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOYA FASULYESİ LİPOKSİJENAZININ POLİAKRİLAMİD JEL ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

Hasan KARADAĞ
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN
Yılı: 2001 , **Sayfa:** 58
Jüri : Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof.Dr.Seyhan TÜKEL
: Prof.Dr. Mustafa CANLI

Lipoksijenaz cis, cis–1,4-pentadien grubu içeren doymamış yağ asitlerine moleküler oksijeni spesifik olarak bağlayıp, cis,trans konjuge dien hidroperoksitlerin oluşumunu katalizler. Bu birincil ürünler endüstriyel önemi olan yağ asitlerine, hidroksi asitlere, dönüştürülebilir. Bu endüstriyel önemin yanısıra, lipoksijenazlar, lökotrien gibi spesifik doku hormonların üzerine fizyolojik etkiyede sahiptirler.

Bu çalışmada, soya fasulyesi lipoksijenazı, glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamid jel üzerine immobilize edilmiştir.

Optimum sıcaklık, optimum pH ve Vmax ve Km değerleri serbest ve immobilize enzim için belirlenmiştir. Bunların yanısıra immobilize enzim için tekrar kullanılabilirlik ve depolama kararlılığı araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Soya Fasulyesi Lipoksijenazı Tip-1, Linoleik asit, Poliakrilamid jel, İmmobilizasyon

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU

ABSTRACT

MSc THESIS

IMMOBILIZATION OF SOYBEAN LIPOXYGENASE ON POLYACRYLAMIDE GEL

Hasan KARADAĞ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Year: 2001 , **Pages:**58

Jury : Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

: Prof.Dr. Seyhan TÜKEL

: Prof.Dr. Mustafa CANLI

Lipoxygenase catalyzes the specific addition of molecular oxygene to polyunsaturated fatty acids (containing the cis, cis–1,4-pentadiene moiety) to formation cis,trans-conjugated diene hydroperoxides. This primary products can be converted to hydroxy acids which are industrially important fatty acids. In addition to industriall importance, lipoxygenases have physiological effect on specific tissue hormones, such as leukotriens.

In this study, soybean lipoxygenase was immobilized on polyacrylamide gel which activated with glutaraldehyde.

Optimal temperature, optimal pH, Vmax and Km value were determined for free and immobilized enzyme. Besides these , reusability and storage stability of immobilized enzyme were investigated.

Key Words: Soybean Lipoxygenase type-1, Linoleic acid, Polyacrylamide Gel, Immobilization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğretimim süresince, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösterici olan ve enzimler konusunu tercih etmemi sağlayan, tezimin hazırlanması sırasında, sürekli kaynak olarak başvurduğum, danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN, sayın hocam Prof.Dr. Seyhan TÜKEL, ve sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin oluşumu sırasında maddi ve manevi ilgilerini esirgemeyen Yrd. Doç.Dr.Bilgehan GÜZEL hocamıza, Laboratuar arkadaşlarım Gül ÖZYILMAZ, Gülümser GÜRSOY, Özlem ALPTEKİN, Kerime ERCİK, Deniz YILDIRIM, Ahmet UMAY'a, asistan arkadaşlarım Mustafa KELEŞ, Belgin GÖZMEN, Muhsin MAZMAN, Özgür SÖNMEZ'e, doktora öğrencisi Aziz YAĞAN'a ve tüm Kimya Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başlamamı sağlayan ve her zaman için bana destek olan babam Hüseyin KARADAĞ ve annem Zeliha KARADAĞ'a ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

LOX : Soya fasulyesi lipoksijenaz

13-HPOD : 13- hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik asid

Vmax : Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız.

Km : Michaelis-Menten sabiti.

Prot. : Protein

T : Tampondaki toplam monomer konsantrasyonu yüzdesi

C : Monomerdeki toplam karşı bağlayıcı bileşik yüzdesi

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri.....2

Çizelge 1.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler.....3

Çizelge 1.3. Enzim immobilizasyonunda kulllanılan taşıyıcılar.....3

Çizelge 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yarar ve sakıncaları.....5

Çizelge 1.5.Lökotrienlerin birbirlerine dönüşmesiyle meydana gelen hastalıklar.....13

Çizelge 4.1. pH ile poliakrilamid jel kürelerinde immobilizasyon.....29

Çizelge 4.2. 288-313 K sıcaklıkları arasındaki immobilize enzim aktiviteleri.....31

Çizelge 4.3. 288-308 K sıcaklıkları arasındaki serbest enzim aktiviteleri.....32

Çizelge 4.4. Çeşitli pH' larda serbest enzim için bulunan aktivite değerleri.....33

Çizelge 4.5. Aktivasyon enerjisinin bulunması için çeşitli sıcaklıklardaki immobilize LOX 'ın aktivite 34

Çizelge 4.6. Aktivasyon enerjisinin bulunması için serbest LOX'ın çeşitli sıcaklıklardaki aktivite değerleri.....36

Çizelge 4.7. İmmobilize enzim için, çeşitli substrat konstrasyonlarına karşı LOX aktivite değerleri.....37

Çizelge 4.8. Çeşitli substrat konsantrasyonlarına karşı LOX aktiviteleri.....38

Çizelge 4.9. Kullanım sayısına bağlı olarak imobilize LOX'ın % aktivite değerleri.....40

Çizelge 4.10. -20 °C' de immobilize LOX'ın depolama kararalılığı.....41

Çizelge 4.11. -20 °C' de immobilize LOX'ın % aktivitesi.....42

Çizelge 4.12. İmmobilize enzimin +5 °C'deki depolama kararlılığı.....42

Çizelge 4.13. % 3'lük jel için değişik substrat derişimlerine karşı bulunan LOX aktivite değerleri.....43

Çizelge 4.14. % 7'lik jel için değişik substrat derişimlerine karşı bulunan LOX aktivite değerleri.....45

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....2
Şekil 1.2. Aminoasit yan zincirlerinin reaktif grupları.....4
Şekil 1.3. Çapraz bağlı poliakrilamid matriksinde enzim tutuklanması.....8
Şekil 1.4. Lipoksijenazın linoleik asidi 13-hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik asidedönüştürme mekanizması.....11
Şekil 1.5. Soya fasulyesi lipoksijenazının amino asit dizisi.....11
Şekil 3.1. Standart kümenhidroperoksit grafiği.....24
Şekil 3.2. Standart protein grafiği.....25
Şekil 3.3. Michaelis-Menten grafiği.....26
Şekil 3.4. Lineweaver-Burk grafiği.....27
Şekil 3.5. Aktivasyon enerjisinin bulunması için Arrhenius çizimi.....28
Şekil 4.1. Değişik pH' larda başta eklenen LOX miktarına göre poliakrilamid jel üzerine, enzimin % immobilizasyon miktarları.....30
Şekil 4.2. İmmobilize LOX için sıcaklık- aktivite değişimi.....31
Şekil 4.3. Serbest enzim için sıcaklık – aktivite değişimi.....32
Şekil 4.4. Serbest enzim için pH –aktivite grafiği.....33
Şekil 4.5. İmmobilize LOX için aktivasyon enerjisi grafiği.....35
Şekil 4.6. Serbest LOX için aktivasyon enerjisi grafiği.....36
Şekil 4.7. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği.....37
Şekil 4.8. Serbest LOX için Michaelis-Menten grafiği.....38
Şekil 4.9. Serbest LOX için Lineweaver-Burk grafiği.....39
Şekil 4.10. İmmobilize LOX'ın yeniden kullanım grafiği.....40
Şekil 4.11. % 3'lük jel için Michaelis-Menten grafiği.....44
Şekil 4.12. % 3'lük jel için Lineweaver-Burk grafiği.....44
Şekil 4.13. % 7'lik jel için Michaelis-Menten grafiği.....45
Şekil 4.14. % 7'lik jel için Lineweaver-Burk grafiği.....46

1.GİRİŞ

Enzimlerin, teknik kimya ve bioteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu enzimlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir (Telefoncu,1997).

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görülmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. O halde bu enzimlerinlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir.

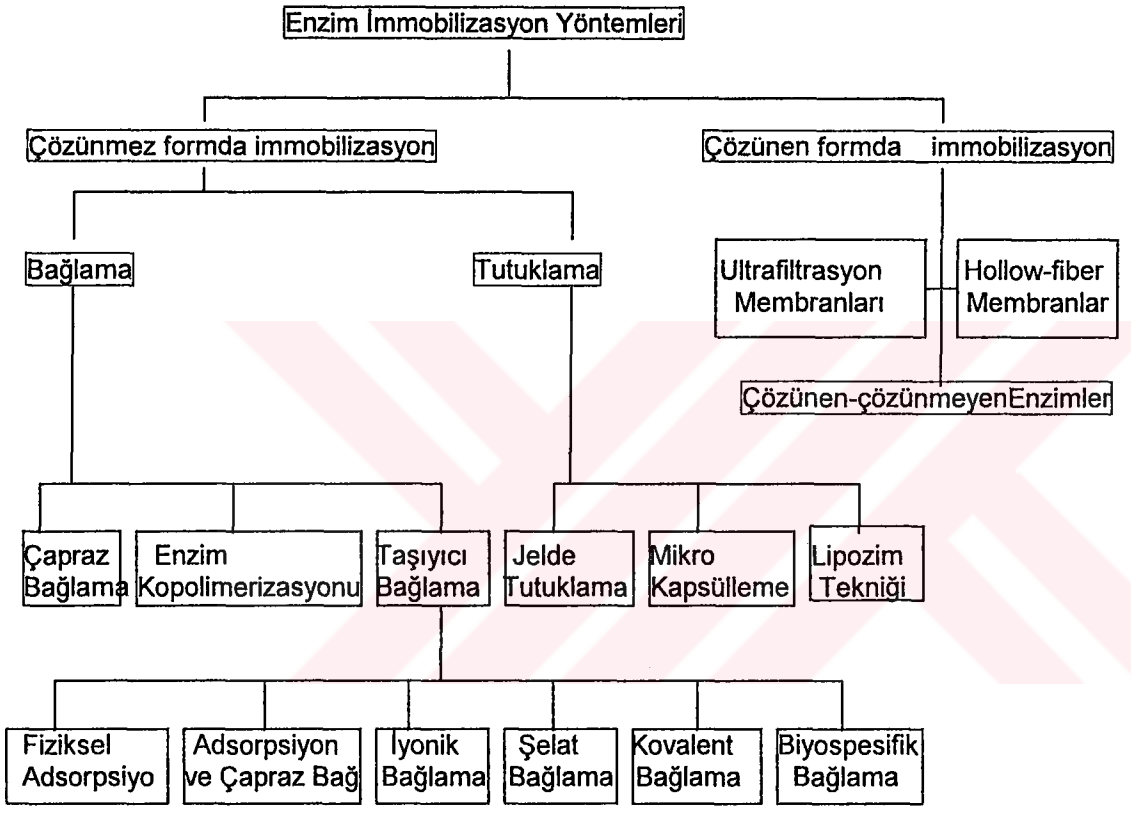
Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör ilavesi düşünülebilir, ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti daha da arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar (Tablo 1.1).

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmakla immobilize edilirler.

1.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır.

Bazı araştırıcılar hatalı olarak "immobilize" terimi yerine "tutuklanmış", "çözünmez hale getirilmiş", "bağlanmış" gibi terimleri kullanmaktadır. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm diğerlerini kapsarken diğerleri yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedir. Enzim immbilizasyon yöntemlerinin sınıflandırıldığı Şekil 1.1. incelendiğinde bu farklılık kolayca anlaşılacaktır.



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.

Çizelge 1.1. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri.

Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme , santrifüjleme v.b) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
Çevre koşullarına (pH ,sıcaklık v.s) karşı daha dayanıklıdır.
Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
Sürekli işlemlere uygulanabilir.
Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis , self-digestion) olasığı azalır.
Mekanistik çalışmalar için uygundur.

1.1.1.Taşıyıcı

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir.

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar.

Çizelge 1.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler.

Hidrofilik karakter, Suda çözünmeme , Gözenekli yapı , Mekanik stabilite ve uygun partikül formu , Kimyasal ve termal stabilite , Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı , Mikroorganizmalara karşı dirençlilik , Ucuzluk , Zehirsizlik, Rejenere olabilme.

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar Tablo 1.3'de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Enzim immobilizasyonunda kulllanılan taşıyıcılar.

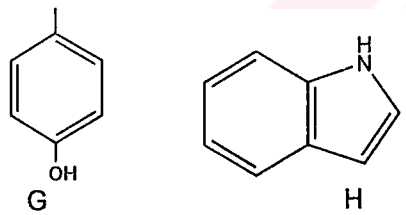
Anorganik	Doğal Polimer	Sentetik Polimer
Kil , cam Silikajel Bentonit Hidroksiapatit Titandioksit Zirkonyumdioksit Nikeloksit Pomza taşı Aktif karbon Metaller Metal oksitler	Selüloz Nişasta Dextran Agar ve agaroz Karragenan Kollagen Kitin ve Kitozan Jelatin Albumin İpek	Polistiren türevleri Poliakrilamid Naylon Vinil ve allil polimerler Oxiranlar Metakrilat İyon değiştirici reçineler Maleik anhidrid polimerleri

1.1.1.1.Kovalent Bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile ve genelde sulu ortamda gerçekleşir. Kovalent bağlanmaya, glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamidde bulunan aldehid grubuna, lipoksijenazın lizin ve N-Terminalinde bulunan $-NH_2$ grubu üzerinden kovalent bağlanması örnek verilebilir.

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma, enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir (Şekil 1.2.).





Şekil 1.2. Aminoasit yan zincirlerinin reaktif grupları.
A : N-Terminal aminoasitlerin amino grubu ve lizinin e-amino grubu
B : C Terminal aminoasitlerin ve aspartik ,glutamik asidin serbest karboksil grupları
C : Sisteinin sülfhidril grubu
D : Metiyoninin tioeter grubu
E : H istidinin imidazol grubu
F : Arginin guanidinil grubu
G :Tirozinin fenolik grubu
H : Triptofanın indolil grubu

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH v.b) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda

çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterlide olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözgenlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir.

Taşıyıcıya bağlamanın yarar ve sakıncaları Tablo 1.4. de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yarar ve sakıncaları.

Yararları	Sakıncaları
Reaktif taşıyıcıya enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir. Katı taşıyıcıya bağlı katalizör kullanışlıdır.Süzme ve santrifüjleme ile ayrılabilir. Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir. Ürünleri kirletmez. Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifikler kazanabilir. Sürekli sistemlere uygundur. değişik fiziksel formlarda (tabaka , partikül , fiber v.b)imal edilebilirler.	Enzimler immobilizasyon koşullarından etkilenebilirler. Bağlama aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden gerçekleşebilir. Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerekli kılabilir. Polimer taşıyıcının sebep olduğu sterik engelleme nedeniyle aktivite azalabilir.

1.1.1.2.Adsorpsiyon

Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorbsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar, aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, $CaCO_3$, kül, kollodyum, silika jel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Adsorpsiyon yönteminin yararları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan

immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

Yöntemin sakıncaları ise şöyle sıralanabilir; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir çekim yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine yol açmaktadır.

1.1.1.3.İyonik Bağlanma

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorpsiyonda etkili olmaktadır.

İyonik bağlanma çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.

1.1.1.4.Şelat Bağlama

Bazı transizyon metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür.
Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış olup daha sonrada kullanılmaya devam edilmiştir.

1.1.1.5.Biyospesifik Bağlanma

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşmeden yararlanılarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar. Örneğin bu yöntemle immobilize edilen İnvertaz, sakkarozun kesiksiz inversiyonunda kullanılmıştır. Spesifik monoklonal

antikorları suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda başarılı biçimde kullanılmaktadır.

1.1.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri

Küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur.

En çok kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, heteerosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinil sülfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdırlar ve şimdiye kadar yalnız immunolojik testlerde kullanılmışlardır.

1.1.2.1.Kopolimerizasyon Yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylece polimer matrikse bağlanmış olur. Yöntem polimer matrikste tutuklamaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmiş olması gibi üstünlüğü vardır.

1.1.2.2.Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent

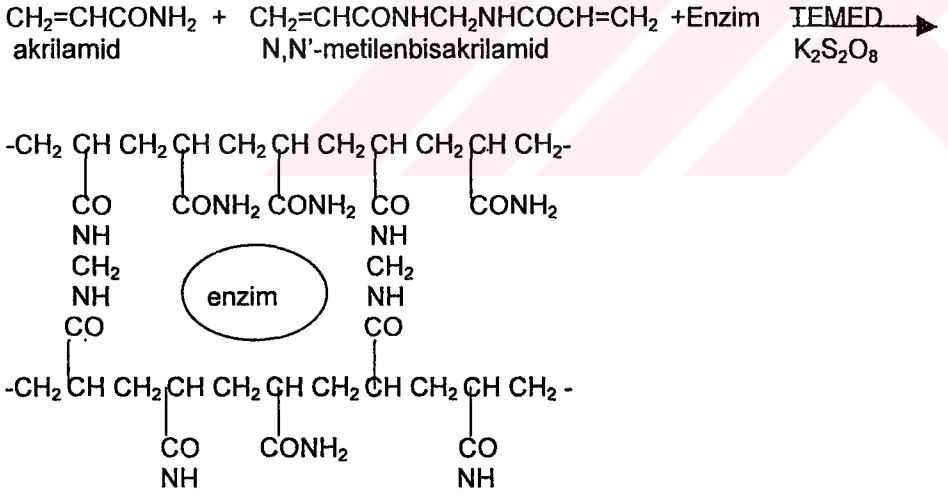
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olasıdır.

1.1.2.3.Polimer Matrikste Tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu taktirde enzim çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N '-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutulmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Bu durum şekil da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Çapraz bağlı poliakrilamid matriksinde enzim tutuklanması.

Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substatın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısınıda zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi

saptanması önemlidir. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleride dışarı çıkar.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

1.1.2.4.Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde (lipozomlarda) ise membran bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membranın) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin kapsülden dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

1.2.1.Lipoksijenaz

Lipoksijenaz cis,cis-1,4-pentadien grubu içeren doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesini katalizleyen oksidoredüktaz grubunda bir enzimdir.

Soya fasulyesi lipoksijenazı 839 amino asitli bir proteindir. Molekül ağırlığı 102.000 olup, her molekül başına bir demir atomu içerir. Demir atomu enzimin aktif

bölgesinde bulunur. Demir atomu, doymamış yağ asitlerine moleküler oksijenin katılmasını katalizler. Katalitik önemi olan bu demir atomuna 3 histidinin ve karboksi terminalinin COO^- grubunun ligand olduğu gösterilmiştir (Gaffney ,1996). Lipoksijenazın 3 boyutlu yapısı şekil 1.5.de gösterilmiştir (Minor ve ark, 1996).

Lipoksijenaz hemen hemen tüm baklagillerde bulunur. Soya fasulyesi, buğdaydan yaklaşık 200 kat daha fazla lipoksijenaz içerir. Şimdiye kadar bu enzimi ticari olarak kullanılabilecek miktarda üreten hiçbir mikroorganizma bulunmamıştır.

Lipoksijenazın doymamış yağları oksitlemesine linoleik asidin oksitlenmesi örnek olarak verilebilir (Uhlig,1998). Lipoksijenazın linoleik asidi oksitlemesine önerilen mekanizmalar şekil 1.4. de gösterilmiştir.

$CH_3(CH_2)_4CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$

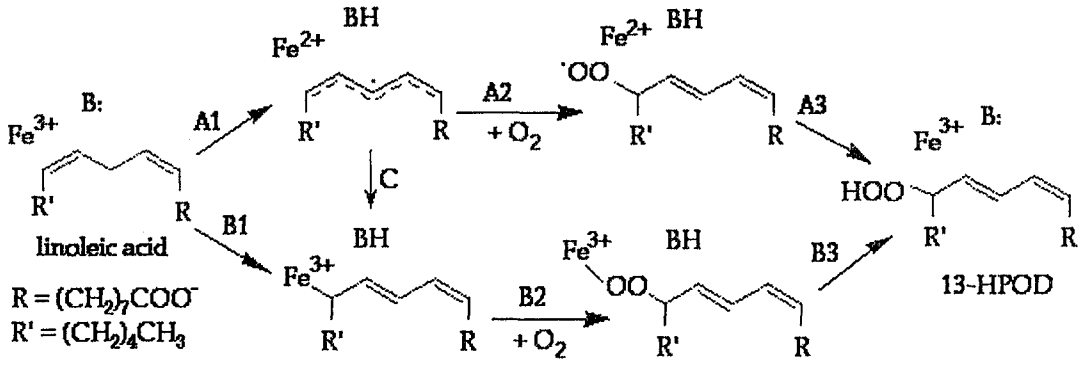
Linoleik asit (cis,cis-9,12-oktadekadienoik asit)

↓ Lipoksijenaz, $+ O_2$

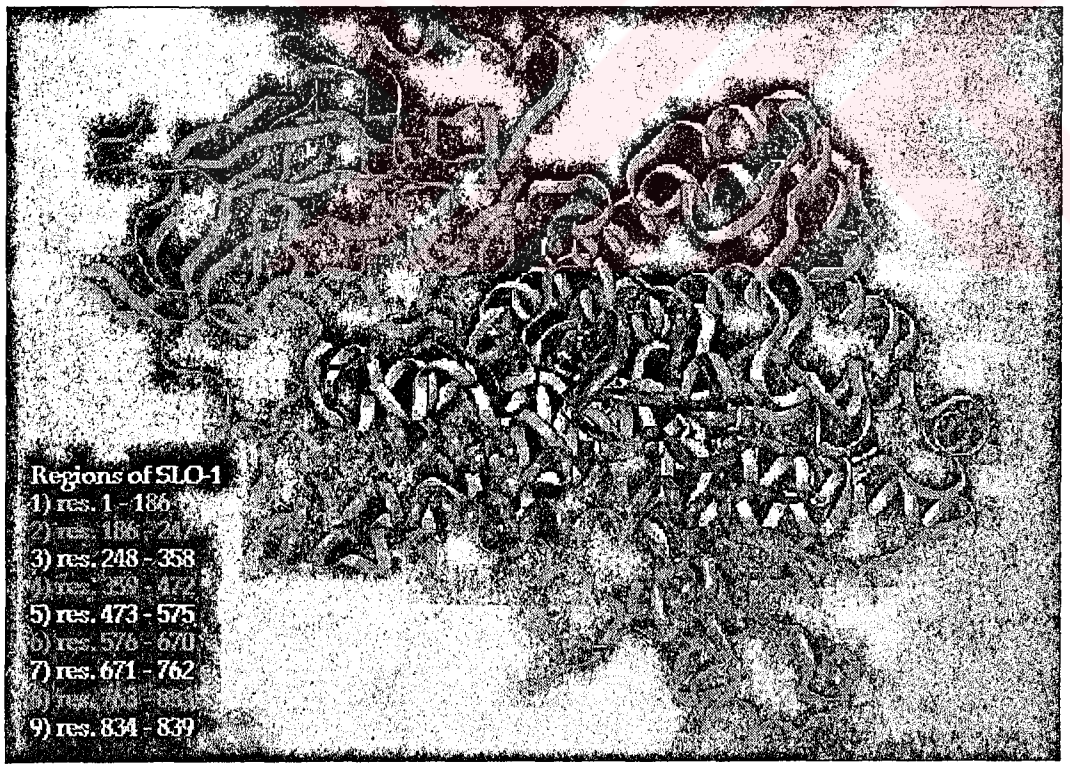
$CH_3(CH_2)_4-CH(OOH)-CH=CH-CH=CH(CH_2)_7-COOH$

13- hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik asit

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Şekil 1.4. Lipoksijenazın linoleik asidi 13- hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik aside dönüştürme mekanizması.B: Baz ; H:Hidrojen ; 13-HPOD: 13- hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik asid ; A1,A2,A3:mekanizmaya önerilen 1. yol(Groot ve ark,1975); B1,B2,B3 : mekanizmaya önerilen 2.yol(Corey ve ark, 1987) ; C : mekanizmaya önerilen olası 3.yol(Scarrow ve ark,1994).



Şekil 1.5. Soya fasulyesi lipoksijenazının amino asit dizisi (Minor ve ark,1996).

Ekmek yapımında lipoksijenaz enzimi (karoten oksidaz) kullanımı oldukça yaygındır. Bu iki sebepten kaynaklanmaktadır. Birincisi; lipoksijenaz karotenoidleri oksitleyerek ekmek içinin daha beyaz olmasını sağladığı için tercih edilen bir beyazlatıcıdır. İkincisi ise hamuru iyileştirici yönde etki edip, hamurun yoğurma toleransını arttırır. Diğer önemli bir rolü; hamurdaki doymamış yağlar üzerine etki ederek hamur kuvvetini ve ekmek aromasını geliştirir, gözenek yapısını inceltir, ekmek hacmini arttırır. Lipoksijenazların hamura etkisi, enzim hamura ilave edilir edilmez, karotenoid pigmentleri ve kabuk pigmentleri okside olarak hamur beyazlatılmaktadır.

Buğday unundan yapılan ekmeği geliştirmenin, saflaştırılmış lipoksijenaz ile değilde, soya fasulyesi unu ile olabileceği kaydedilmiştir. Çünkü lipoksijenazın uygun aktivite gösterebilmesi için linoleik asidin ortamda bulunması gerekir. Linoleik asit ise buğday ununda fazla bulunmaz. Buna karşın soya fasulyesi unu yeterli miktarda linoleik asit bulundurur. Günümüzde Amerika da buğday ununu geliştirmek için % 1 lik soya fasulyesi unu kullanılmaktadır (Tucker ve ark,1995).

Öte yandan lipoksijenazın ekmeği geliştirmesi üzerine hala tartışmalar vardır. Lipoksijenazların makarnalık buğdayın karakteristik sarı rengini gidermeleri nedeni ile makarna kalitesi üzerine bozucu etkilere sahip oldukları kaydedilmiştir. Çünkü makarnada durum buğdayın karakteristik sarı rengi istenir. Aynı zamanda lipoksijenaz enzimi makarnada aroma kaybına ve istenmeyen lezzetlerin oluşmasına yol açar.

Soya fasulyesinden elde edilen lipoksijenaz enzimi yerli bitkisel yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerine spesifik olarak oksijen ekleyebilmektedir. Bu sayede elde edilen maddeler risoneleik asite dönüştürülebilmektedir. Risinoleik asit ve onun türevleri ise sabunun, boyanın, verniğin, reçinenin, plastiğin ve yağlayıcı maddelerin asıl bileşenleridir. Örneğin A.B.D'de hint yağından elde edilen risoneleik asit yılda 30 000 tonlarla ithal edilmektedir. Eğer risoneleik asit A.B.D' deki yerli yağlardan üretilebilirse bu ekonomik açıdan büyük bir yarar sağlayacaktır.

1.2.2.Lipoksijenazın Biyolojik İşlevi

Lipoksijenazlar doymamış yağlara oksijen ekleyerek hidroperoksi türevlerini oluştururlar. Hidroperoksitler ise lökotrien ve lipoksinler gibi spesifik hormonların başlangıç maddesi görevini görürler. Bu hormonlar fizyolojik reaksiyonlarda, örneğin bağışıklık sisteminde ve solunum sisteminde önemli rol alırlar lipoksijenaz ürünleri ile ilgili olan lökotrienlerin uygulanması çeşitli hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır (Champe ve ark,1997).

Lökotrienlerin birbirine dönüşmesiyle çizelge 1.5 deki hastalıklar oluşur.

Çizelge 1.5.Lökotrienlerin birbirlerine dönüşmesiyle meydana gelen hastalıklar.

Lökotrien A_4→ Lökotrien C_4→ Lökotrien D_4→Lökotrien E_4
Düz kas kasılması Bronş kasılması Damar kasılması Artmış damar gerginliği Anaflaksinin yavaş reaksiyon veren maddesinin bileşenleri
Lökotrien A_4→Lökotrien B_4
Polimorfonükleer lökositlerin artmış kemotaksisi Lizozom enzimlerinin salıverilmesi Beyaz kan hücrelerinin adhezyonu

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Graveland, A., 1970 Lipoksijenazı glutenin üzerine adsorplamıştır. Adsorpsiyonun geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir. Glutenin –Lipoksijenaz, kompleksinin linoleik asid ile reaksiyonu sonucu hidroksi-epoksi asid oluşmuştur. Bu bileşik ise çabucak trihidroksi aside hidroliz olmuştur. Ayrıca glutenin lipidlerinin uzaklaştırılması durumunda, adsorpsiyonun inhibe olduğu kaydedilmiştir.

Emken, E.M., Dutton, H.J., 1970 Sulu soya fasulyesi unu ekstraktında ve 64 mg / ml $CaCl_2$ eklenip saflaştırılmış soya fasulyesi unu ekstraktında lipoksijenaz aktivitesi belirlenmiştir. Bu ekstraktlar kullanılarak, % 10 ham sabun stoğunda bulunan linoleik asidin % 90'ının 20-40 dakikada oksitlendiği belirlenmiştir.

Grosman, S., Trop, M., Budowski, P., Perl , M ., Pınsky, A., 1972 Soya fasulyesi lipoksijenazı CNBr ile muamele edilmiş agaroz ile tepkimeye konarak çözünürsüzleştirilmiştir. Aktivite, çözünür lipoksijenaz enzimlerinde uygulanan polarografik yöntem, spektrofotometrik yöntem ve radyoaktivite belirleyen ışıltı sayıcı kullanılarak ölçülmüştür. Agaroz bağlı lipoksijenaz kullanılarak, karoten-linoleat sulu çözeltisindeki karotenlerin % 70' nin beyazlatıldığı tespit edilmiştir.

Diaz, D. P., Piazza, G. J., Broweer, D. P., Medina, M. B., 1993 Soya fasulyesi lipoksijenaz enzimini karbonildiimdazol ile aktifleştirilmiş desteğe kovalent bağlamışlardır. Linoleik asid substrat olarak kullanılmış, enzim aktivitesi ise oluşan hidroperoksioktadekadienoik asid derişimi 560 nm de spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Bunun için Xylenol Orange metodu kullanılmıştır.

Serge, B., Rabinovitch-Chable H., Beneytout, Jean-L., 1994 Solanum tuberosum tuber, Lupinus albus, Cicer arietinum ve Pisum sativum tohumlarından ekstrakte edilen lipoksijenaz enzim çözeltisi, magnezyum silikatlı talk üzerine adsorbe edilmiştir. Tüm örnekler için spesifik aktivitede yüzlerce kat artış belirlenmiştir. Böylece hızlı, ucuz bir şekilde hem enzim saflaştırılmış hem de enzim kararlı hale getirilmiştir.

Cuperus, F.P., Kramer, G.F.H., Derksen, J.T.P., Bouwer, S.T., 1995 Bu çalışmada, nötral ve yüklü destekler üzerine soya fasulyesi lipoksijenazının

immobilizasyonu araştırılmıştır. En iyi sonuç anyon değiştirici esaslı selüloz kullanılarak elde edilmiştir. İmmobilize edilmiş lipoksijenaz aktivitesi, serbest lipoksijenaz aktivitesinden daha düşük bulunmuştur. Bu yağ asidinin destek kürelerine doğru difüzyonun sınırlanmasından yada yağ asidinin destek kürelerinden difüzyonunun engellenmesinden kaynaklanmaktadır.

Gafffney, B. J., 1996 X-Ray yapı analizi ve spektroskopik yöntemler kullanılarak lipoksijenaz yapısı aydınlatılmıştır. Bu yöntemler sonucu 3 histidinin yan zincirlerinin ve karboksi terminalinin COO^- grubunun katalitik önemi olan demir atomuna ligand oldukları kayd edilmiştir.

Hsu, A. F. C., Foglia, T. A., Piazza G. J., 1996 Borat tamponundaki lipoksijenaz ve kalsiyum alginat kürelerinin bir karışımı, tetrametoksi ortosilikatın hekzan çözeltisine konmuştur. Tetrametoksi ortosilikat hidroliz olarak alginat jelin içine nüfuz etmiş ve birlikte polimerleşerek lipoksijenazı immobilize edecek küreler oluşturmuşlardır. Tutuklanmış enzim aktivitesi, serbest enzimden daha az olmasına rağmen, alginat sol jelce immobilize edilen enzim aktivitesini uzun bir süre korumuş ve tekrar tekrar kullanılabilmiştir.

Pinto, M. C., Macias, P., 1996 Lipoksijenaz, linoleik asidin hidroperoksi bileşiklerini elde etmek için, glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamid jele immobilize edilmiştir. Enzimin katalitik etkinliği, bağlanma prosesi ile düşmesine rağmen, sistemin kararlılığı yüksek seviyede bulunmuştur. Sistemin bir reaktörde kullanılması ile uzun dönemli reaksiyonlar sonucu hiç bir inaktivasyona rastlanılmamıştır.

Syuan, S., Hsu, A.F.C., Thomasa, F., Shui, T., 1996 Bu çalışmada enzim immobilizasyonu için kilin etkinliği test edilmiştir. Kil çapraz bağlanabilecek bir tabakaya sahip olup, elek gibi gözenekli bir yapıya sahiptir. Enzim gözenekli yapıda tutulup, aktivitesini korumuş ve defalarca kullanılabilmiştir.

Gargouri, M., Legoy, M.D., 1997 Lipaz ve lipoksijenaz bienzimatik sistemi kullanılarak triaçilgliserolerden yağ asidi hidroperoksitleri elde edilmiştir. Ortam olarak oktan / pH= 9.0 tamponu (v / v =1 / 5) kullanılmıştır. Organik faz (oktan) sistemde triaçilgliserollerin yüksek derecede çözünmesine ve oluşan yağ asidi hidroperoksitlerin ortamdan kolayca ayrılmasına yol açmıştır. Triaçilgliseroller,

oktan ile su fazı ara yüzeyinde lipazca hidrolize edilmiştir. Serbet kalmış doymamış yağ asitleri sulu ortama transfer edilmiş ve lipoksijenaz ile reaksiyona konmuştur. Reaksiyon sonucu oluşan hidroperoksitler hidrofilik oldukları için sulu ortama geçmişlerdir. Mucor Javanicus'dan elde edilen lipaz için trilinolein substrat olarak kullanılıp, bu reaksiyonun ürünleri soya fasulyesi lipoksijenazı-1 ile etkileştirildiğinde yüksek derecede verim elde edilmiştir.

Chikere, A.C., Galunsky, B., Schünemann, V., Kasche, V., 2000 Soya fasulyesi lipoksijenazlarından lipoksijenaz 1 ve 2 bir anyon değiştirici ile saflaştırılmış ve ticari olarak hazır bulunan CNBr Sepharose 4B, Fractogel EMD Azlactone, Fractogel EMD Epoksi ve Eupergit C üzerine immobilize edilmiştir. 0,5 M'lık yüksek iyonik şiddette, epoksice aktive edilmiş destekler Eupergit C ve Fractogel EMD Epoksi üzerine immobilize edilmiş enzimler +4 °C de 5 günde aktivitelerini tamamen kaybetmişlerdir. Bu biyokatalizörlerin depolama kararlılıkları immobilizasyon koşulları değiştirilerek arttırılmıştır. Düşük iyonik şiddette, 0,05 M da, immobilize enzimin yarı ömrü 20 kez artmıştır. Fakat düşük iyonik şiddette enzim immobilizasyonun gerçekleşmesi zayıf bulunmuştur.

Gonzalez-Saiz, J. M., Pizarro, C., 2000 Dış değişikler sonucu, polimerik destek içinde oluşan yükler ile enzim arasındaki karşılıklı etkileşmeler incelenmiştir. Bu yükler tarafından oluşturulan elektrostatik alan enzimatik aktivite ve kinetik parametreler üzerinde asıl etkiyi oluşturur. Dış etkiler sonucu, poliakrilamid jel içinde akrilamidin hidrolizi sonucu, asidik grupların varlığı belirlenmiştir. Bu yüzden jel içinde enzimin mikroçevresinde pH'ın en fazla 1,5 birim düştüğü saptanmıştır. Böylece, deneysel olarak bulunan optimum pH'ın 1,5 birim alkaliye kaymış olduğu tespit edilmiştir.

Kermasha, S., Diom, N., Bisakowski, B., 2001 Kloroform, diklormetan, hekzan, izooktan, oktan ve toluen ortamında linoleik asit substrat olarak kullanılarak lipoksijenazın etkinliği incelenmiiştir. Sulu ortam ile karşılaştırıldığında, mono fazik izooktan, oktan, hekzan ortamında LOX aktivitesinde sırasıyla 2,6 ; 2,2 ; 1,8 kat artış gözlenmiştir. Bununla birlikte toluen, kloroform, diklormetan ortamında enzim aktivitesinde inhibisyon gözlemlenmiştir. Ayrıca organik çözücü içeren, % 3,5 oktan,

% 4 izooktan ve Tris-HCl tampon çözeltisinde LOX aktivitesinde büsbütün artış belirlenmiştir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Soya fasulyesi lipoksijenazı
Linoleik asid
Akrilamid
Glutaraldehid
Metilenbisakrilamid
TEMED
Amonyumpersülfat
Toluen
Kloroform
Tween 20 (polyoksiethylen sorbitan monolaurat)
Azot gazı
Fosfat tamponu
Ksilenol orange
Borat tamponu
Amonyum ferrus sülfat
H_2SO_4
Metanol
2,6 di-t-butil-4-metilfenol
Standard sığır albumini
Sodyum karbonat
Na-K Tartarat
NaOH
Folin Ciocalteu
Kümen hidroperoksit

3.1.2.Kullanılan Cihazlar

U.V-Vis. Sektrofotometre (Ati Unicam)
pH metre (Hanna 8417)
Magnetik karıştırıcı
Kriyostat(Grant)
Etüv (ES 500)
Otomatik pipet
Elektrikli terazi
Mikroskop (Prior,England)

3.2.Metod

3.2.1.İmmobilize Lipoksijenazın Hazırlanması

Poliakrilamid jel kürelerinin hazırlanması, glutaraldehid ile aktive edilmeleri ve lipoksijenazın bu kürelere immobilizasyonu Klaus Mosbach tarafından blirtilen yönteme göre yapılmıştır (Mosbach, 1976).

Jelin yapısı, kürelerin büyüklüğü, jeldeki gözenekler, polimerizasyon kinetiğinin yanında, özellikle tampondaki toplam monomer konsantrasyonu yüzdesi (T) ve monomerdeki toplam karşı bağlayıcı bileşik yüzdesi (C) oranına bağlıdır.

$$T = \frac{\text{Bisakrilamid(g)} + \text{akrilamid(g)}}{\text{tamponçözelti(ml)}} \times 100 \qquad (3.1)$$

$$C = \frac{\text{Bisakrilamid(g)}}{\text{akrilamid(g)} + \text{bisakrilamid(g)}} \times 100 \qquad (3.2)$$

Yapılan çalışmada T:C=10:3, T:C=10:5 ve T:C=10:7 olmak üzere 3 farklı jel edilmiştir.

3.2.1.1.Jel Kürelerinin Elde Edilişi (T:C=10:5)

Hidrofilik faz: Akrilamid; N,N'-Metilenbisakrilamid; 0,1 M Tris-HCl tamponu pH=7,0; N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED); amonyum per sülfat.

Organik faz: Toluene; kloroform.

Kürelerin polimerleşmesi, bir magnetik karıştırıcı, azot gazı (N_2) için giriş ve çıkış ve monomer çözeltisinin eklenmesi için üst bir giriş ile donatılmış 250 ml' lik bir balonda gerçekleştirilmiştir. Balon, 1L'lik beherde buz banyosuna konmuş, beher ise magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Balona 72,5 ml toluen, 27,5 ml kloroform olmak üzere 100 ml hidrofobik faz eklenip, bu fazın sulu faz ile aynı yoğunlukta olması sağlanmıştır. Polimerleşmeden önce, hidrofobik faz yaklaşık 1000 rpm de N_2 (g) altında karıştırılmıştır. Karıştırma hızı oluşacak küre büyüklüğünü belirler. Tris-HCl tamponunda 1,425 g akrilamid ve 0,075 g bisakrilamid çözülüp, 14,625 ml'ye tamamlanmış, derişimi 0,6 g / ml olan amonyum persülfat çözeltisinden 0,25 ml, TEMED den ise 0,125 ml eklenip, bu monomer çözeltisi hafifçe polimerleşmeye başladığında (vizkozitesi arttığında) balona ilave edilmiştir. Sulu fazın polimerleşmesi 1-5 °C'de 30 dakikada gerçekleşmiştir. Polimerleşme sırasında dışarıya ısı verildiği gözlemlenmiştir.

Polimerleşme işleminden sonra, poliakrilamid jel küreleri, içine cam pamuğu yerleştirilmiş huni kullanılarak çözeltiden ayrılmışlardır. Bu küreler, kloroformun uzaklaştırılması için ilk önce 50 ml toluen ile ardından 2 litre su ile yıkanmışlardır. Bunu takiben jel küreleri, etüvde 60 °C de 12 saat kurutulmuştur.

3.2.1.2.Jel Kürelerinin Glutataraldehid İle Aktifleştirilmesi

Yukarıda anlatılan şekilde elde edilen 100 mg kuru polimer alınıp, suda şişmesine izin verilmiş ardından bu kürelerin üzerine pH=7,4 , 0,2 M fosfat tamponunda çözülmüş % 6' lık glutaraldehid çözeltisinden 4 ml eklenip 37 °C'de 14 saat inkübe edilmiştir. Glutaraldehid ile muamele edilmiş küreler, 4 °C'de bulunan destile su ile 4 saat aralıklarla bir gün boyunca yıkanmıştır.

3.2.1.3.Enzimin Jele Bağlanması

Lipoksijenazın 0,1 M , pH=8,0 ; 8;5 ; 9,0 ; 9,5 ; 10,0 borat tamponunda 0,4 mg / ml'lik çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerden 4 ml alınıp glutaraldehid ile aktive edilmiş jel kürelerinin üzerine eklenmiştir. Lipoksijenaz bu kürelerle 4 °C de 12 saat inkübe edilmiştir. İmmobilize olmamış protein kısmı, kürelerin üstünden otomatik pipetle alınmış, Lowry yöntemine göre protein miktarları belirlenmiştir. Bağlanmamış proteini yerinden söküp almak için küreler 4 ml'lik borat tamponu ile 5 defa daha yıkanıp, kürelerin üstündeki bu sıvılar alınıp protein içerikleri saptanmıştır.

3.2.2.Enzim Aktivite Tayini

Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı yada meydana gelen ürün miktarı belirlenerek enzim aktivitesi belirlenmektedir (Gözükara,1997). Bu çalışmada oluşan ürün derişimi U.V-Vis. Sektrofotometre'de, xylenol orange metoduna göre 560 nm'de okuma yapılarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi "spesifik aktivite" birimi ile verilmiştir.

Ünite: Bir mikromol (μmol) yahut 10^{-6} mol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri INTERNATIONAL UNIT (IU) şeklinde gösterilmektedir.

Spesifik aktivite: Bir miligram (mg) proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Ünite}}{\text{miligram}} = \frac{\mu mol}{mg.dk.} \qquad (3.3)$$

3.2.3. Hidroperoksioktadekadienoik Asit Oluşturulması

3.2.3.1. Serbest enzim ile hidroperoksioktadekadienoik asit oluşturulması

Serbest enzimin pH = 9,0'da 0,01mg/ml lik çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 2μL alınıp, deney tüplerinde bulunan 0,1 M, pH = 10,5 karbonat tamponunun üzerine eklenmiştir. Daha sonra bu çözelti 30 °C' de 10 dk.inkübasyona maruz bırakılıp, çözeltinin sıcaklığının 30 °C' olması sağlanmıştır. % 95 etanolde çözülmüş 20 mM'lık linoleik asitten 2,5-400 μL arasında değişen hacimler alınıp, bu tüplere eklenmiş ve tüp içeriklerinin 2500 μL olması sağlanmıştır. Deney tüplerinde 3 dk sonra 500 μL metanol eklenip reaksiyon durdurulmuştur. Bu oluşan ürünlerden 50 μL alınıp Xylenol Orange Metoduna göre hidroperoksioktadekadienoik asit içerikleri hesaplanmıştır.

3.2.3.2. İmmobilize enzim ile hidroperoksioktadekadienoik asit oluşturulması

0,02-0,03 mg enzim içeren poliakrilamid jel kürelerinden küçük porsiyonlar deney tüplerine alınarak, üzerine 0,1 M pH = 8,5 tamponu eklenip, 35 °C' de 10 dk.inkübe edildikten sonra deney tüplerinin hacmi 2500 μL'ye 2,5-400 μL aralğında değişen 20 mM linoleik asit ile tamamlanmıştır. Reaksiyon 3 dk sonra 500 μL metanol ile durdurulmuştur. Bu oluşan ürünlerden 50 μL alınıp Xylenol Orange Metoduna göre hidroperoksioktadekadienoik asit içerikleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Xylenol Orange Metodu

Oluşan hidroperoksioktadekadienoik asit örneğinden 50 µL alınıp, xylenol orange çözeltisine (2,0 mL) eklenmiş ve etanol ile 2,1 ml'ye tamamlanmıştır. Kör ise 2,0 mL xylenol orange çözeltisi + 100 µL etanol ile hazırlanmıştır. Ölçüm için örnekler ve kör oda sıcaklığında 45 dk. bekletilip, 560 nm'de absorbansları okunmuştur(Jiang,1991:Diaz ve ark.1993'den).

Günlük olarak taze hazırlanan kümen hidroperoksid boya çözeltisi, kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılmiştır. Çizilen kalibrasyon eğrisi şekil de gösterilmiştir. Kümen hidroperoksid çözeltisi 1:1 oranında toluen : metanol içinde hazırlanmıştır.

Xlenol Orange Çözeltisi

100 µM xylenol orange

250 µM Amonyum ferrus sülfat

25 mM H_2SO_4

4mM 2,6 di-t-butil-4 metilfenol

Yukarıdaki kimyasalların (9:1 v/v) metanol:su içindeki çözeltilerinin hazırlanması ile oluşturulmuştur.

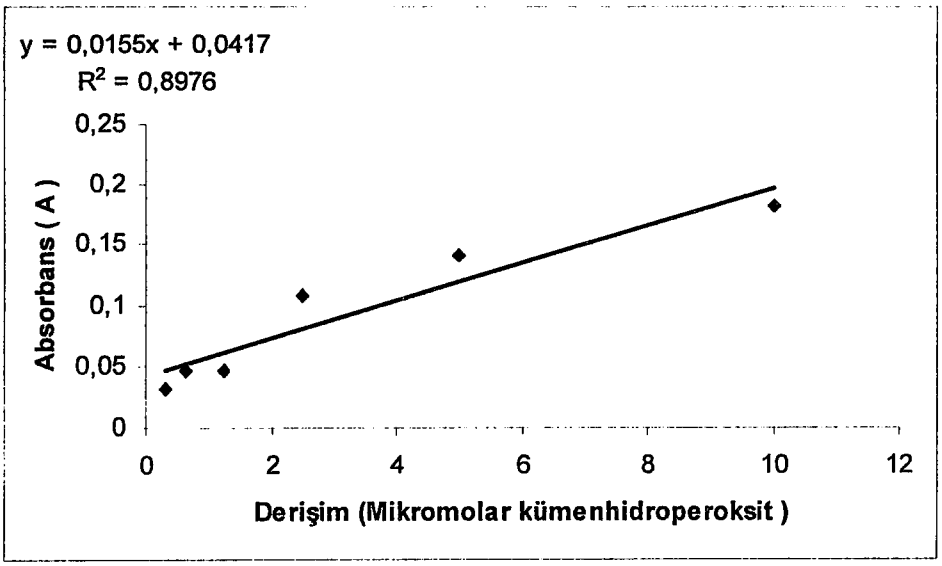
560 nm'de Fe(III)xylenol orange kompleksinin oluşumu aşağıdaki mekanizma ile açıklanmaktadır (Gupta,1973 : Lima, 1995'den).

$$LOOH + Fe(II) + H^+ \rightarrow Fe(III) + H_2O + LO\bullet \quad (3.4)$$

$$LO\bullet + xylenol + H^+ \rightarrow LOH + xylenol\bullet \quad (3.5)$$

$$+ \quad xylenol\bullet + Fe(II) \rightarrow xylenol + Fe(III) \quad (3.6)$$

$$LOOH + 2Fe(II) + 2H^+ \rightarrow 2Fe(III) + H_2O + LOH \quad (3.7)$$



Şekil 3.1. Standart kümenhidroperoksit grafiği.

3.2.5.Protein Tayini

Protein tayini metodu Lowry ve ark (1951), tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Protein tayini için aşağıda içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1)Çözelti A: Bu çözelti 2 g. Na_2CO_3, 0,1 M NaOH çözeltisinde çözülerek ve aynı çözelti ile son hacim 100 ml'ye seyreltilerek hazırlanmıştır.

2)Çözelti B: 0,5 g.$CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik Na-K Tartarat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

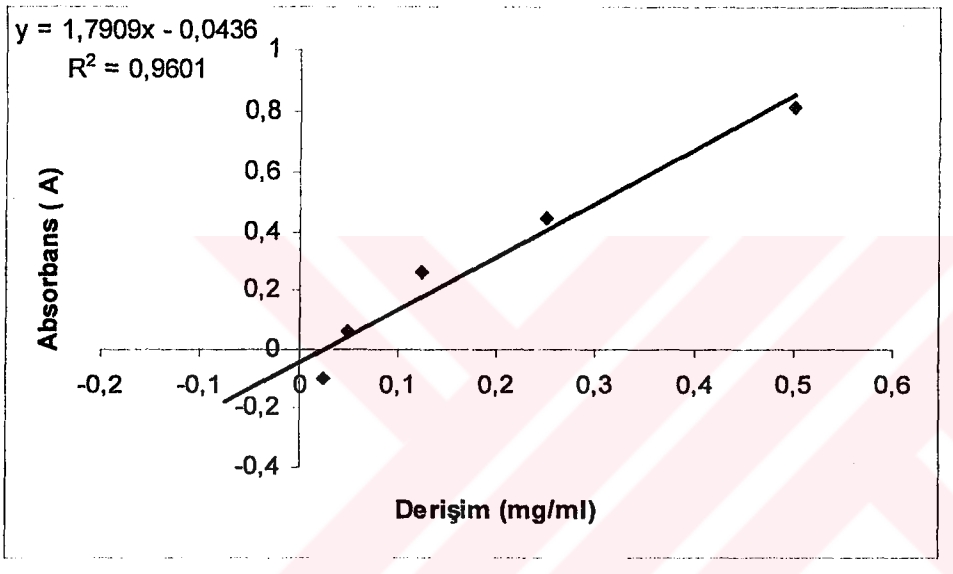
3)Çözelti C: 50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı an hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)

4)Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:3 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5)Standart protein çözeltisi: 1 ml'sinde 0,5 mg. sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisiyle hazırlanmıştır.

6)Standart protein eğrisinin çizimi; 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla standart protein çözeltisinden (0,5 mg./ml) 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,50; 1,00 ml eklenip serum fizyolojik ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Her tüpe 5ml C çözeltisi

ilave edilip, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:3 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 ml eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuş, bu değerler 0 ; 0,025 ; 0,050 ; 0,125 ; 0,250 ; 0,500 mg / ml derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Poliakrilamid jelden sökülen protein, miktarları standart protein eğrisinden ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Standart protein grafiği.

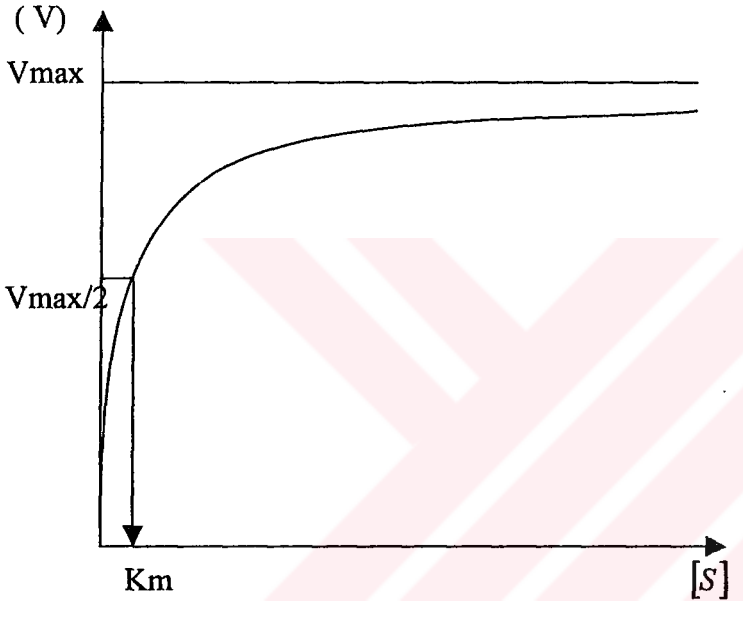
3.2.6.Michaelis-Menten Katsayısı (Km) Ve Maksimum Hızın(Vmax) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi

Sabit konsantrasyondaki pek çok enzimin reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Eğer enzimin reaksiyon hızı(V), substrat konsantrasyonuna($[S]$) karşı grafiğe geçirilirse şekil 3.3.'de olduğu gibi hiperbolik bir eğri ortaya çıkar. 1913 yılında Leonard MICHAELIS ve Malid MENTEN bu hiperbolik eğrinin matematiksel olarak nasıl ifade edileceğini bir formüle bağlamışlardır (Rawn,1989).

$$V = \frac{V\,\max \times [S]}{Km + [S]} \qquad (3.8)$$

Vmax = Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız.

Km = Michaelis-Menten sabiti.

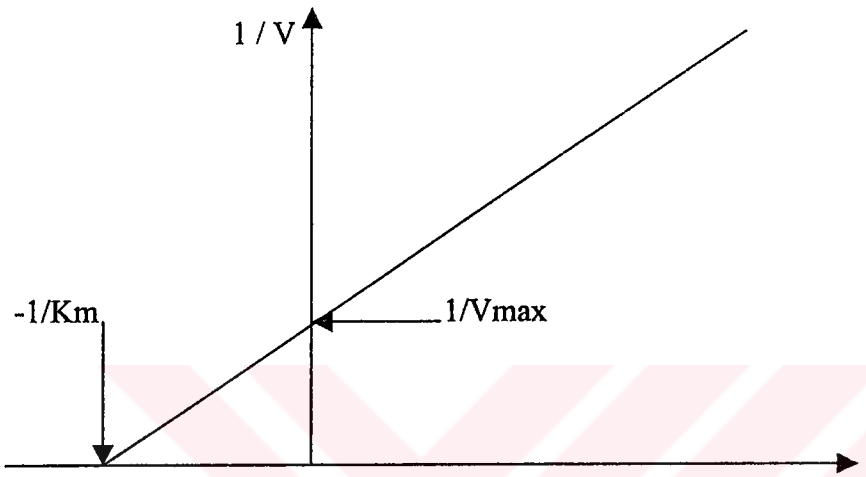


Şekil 3.3. Michaelis-Menten grafiği. Artan substrat konsantrasyonuna karşı hızdaki değişim.

Michaelis-Menten eşitliği bir hiperbolik eğrinin denklemidir. Vmax'ın değerini grafikten tam olarak tespit etmek zordur.Eğer Michaelis-Menten eşitliği her iki tarafı 1'e bölünürse Lineweaver-Burk eşitliği olarak adlandırılan bir doğru denklemi elde edilir. 1/ S'ye karşı 1/V grafiğe geçirilirse şekil 3.4.'de görüldüğü gibi Km ve Vmax. değerleri kolaylıkla belirlenebilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km + [S]}{V\,\max \times [S]} \qquad (3.9)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V\max} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V\max} \qquad (3.10)$$



Şekil 3.4. Lineweaver-Burk grafiği.

3.2.7.Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

1889 yılında İsveçli kimyacı S. Arrhenius tarafından, bir reaksiyon hızı (V) ile ortam sıcaklığı (T) arasında;

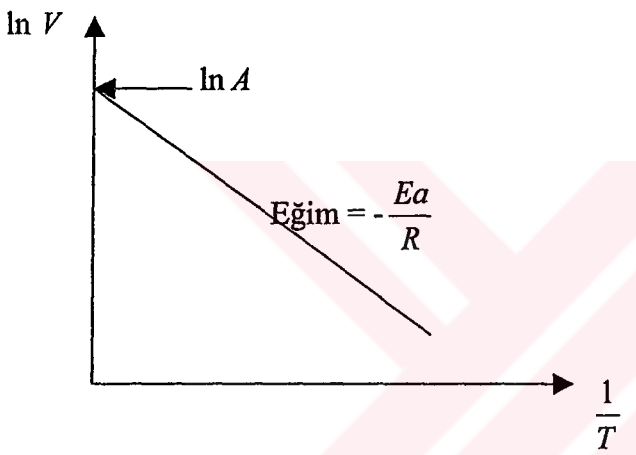
$$V = A \cdot e^{-Ea / R.T} \qquad (3.11)$$

denklemiyle gösterilen bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Tez,1990). Ea aktivasyon enerjisi, R ideal gaz sabiti, A ise Arrhenius sabitidir. Bu denklemin ln'i alınıp, 1 / T ye karşı ln V grafiğe geçirilirse, ordinat eksenini lnA değerinde kesen, eğimi –Ea/R olan bir doğru elde edilir (Şekil 3.5.).

$$\ln V = -\frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \qquad (3.12)$$

Ayrıca T_1 ve T_2 sıcaklıklarında elde edilen V_1 ve V_2 arasında ise aşağıdaki denklem çıkarılabilir.

$$\ln \frac{V_2}{V_1} = \frac{Ea}{R} . (\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}) \qquad (3.13)$$



Şekil 3.5. Aktivasyon enerjisinin bulunması için Arrhenius grafiği.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. İmmobilizasyon İle İlgili Bulgular

4.1.1.1 Poliakrilamid jel Küresi Eldesi

Poliakrilamid jel Mosbach, K. ve arkadaşları tarafından bildirilen yönteme göre yapılmıştır. Kurutulmuş poliakrilamid jel kürelerinin mikroskopta gözlenmesi ile küre çaplarının 500 μm olduğu tespit edilmiştir (Ekler).

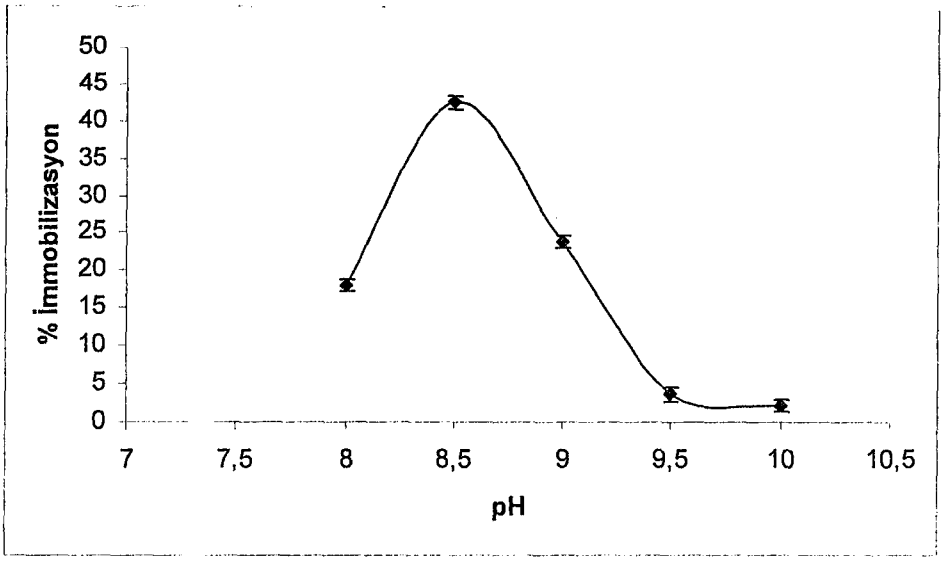
4.1.1.2. İmmobilizasyon İçin Optimum pH' ın Belirlenmesi

Bu amaçla 0,1 M , pH = 8,0 – 10,0 borat tamponu aralığında çalışılmıştır. LOX'ın 0,4 mg / ml lik çözeltisi yukarıda belirtilen tamponlarda hazırlanmış ve bunun 4 ml'si, daha önceden 100 mg kuru poliakrilamidden alınıp, glutaraldehid ile aktifleştirilmiş jel küreleri üzerine eklenmiştir. Bu işlemlere göre elde edilen veriler çizelge 4.1.'de verilmiştir. Buna göre en iyi immobilizasyon % 42,5 ± 1,5 ile pH= 8,5'te sağlanmıştır. Tüm veriler 3 paralel çalışma ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. pH ile poliakrilamid jel kürelerinde immobilizasyon.

pH	mg LOX / g poliakrilamid jel	% İmmobilizasyon
8,0	2,88 ± 0,28	18,0 ± 1,8
8,5	6,80 ± 0,24	42,5 ± 1,5
9,0	3,80 ± 0,37	23,8 ± 2,4
9,5	0,56 ± 0,20	3,6 ± 1,3
10,0	0,34 ± 0,29	2,1 ± 1,8

Çizelge 4.1.'deki veriler grafiğe geçirilirse şekil 4.1. elde edilir.



Şekil 4.1. Değişik pH'larda başta eklenen LOX miktarına göre poliakrilamid jel üzerine, enzimin % immobilizasyon miktarları.

4.1.2. İmmobilize ve Serbest LOX İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

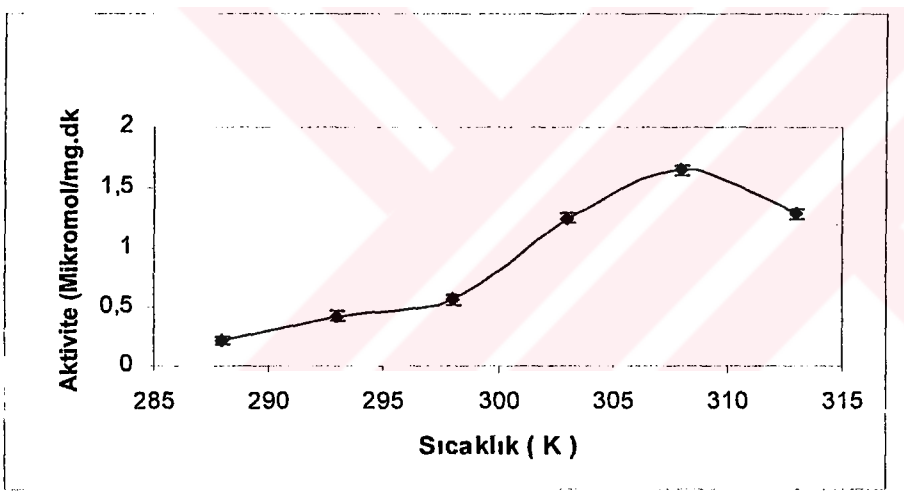
4.1.2.1. İmobilize Enzim İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

İmmobilize enzim küreciklerinden küçük porsiyonlar alınıp, üzerine 2300 µL 0,1 M pH= 8,5 tamponu eklenip, çeşitli sıcaklıklarda 10 dakika ön inkübasyondan sonra, etanolde hazırlanan 20 mM linoleik asit çözeltisinden 200 µL eklenip, 3 dakika beklenilmiştir. Reaksiyon 500 µL soğuk metanol ile durdurulmuştur. Yapılan çalışmalar çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi immobilize LOX için optimum sıcaklık (enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık) 308 K (35 °C) bulunmuştur.

Çizelge 4.2. 288-313 K sıcaklıkları arasındaki immobilize enzim aktiviteleri.

Sıcaklık (K)	İmmobilize LOX Aktivitesi (µmol / mg prot.dk.)
288	0,215 ± 0,021
293	0,417 ± 0,021
298	0,556 ± 0,022
303	1,244 ± 0,041
308	1,650 ± 0,025
313	1,284 ± 0,033

Çizelge 4.2.'de verilen değerler şekil 4.2'de grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 4.2. İmmobilize LOX için sıcaklık- aktivite değişimi.

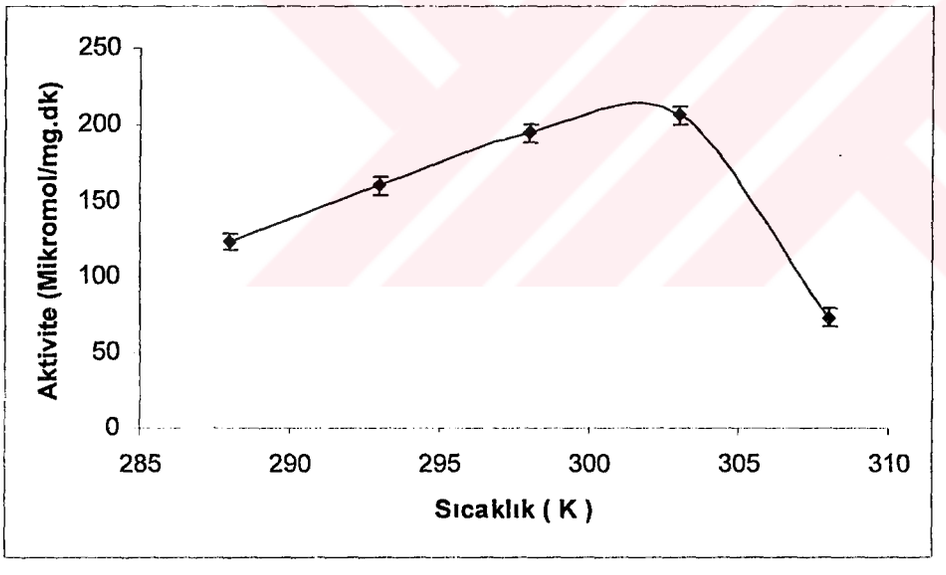
4.1.2.2. Serbest Enzim İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

2298 µL, pH= 8,5 tamponuna, 200 µL 20 mM linoleik asit eklenip, 10 dakika ön inkübasyondan sonra 288-308 K arasında LOX'ün aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 288-308 K sıcaklıkları arasındaki serbest enzim aktiviteleri.

Sıcaklık	Serbest LOX Aktiviteleri (μ mol / mg prot.dk)
288	122,8 ± 9,8
293	159,4 ± 8,0
298	193,9 ± 8,1
303	205,7 ± 11,3
308	73,2 ± 11,3

Çizelgeden de görüleceği gibi serbest LOX için optimum sıcaklık 303 K (30 °C) bulunmuştur. Çizelge 4.3'deki verilerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.3. elde edilmiştir.



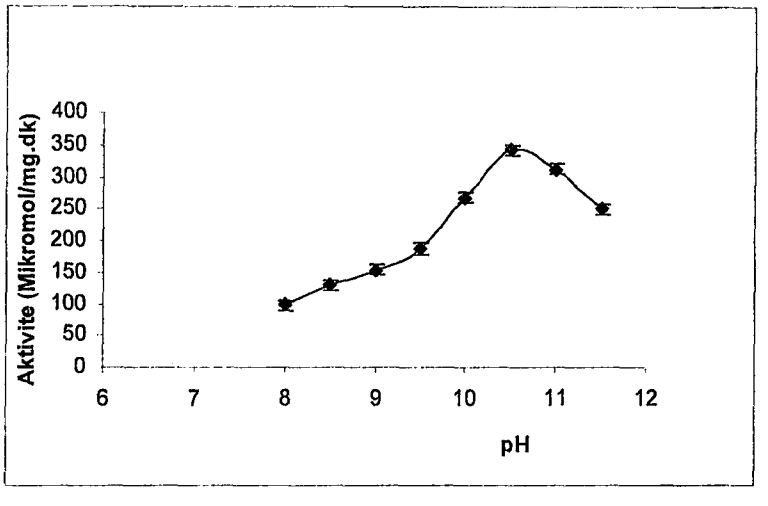
Şekil 4.3. Serbest enzim için sıcaklık – aktivite değişimi.

4.1.3. Serbest Enzim İçin Optimum pH' ın Belirlenmesi

Optimum pH'ın bulunması için, optimum sıcaklık olan 30 °C de çalışılmış pH=8,0-10,0 arasında 0,1 M borat tamponu, pH=10,5-11,5 arasında ise 0,1 M karbonat tamponu kullanılmıştır. Aktivite için 2298 μL tampon çözeltisi + 2μL, 0,01 mg/ml enzim çöeltisi kullanılmış 10 dakika ön inkübasyondan sonra 200 μL 20 mM linoleik asit çözeltisi eklenip, 3 dakika reaksiyonun gerçekleşmesine olanak sağlanmış, ardından 500 μL metanol ile reaksiyon durdurulmuştur.

Çizelge 4.4. Çeşitli pH' larda serbest enzim için bulunan aktivite değerleri .

pH	Aktivite (μmol /mg prot.dk)
8,0	96,9 ± 3,7
8,5	128,7 ± 2,3
9,0	152,9 ± 6,4
9,5	187,4 ± 4,9
10,0	268,2 ± 4,9
10,5	341,5 ± 8,1
11,0	311,3 ± 6,5
11,5	250,2 ± 4,0



Şekil 4.4. Serbest enzim için pH –aktivite grafiği.

4.1.4. İmmobilize ve Serbest LOX İçin Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

4.1.4.1.İmmobilize LOX için Aktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi

288-308 K arasında bulunan immobilize LOX aktivitelerinin ln'i alınıp 1/ T'leri çizelge 4.5.de gösterilmiş olup, bu verilerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.5. elde edilmiştir. Aktivasyon enerjisi (Ea) ise eğim (m) ile ideal gaz sabiti (R)'nin çarpımından hesaplanmıştır.

Grafikte bulunan 4.1. denkleminden m=9306, R= 8,314 J/ mol.K alındığında, aktivasyon enerjisi;

$$y=-9306.x+30,78 \qquad (4.1.)$$

$$Ea = m \times R$$

$$Ea=9306 \times 8,314$$

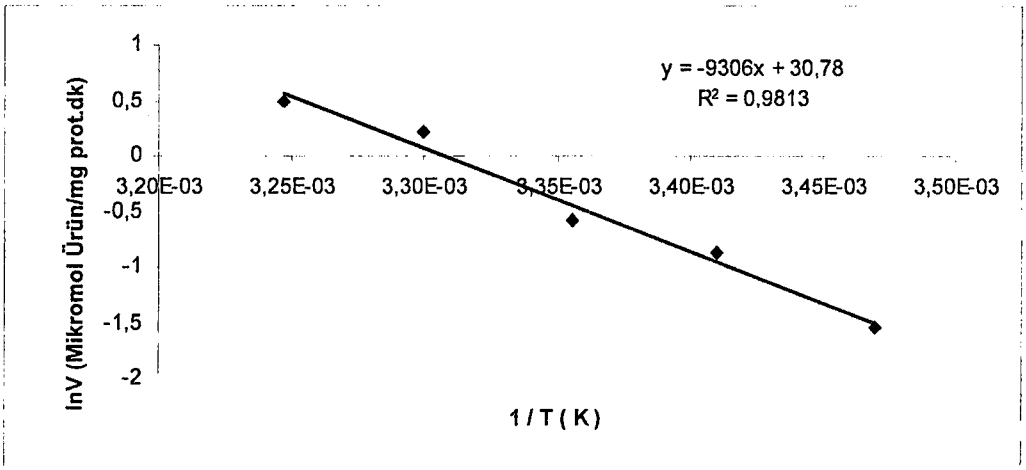
$$Ea=77370 \text{ J / mol}$$

$$Ea=77,370 \text{ kJ / mol}$$

olarak bulunumuştur.

Çizelge 4.5. Aktivasyon enerjisinin bulunması için çeşitli sıcaklıklardaki immobilize LOX 'ın aktivite değerleri.

Sıcaklık (K)	İmmobilize LOX Aktivitesi (μmol / mg prot.dk.)	ln Aktivite ln(μmol/mg prot.dk)	1/ Sıcaklık 1 / T (K^{-1})
288	0,215 ± 0,021	-1,537	$3,472.10^{-3}$
293	0,417 ± 0,021	-0,875	$3,413.10^{-3}$
298	0,556 ± 0,022	-0,587	$3,356.10^{-3}$
303	1,244 ± 0,041	0,218	$3,300.10^{-3}$
308	1,650 ± 0,025	0,5	$3,247.10^{-3}$



Şekil 4.5. İmmobilize LOX için aktivasyon enerjisi grafiği.

4.1.4.2. Serbest LOX İçin Aktivasyon Enerjisinin Bulunması

288-303 K arasındaki ölçümü alınan serbest LOX aktivitelerinin ln'i alınıp 1 / T'ye karşı çizelge 4.6. deki değerlerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.6. elde edilmiştir.

Aktivasyon enerjisi ise;

$$Ea=3048,5\times 8,314 \qquad (4.2.)$$

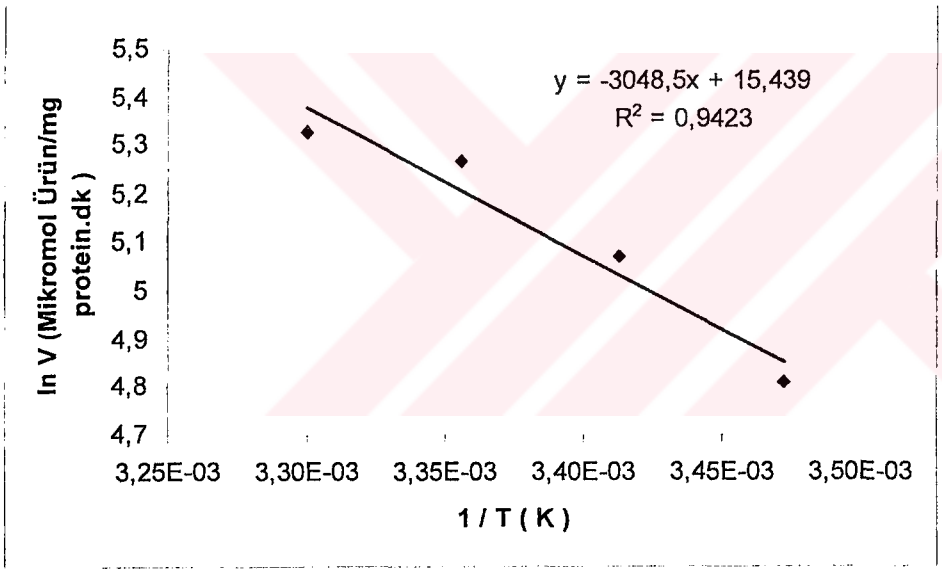
Ea=25345 J / mol

Ea=25,345 kJ / mol

olarak hesaplanmıştır .

Çizelge 4.6. Aktivasyon enerjisinin bulunması için serbest LOX'ın çeşitli sıcaklıklardaki aktivite değerleri.

Sıcaklık	Serbest LOX Aktiviteleri (μ mol / mg prot .dk)	ln Aktivite ln(μmol / mg prot.dk)	1/ Sıcaklık 1 / T (K^{-1})
288	122,8 ± 9,8	4,81	$3,47.10^{-3}$
293	159,4 ± 8,0	5,07	$3,41.10^{-3}$
298	193,9 ± 8,1	5,27	$3,36.10^{-3}$
303	205,7 ± 11,3	5,33	$3,30.10^{-3}$
308	73,2 ± 11,3	4,29	$3,25.10^{-3}$



Şekil 4.6. Serbest LOX için aktivasyon enerjisi grafiği.

4.1.5. İmmobilize Ve Serbest Enzim İçin Maksimum Hız (Vmax) Ve Michaelis-Menten Katsayısının (Km) Belirlenmesi

4.1.5.1. İmmobilize LOX İçin Vmax Ve Km'nin Belirlenmesi

Km ve Vmax'ın değerleri, 35 °C ve pH = 8,5'te immobilize enzim için çizilen için Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

333,33-2000 μM arasında linoleik asit kullanılarak, immobilize LOX için çizelge 4.7.'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. İmmobilize enzim için, çeşitli substrat konstrasyonlarına karşı LOX aktivite değerleri.

S (μM)	V (μ mol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$)	1/S, (μM^{-1})	1/ V (μ mol^{-1}.mgprot.dk)
333,33	0,697	0,0030	1,435
666,66	0,932	0,0015	1,073
1333,32	1,65	0,00075	0,606
2000	2,46	0,0005	0,406

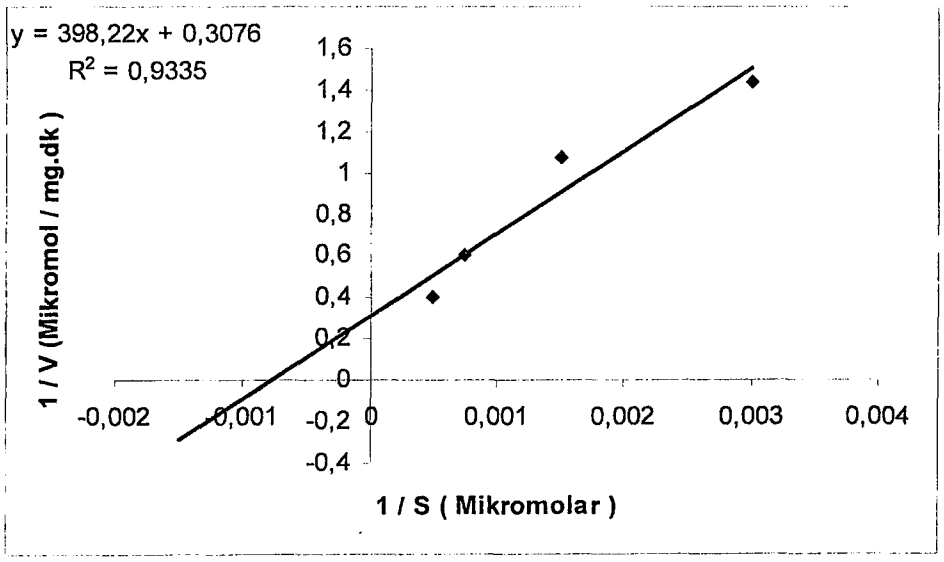
Çizelge 4.7.'deki veriler grafiğe geçirilirse şekil 4.7. elde edilir. Şekil 4.8' deki doğru denkleminden Vmax ve Km bulunabilir.

$$y=398,22 \cdot x +0,3076 \qquad (4.3.)$$

x = 0 ise y = 0,3076 , y=1 / Vmax , Vmax =3,25 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$

y = 0 ise $x = -7,724.10^{-4}$, x = -1/Km , Km = 1294,6 μM , Km = 1,2946 mM

Turnover sayısı : 5,53 s^{-1}.



Şekil 4.7. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği .

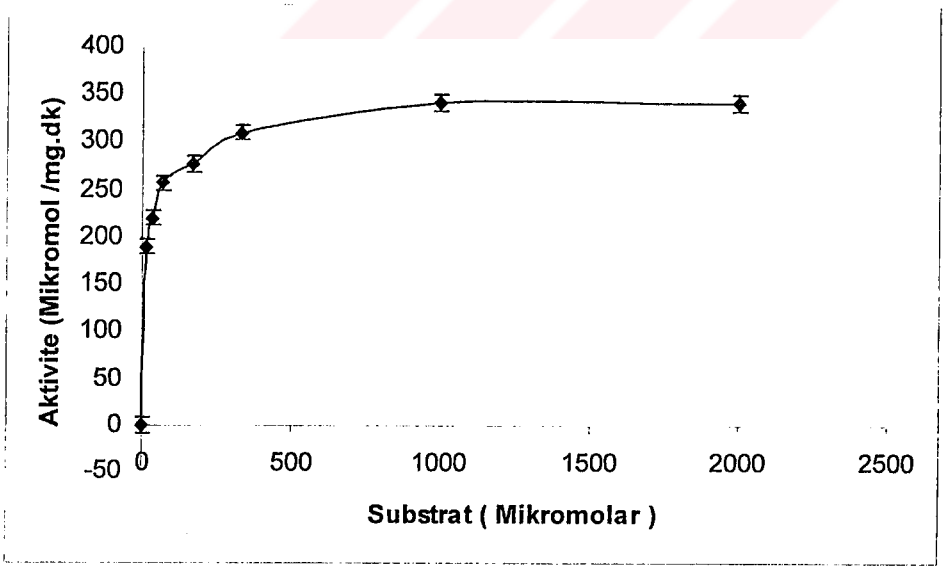
4.1.5.2. Serbest LOX İçin Vmax Ve Km'nin bulunması

Serbest enzim için Vmax ve Km değerleri , pH = 10,5 ve 30 °C'de çalışılarak elde edilmiştir. Bu değerler çizelge 4.8.'de gösterilmiştir.

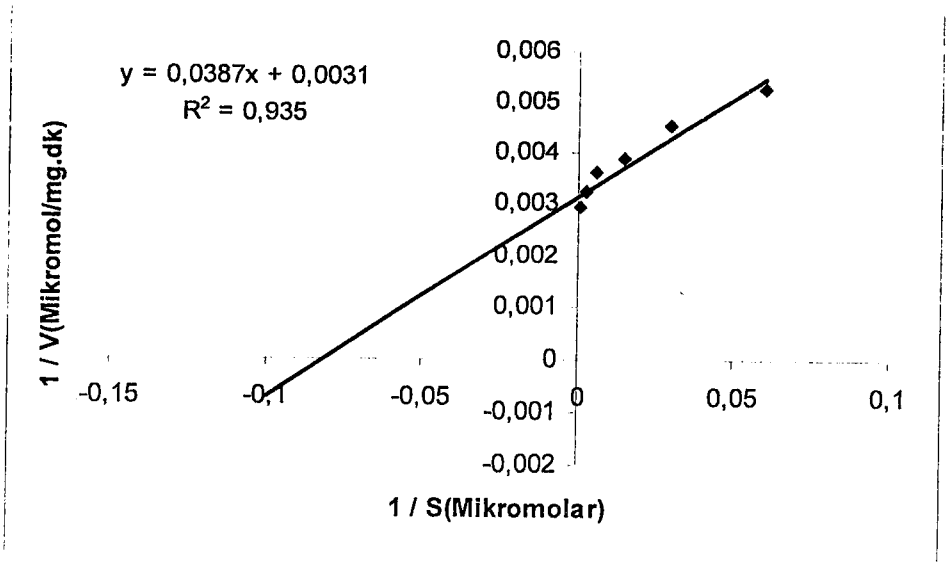
Çizelge 4.8. Çeşitli substrat konsantrasyonlarına karşı LOX aktiviteleri.

S(μM)	V(μMol.mg prot^{-1}.dk^{-1})	1 / S (μM^{-1})	1 / V (μ Mol^{-1}.mgprot.dk)
16,66	189,8	0,060	0,00527
33,33	220,0	0,030	0,00455
66,66	256,9	0,015	0,00389
166,66	277,2	0,006	0,00361
333,33	310,2	0,003	0,00323
1000	341,5	0,001	0,00293
2000	341,5	0,0005	0,00293

Çizelge 4.8.'deki verilerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.8. ve şekil 4.9. elde edilir.



Şekil 4.8. Serbest LOX için Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.9. Serbest LOX için Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiğindeki doğru denkleminden Vmax ve Km değerleri kolaylıkla bulunabilir.

$$y = 0{,}0387 \cdot x + 0{,}0031 \qquad (4.4.)$$

x = 0 ise y = 0,0031 , y = 1 / Vmax , Vmax =322,6 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$.

y = 0 ise x = -0,0801 , x = -1 / Km , Km = 12,48 μM , Km = 0,01248 mM

Turnover sayısı : 548,4 s^{-1}.

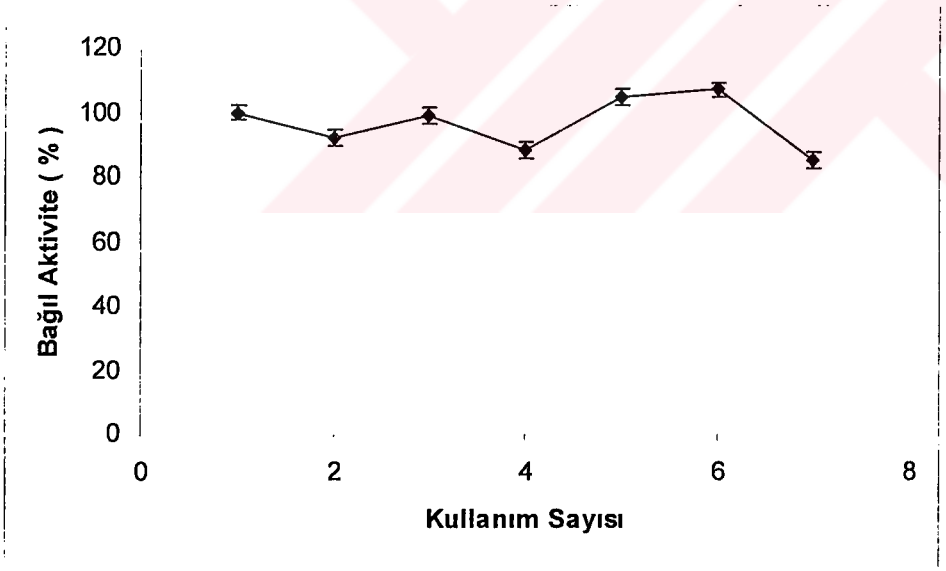
4.1.6. İmmobilize LOX'ın Tekrar Kullanımı İle İlgili Çalışmalar

Bu amaçla, poliakrilamid jel küreciklerine immobilize olmuş LOX' dan belirli miktarda alınıp 0,7 x 5 cm ebadındaki kolona yerleştirilip kolonun alt kısmı parafilmle kapatılmıştır. 2920 μL pH = 8,5 tamponu eklenip, 35 °C'de 10 dk ön inkübe edilip, 80 μL 20 mM linoleik asit eklenip 3 dk sonra ürün alt kısımdan alınmıştır. İmmobilize enzim her kullanımından sonra 3 ml borat tamponu ile yıkanmıştır. Tüm veriler aynı gün içinde elde edilmiştir. 1.kullanıma (% 100) göre bulunan değerler çizelge 4.9. da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kullanım sayısına bağlı olarak imobilize LOX'ın % aktivite değerleri.

Kullanım Sayısı	% İmmobilize LOX Aktivitesi	Aktivite ($\mu mol.mg\ prot^{-1}.dk^{-1}$)
1	100	0,057 ± 0,003
2	92	0,052 ± 0,003
3	99	0,056 ± 0,003
4	88	0,050 ± 0,003
5	105	0,060 ± 0,003
6	107	0,061 ± 0,003
7	85	0,048 ± 0,003

Çizelge 4.9. daki veriler grafiğe geçirilirse şekil 4.10. elde edilir.



Şekil 4.10. İmmobilize LOX'ın yeniden kullanım grafiği.

4.1.7. İmmobilize Ve Serbest LOX'ın Depolama Kararlılığı

4.1.7.1. İmmobilize LOX'ın Depolama Kararlılığı

İmmobilize LOX'ın da depolama kararlılığı aynı şekilde, -20 °C'de araştırılmıştır. Küçük porsiyonlar halinde enzim immobilize etmiş poliakrilamid jel küreleri deney tüplerine alınmış ve üzerini örtecek şekilde 1 ml pH = 8,5 tamponu ve 1 ml %30 , % 40 , % 50 (w / w) gliserol çözeltileri eklenmiştir. 0. ; 5. ; 10. ; 15. günkü aktivite değerleri çizelge 4.10.'da verilmiştir. Depolamada kullanılan tüm çözeltilerdeki immobilize enzimlerde inaktivasyon olmasına rağmen, % 40 gliserol çözeltisinde inaktivasyon daha az görünmektedir.

4.1.7.2.Serbest LOX'ın Depolama Kararlılığı

Serbest LOX'ın depolama kararlılığı, orjinal şişesinde LOX'ın, -20 °C' de bekletilmesi ile elde incelenmiştir. Başlangıçta 341,5 ± 8,1 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$. olan enzim aktivitesi; 70. günün sonunda 317,8 ± 4,6 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$ ya düşmüştür. Bu ise orjinal şişesinde, -20 °C' de bekletilen LOX'ın 70 gün sonra başlangıç aktivitesinin % 93,1'ini koruduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10. -20 °C' de immobilize LOX'ın depolama kararalılığı.
(Aktivite = μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$)

	PH = 8.5 tamponu	% 30 Gliserol	% 40 Gliserol	% 50 gliserol
Başlangıç	1,127 ± 0,009	1,127 ± 0,009	1,127 ± 0,009	1,127 ± 0,009
5 .Gün	0,034 ± 0,009	0,108 ± 0,009	0,118 ± 0,009	0,070 ± 0,009
10 .Gün	0,011 ± 0.009	0,015 ± 0.009	0,054 ± 0,009	0,061 ± 0,009
15. Gün	0,0035 ± 0.009	0,0046 ± 0.009	0,0078 ± 0,009	0,0045 ± 0,009

Çizelge 4.11. -20 °C' de immobilize LOX'ın % aktivitesi.

Gün	PH = 8.5 tamponu	% 30 Gliserol	% 40 Gliserol	% 50 gliserol
0	% 100 ± 0,8	% 100 ± 0.8	% 100 ± 0.8	% 100 ± 0.8
5	% 3.0 ± 0,8	% 9.6 ± 0.8	% 10.5 ± 0.8	% 6.2 ± 0.8
10	% 0.98 ± 0,8	% 1.3 ± 0.8	% 4.8 ± 0.8	% 5.4 ± 0.8
15	% 0.3 ± 0,8	% 0.4 ± 0.8	% 0.7 ± 0.8	% 0.4 ± 0.8

İmmobilize enzimin +5 °C' de üzerine hiç bir çözelti eklenmeyip bekletilmesi ile çizelge 4.12. deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.12. İmmobilize enzimin +5 °C'deki depolama kararlılığı.

Gün	Aktivite ($\mu mol.mg\ prot^{-1}.dk^{-1}$)	% Aktivite
0	1,127	100 ± 1,6
5	0,556	49,3 ± 1,6
20	0,042	3,7 ± 1,6

4.1.8. İmmobilize LOX İçin % 3 ve % 7'lik Poliakrilamid Jel Küreleri Hazırlanması

Materyal ve metotta bildirilen yönteme göre T = % 10 ve C = % 3 ve C = % 7 oranında jel küreleri elde edilmiş, glutaraldehid ile aktifleştirilip, pH = 8,5'te enzim immobilizasyonu sağlanmıştır.

% 5'lik sonradan glutaraldehid ile aktive edilmiş, 100 mg kuru poliakrilamid jel küreleri üzerine başlangıçta eklenen 1,6 mg toplam enzimden 6,80 ± 0,24 mg LOX yani başlangıç miktarının % 42,5 ± 1,5'i immobilize olmuştur.

% 3'lük sonradan glutaraldehid ile aktive edilmiş, 100 mg kuru poliakrilamid jel küreleri üzerine başlangıçta eklenen 1,6 mg toplam enzimden 0,964± 0,032 mg LOX yani başlangıç miktarının %60,3± 2,0'ı immobilize olmuştur.

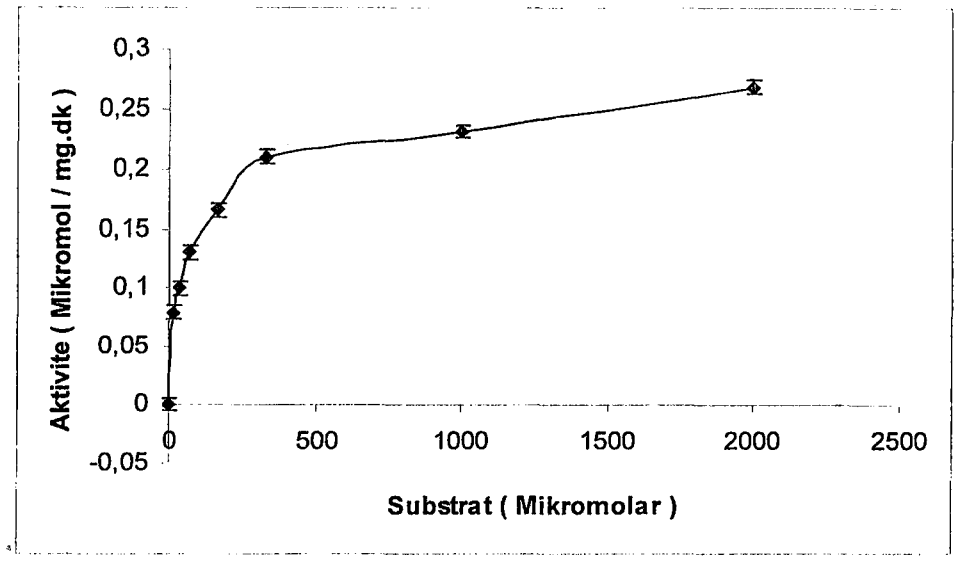
% 7'lik sonradan glutaraldehid ile aktive edilmiş, 100 mg kuru poliakrilamid jel küreleri üzerine ise başlangıçta eklenen 1,6 mg toplam enzimden 0,955± 0,022 mg LOX yani başlangıç miktarının % 59,7± 1,4'ü immobilize olmuştur.

% 3 ve % 7'lik jel için pH=8,5 ve 35 °C'de değişik substrat konsantrasyonlarında, bulunan aktivite değerleri çizelge 4.13. ve 4.14.'de verilmiştir.

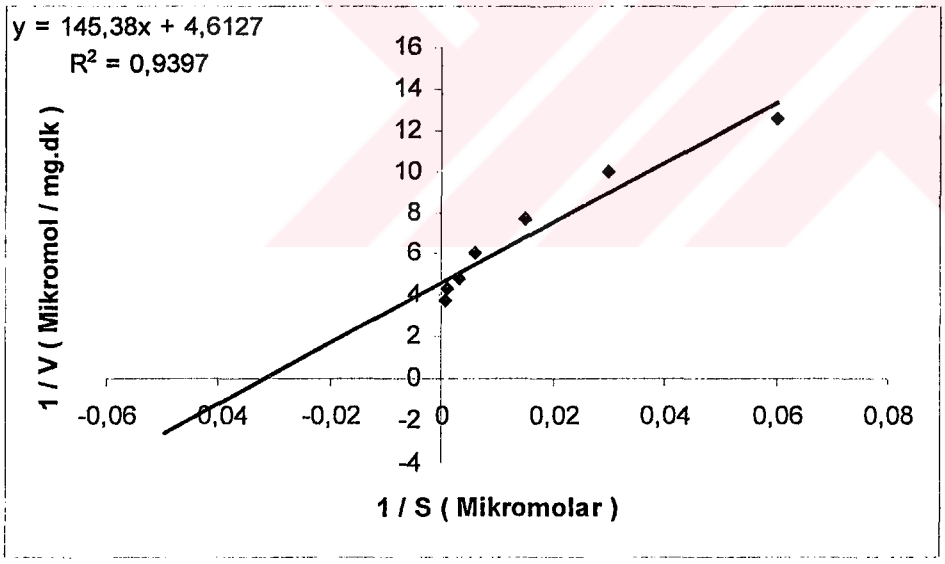
Çizelge 4.13. % 3'lük jel için değişik substrat derişimlerine karşı bulunan LOX aktivite değerleri.

Substrat (μM)	Aktivite (μmol.mg prot^{-1}.dk^{-1})	1 /Substrat ,(μM)$^{-1}$	1/Aktivite(μMol^{-1}. .mg prot .dk.)
16,66	0,0795± 0,0056	0,0600	12,58
33,33	0,1000± 0,0056	0,0300	10,0
66,66	0,1305± 0,0056	0,0150	7,66
166,66	0,1657± 0,0056	0,0060	6,04
333,33	0,2100± 0,0056	0,0030	4,76
1000	0,2315± 0,0056	0,0010	4,32
2000	0,2690± 0,0056	0,0005	3,72

Çizelge 4.13.'deki verilerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.11.ve şekil 4.12. elde edilir.



Şekil 4.11. % 3'lük jel için Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.12. % 3'lük jel için Lineweaver-Burk grafiği.

% 3'lük jel için Vmax ve Km çizilen Lineweaver-Burk grafiğindeki doğru denkleminden hesaplanmıştır.

$$y = 145{,}38\ x + 4{,}6127 \qquad (4.5.)$$

x = 0 ise y = 4,6127 , y = 1 / Vmax , Vmax = 0,217 μmol.mg^{-1}.dk^{-1}

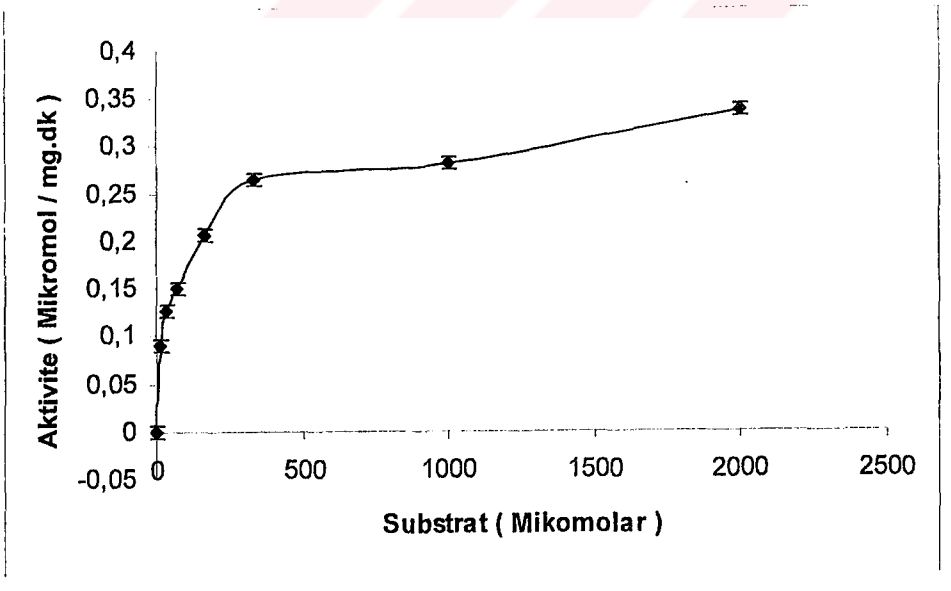
y = 0 ise x = -0,03173 , x = -1 / Km , Km =31,5 μM ,Km = 0,0315 mM.

Turnover sayısı : 0,37 s^{-1}.

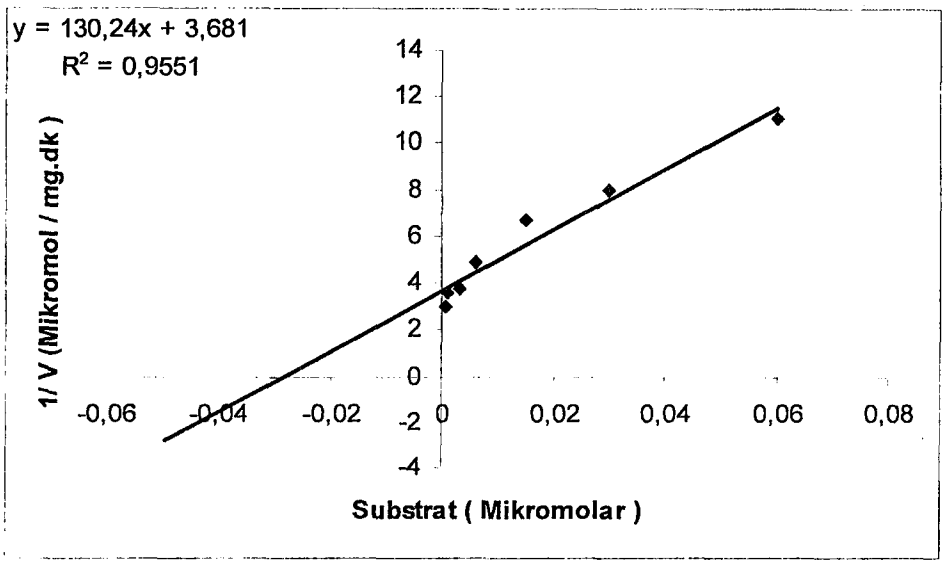
Çizelge 4.14. % 7'lik jel için değişik substrat derişimlerine karşı bulunan LOX aktivite değerleri.

Substrat (μM)	Aktivite(μMol.mg^{-1}. dk^{-1})	1 /S (μM)$^{-1}$	1/Aktivite(μMol^{-1}.mg. dk)
16,66	0,0905 ± 0,0064	0,0600	11,05
33,33	0,126 ± 0,0064	0,0300	7,94
66,66	0,1505 ± 0,0064	0,0150	6,65
166,66	0,2055 ± 0,0064	0,0060	4,87
333,33	0,264 ± 0,0064	0,0030	3,79
1000	0,2815 ± 0,0064	0,0010	3,55
2000	0,338 ± 0,0064	0,0005	2,96

Çizelge 4.14.'daki verilerin grafiğe geçirilmesi ile şekil 4.13. ve şekil 4.14. elde edilir.



Şekil 4.13. % 7'lik jel için Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.14. % 7'lik jel için Lineweaver-Burk grafiği .

% 7'lik jel için de Vmax ve Km çizilen Lineweaver-Burk grafiğindeki doğru denkleminden hesaplanmıştır.

$$y = 130{,}24\,x + 3{,}681 \qquad (4.6.)$$

$x = 0$ ise $y = 3{,}681$, $y = 1 / Vmax$, $Vmax = 0{,}272\ \mu Mol.mg\ prot^{-1}.dk^{-1}$

$y = 0$ ise $x = -0{,}0283$, $x = -1 / Km$, $Km = 35{,}38\ \mu M$, $Km = 0{,}03538$ mM

Turnover sayısı : $0{,}46\ s^{-1}$.

4.2.Tartışma

Graveland (1970), yaptığı çalışmada, LOX'ı glutenin üzerine adsorbe etmiş, fakat bu adsorpsiyonun geri dönüşümlü olduğunu bulmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada, enzim glutaraldehid üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir.

Grosman ve ark (1972), yaptıkları çalışmada LOX'ı, CNBr ile muamele edilmiş destek üzerine immobilize edilmiş ve gram agaroz başına 1-12 mg enzimin immobilize olduğunu kaydetmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise gram poliakrilamid jel üzerine C = % 5 lik jel için 6,8 ± 0,24 mg enzim, C = % 3'lük jel için 9,64 ± 0,32 mg, C = % 7' lik jel için ise 0,955 ± 0,22 mg enzim immobilize olmuştur.

Diaz ve ark (1993), yaptıkları çalışmada soya fasulyesi lipoksijenaz enzimini karbonildiimidazolca aktifleştirilmiş desteğe kovalent bağlamışlardır. Kovalent bağlama sonucu yaklaşık % 70 oranında enzim immobilizasyon sağlamışlardır. Bizim yaptığımız çalışmada ise C = % 5'lik jel için % 42 ± 1,5, C = % 3 ve % 7 jel için ise %60,3 ± 2,0 ve % 59,7 ± 1,4 immobilizasyon sağlanmıştır.

Battu ve ark (1994), yaptıkları çalışmada Solanum tuberosum tuber, Lupinus albus, Cicer arietinum ve Pisum sativum tohumlarından ekstrakte edilen lipoksijenaz enzim çözeltisi, magnezyum silikatlı talk üzerine adsorbe edilmiş ve % 20 oranında immobilizasyon sağlanmıştır.

Cuperus ve ark (1995), yaptıkları çalışmada, nötral ve yüklü destekler üzerine soya fasulyesi lipoksijenazının immobilizasyonunu araştırmışlardır. En iyi sonucu anyon değiştirici esaslı selüloz kullanarak % 4-14 oranında immobilizasyon elde etmişlerdir.

Pinto ve ark (1996), yaptıkları çalışmada, soyafasulyesi lipoksijenazını, glutaraldehidce aktive edilmiş poliakrilamid jele immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon için en uygun pH'ın 8,0-9,0 arasında gerçekleştiğini bulmuşlardır. İmmobilizasyon için en uygun koşulların % 10 akrilamid, % 6 glutaraldehid ve pH = 8,0 olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada ise T = %10 monomer, C = % 5'lik bisakrilamid ve pH= 8,5 koşullarının immobilizasyon için en uygun koşullar olduğu bulunmuştur.

Chikere ve ark (2000), yılında yaptıkları çalışmada soya fasulyesi lipoksijenazlarından lipoksijenaz 1 ve 2'yi bir anyon değiştirici ile saflaştırıp, ticari olarak hazır bulunan CNBr Sepharose 4B, Fractogel EMD Azlactone, Fractogel EMD Epoksi ve Eupergit C üzerine immobilize etmişlerdir. En iyi immobilizasyonu CNBr Sepharose 4B ile % 60 oranında gerçekleştirmişlerdir.

Grosman ve ark (1972), yaptıkları çalışmada LOX ve agaroz bağlı LOX için spesifik aktiviteyi sırasıyla 8,93 ve 8,48 μmol O_2.mg $prot^{-1}$.dk bulmuşlardır. Km'yi ise serbest enzim için $1,8.10^{-4}$ M , agaroz bağlı enzim için $3,0.10^{-4}$ M bulmuşlardır.

Diaz ve ark (1993), yaptıkları çalışmada soya fasulyesi lipoksijenaz enzimini karbonildiimidazolca aktifleştirilmiş desteğe 15 °C ve 0,2 M pH =9,0 da kovalent bağlamaları sonucu yaptıkları çalışmada, immobilize enzim için aktiviteyi 0,184 μmol /mg prot.dk olarak ölçmüşlerdir. İmmobilize LOX'ın 7 defa kullanımı sonucu, başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğunu bulmuşlardır. Ayrıca immobilize LOX'ın aktivitesinin yarısını kaybetmesi için ise yaklaşık 75 saatin geçmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Serge ve ark (1994), yılında Solanum tuberosum tuber, Lupinus albus, Cicer arietinum ve Pisum sativum tohumlarından ekstrakte ettikleri lipoksijenaz enzim çözeltisini, magnezyum silikatlı talk üzerine adsorbe etmişlerdir. İmmobilizasyon ile Cicer arietinum ekstrakı 2,15 kat saflaşıp, o ölçüde spesifik aktivitesinde artış olmuştur. Pisum sativum ekstraktı 1,49 , Lupinus albus ekstraktı 14,3 , Solanum tuberosum tuber ekstaktı ise 6,5 kat saflaşmıştır. 4 °C'de serbest lipoksijenaz aktivitesinin düzgün bir şekilde düşüp, 30.günde sıfırlandığını bulmuşlardır. Bunun yanında, immobilize lipoksijenazların, aktivitelerinin ilk 5-10 gün içinde düşüp, ondan sonraki 20 günde sabit hale geldiklerini bulmuşlardır.

Cuperus ve ark (1995), yılında yaptıkları çalışmada, soya fasulyesi lipoksijenazının immobilizasyonunu araştırmışlardır. 10 °C'de pH = 9,0'da DEAE-anyon değiştiricisi üzerine immobilize olmuş LOX'ın maksimum aktivitesini 2 μmol.mg $prot^{-1}$.dk^{-1} olarak ölçmüşlerdir. Serbest LOX için ise aktivitenin 180-190 μmol.mg $prot^{-1}$.dk^{-1} olduğunu ifade etmişlerdir. pH = 7,0'de serbest LOX'ın aktivitesini, 5 °C ve 25 °C'de, % 35 oranında kaybettiğini, pH = 9,0'da ise

aktivitenin ilk 2 günde % 20 azaldığını, 3. günde ise daha çabuk düştüğünü bulmuşlardır. İmmobilize LOX'ın aktivitesinin ise 2 günde % 30-40 oranında azaldığını kaydetmişlerdir.

Hsu ve ark (1996), yılında yaptıkları çalışmada soya fasulyesi lipoksijenazını, kalsiyum alginat sol jel matriksi içinde immobilize etmişlerdir. İmmobilize LOX için optimum pH'ı 9,0 olarak bulmuşlardır. Fakat optimum sıcaklığı araştırmamışlardır. 15 °C'de, yaptıkları deneylerde immobilize enzim için aktiviteyi, serbest enzime göre % 15 ile % 30 arasında bulmuşlardır. Oda koşullarında serbest LOX'ın 1 günde aktivitesini tamamen kaybettiğini, kalsiyum alginat sol jel matriksi içindeki immobilize LOX'ın ise oda koşullarında 25 gün aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. İmmobilize LOX'ın 5 kez kullanımı ile aktivitede hiç bir azalma görülmemiştir.

Pinto ve ark (1996), yılında yaptıkları çalışmada, Lipoksijenazı, glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamid jele immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklığı sırasıyla 30°C ve 35 °C olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize LOX için optimum pH'ı 9,0 olarak belirlemişlerdir. Serbest enzim için maksimum hız 6,25 μmol O_2/mg prot.dk, Km ise 0,077 mM, immobilize LOX için ise maksimum hız 2,08 μmol O_2/mg prot.dk, Km ise 0,145 mM olarak hesaplanmıştır. Öte yandan aktivasyon enerjisi, serbest enzim için 22,8 kJ/mol immobilize enzim için ise 19,3 kJ/mol olduğu belirtilmiştir.

Kermasha ve ark (2001), yılında yaptıkları çalışmada, 20 °C'de ve 0,1 M pH = 9,0 Tris-HCl tamponunda, soyafasulyesi lipoksijenazı için Vmax'ı 18,85 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km'yi ise 0,36 mM olarak belirlemişlerdir. % 3,5 oktan veya % 4 izooktan içeren 0,1 M pH = 9,0 Tris-HCl tamponunda ise Vmax 47,96 μ mol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km 21,42 mM bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada ise LOX glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamid jele immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık sırasıyla 30°C ve 35 °C bulunmuştur. LOX'ın poliakrilamid jele en çok bağlandığı ve sökülmediği pH, 8,5 olduğu için immobilize enzim için, optimum pH 8,5 alınmıştır. Serbest enzim için optimum pH, 10,5 olarak bulunmuştur. Serbest enzim

için maksimum hız 322,6 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km ise 0,01248 mM, immobilize LOX için ise maksimum hız 3,25 μ Mol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km ise 1,2946 mM olarak hesaplanmıştır. Öte yandan aktivasyon enerjisi, serbest enzim için 25,345 kJ / mol, immobilize enzim için ise 77,370 kJ / mol olarak bulunmuştur. Bulgularımıza göre serbest enzim ile immobilize enzim arasında yüz kata yakın enzimatik aktivite azalması gözlemlenmiştir. İmmmobilize enzim hızının bu kadar azalması, immobilizasyon esnasında enzimin aktif bölgesinde aktivite azalmasına neden olabilecek bir takım konformasyon değişikliklerinin olabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1.Sonuçlar

Yapılan deneyler doğrultusunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1) LOX'ın glutaraldehid ile aktive edilmiş, poliakrilamid jele immobilizasyonu gerçekleşmiştir. En iyi immobilizasyon, pH=8,5 borat tamponunda gerçekleşmiştir. T:C=10:3, T:C=10:7 oranlarında hazırlanan poliakrilamid jellerde % 58-60 gibi yüksek immobilizasyon sağlanmasına rağmen, T:C=10:3'lük jelde Vmax = 0,217 μMol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, T:C=10:7'lik jelde Vmax = 0,272 μmol. mg $prot^{-1}.dk^{-1}$ bulunmuştur. T:C=10:5'lik jelde ise %42,5 ± 1,5 immobilizasyon sağlanmasına rağmen Vmax =3,25 μ mol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu nedenle en verimli immobilizasyon T:C=10:5'lik jel ile sağlanmıştır.

2) Serbest enzim için optimum pH, pH=10,5 karbonat tamponuyla sağlanmıştır.

3) Serbest LOX için aktivasyon enerjisi 25,345 kJ / mol olarak bulunmuştur.

4) İmmobilize LOX için aktivasyon enerjisi 77,370 kJ / mol olarak bulunmuştur.

5) Serbest enzim için maksimum hız 322,6 μmol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km ise 0,01248 mM şeklinde bulunmuştur.

6) immobilize LOX için ise maksimum hız 3,25 μ Mol.mg $prot^{-1}.dk^{-1}$, Km ise 1,2946 mM şeklinde bulunmuştur.

7) İmmobilize LOX ard arda 7 defa hidroperoksioktadekadienoik asit üretiminde biyokatalizör olarak kullanılmıştır. 7 defa kulanım ile LOX başlangıç aktivitesinin % 85'ini koruyabilmiştir.

8) Serbest LOX orjinal şişesinde -20°C'de 70 gün sonra sonra başlangıç aktivitesinin % 93,1'ini koruyabilmiştir.

9) İmmobilize LOX -20 °C'de 0,1 M pH = 8,5 tamponu, %30 , % 40 , % 50 gliserol çözeltilerinde bekletildiğinde 5. günün sonunda sırasıyla aktivitesinin % 3,0± 0,8 ; % 9,6± 0,8 ; % 10,5± 0,8; % 6,2± 0,8 koruyabilmiştir. İmmobilize

LOX'ın üzerine hiç bir çözelti eklenmeyip +5 °C'de bekletilmesi ile 5.günün sonunda LOX başlangıç aktivitesinin % 49,3 ± 1,6'sını koruyabilmiştir.

10) Lipoksijenazın poliakrilamid jel üzerine immobilizasyonu, immobilize enzim için aktivitenin düşük çıkması nedeniyle kullanışlı bir yöntem değildir.

5.2.Öneriler

1) Glutaraldehid ile aktive edilmiş poliakrilamid jele LOX'ın immobilizasyonu pH 8,0-9,0 arasında yapılmalıdır. pH = 9,0'dan yüksek pH'larda immobilizasyon gerçekleşmemektedir.

2) İmmobilize LOX'ın reaksiyon koşulları pH=8,5 ve 35°C seçilmelidir. İmmobilize LOX 35 °C den yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmektedir.

3) Serbest LOX'ın reaksiyon koşulları pH=10,5 ve 30 °C seçilmelidir. Serbest LOX 30 °C den yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmektedir.

4) LOX poliakrilamid jele immobilize edildikten sonra tekrar tekrar kullanılabilir.

5) Serbest ve immobilize LOX'ın aktivitelerini kaybetmemeleri için olabildiğince soğukta depolanmaları gerekmektedir.

6) İmmobilize ve serbest LOX çözeltide aktivitelerini daha kısa sürede kaybetmektedirler.

7) İmmobilizasyon sırasında LOX'ın katalitik bölgesinde meydana gelen değişiklikler araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. **CHAMPE P.C., HARVEY R.A., 1997.** Biyokimya. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 445s.

2. **CHİKERE, A.C., GALUNSKY, B., SCHÜNEMANN, V., KASCHE, V., 2000.** Stability Of İmmobilized Soybean Lipoxygenases : İnfluence Of Coupling Conditions On The İonization State Of The Active Site Fe. Enzyme And Microbial Technology, 28:168-175.

3. **COREY, E.J., NAGATA, R., 1987.** Evidence İn Favor Of An Organoiron-Mediated Pathway For Lipoxygenation Of Fatty Acids By Soybean Lipoxygenase. J. Am. Chem. Soc., 109: 8107-8108.

4. **CUPERUS, F.P., KRAMER, G.F.H., DERKSEN, J.T.P., BOUWER, S.T., 1995.** Activity Of İmmobilized Lipoxygenase Used For The Formation Of Perhydroxyacids. Catalysis Today, 25:441-445.

5. **DIAZ, D.P., PIAZZA, G.J., BROWEER, D.P., MEDINA, M.B., 1993.** A Method For İmmobilization Of Lipoxygenase. Biotechnol. Appl. Biochem., 18:359-367.

6. **EMKEN, E.M., DUTTON, H.J., 1970.** Lipoxygenase-Oxidized Soap Stock As Source Of Hidroxy Conjugated Octadecadienoic Acids. Journal Of The American Oil Chemists' Society, 48:324-329.

7. **GAFFNEY, B.J., 1996.** Lipoxygenases: Structural Principles and Spectroscopy.Annu.Rev. Biophys. Biomol. Struct., 25:431-459.

8. **GARGOURİ, M., LEGOY, M.D., 1997.** Bienzymatic Reaction For

Hydroperoxide Production İn A Multiphasic System. Enzyme And Microbial Technology, 21 : 79-84.

9. GONZALEZ-SAİZ, J. M., PİZARRO, C., 2000. Polyacrylamide Gels As Support For Enzyme İmmobilization By Entrapment. Effect Of Polyelectrolyte Carrier, Ph And Temeprature On Enzyme Action And Kinetics Parameters. European Polymer Journal, 37:435-444.

10. GÖZÜKARA, E.M.,1997. Biyokimya 2 . Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul,1225s.

11. GRAVELAND, A., 1970. Modification Of The Course Of Reaction Between Wheat Flour Lipoxygenase And Linoleic Acid Due To Adsorption Of Lipoxygenase On Glutenin. Biochemicial And Biophysical Research Cominication., 41 (2): 427-434.

12. GROOT, J.J.M.C., VELDİNK, G.A., VLİEGENTHART, J.FG., BOLDİNGH, J., WEVER, R., VAN GELDER, B.F., 1975. Demonstration By EPR Spectroscopy Of The Functional Role Of İron İn Soybean 1-Lipoxygenase. Biochim. Biophys. Acta, 377: 71-79.

13. GROSMAN, S., TROP, M., BUDOWSKİ, P., PERL , M ., PINSKY, A., 1972 Properties Of Agarose-Bound Soya-Bean Lipoxygenase. Biochem. J., 127:909-910.

14. HSU, A.F.C., FOGLİA, T.A., PİAZZA G.J., 1996. İmmobilization Of Lipoxygenase İn An Alginate-Silicate Solgel Matrix: Formation Of Fatty Acid Hydroperoxides. Biotechnology Letters, 19 (1) : 71-74.

15. KERMASHA, S., DİOM, N., BİSAKOWSKİ, B., 2001. Biocatalysis Of

Lipoxygenase İn Selected Organic Solvent Media. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11: 909-919.

16. **LIMA, M.H.,WILMORE G.W., AND STOREY K.B., 1995.** Quantification Of Lipid Peroxidation In Tissue Extracts Based On Fe(III) Xylenol Orange Complex Formation. Free Radical Biology& Medicine,19 (3):271-280.

17. **LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR,A.L., and RANDAL, R.S., 1951.** J.Biol. Chem.,193: 265-275.

18. **MİNOR, W., STECZKO, J., BOLİN, J.T., OTWİNOWSKİ, Z., AXELROD, B., 1993.** Crystallographic Determination Of The Active Site Iron And Its Ligands In Soybean Lipoxygenase-1. Biochemistry, 32:6320-6323.

19. **MOSBACH, K., 1976.** Methods İn Enzymology, vol XLIV. Academic Press, Inc., London,999s.

20. **PİNTO, M. C., MACİAS, P., 1996.** Synthesis Of Linoleic Acid Hydroperoxide Using İmmobilized Lipoxygenase İn Polyacrylamide Gel. Applied Biochemistry And Biotechnology, 59:309-318.

21. **RAWN, D., 1989.** Biochemistry. Biological Supply Company, Caroline,1106s.

22. **SCARROW, R. C., TRİMİTSİS, M.G., BUCK, C.P., GROVE, G.N., COWLİNG, R.A., NELSON, M.J., 1994.** X-ray Spectroscopy of the Iron Site in Soybean Lipoxygenase-1: Changes in Coordination upon Oxidation or Addition of Methanol. Biochemistry, 33:15023-15035.

23. **SERGE, B., RABINOVITCH-CHABLE H., BENEYTOUT, JEAN-L., 1994.** Effectiveness Of Talc As Adsorbent For Purification And İmmobilization Of Plant Lipoxygenases. J. Agric. Food Chem., 42: 2115-2119.

24. SYUAN, S., HSU, A.F.C., THOMASA, F., SHUI, T., 1996 Effectiveness Of Cross-Linked Phyllosilicates For İntercalative İmmobilization Of Soybean Lipoxygenase. Tektran U.S Agricultral Research Service,1-2.

25. TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Matbası, Aydın,446s.

26. TEZ, Z., 1990. Kimyasal Kinetik. Dicle Üniversitesi Matbaası, Diyarbakır,97s.

27. TUCKER,G.A. AND WOODS, L.F.J., 1995. Enzymes In Food Processing 2nd Edition.

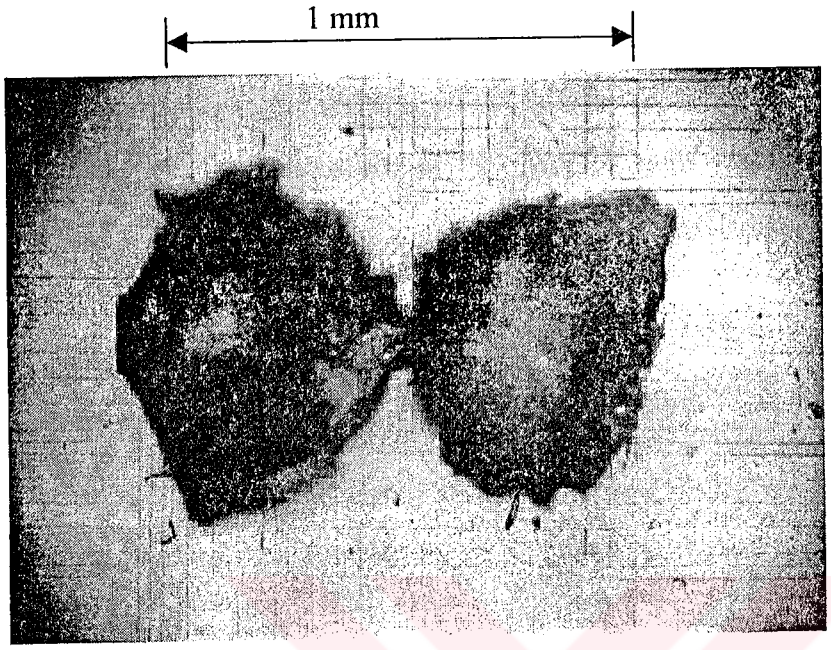
28. UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Aplication

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Adıyaman'da doğdum. İlköğretimimi Çokpınar İlkokulu ve Gazi Ortaokulu'nda orta öğretimimi Gaziantep Şehit Şahin Lisesi'nde tamamladım. 1993'de kazandığım Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1997 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldum.

1997 güz döneminde Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yüksek lisans eğitim programına girdim. YADİM'de 1 yıl ingilizce hazırlık gördüm. 1999 yılı bahar döneminde Kimya Bölümünde açılan araştırma görevliliği sınavını kazandım ve bu görevimi sürdürmekteyim.

EKLER



Şekil : Poliakrilamid jel kürelerinin, alanı 1 mm^2 olan thoma lamında görünümü.Her küçük karenin alanı 50 $\mu m \times 50\ \mu m$ dir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ