ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali TOPRAK

LİPOKSİJENAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARININ OLUŞTURULMASI VE ÇEŞİTLİ KİNON SENTEZLERİNDE KULLANILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPOKSİJENAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARININ OLUŞTURULMASI VE ÇEŞİTLİ KİNON SENTEZLERİNDE KULLANILMASI

Ali TOPRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez …/…/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….....	…….	…….....
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL	Doç. Dr. Ramazan BİLGİN	Doç. Dr. Gülüzar ATLI
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013YL13

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİPOKSİJENAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARININ OLUŞTURULMASI VE ÇEŞİTLİ KİNON SENTEZLEİNDE KULLANILMASI

Ali TOPRAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl: 2013, Sayfa: 69
Jüri :Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
:Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
:Doç. Dr. Gülüzar ATLI

Bu çalışmada soya fasülyesi tohumlarından (*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi) kısmi olarak saflaştırılan lipoksijenaz (LOX) çapraz bağlı lipoksijenaz agregatları (LOX-CLEA) oluşturularak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon için en uygun glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılarak sırasıyla %20 (w/v), %55 (w/v) ve 10 saat olarak belirlenmiştir.

Serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri serbest LOX sırasıyla 8,5 ve 25 ºC, LOX-CLEA için ise sırasıyla 8,5 ve 60 ºC olarak belirlenmiştir. Serbest LOX'un belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde linoleik asit substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 28 mM ve 1593 nmol/dk mg potein olarak, LOX-CLEA için ise bu değerler 4,4 mM ve 1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir. Serbest LOX 35 ve 60 °C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %85 ve 47'sini korurken aynı koşullarda LOX-CLEA başlangıç aktivitesinin sırasıyla %90 ve 73'ünü korumuştur.

Serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin hidroperoksidaz aktivitesi 1,4-benzokinon ve timokinon sentezleri için incelenmiştir. En yüksek 1,4-benzokinon verimi 15 dakika reaksiyon süresi sonrasında serbest LOX ve LOX-CLEA için sırasıyla %24 ve 33 olarak, buna karşın en yüksek timokinon verimleri serbest LOX ve LOX-CLEA için sırasıyla % 12 ve 15 olarak elde edilmiştir. LOX-CLEA kesikli reaktörde 1,4-benzokinon sentezi için 15 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 39'unu korumuştur.

Anahtar Kelimeler: Lipoksijenaz, yanıt yüzey metodu, CLEA, immobilizasyon, kinon sentezi

ABSTRACT

MSc THESIS

PREPARATION OF CROSSLINKED ENZYME AGGREGATES OF LIPOXYGENASE AND ITS USE IN THE SYNTHESIS OF VARIOUS QUINONES

Ali TOPRAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Supervisor :Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year: 2013, Sayfa: 69
Jury :Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
:Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
:Assoc. Prof. Dr. Gülüzar ATLI

In this study, lipoxygenase (LOX) partially purified from soybean seeds (*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi) was immobilized as crosslinked enzyme aggregates (LOX-CLEA). The optimal glutaraldehyde and ammonium sulfate concentrations and immobilization time for the immobilization were determined as 20% (w/v), 55% (w/v) and 10 h, respectively by using response surface methodology (RSM).

The optimum pH and temperature of free LOX and LOX-CLEA were determined as 8.5 and 25 ºC, respectively for the free LOX and 8.5 and 60 ºC, respectively for LOX-CLEA. Under the predetermined optimal pH and temperature values, K_m and V_{max} values of the free LOX were 28 mM and 1593 nmol/min mg protein, respectively towards linoleic acid. The corresponding K_m and V_{max} values of the LOX-CLEA were 4.4 mM ve 1046 nmol/min g CLEA. After 24 h preincubation time, the free LOX protected 85 and 47% of its initial activity at 35 and 60 °C, respectively whereas LOX-CLEA protected 90 and 73% of its initial activity, respectively under the same conditions.

The hydroperoxidase activities of free lipoxygenase and LOX-CLEA were investigated for the synthesis of 1,4-benzoquinone and thymoquinone. After 15 min reaction time the highest 1,4-benzoquinone yield was obtained as 24 and 33%, respectively for the free LOX and LOX-CLEA whereas the highest thymoquinone yields were obtained as 12 and 15%, respectively for the free LOX and LOX-CLEA. After 15 reuses, LOX-CLEA protected 39% of its initial activity for the synthesis of 1,4-benzoquinone in a batch type reactor.

Anahtar Kelimeler: Lipoxygenase, RSM, CLEA, Immobilization, Quinones

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince, engin bilgi ve deneyimleri ile yardım ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda beni aydınlatan ve geliştirici açıklamaları ile çalışmalarım boyunca önümde bir ışık olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e, sayın hocam Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve sayın hocam Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metodlar hakkında sürekli beni bilgilendiren ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Öğ. Gör. Dr. Deniz YILDIRIM'a ve Öğ. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca beni manevi olarak destekleyen laboratuvar arkadaşlarım Yakup AKKOÇ, Gözde ERGÖÇEN, Özge CAN ve Müge ŞENGÜL'e çok teşekkür ederim.

Bütün eğitimim boyunca maddi ve manevi hiçbir desteği, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen annem Nezaket TOPRAK'a, babam Musa TOPRAK'a ve kardeşlerime sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER ..... …..IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ X
1. GİRİŞ 1
1.1. Lipoksijenazlar……...1
1.2. Enzim İmmobilizasyonu……4
1.3. Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Metodology, RSM)……..6
1.3.1. Deneysel Tasarım……...7
1.4. Çapraz Bağlama Yöntemi……..9
1.5. Kinonlar……...……12
1.6. Kimyasal Aminasyon……...……...……14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……..15
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. Materyal 23
3.2. Metod 23
3.2.1. Örneklerin Homojenizasyonu 23
3.2.2. Lipoksijenaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması 24
3.2.3. Lipoksijenazın CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu 24
3.2.4. Lipoksijenazın İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu ……..……...25
3.2.5. Serbest Lipoksijenazın ve LOX-CLEA Aktivitesinin Belirlenmesi .26
3.2.6. Protein Tayini 27
3.2.7. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA' ın Karakterizasyonu 28
3.2.7.1. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın Optimum pH'larının Belirlenmesi 28
3.2.7.2. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA' ın Optimum

Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....28
3.2.7.3. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi 28
3.2.7.4. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....29
3.2.7.5. Serbest Lipoksijenaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi 29
3.2.8. Serbest LOX ve LOX-CLEA ile Kinon Sentezi 29
3.2.8.1. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Optimum pH'larının Belirlenmesi 29
3.2.8.2. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi …….30
3.2.8.3. Farklı Peroksitlerin *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkileri……...30
3.2.8.4. Peroksit derişiminin *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkileri.....30
3.2.8.5. Başlangıç LOX-CLEA Miktarının *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkisi……...30
3.2.8.6. LOX-CLEA' ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
4.1. Bulgular.....33
4.1.1. Lipoksijenazın CLEA Oluşturularak İmmobilizasyonun Yanıt Yüzey Yöntemi İle İncelenmesi.....33
4.1.2. Serbest Lipoksijenazın Karakterizasyonu.....38
4.1.3. LOX-CLEA'un Karekterizasyonu 42
4.1.4. Serbest LOX ve LOX-CLEA İle Kinon Sentezleri……...45
4.2. Tartışma.....51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 57
5.1. Sonuçlar 57
5.2. Öneriler 57

KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 67
EKLER.....69

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. LOX-CLEA hazırlanmasının optimizasyonunda kullanılacak faktörlerin en düşük, orta ve en yüksek değerleri 25
Çizelge 3.2. LOX-CLEA hazırlanmasının optimizasyonunda kullanılacak Box–Behnken dizaynı..... 26
Çizelge 4.1. Deneysel ve hesapsal LOX-CLEA aktiviteleri 34
Çizelge 4.2. Önerilen kuadratik model için ANOVA sonuçları..... 34

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Lipoksijenazın katalizlediği bir reaksiyon……..…….....3
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....5
Şekil 1.3. Yanıt yüzey metodunda kullanılabilecek bir deneysel strateji.....8
Şekil 1.4. Çapraz bağlı immobilize enzim hazırlama yöntemleri 10
Şekil 1.5. 1,4-Benzokinonun kimyasal yapısı 13
Şekil 1.6. Timokinonun kimyasal yapısı.....14
Şekil 4.1. Glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.....35
Şekil 4.2. Glutaraldehit derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.....36
Şekil 4.3. Amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.....37
Şekil 4.4. Farklı çöktürücülerin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.....38
Şekil 4.5. Serbest LOX aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 39
Şekil 4.6. Serbest LOX aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.....39
Şekil 4.7. Serbest LOX için Lineweaver-Burk grafiği.....40
Şekil 4.8. Serbest LOX'un aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi 41
Şekil 4.9. Serbest LOX'un bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.....42
Şekil 4.10. LOX-CLEA aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 42
Şekil 4.11. LOX-CLEA aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.....43
Şekil 4.12. LOX-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.....44
Şekil 4.13. LOX-CLEA'un aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi 44
Şekil 4.14. 1,4-Benzokinon sentezi için serbest LOX ve LOX-CLEA aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.....44
Şekil 4.15. 1,4-Benzokinon sentezi için serbest LOX ve LOX-CLEA aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi 46
Şekil 4.16. Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine çeşitli peroksitlerin etkisi. 47

Şekil 4.17. Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine kümen hidroperoksit derişimin etkisi.....48
Şekil 4.18. LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine kullanılan katalizör miktarının etkisi 49
Şekil 4.19. Farklı substratlar için serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen kinon sentezleri için verim değerleri 50
Şekil 4.20. LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezi için kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığı.....50

1. GİRİŞ

1.1. Lipoksijenazlar

Lipoksijenazlar (LOX; EC 1.13.11.12) iki veya daha fazla doymamış bağ içeren yağ asitlerine oksijen katarak onları yağ asidi hidroperoksitlerine dönüştüren, Hem grubu içermeyen demir taşıyıcı dioksijenazlardır. İlk kez 1928 yılında Bohn ve Haas tarafından rapor edilen bu enzim, 1947 yılında Theorell ve ark. tarafından kristal formda elde edilerek karekterizasyonu yapılmıştır (Bohn ve Haas, 1928; Theorell ve ark., 1947). Lipoksijenaz ilk kristalize edilen enzimlerden bir tanesidir. Önceki çalışmalarda lipoksijenazın hiçbir metal kofaktörü ve prostetik grup içermediği rapor edilmiştir (Siedow, 1991; Axelrod, 1974). Ancak bitkisel kaynaklı lipoksijenaz üzerine yapılan daha sonraki çalışmalar, lipoksijenazın Hem yapısı içermeyen aktif merkezinde Fe^{+2} bulunduran dioksijenaz olduğunu ortaya çıkarmıştır (Siedow, 1991; Feussner ve Wasternack, 2002).

Lipoksijenaz aktivitesi 60'dan fazla gelişmiş bitkide, memelilerde, ökoryatik alglerde, fungilerde, siyanobakterilerde ve prokaryotlarda tanımlanmıştır. Tüm lipoksijenazların katalizlediği genel reaksiyon cis,cis-1,4 pentadien sistemine moleküler oksijeni eklemektir. Teorik olarak oksijen pentadien sisteminin sonuna eklenir. Oluşan hidroperoksi ürünü cis, trans konjuge çift bağı içerir. Linoleik asit substrat olarak kullanılırsa oluşacak iki olası ürün 9- ve 13-hidroperoksi cis,trans oktadekadienoik asittir.

Lipoksijenaz aktivitesi, genel olarak enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan konjuge çift bağların 234 nm'de verdiği absorbsiyon ölçülerek veya oksijen elektrodu kullanılarak ölçülür. Birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitleri substrat olarak kullanılmasına rağmen, linoleik asit deneysel çalışmalarda en fazla kullanılan moleküldür.

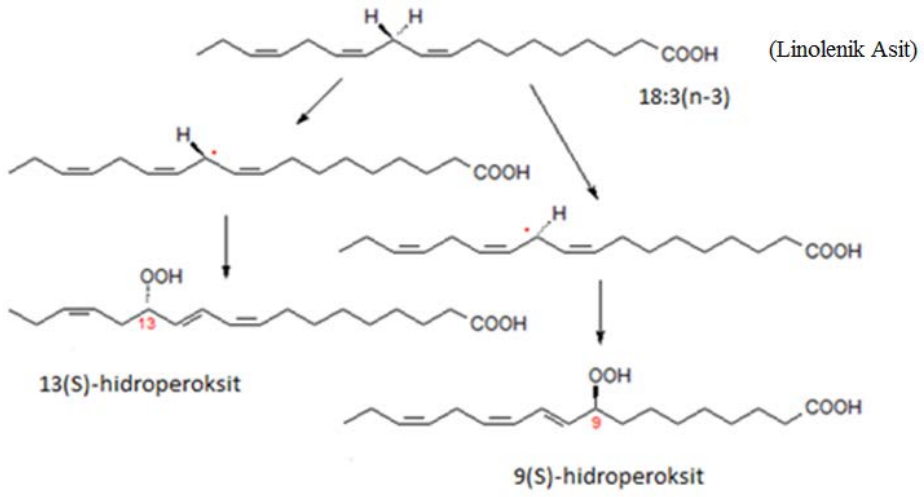
Axelrod ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada enzimin üç izoenzimi olduğunu bildirilmiştir (Axelrod ve ark., 1972). Lipoksijenaz enzimi, optimum pH, substrat özgünlüğü, ürün oluşumu ve kararlılık bakımından LOX-1, LOX-2, LOX-3, olarak adlandırılan üç izoenzime sahiptir. Her üç izoenzimde, tek bir polipeptid biriminden

oluşmuş ve molekül ağırlığı 96000 civarında olan bir proteindir. Üç izoenzim izoelektrik noktaları bakımından birbirinden farklıdır. LOX-1, LOX-2, LOX-3'ün izoelektrik noktaları sırasıyla 5,68, 6,25, ve 6,15 olarak bildirilmiştir (Axelrod ve ark., 1972). Bu yük farklılıkları LOX-1'in anyon değiştirici kromotografi ile kolayca ayrılmasını sağlar. LOX-2 ve LOX-3 'ün ayrılması daha zordur. Bu iki izoenzimin ayrılmasında HPLC ve kromotografik odaklama yöntemleri kullanılır.

Lipoksijenaz izoenzimlerinden LOX-1 için en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH 9,0, LOX-2 için 6,5, LOX-3 için ise pH 7,0 olduğu bildirilmiştir (Axelrod ve ark., 1972). LOX-1, yağ asitlerinin sülfat esterlerine karşı aktivite gösterirken esterleşmiş yağ asitlerine karşı aktivite göstermediği saptanmıştır. LOX-2 ve LOX-3, pH 7'nin altında nötral ve serbest yağ asitlerine karşı yüksek aktivite göstermektedir (Axelrod ve ark., 1972).

Lipoksijenazın özellikle çok çeşitli bitki tohumlarında var olduğu bilinmektedir. Bezelyeleri kapsayan çeşitli tohumlarda, fasulyelerde, yer fıstığında, turpta ve patateste bulunmaktadır (Brash, 1999; Wang ve ark., 2008; Padilla ve ark., 2009; Osipavo ve ark., 2010).

Lipoksijenaz'ın katalizlediği reaksiyon stereo ve konuma spesifiktir. Bundan dolayı katalizlenen reaksiyon sonucu farklı reaksiyon ürünleri oluşmaktadır. Enzimin özelliği, substratın yapısı, substratın aktif merkeze giriş yönü, reaksiyon koşulları ve aktif merkezin üç boyutlu yapısı farklı ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır (Yıldırım, 2003). Örneğin; LOX-1 aktif merkeze metilen ucundan girdiğinden oluşan ürün sadece 13-hidroperoksi linoleik asittir. Fakat LOX-2 izomerinde ise substrat aktif merkeze karboksil ucundan girdiğinden dolayı oluşan ürün büyük oranda 9-hidroperoksi oktadekadienoik asit olacaktır (Yıldırım, 2003). Lipoksijenazın katalizlediği bir reaksiyon Şekil 1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Lipoksijenazın katalizlediği bir reaksiyon.

Lipoksijenazlar endüstride farklı kullanım alanlarına sahiptirler. Soya fasulyesinden elde edilen lipoksijenaz enzimi doğal bitkisel yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerine spesifik olarak oksijen ekleyebilmektedir. Bu sayede elde edilen maddeler risinoleik asite dönüştürülebilmektedir. Risinoleik asit ve onun türevleri ise sabunun, boyanın, verniğin, reçinenin, plastiğin ve yağlayıcı maddelerin asıl bileşenidir.

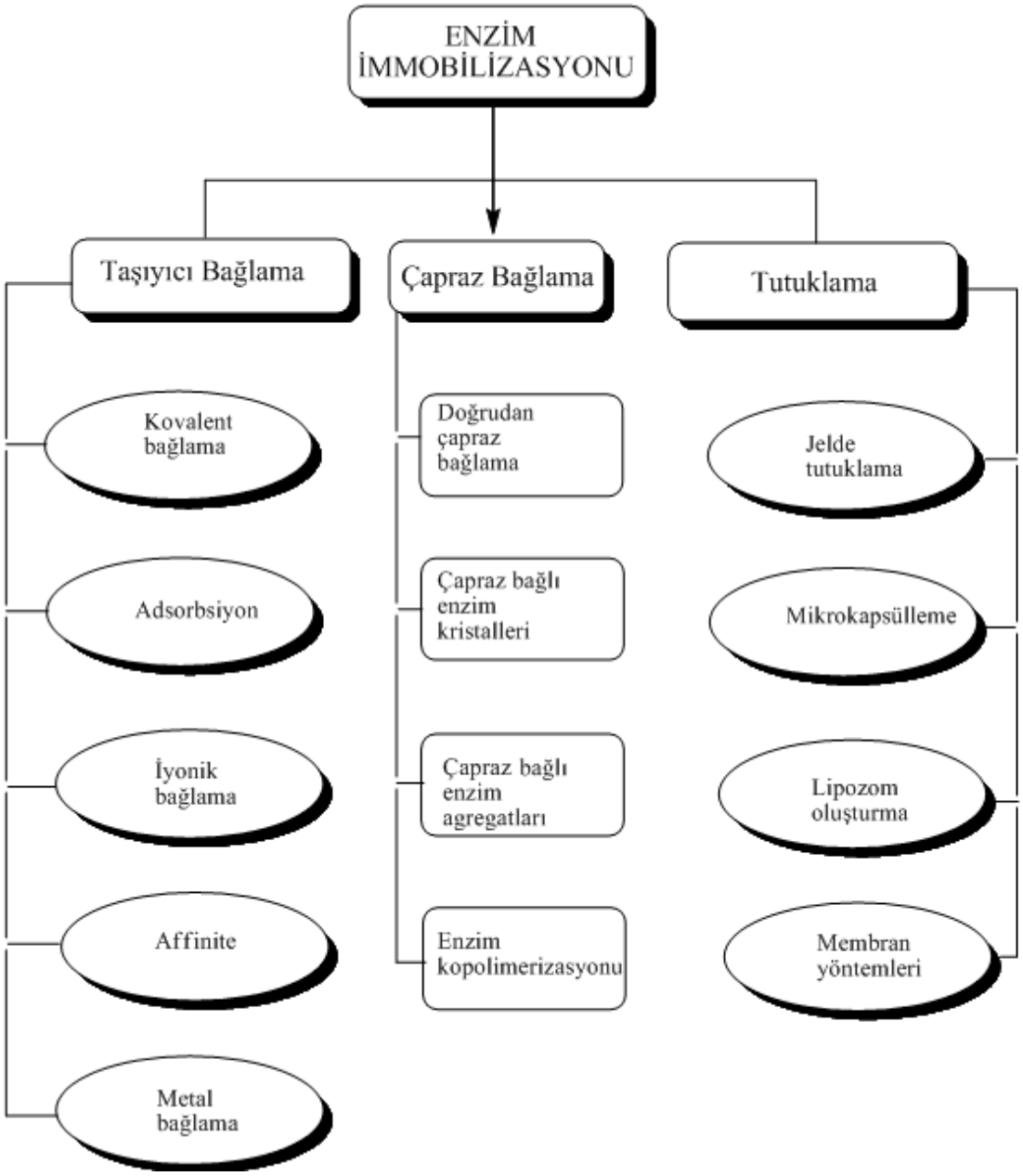
Ekmek yapımında da lipoksijenazın kullanımı oldukça yaygındır. Bu iki sebepten kaynaklanmaktadır. Birincisi; lipoksijenaz karateonidleri oksitleyerek ekmek içinin daha beyaz olmasını sağladığı için tercih edilen bir beyazlatıcıdır. İkincisi ise; hamuru iyileştirici yönde etki edip, hamurun yoğrulma toleransını artırmaktadır.

Lipoksijenaz enzimi H_2O_2' li ortamda Fenton reaksiyonu yolu ile ksenobiotiklerin oksidasyonu, epoksidasyon, desülfürasyon, *N*-demetilasyon ve sülfoksidasyon reaksiyonlarında kullanılabilmektedir. Lipoksijeaz katalizli bu reaksiyonlara örnek olarak guaiakolün H_2O_2 varlığında soya fasulyesi lipoksijenazı tarafından tetraguaiakole dönüştürülmesi, aldrinin epoksidasyonu, parathionun desülfürasyonu, aminopirinin *N*-demetilasyonu ve tiyobenzamidin sülfoksidasyonu verilebilir (Kulkarni ve ark.,1988; Naidu ve Kulkarni.,1991a; Naidu ve Kulkarni.,1991b; Naidu ve Kulkarni.,1991c; Yang ve ark., 1998).

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

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, tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından tepkimenin kontrolü çok güçtür hatta çoğu kez olanaksızdır. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün ve ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktır. Yukarıda belirtildiği gibi, katalizör olarak kullanılan serbest enzimi tepkime 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.

İmmobilizasyon, çözünmüş durumdaki bir enzimin tekrar ve sürekli kullanımını sürekli kılmak, kararlılığını artırmak için enzimin organik veya inorganik desteğe bağlanması veya bir membran ile etrafının sarılmasıdır. Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok çeşitli sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 1.2'de olduğu gibi bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Tischer ve Wedekind, 1998).

Çeşitli yöntemler kullanılarak immobilize edilen enzimlerin serbest enzime göre beklenen üstünlükleri vardır. İmmobilize enzimler reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmeli, birçok kez ve uzun süre sürekli işlemlere uygulanabilmeli ve çevre koşullarına (pH, sıcaklık) karşı dayanıklı olabilmelidirler.

1.3. Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM)

Yanıt yüzey yöntemi, "Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması" ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. İlk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır. Myers ve Montgomery yanıt yüzey yöntemini, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlamıştır (Myers ve Montgomery, 1995). Yanıt yüzey yöntemi (RSM) sahip olduğu avantajlardan dolayı günümüzde uygulamalı bilim ve mühendislik dallarında kullanılan matematiksel ve istatistiksel bir yöntemdir (Box ve Wilson, 1951). Bu yöntem teknolojik proseslerin matematiksel modellemelerinde ve optimizasyonunda sıkça kullanılmaktadır. Box ve Wilson en az sayıda gözlem değeri ile yanıt yüzeyi üzerinde yanıt değişkeninin maksimum değerini aldığı noktaya erişilmesi amaçlanan deneme düzenlerini ortaya koymuşlardır. Bu yöntem, birçok deney türü için ortaya çıkan problemleri eş zamanlı olarak çözmek ve cevapları da eş zamanlı olarak optimize etmekte faydalanılan kullanışlı ve etkili bir metottur (Chen, 1994). Yanıt yüzey yöntemi model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. Bir faktörün temel etkisinin veya diğer faktörlerle etkileşiminin yanıt değişkeninin değerinde ne derece önemli etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak birden fazla değişkenin örneğin pH, konsantrasyon, zaman, sıcaklık gibi yanıt üzerindeki etkileri araştırılıp optimum değerleri tespit edilebilir. Sonuçlar üç boyutlu grafik ve kontur haritası olarak verilebilir. Az sayıda deneysel kombinasyon kullanılarak test edilmeyen faktör değeri ve bunların kombinasyonları hakkında tahmin yapılabilir (Joglekar ve May, 1987).

Yanıt yüzey oluşturmadaki amaç deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkili olan çok sayıdaki parametreden oluşan bir tasarım düzleminde belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir. Elde edilen fonksiyon deneysel verileri temsil etmekle birlikte, model uyumunun fazla olması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçlı çalışmalarda;

$$Y=f(X_1,X_2,\ldots\ldots\ldots..,X_n)+\varepsilon$$

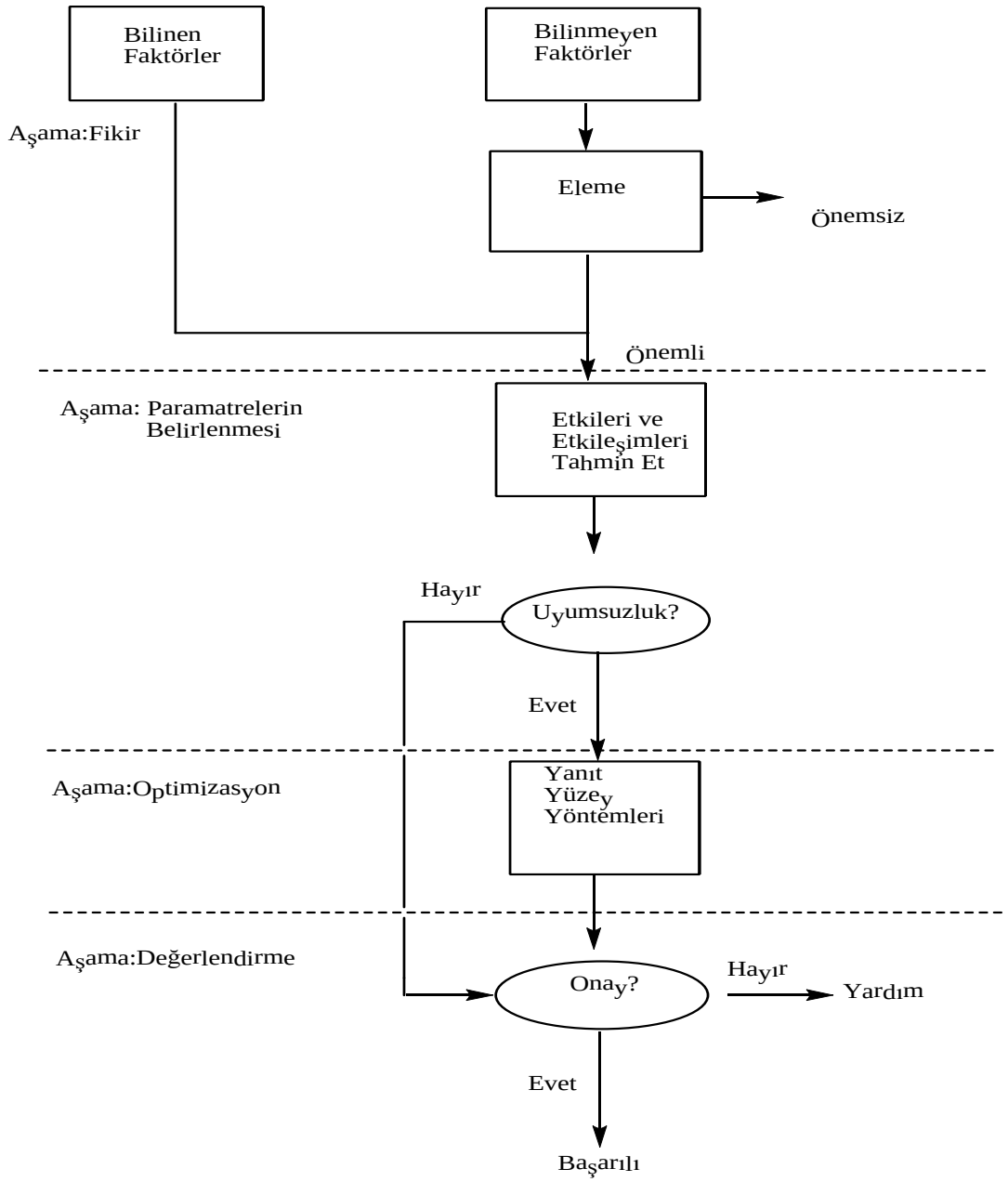
eşitliği esas alınır. Burada Y bağımlı yanıt değişkeni, f bağımsız değişkenler olarak bilinen kantitatif değişkenler olan $X_1, X_2, \ldots, X_n$'in fonksiyonu ve ε ise tesadüfi hata terimidir.

1.3.1. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım yani istatistiksel tasarım en az sayıda deneyle maksimum bilgiyi elde etmek için deneylerin nasıl planlanacağı ve yapılacağının metodudur. Tasarım uygulanmadan önce literatürler taranarak ve ön deneyler yapılarak yanıtı etkileyen bağımsız değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri belirlenmelidir (Türk, 2008). Deneysel tasarım seçimi yapılmadan önce ise aşağıdaki aşamalar tespit edilmelidir (Montgomery, 1996).

- Problemin durumu ve tanımlanması,
- Faktörler, seviye ve aralıklarının seçilmesi,
- Cevap değişkeninin seçilmesi,
- Deneysel tasarım matrisi oluşturulması,
- Deneylerin gerçekleştirilmesi,
- Verilerin istatistiksel analizinin yapılması,
- Sonuçların değerlendirilmesi

Deneysel tasarım birkaç faktörün eş zamanlı değiştirilebilmesi ve her bir faktörün bağımsızca değerlendirilmesini mümkün hale getirdiğinden geleneksel deney yöntemlerini göre daha az deney yapılarak daha kısa sürede daha doğru sonuç alınmasını sağlar. Deneysel tasarımda ön görülen strateji Şekil 1.3' de görüldüğü gibi özetlenebilir (Anderson ve Whitkomb, 2005).



Şekil 1.3. Yanıt yüzey metodunda kullanılabilecek bir deneysel strateji.

Deneysel çalışmaların tasarlanması ve optimizasyonunda kullanılan tasarım türleri uygun yazılıma sahip paket programlar yardımıyla anlaşılır ve kolay hale gelmiştir. Bazı tasarım yöntemleri şunlardır; merkez kompozit tasarım (Central Composite Design, CCD), Box-Behnken tasarımı, hibrid tasarım, bir faktör tasarımı, üç düzeyli tasarım, pentagonal tasarım, hegzagonal tasarım, D-optimal tasarım, kullanıcı tanımlı tasarımdır (Turan ve Altundoğan, 2011).

1.4. Çapraz Bağlama Yöntemi

Çapraz bağlama yöntemi, enzim immobilizasyon yöntemleri için öngörülen sınıflandırmalardan bağlama yönteminin bir sınıfını oluşturur. Çapraz bağlama ile yapılan enzim immobilizasyon yöntemlerinde küçük molekül yapılı, iki veya çoklu fonksiyonel grup içeren reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadırlar (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, proteine, reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzim ve reaktif türüne çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, *p*-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.

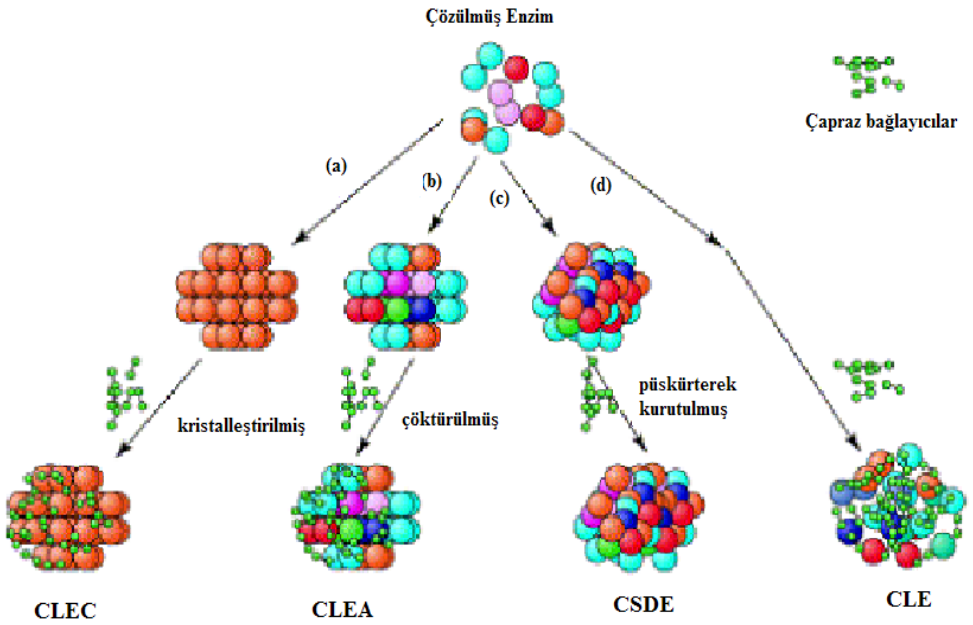
Çapraz bağlı immobilize enzimler;

CLE: Çapraz bağlı çözünmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme)

CLEC: Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal)

CSDE: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spray dried enzyme)

CLEA: Çapraz bağlı enzim agregatları (Cross-linked enzyme agregate) olmak üzere dört farklı şekilde hazırlanabilmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Çapraz bağlı immobilize enzim hazırlama yöntemleri: (a) kristallendirme, (b) çöktürme, (c) püskürterek kurutma, (d) doğrudan çapraz bağlama (Twyman, 2005).

CLE: Bu tür immobilize enzim için termal kararlılık güçlendirilebilir ancak çapraz bağlayıcının miktarı, sıcaklık, pH ve iyonik güç gibi birkaç faktör arasında hassas bir denge gerektirir. Ayrıca çözünmüş enzim moleküllerinin arasındaki yüksek oranda intermoleküler çapraz bağların oluşması düşük aktivite, zayıf tekrarlanabilirlik, düşük mekanik kararlılık gibi bazı olumsuzluklara neden olabilmektedir. Ayrıca jölemsi yapıda olması da dezavantajlarından biridir (Cao ve ark., 2003).

CLEC: Büyüklükleri 1- 100 µm arasında kontrol edilebilen, yüksek oranda aktif ve kararlı immobilize enzimler olarak geliştirilmiştir. Diğer taraftan ezim kristalizasyonu için kullanılacak enzimin son derece saf olması gerekmektedir. Bu da maliyeti çok artırmaktadır. Lipaz, proteaz ve açilaz gibi birçok hidrolazlar asimetrik sentezler için kiral biyokatalizörler olarak ticari amaçla CLEC olarak kullanılmıştır (Cao ve ark., 2003).

CSDE: Püskürtülerek kurutulmuş enzim tozları çapraz bağlı enzim preparatları hazırlamak için kullanılır. Uygun bir aktivite göstermesine rağmen bu

yöntemden şimdiye kadar yararlanılmamıştır. Çünkü bu yöntem uygulanırken enzim, kurutulması nedeniyle etkisiz hale gelmektedir. CSDE'nin CLEC, CLEA veya taşıyıcı ile yapılan immobilize enzimlerle kıyaslandığında oldukça düşük aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Cao ve ark., 2003).

CLEA: Çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar oluşturmasına dayanmaktadır. Uygun agregat oluşturucular eklenmesiyle enzim çözeltisinin elektrostatik sabitlerinin değişmesi ile ya da enzim çözeltisinin hidrasyon durumunun değiştirilmesi ile çözünmez enzim agregatları oluşturulabilmektedir. Yüksek oranda çözünmüş serbest enzim molekülleri çöktürücülerle çözünmez çökeltiler halinde çöktürülürler. Bu çözünmez çökeltiler daha sonra bifonksiyonel çapraz bağlayıcıların eklenmesiyle çapraz bağlanırlar. Oluşmuş CLEA'lar CLEC'lerle karşılaştırılabilir aktivite ve kararlılık gösterirler. CLEA'nın kullanımı halen gelişmekte olan bir teknolojidir (Cao ve ark., 2003). CLEC'in aksine enzimin kristal formunu gerektirmez bu nedenle maliyeti daha düşüktür (Sheldon, 2007). CLEA yöntemi enzimi tamamen saf bir halde kullanmaya gerek duymadığı için basit, sağlam ve etkili bir metottur. CLEA'da çapraz bağlama için kullanılan reaktif aldehit grubu içeren, yüksek molekül ağırlıklı polifonksiyonel polimerlerin (100-200 kDa) enzimlerin veya alt ünitelerin çapraz bağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Mateo ve ark., 2003). Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zahmetlidir. Enzim aktifliği; tepkime süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

CLEA Yönteminin Avantajları:

- Tek bir işlemde enzimlerin immobilize edilebilmesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni, çok yönlü ve etkili olması,
- Metodun hızlı immobilizasyon için basit olması
- Metot ilk adımda saflaştırma ve immobilizasyonun bir bileşimi olduğundan enzimin yüksek saflığını gerektirmemesi,
- Yöntemin kombine CLEA'ların hazırlanması için de uygun olması,

- Herhangi bir destek kullanılmaması nedeniyle enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,
- Yüksek kararlılık ve düşük üretim maliyeti,
- Endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç,
- Multimerik enzimlerin alt ünitelerinin ayrılmasını engelleyerek enzimin kararlılığının artması ve dördüncül yapısının dengeli tutulması.

CLEA Yönteminin Dezavantajları:

- Yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklar,
- Çöken enzimlerin partikül boyutlarının kontrolünün zorluğu.

1.5. Kinonlar

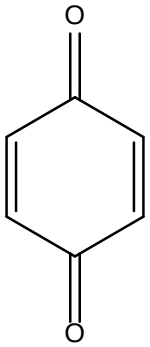
Aromatik bir halka üzerinde, iki tane keton karbonili içeren bileşiklerdir ve karbonil grubu halkanın bir parçası haline gelmiştir. Benzenden türeyen kinonlar için, doğrudan doğruya o- veya p-kinon denildiği gibi, bu grubun en basit üyesi olan *p*-benzokinona ($C_6H_4O_2$) doğrudan kinon da denilir. Kinonlar aromatik bileşik değildirler. Benzenden orto ve para olmak üzere iki kinon izomeri oluşur. Bu bileşiklerde karbonil grubu halkanın bir parçası haline gelmiştir. Oksijen atomları orto veya para konumunda olabilir fakat m-kinonlar mevcut değildir (Bayrak, 2009).

Kinonlar aromatik bileşik olmamalarına karşın bir indirgenme-yükseltgenme dönüşüm sistemi sağlarlar. Bu indirgenme–yükseltgenme sistemi sayesinde fotosentez ve solunum gibi biyolojik redoks tepkime zincirlerinde önemli rol oynarlar. Bunun yanı sıra kinon bileşikleri konjuge olmaları nedeniyle renkli bileşiklerdir ve doğal boyar maddesi olarak kullanılırlar. Tedavi edici kinon bileşikleri olduğu gibi herbisit, fungusit, insektisit vb. özellikler gösterenlerde bulunmaktadır (Astreitwieser ve Heatcock, 1976).

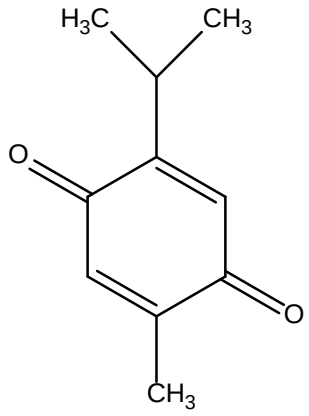
1,4-Benzokinon, yükseltgeme ajanı olarak, boya imalatında, hidrokinon imalatında, deri tabaklanmasında ve jelatini çözünmez hale getirmede ve hayvan liflerinin kuvvetlendirilmesinde reaktif olarak kullanılır ve çok amaçlı kullanılan 1,4-dioksibenzol için bir çıkış materyali olarak ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 1.5).

Doymamış yan zincirli benzokinon ve antrakinon, polimer zinciri boyunca kinon yapıları içeren polimerler verebilirler. Bu polimerler, sudan oksijenin uzaklaştırılmasında ve suyun saflaştırılmasında kullanılabilir. Ayrıca hidrojen peroksidin üretilmesinde, yardımcı biyokimyasal reaksiyonlarda (redoks ajanlarından dolayı kirliliğin istenmediği yerlerde), gastrointestinal ülserlerin tedavisinde ve renkli fotoğraf sistemleri için yayılmayan indirgeyici araçlarda kullanılır.

Timokinon ($C_{10}H_{10}O_2$; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon (Şekil 1.6)) 2000 yılı aşkın süredir antioksidan, anti-inflamatuar ve antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (Woo ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda timokinonun pek çok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca timokinonun, androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek hormon-refraktör (cevap vermeyen) prostat kanserini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Yanaroğlu, 2011).



Şekil 1.5. 1,4-Benzokinonun kimyasal yapısı.



Şekil 1.6. Timokinonun kimyasal yapısı.

1.6. Kimyasal Aminasyon

Enzimlerin yapısında kimyasal yöntemler ile değişiklikler yapılarak enzimin kararlılığında bir artış sağlanmak istenmektedir. Bu amaçla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri ise kimyasal aminasyon yöntemidir. Bu yöntemle enzimin yüzey alanındaki reaktif grupların sayısı artırılarak, enzimin kararlılığında bir artış gözlenmesinin yanında bu reaktif gruplar sayesinde immobilizasyon yüzdesinde de bir artış gözlenmektedir.

Kimyasal aminasyon işlemi, etilendiamin (EDA) varlığında enzimin yüzeyinde bulunan karboksil gruplarının 1-etil-3-(dimetilamino-propil) karbodiimid (EDCA) gibi kimyasallarla aktifleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Bu reaksiyonda, aktive edilmiş karboksil grubu ile etilendiaminin bir amino grubu arasında amit bağı oluşur. Aktifleştirici kimyasalın yapıdan ayrılmasıyla da yeni bir serbest amino grubu oluşur. Oluşan yeni amino grubun pK değeri yaklaşık 9,2'dir. Bu yüzden, bu amino grubu proteinin yüzeyinde bulunan lizin artıklarının amino gruplarından daha reaktiftir. Bu sayede immobilizasyon yüzdesi artırılmaktadır. Modifiye edilmiş amino gruplarının sayısı EDAC konsantrasyonunun ayarlanmasıyla kolayca kontrol edilebilir (Lopez-Gallego ve ark., 2005).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Grossman ve ark. (1972) soya fasulyesi lipoksijenazının affinite kromatografisi ile saflaştırılmasını çalışmışlardır. Ayırma, ham ekstraktın doğrudan linoleil aminoetil agaroz kolonundan geçirilmesiyle yapılmıştır. Adsorbe olmayan diğer proteinler 5 mM asetat tamponu (pH 5,0) ile lipoksijenaz ise 0,2 M asetat tamponu ile kolondan uzaklaştırılmıştır. Protein tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır. Aktivite ölçümleri ise pologrefik olarak oksijen absorbsiyonu incelenerek ve spektrofotometrik olarak oluşan konjuge çift bağlar izlenerek yapılmıştır.

Luquet ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada soya fasulyesini doğrudan trigliseritlerin oksidasyonu için kullanmışlardır. Bu çalışmada kaba lipoksijenaz preparatları kullanılmış ve enzim aktivitesinin kaba enzim preparatları kullanıldığında daha kararlı olduğu bulunmuştur. Herhangi bir yüzey aktif madde ya da organik çözücü yokluğunda ve düşük miktarda su içeren ortamda enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Lipoksijenazın aktivitesi 234 nm'de ve 25 °C'de oluşan konjuge çift bağlar izlenerek ölçülmüştür.

Gilabert ve ark. (1994) asidik pH 'larda (pH 3,0-4,0) hidrojen peroksit varlığında, soya fasulyesi lipoksijenazının klorpromazin'in oksitlenmesini sağladığını bildirmişlerdir. Lipoksijenaz enziminin pH 3,5'de yarı ömrünün 2 saat olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin siklopromazin için K_m değerinin 2,1 mM, V_{max} değerinin ise 125 μmol/dk.mg protein olduğunu bildirmişlerdir. Hidrojen peroksit için K_m değerini ise 0,25 mM olarak bildirmişlerdir.

Delicado ve ark. (1996) hidrojen peroksit varlığında soya fasulyesi lipoksijenazının hidroperoksidaz aktivitesinden yararlanılarak izoproterenol'ün pH 6'da oksitlendiğini bildirmişlerdir. Reaksiyonun başlangıç hızının ve reaksiyonun başlaması için geçen sürenin enzim, substrat ve hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlılığı incelenmiştir.

Delicado ve ark. (1997a) Troloks C'nin (suda çözünebilen bir E vitamini analogu) lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesinden yararlanılarak yükseltgenmesini incelemişlerdir. Troloks C'nin hidrojen peroksit varlığında, ilgili

fenoksil radikaline oksitlendiği ve bir ketodien ara ürünü yoluyla da Troloks C kinona dönüştüğü bildirilmiştir. Reksiyonun askorbat varlığında gerçekleştiği zaman, fenoksil radikali tespit edilememiştir. Troloks C radikali ile askorbat arasındaki sinerjik reaksiyonun kantitatif ve enzim, Troloks C, hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Lipoksijenazın Troloks C'nin yükseltgenmesinde hidroperoksidaz aktivitesi ile dioksijenaz aktivitesini birlikte göstermesi sonucu; lipoksijenazın membranlarda reaktif oksijen türlerine karşı lipofilik antioksidan bariyeri yok etmede anahtar bir enzim olabileceği öngörüsüne ulaşmışlardır.

Delicado ve ark. (1997b) lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesinden yararlanılarak bir sentetik kanserojenik östrojen olan dietilstilbestrolün oksidasyonunu çalışmışlardır. Reaksiyonun oksijen, dietilstilbestrol ve hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma, bu reaksiyonun birçok enzim tarafından gerçekleştirildiğinin bilinmesine rağmen, lipoksijenaz tarafından da gerçekleştirilebileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Gilabert ve ark. (1997) bir *N*-alkil aromatik amin olan aminopirinin lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesi tarafından yükseltgenmesini çalışmışlardır. Hidrojen peroksitin oluşan aminopirin radikal katyonuna molar oranı 0,5 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyonun substrat yenilenmesi ile enzimatik-kimyasal ikinci dereceden mekanizma ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Radikal katyonun ayrışma sabiti değişik deneysel koşullar altında değerlendirilmiştir. Reaksiyon hızının proton konsantrasyonu ile ters orantılı olduğu fakat aminopirinin konsantrasyonundan etkilenmediği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçların N-demetilasyon için yeni ve kapsamlı bir mekanizma önerdiği bildirilmiştir.

Roy ve ark. (1997) soya fasulyesi lipoksijenazının askorbik asitli ortamda oksidasyon etkisini çalışmışlardır. Askorbik asitin oksitlenmesinin linoleik asit, askorbik asit ve enzimin konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için gerekli şartların, 50 mM Tris tamponu (pH 8,3) içerisinde 500 µM askorbik asit ve 25 nM soya fasulyesi lipoksijenazı olduğunu rapor etmişlerdir. Askorbik asit için K_m=100 µM, V_{max}=460 nmol/dk. olarak bildirmişlerdir. Ayrıca askorbik asitli ortamda ksenobiotiklerin soya fasulyesi

lipoksijenazı tarafından oksidasyonunu çalışmışlardır. Askorbik asitin ksenobiotiklerin lipoksijenaz tarafından oksidasyonunu azalttığını belirlemişlerdir.

Suurmeijer ve ark. (1998) domates lipoksijenazının saflaştırılması, ürün karekterizasyonu ve kinetik özelliklerini incelemişlerdir. Enzimin saflaştırılmasında resource-q ve fenilsefaroz-hp kullanılmış enzim aktivitesi linoleik asit kullanılarak spektrofotometrik olarak 234 nm'de ölçmüştür. Enzimin spesifik aktivitesi 668 nkat-mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. Ürün analizi yapıldığında elde edilen ürünün %96 oranında 9-hidroperoksi-(10E,12Z) oktadekadienoik asit olduğu belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten eğrisi çizildiğinde K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 4,1 ve 7,4 $mM.min^{-1}.mg^{-1}$ protein olduğu rapor edilmiştir.

Santano ve ark. (2002) lipoksijenazı kontrollü cam gözeneklere adsorpsiyon yoluyla immobilize edip, lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesinden yararlanarak ksenobiyotiklerin oksidatif detoksifikasyonu sağlamışlardır. Lipoksijenazın pH 9'da daha etkin olduğu bulunmuştur. Hidrojen peroksit varlığında pH: 3,5'te immobilize lipoksijenazın klorpromazini oksitlediği belirlenmiştir. Reaksiyonun serbest enzimle hemen hemen aynı koşullarda gerçekleştiği ve immobilize lipoksijenazın katalitik etkinliği 2,84 $dak^{-1}mM^{-1}$ olarak bulunmuştur. Sonuçlar pH:6,3'te immobilize lipoksijenazın, hidrojen peroksit varlığında amino karbonunda N-demetilasyonu gerçekleştirdiğini göstermiştir. Reaksiyonun etkinliği 36 dak^{-1} mM^{-1} olarak bulunmuş ve bu değerin aynı koşullardaki serbest enzimin reaksiyon etkinliğine (10,55 dk^{-1} mM^{-1}) göre yüksek olduğu görülmüştür. İmmobilize lipoksijenazın reaksiyon kararlılığından dolayı reaksiyonların bioreaktörde gerçekleştirilmesine imkan sağlayabileceği bildirilmiştir.

Fauconnier ve ark. (2003) patates köklerinde lipoksijenaz aktivitesini belirli zaman aralıklarında araştırmışlardır. Oluşan yağ asidi hidroperoksitlerinin analizleri sonucunda ana ürünün 9-*S*-hidroperoksit linoleik asit (9-HPOD) olduğu belirlenmiştir. 45 ve 60 gün depolama süresi arasında yapılan analizlerde yüksek oranda 9-HPOD ve kolneleik asit gözlemlendiği rapor edilmiştir. Elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi (ESI-MS/MS) ile yapılan fosfolipid ve galaktolipid analizlerinde fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidillinositol,

digalaktozildiaçilgiserol ve monogalaktozildiaçil gliserol düzeylerinin 0 ile 45 gün arasında düşüş gösterdiği rapor edilmiştir.

Redrejo-Rodriguez ve ark. (2004) kuersetin, taksifolin, kateşin ve luteloin gibi flavonoidlerin lipoksijenaz aktivitesine inhibisyon etkisini semiempirik yöntemler kullanarak incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar incelenen flavonoidlerin düzlemsel yapıları ile inhibisyon etkisi arasında bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, E_{LUMO} ve bu orbitallerin delokalizasyonunun inhibisyon etkinliği ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Karout ve ark. (2007) soya fasulyesi lipoksijenazının tetrametoksisilan içerisine immobilizasyonu incelemişlerdir. İmmobilizasyon sırasında çeşitli organik çözücülerin, pH'nın ve sıcaklığının lipoksijenaz aktivitesine etkilerini incelemişler ve immobilize lipoksijenaz preparatının serbest enzimin aktivitesinin %30'unu gösterdiğini belirlemişlerdir. Linoleik asitin substrat olarak kullanıldığı çalışmada lipoksijenaz aktivitesine spektrofotometrik olarak oluşan konjuge dien'lerin absorbansının ölçülmesiyle bakıldığını bildirmişlerdir.

Hall ve ark. (2007) lipoksijenaz (LOX) ve hidroperoksid liyaz (HPL) aktivitesi içeren *Penicillium camemberti* ekstraktı kullanılarak immobilizasyon çalışması yapıldığını bildirmişlerdir. İmmobilizasyonda oksiran akrilik boncuklar, Eupergit C ve Eupergit C250L- iminodiasetik asid (IDA) destek materyallerinin kullanıldığını bildirmişlerdir. Her iki enzim için serbest ve immobilize koşullar için optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. İmmobilizasyonla her iki enzimin termal kararlılıklarının arttığı belirlenmiştir. İmmobilize HPL enzimininin 4 ˚C'deki kararlılığının LOX enzimine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilizasyon işleminden sonra, LOX enziminin etkinliğinde bir azalmaya karşın HPL enziminin etkinliğinde bir artış gözlendiği rapor edilmiştir.

Szymanowska ve ark. (2009) lipoksijenazı bezelye tohumundan izole etmişler ve sonrasında karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan lipoksijenazının molekül ağırlığını 93 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin kaffeik asid, ferulik asid, benzoik asid, kateşin, kuersetin ve kaempferol gibi değişik inhibitörlere karşı ilgisini araştırmışlardır. Yapılan inhibisyon çalışmalarında en etkili inhibitör olarak kaffeik asit ve en az etkili inhibitör olarak kaempferol rapor

edilmiştir. Lipoksijenazın substrat olarak en yüksek aktiviteyi linoleik aside karşı, en düşük aktiviteyi ise oleik aside karşı gösterdiği belirlenmiştir. Linoleik asid için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,44 mM ve 151,5 U/dk olarak belirlenmiştir. Lipoksijenaz için optimum pH 5,5 olarak rapor edilmiştir.

Borges ve ark. (2009) azelat iyonları ile alkali birlikte çöktürme yöntemiyle Zn/Al çift katmanlı hidroksit materyali elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Tabakalı materyalin yüzey alanının organik iyonlardan oluştuğu X-ray kırınım ve FTIR spektroskopisi ile belirlendiği bildirilmiştir. Lipoksijenaz aktivitesi içeren *Penicillium camemberti* enzimatik ektraktı için elde edilen bu materyal destek maddesi olarak kullanılmıştır. İmmobilizasyon için optimum koşulun 0,6mol.L^{-1} potasyum fosfat tamponu (pH 6,0) olduğu bildirilmiştir. Enzimin substrat ilgisi immobilizasyondan sonra değişmemiş fakat spesifik aktivitesinde küçük bir düşüş gözlenmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra enzimin termal kararlılığının arttığı belirlenmiştir. 60 ºC'de yapılan termal kararlılık çalışmalarında, serbest enzimin inhibe olmasına karşın immobilize enzimin aktivitesinin %68'ini koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca tekrar kullanım çalışmalarında immobilize enzimin 8 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğu bildirilmiştir.

Jacobo-Velázquez ve ark. (2010) avakado meyvesinden (*Persea americana* Mill. cv. Hass) lipoksijenazın kısmi saflaştırılması ve karekterizasyonu çalışmalarını yapmışlardır. Kısmi saflaştırma işleminde amonyum sülfat ile çöktürme ve anyon değiştirme adsorpsiyon yöntemlerinin sırasıyla gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Lipoksijenaz aktivitesi üzerine scaklık, pH ve kalsiyum iyonları derişiminin etkisi belirlenmiştir. Bununla beraber *in vitro* koşullarda avakado lipoksijenazının β-karoteni oksitlemesi çalışmalarının yapıldığı bildirilmiştir. Optimum aktiviteye 40 ºC, pH 6,5 ve 0,20 mM kalsiyum iyonları konsantrasyonunda ulaşılmıştır.

Kartal ve ark. (2011) çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak *Candida rugosa* lipazından çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlamışlardır. İmmobilizasyon yöntemi için uygun şartları belirlemişlerdir. CLEA'ların serbest enzime göre birçok avantajı olduğunu bildirmişlerdir. CLEA'ların 50 °C ve 60 °C'de serbest enzime göre daha kararlı oldukları ve tekrar kullanılabilirlik açısından da serbest enzime göre daha iyi olduklarını belirlemişlerdir. Özellikle uzun zincirli yağ

asitleri ve alkoller substrat olarak kullanıldığında, CLEA'ların siklohekzan içindeki esterleşme reaksiyonlarını serbest enzime göre daha yüksek bir verimlilikle katalizlediği bildirilmiştir.

Sulek ve ark. (2011) peroksidazın çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) turp köklerinden başarılı bir şekilde hazırlandığını rapor etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve değisik agregat ajanları kullanılmıştır. Elde edilen CLEA'ların serbest enzimin aktivitesinin %83'ünü gösterdiği bildirilmiştir. CLEA'lar yumurta albümini (37 mg/mL) ve pentaetilenhekzaamin (10 mM) varlığında elde edilmiştir. Albümin CLEA'ların kararlılığında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Turp peroksidazı sadece 6 lizin artığına sahiptir. Ortama ilave edilen pentaetilenhekzaamin, enzimin dış yüzeyindeki amino grupları sayısını artırdığı için çapraz bağlamayı kolaylaştırmaktadır. Elde edilen peroksidaz enzim agregatları kolesterol oksidaz ile birlikte biyosensör alanında kullanılacağı öngörülmektedir.

You Xu ve ark. (2012) çapraz bağlı mantar tirozinazı agregatlarını L-tirozinden L-3,4-dihidroksifenilalanin elde etmek için kullanmışlardır. Bu immobilize enzim tarafından katalizlenen sentetik reaksiyon farklı deneysel süreçlerde incelenmiştir. Kesikli proseste, 2 saat süre ile gerçekleştirilen reaksiyonda dönüşümün 209,0 mg L^{-1} $saat^{-1}$ verimlilikle %53 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu dönüşümün, aynı enzimin taşıyıcı bağlama yöntemi ile yapılan diğer proseslere göre daha uygun olduğu belirlenmiştir. L-3,4-dihidroksifenilalaninin oluşumu üzerine pH, sıcaklık ve L-askorbik asit etkisi incelenmiştir. Reaksiyonun gidişatının L-3,4-dihidroksifenilalanin konsantrasyonunun HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerle izlenerek belirlendiği bildirilmiştir. İndirgeyici ajanın doğru uygulandığı sürece, her iki yöntemle elde edilen sonuçların birbirleriyle uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Tirozinaz CLEA'larının kalsiyum alginat jeline tutturulmasıyla kararlılığının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Elde edilen CLEA/alginat boncukları sürekli karıştırmalı tank reaktöre konularak gerçekleştirilen reaksiyon sonucu, reaksiyonun 104 saat süresi sonunda ve 57,4 mg L^{-1} $saat^{-1}$ verimlilikle başarıldığı bildirilmiştir.

Villaverde ve ark. (2012) *Trichoderma reesei* mantar türünden rekombinant olarak üretilen *Gaeumannomyces graminis tritici* lipoksijenazının linoleik asiti hidroperoksitlere dönüştürmesini çalışmışlardır. Hidroperoksit üretiminin optimizasyon çalışmaları için yanıt yüzey yöntemini kullanmışlardır. Optimum koşullar pH 6,7, 23,9 ºC ve 18 saat olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda ve substrat derişimi 10 g/L olduğunda, hidroperoksit üretiminin %88 verimle gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca 13-(Z,E)-HPODE izomerinin iyi bir duyarlılıkla % 47,4 verimle elde edildiği bildirilmiştir. Endüstriyel olarak kullanılan linoleik asit konsantrasyonları (100-300 g/L) kullanılarak gerçekleştirilen hidroperoksit üretiminin yaklaşık %40 verimle ve 3,6 g L^{-1} $saat^{-1}$ hacimsel verimlilikle gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı;

1) Soya fasulyesi tohumlarından kısmi saflaştırılmış lipoksijenazın çapraz bağlı enzim agregatlarının oluşturulması (LOX-CLEA)
2) LOX-CLEA oluşumu için optimum koşullarının yanıt yüzey yöntemi ile incelenmesi
3) Serbest LOX ve LOX-CLEA preparatlarının karakterizasyonu
4) Serbest LOX ve LOX-CLEA preparatlarının 1,4-Benzokinon ve timokinon sentezlerinde kullanılabilirliklerinin araştırılmasıdır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, Fluka ve Merck firması tarafından sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan soya fasulyesi örnekleri ise Ç.Ü. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.(*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi).

Kimyasallar: Linoleik asit, hidrokinon, 1,4-Benzokinon, fenol, timol, timokinon, hidrojen peroksit, tert-bütil hidroperoksit, kümen hidroperoksit, glutaraldehit (%50, w/w) amonyum sülfat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, polietilenglikol (PEG), dimetil sulfoksit (DMSO), t-bütanol, *N*-siklohekzil-*N*^{l}-(2-morfolinoetil) karbodiimid-meto-p-toluensülfonat, sodyum sitrat, sığır serum albümin, aseton, metil alkol, sodyum hidroksit, glasiyel asetik asit, fosforik asit (%85,v/v), hidroklorik asit (%37,v/v), borik asit.

Araç ve gereçler: UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA8417), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj (Kendro Laboratory, Labofuge 200), elektrikli terazi, otomatik pipet (Eppendorf, Mikrolit), girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu (Memmert).

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin Homojenizasyonu

Soya fasulyesi tohumlarının her 100 gramı için 200 mL önceden -20 °C'ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek örnekler blender ile homojenize edilmiştir. Sonrasında homojenat su trompu yardımıyla vakum altında süzülerek ve filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar blender haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 2 kez tekrarlanmıştır. Böylece aseton ile birlikte fenolik bileşikler ve bazı lipitler de süzüntü ile uzaklaştırılmıştır. Son süzme işlemi sonunda elde

edilen toz halindeki katı ekstrakt asetonun uçurulması amacıyla 24 saat 5 °C'de bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Lipoksijenaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Aseton ekstraksiyonu işlemi ile elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 30 mL borat tamponunda (50 mM, pH 9,0) çözüldükten sonra elde edilen çözelti, 10000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanta farklı doygunlukta %20-60'lık amonyum sülfat çöktürmeleri uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmeleri sonucunda elde edilen her bir çökelti ve süpernatantın lipoksijenaz aktiviteleri ve protein miktarı tayinleri Lowry (1951) yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.3. Lipoksijenazın CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu

LOX 'ın CLEA oluşturarak immobilizasyonu için Sheldon ve ark. (2006) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Soya fasülyesi tohumlarından aseton ile çöktürme sonucu elde edilen katı ekstraktın her 1 gramına 5 mL 50 mM borat tamponu (pH 9,0) eklenmiş ve 60 dk karıştırıldıktan sonra 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve çökelti 2,5 mL tampon ile (50 mM pH 9 borat tamponu) çözülmüştür. Bu çözelti içerisine 5 mL kimyasal aminasyon çözeltisi (10 mM *N*-siklohekzil-*N*'-(2-morfolinoetil) karbodiimid-meto-p-toluensülfonat içeren pH 4,7'ye ayarlanmış 1 M etilendiamin) ilave edilip 1 saat oda koşullarında (25 ºC) bekletilmiştir. Elde edilen lipoksijenaz çözeltisine derişimi %60 olacak şekilde katı amonyum sülfat eklenmiş, 5 ºC'de 20 dk bekletilmiş ve lipoksijenazın çöktürülmesi sağlanmıştır. Çöktürme işlemi sağlandıktan sonra 0,6 mL glutaraldehit (%50'lik, v/v) eklenerek 5 ºC'de 10 saat boyunca çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. Oluşan CLEA örnekleri üzerine 4 mL soğuk aseton eklenerek iyice çalkalandıktan sonra aseton fazı dökülmüştür. Daha sonrasında CLEA örneklerine 2 mL eter eklenmiş ve

çalkaladıktan sonra süzülmüştür. Elde edilen immobilize LOX-CLEA'lar süzüntüde glutaraldehit kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanmıştır.

3.2.4. Lipoksijenazın İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Lipoksijenazın CLEA şeklinde immobilizasyonunda, uygun immobilizasyon koşulları RSM kullanılarak belirlenmiştir. Literatür taraması ve ön çalışmalar yapılarak CLEA hazırlanmasına etki eden önemli faktörler çapraz bağlayıcının derişimi, çöktürücünün derişimi ve immobilizasyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu faktörlerin minumum ve maksimum değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Yanıt ise lipoksijenaz CLEA'nın (LOX-CLEA) aktivitesi olmuştur. Bu amaçla Çizelge 3.2'de verilen 3-faktör ve 3-düzey BBD immobilizasyon çalışmalarında uygulanmış ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi Design-Expert 8.0.7 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. LOX-CLEA hazırlanmasının optimizasyonunda kullanılacak faktörlerin en düşük, orta ve en yüksek değerleri.

Faktörler	**Sembol**	**Değişken düzeyleri**		
		En düşük	**Orta**	**En yüksek**
		-1	**0**	**+1**
Glutaraldehit derişimi (%)	X_1	20	25	30
Amonyum sülfat derişimi (%)	X_2	50	60	70
İmmobilizasyon süresi (saat)	X_3	10	15	20

Çizelge 3.2. LOX-CLEA hazırlanmasının optimizasyonunda kullanılacak Box–Behnken dizaynı.

Sıra No	Glutaraldehit derişimi (%)	Amonyum sülfat derişimi (%)	İmmobilizasyon süresi (saat)
1	25	70	20
2	25	70	10
3	30	50	15
4	20	60	20
5	25	60	15
6	30	60	20
7	30	70	15
8	20	50	15
9	25	50	20
10	30	60	10
11	20	70	15
12	25	50	10
13	25	60	15
14	20	60	10
15	25	60	15

3.2.5. Serbest Lipoksijenazın ve LOX-CLEA Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipoksijenaz aktivitesi ölçümünde Axelrod ve ark. (1972) ve Baracat-Pereira ve ark. (2001) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Enzim aktivitesi linoleik asitin enzim ile etkileşmesi sonucu oluşan konjuge çift bağların 234 nm'de artan absorbansı 3 dakika boyunca izlenerek ölçülmüştür. Yöntemde 5 mL metil alkol içerisinde derişimi 0,04 M olacak şekilde linoleik asit ana substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 3 mL 50 mM borat tamponu (pH 9,0) içerisine 5 µL substrat çözeltisi eklenip 20 °C' de 5 dakika bekletilmiş, bu çözelti içerisine 10 µL enzim çözeltisi ilave edilmiş ve 234 nm' de artan absorbans 3 dakika boyunca kaydedilmiştir. Kör

olarak 3 mL 50 mM borat tamponu (pH:8,5) kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin U/mL cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite} = \frac{\Delta\text{Absorbans}}{\varepsilon} \times \frac{V_t}{V_e} \times \frac{1}{t}$$

V_t: Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e: Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ε: Molar ekstinksiyon katsayısı (25000 M^{-1} cm^{-1})

t: Reaksiyon zamanı (3 dk)

LOX-CLEA aktivitesi belirlemek amacıyla 40 mg LOX-CLEA alınıp üzerine 50 mM borat tamponu (pH 8,5) içinde 0,04 M linoleik asit olacak şekilde hazırlanan substrat çözeltisinden 5 µL eklenmiş ve 5 dk sonra 234 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Enzim aktivitesi U/g CLEA cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A: Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmştır.

2. Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3. Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

4. Folin-Ciocalteau çözeltisi saf su ile 1/2 oranında seyreltilerek hazırlanamıştır.

5. Standart protein çözeltisi:100 mL'de 100 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9' luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.

6. Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden ilave edilmiştir.. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış ve sonrasında her tüpe 5 mL C çözeltisinden ilave edilmiştir. Örnekler 10 dakika oda

sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1/2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuş ve bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Karakterizasyonu

3.2.7.1. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri farklı pH'larda (7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 8,5, 9,0, 9,5 ve 10,0 borat) 50 mM derişimindeki tampon çözeltiler kullanılarak 25 ºC'de belirlenmiştir.

3.2.7.2. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri daha önceden belirlenmiş optimum pH için farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ve 70 ºC) belirlenmiştir.

3.2.7.3. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest LOX'ın termal kararlılığını belirlemek için enzim iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 ºC) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

LOX-CLEA'ın termal kararlılığını belirlemek için preparat iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 ºC) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarlında(1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.7.4. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

3.2.7.5. Serbest Lipoksijenaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest LOX enziminin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 5 ºC ve oda sıcaklığında (25 ºC) bekletilerek kalan aktiviteleri belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür.

3.2.8. Serbest LOX ve LOX-CLEA ile Kinon Sentezi

Yöntemde 2,75 mL pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponu üzerine 50 µL serbest LOX veya 40 mg LOX-CLEA ilave edilmiştir. Karışım 40 °C'de 2 dakida inkübe edilmiş ve reaksiyon 100 µL H_2O_2 (200 mM) ve 100 µL p-hidrokinon (200 mM) çözeltilerinin eklenmesi ile başlatılmıştır. 10 dakika reaksiyon süresi sonunda oluşan *p*-Benzokinon miktarı spektrofotometerik olarak 410 nm'de belirlenmiştir.

3.2.8.1. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri farklı pH'larda (6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0) ölçülerek *p*-Benzokinon sentezi için optimum pH'ları belirlenmiştir.

3.2.8.2. Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ve 70 ºC) ölçülerek *p*-Benzokinon sentezi için optimum sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.2.8.3. Farklı Peroksitlerin *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkileri

Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen *p*-Benzokinon sentezi üzerine peroksitlerin etkisini incelemek için sentezler hidrojen peroksit, *tert*-bütil hidroperoksit ve kümen hidroperoksit kullanılarak ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.4. Peroksit derişiminin *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkileri

Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen *p*-Benzokinon sentezi üzerine peroksit derişiminin etkisini incelemek için sentezler belirlenen optimum pH, sıcaklık ve peroksit varlığında derişimi 100, 200 ve 400 mM olan peroksit çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.5. Başlangıç LOX-CLEA Miktarının *p*-Benzokinon Sentezi Üzerine Etkisi

Kullanılan LOX-CLEA miktarının 1,4-Benzokinon verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla sentez işlemi farklı miktarda LOX-CLEA (10, 20, 40, 80 ve 100 mg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.6. LOX-CLEA' ın *p*-Benzokinon Sentezi İçin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

LOX-CLEA örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesinde, çapı 1,5 cm uzunluğu 6,0 cm olan kolon kullanılmıştır. LOX-CLEA

örneğinden 1 g tartılarak üzerine 5,6 mL pH'sı 6,5 olan 50 mM fosfat tamponu ilave edilmiş ve reaksiyon 200 μL kümen hidroperoksit (200 mM) ve 200 μL *p*-hidrokinon (200 mM) ilavesi ile 60 °C'de başlatılmıştır. 15 dk sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılarak, oluşan ürünün 410 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. LOX-CLEA'ın tekrar kullanımına bağlı aktivite değişimini incelemek amacıyla aynı işlemler 15 kez tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada soya fasulyesinden kısmi olarak saflaştırılan LOX enziminin CLEA oluşturma yöntemiyle immobilizasyonu yanıt yüzey yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla 3-faktör ve 3-düzey Box-Behnken deneysel dizaynı kullanılmıştır. Serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) gerçekleştirilmiş ve serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin 1,4-benzokinon ve timokinon sentezlerinde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1.1. Lipoksijenazın CLEA Oluşturularak İmmobilizasyonun Yanıt Yüzey Yöntemi İle İncelenmesi

Box-Behnken dizaynı ile oluşturulan deneysel setin yanıtları (LOX-CLEA aktiviteleri) Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'den görüleceği üzere en yüksek ve en düşük LOX-CLEA aktiviteleri sırasıyla 510 ve 224 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. ANOVA analizleri sonucunda önerilen ikinci dereceden eşitliğin regresyon katsayıları aşağıda eşitlik 2'de verildiği şekilde belirlenmiştir.

$$Y = +356 - 8,5X_1 - 39,1X_2 - 39,6X_3 + 21,3X_1 \times X_2 + 38,3X_1 \times X_3 + 31X_2 \times X_3 - 23X_1^2 - 57,3X_2^2 + 71,8X_3^2 \quad \textbf{(Eşitlik 2)}$$

Eşitlikte Y; LOX-CLEA aktivitesini (nmol/dk. g CLEA), X_1, X_2 ve X_3 sırasıyla glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Deneysel ve hesapsal LOX-CLEA aktiviteleri.

Glutaraldehit derişimi (%)	Amonyum sülfat derişimi (%)	İmmobilizasyon süresi (saat)	LOX-CLEA aktivitesi (nmol/dk. g CLEA) (Deneysel)	LOX-CLEA aktivitesi (nmol/dk. g CLEA) (Hesapsal)
30	50	15	285	338
20	60	10	510	506
25	60	15	380	356
20	60	20	323	350
30	60	10	410	429
25	60	15	353	356
25	70	20	335	323
20	70	15	224	260
20	50	15	338	338
30	60	20	376	427
25	50	20	358	339
25	50	10	468	480
25	60	15	335	356
30	70	15	256	260
25	70	10	321	340

Önerilen kuadratik eşitliğin ANOVA sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. p-değeri 0,05'ten küçük olan model terimlerindeki değişimler anlamlı değişimler olarak kabul edilmiştir. Bu durumda X_2, X_3, X_1X_3, X_2X_3, X_2^2 ve X_3^2'deki değişimler anlamlıdır.

Çizelge 4.2. Önerilen kuadratik model için ANOVA sonuçları.

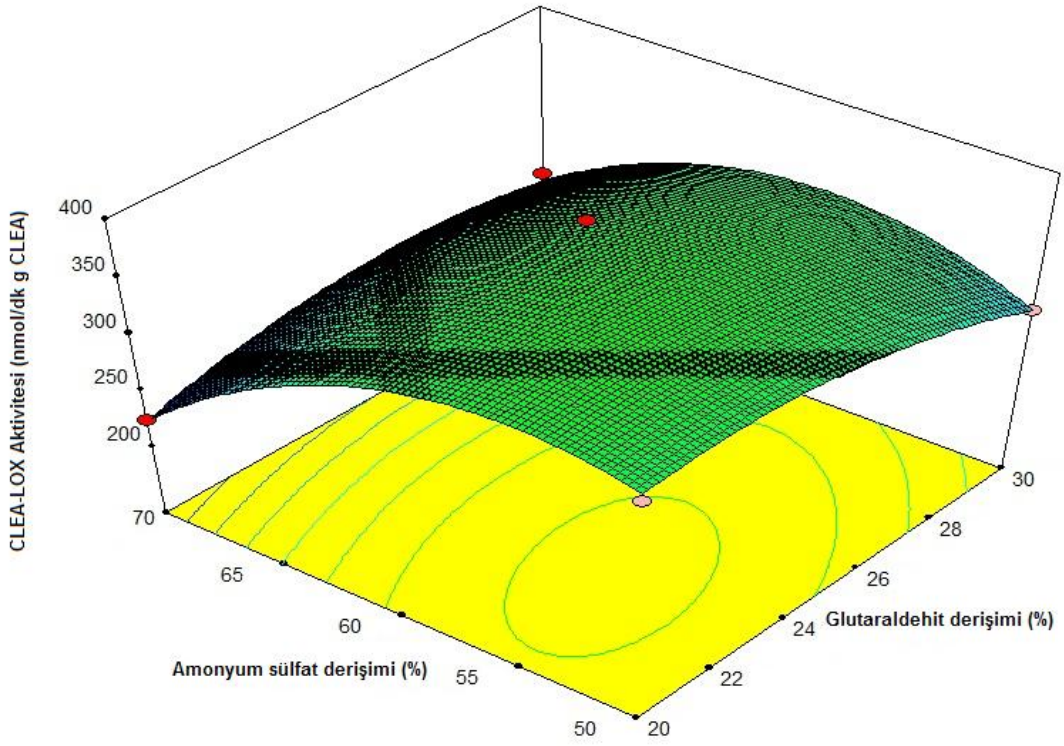
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-değeri Prob > F
Model	72686,98	9	8076,33	12,80	0,0059
X_1	578,00	1	578,00	0,92	0,3825
X_2	12246,13	1	12246,13	19,41	0,0070
X_3	12561,13	1	12561,13	19,91	0,0066
X_1X_2	1806,25	1	1806,25	2,86	0,1514
X_1X_3	5852,25	1	5852,25	9,28	0,0286
X_2X_3	3844,00	1	3844,00	6,09	0,0566
X_1^2	1953,23	1	1953,23	3,10	0,1388
X_2^2	12101,77	1	12101,77	19,18	0,0072
X_3^2	19008,23	1	19008,23	30,13	0,0027
Residual	3154,75	5	630,95		
Lack of Fit	2128,75	3	709,58	1,38	0,4457
R^2 0,96					

Eşitlik 2 sadece anlamlı model terimlerini içerek şekilde yeniden düzenlendiğinde Eşitlik 3 elde edilmiştir.

$$Y = +356 - 39{,}1X_2 - 39{,}6X_3 + 38{,}3X_1 \times X_3 + 31X_2 \times X_3 - 57{,}3X_2^2 + 71{,}8X_3^2 \quad \textbf{(Eşitlik 3)}$$

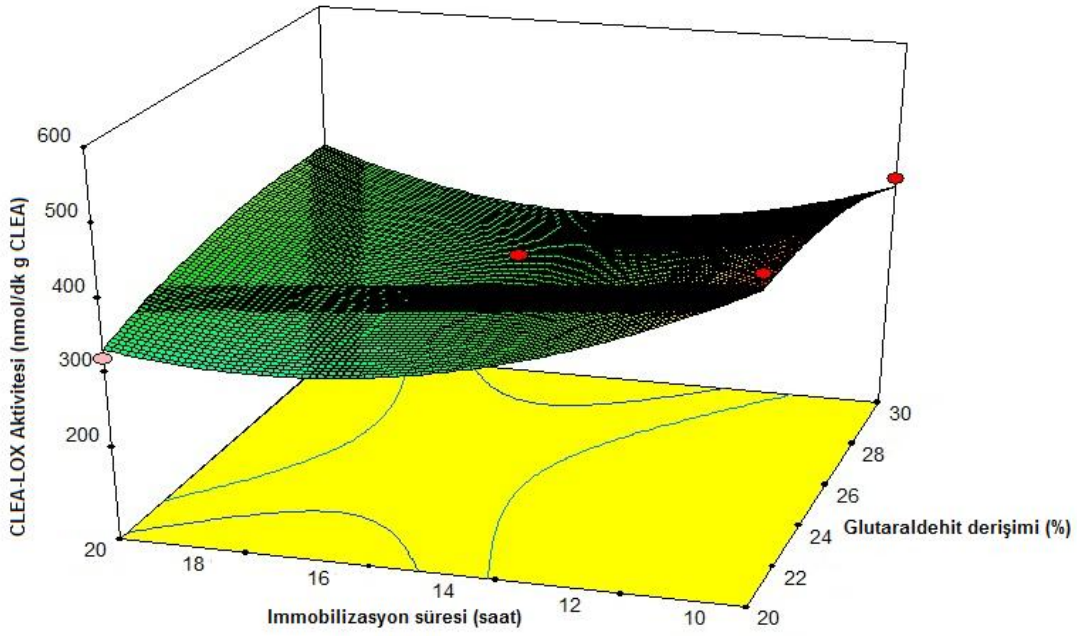
Çizelge 4.1'de verilen hesapsal LOX-CLEA aktiviteleri Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır. Önerilen model için belirleme katsayısı (R^2) 0,96 olarak bulunmuştur. Bu sonuç elde edilen eşitliğin önerilen kuadratik modeldeki değişimleri %96 oranında açıklamaktadır.

Şekil 4.1 sabit immobilizayon süresi için (15 saat) glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir. Şekil 4.1'den görüldüğü gibi amonyum sülfat ve glutaraldehit derişimindeki artışlar LOX-CLEA aktivitesi azaltmaktadır. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %50 ve 15 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 338 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat derişimi %70'e çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 224 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

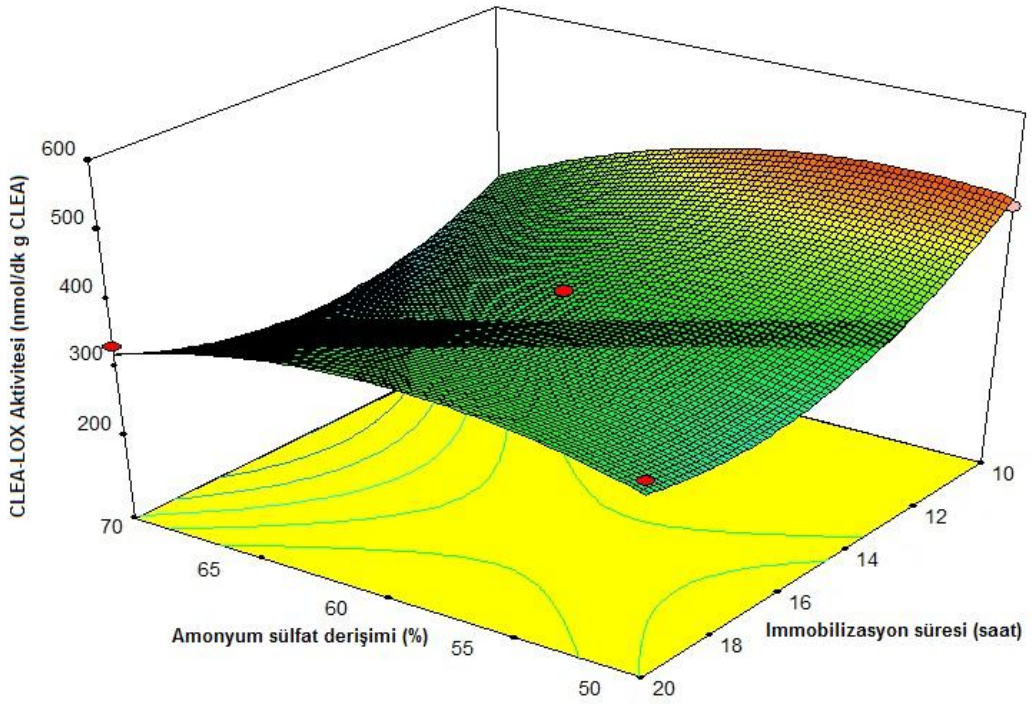
Şekil 4.2 sabit amonyum sülfat derişimi için (%60) glutaraldehit derişimi ve immobilizasyon süresindeki değişimlerin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %60 ve 10 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 510 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon süresi 20 saate çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 323 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Glutaraldehit derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

Şekil 4.3'de ise sabit glutaraldehit derişimi için (%25) amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresindeki derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini görülmektedir. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %25, %50 ve 20 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 358 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat derişimi %70'e çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 335 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir. Glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri

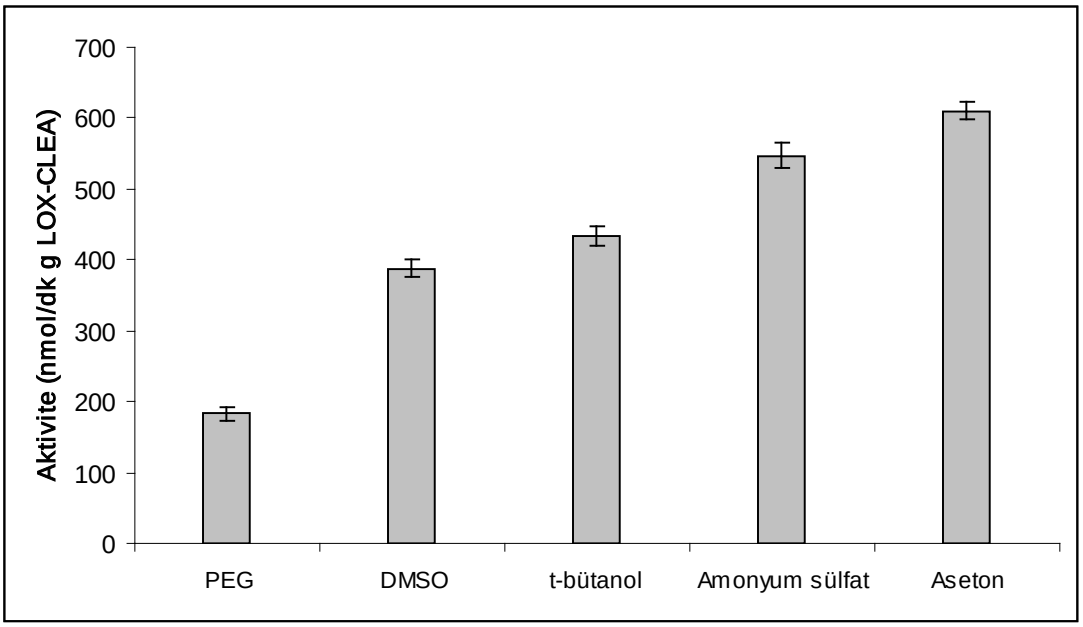
sırasıyla %25 ve %50'de sabit tutulup immobilizasyon süresi 10 saate düşürüldüğünde ise LOX-CLEA aktivitesi 468 nmol/dk. g CLEA olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

LOX-CLEA immobilizasyonu için optimum glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %55 ve 10 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda LOX-CLEA aktivitesi 547 nmol/dk. g CLEA olarak ölçülmüştür.

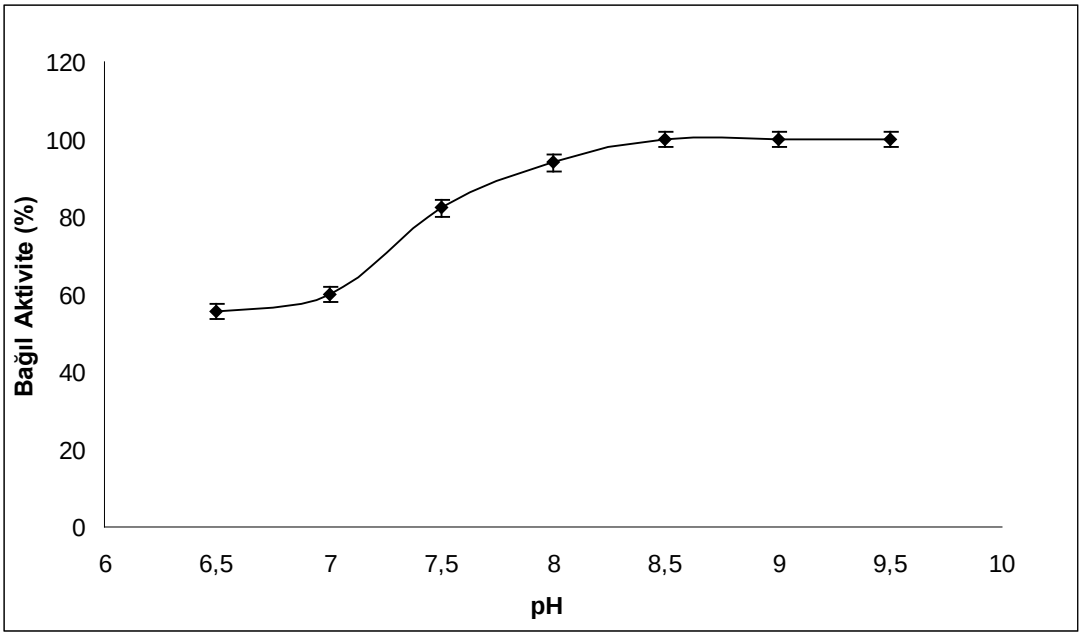
Farklı çöktürücülerin LOX-CLEA aktivitesine etkilerini incelemek amacıyla optimum glutaraldehit ve immobilizasyon süresinde amonyum sülfat yerine farklı çöktürücüler kullanılarak LOX-CLEA eldesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'den görüldüğü üzere en yüksek LOX-CLEA aktivitesi 610 nmol/dk. g CLEA olarak asetonun çöktürücü olarak kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı çöktürücülerin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

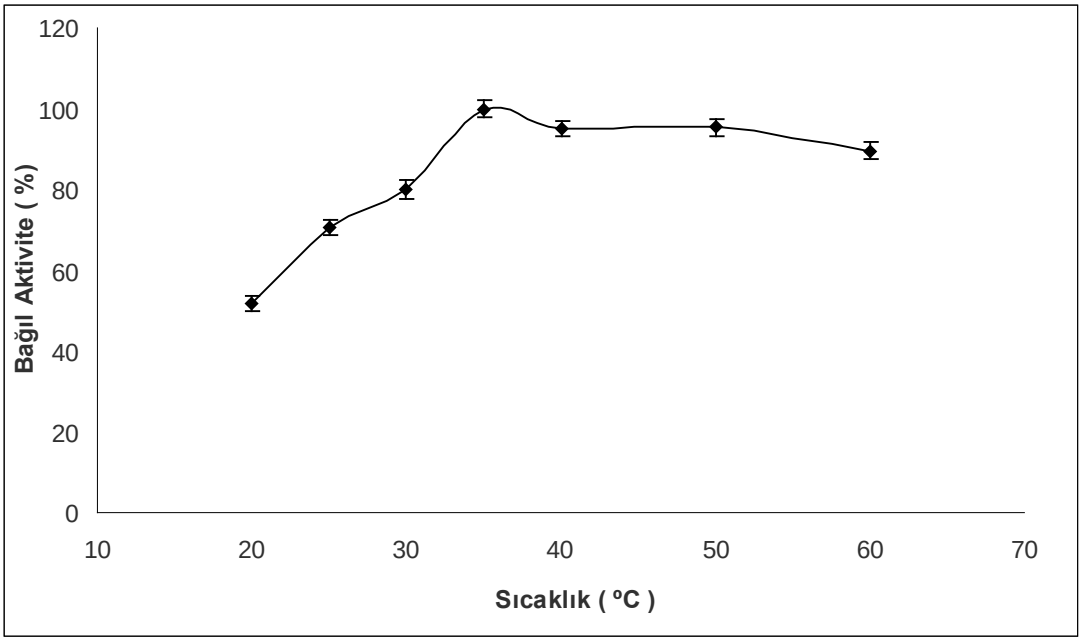
4.1.2. Serbest Lipoksijenazın Karakterizasyonu

Serbest LOX'un optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH'larda (6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 8,5, 9,0, 9,5 ve 10,0 borat) hazırlanan tamponların 50 mM derişimindeki çözeltileri kullanılarak 25 ºC'de serbest LOX aktivitesi belirlenmiş ve Şekil 4.5'de grafiğe geçirilmiştir. Serbest LOX'ın pH 7,0'de maksimum aktivitesinin %60'ını gösterdiği belirlenmiştir. Serbest LOX'ın aktivitesi pH 7,0-8,0 aralığında doğrusal olarak artmış ve maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8,5-9,5 aralığı olarak belirlenmiştir.



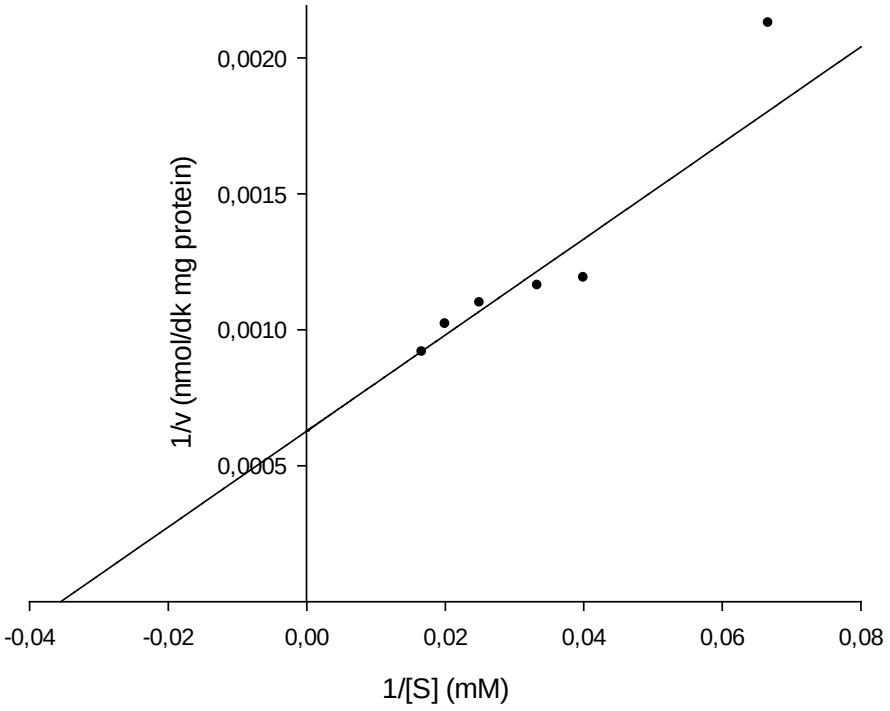
Şekil 4.5. Serbest LOX aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

Serbest LOX aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 50 mM pH 8,5 borat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 ºC) ölçülmüş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 35 ºC olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



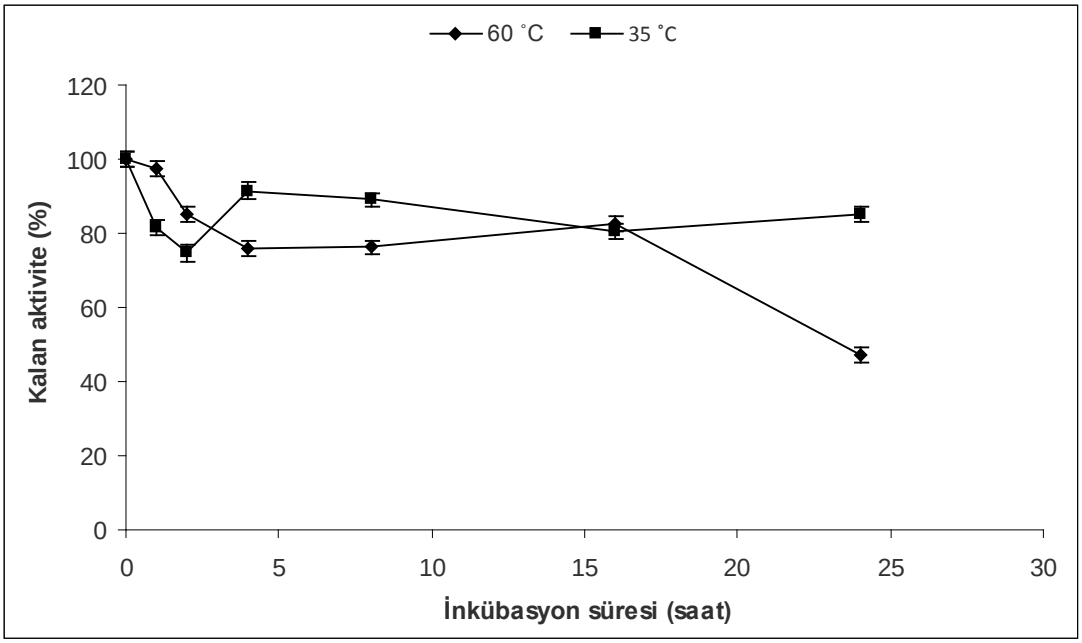
Şekil 4.6. Serbest LOX aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde serbest LOX aktivitesi farklı substrat derişimlerinde (15-60 mM) ölçülmüş aktivite değerleri Linewear-Burk grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 4.7). Serbest LOX için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 28 mM ve 1593 nmol/dk mg protein olarak belirlenmiştir.



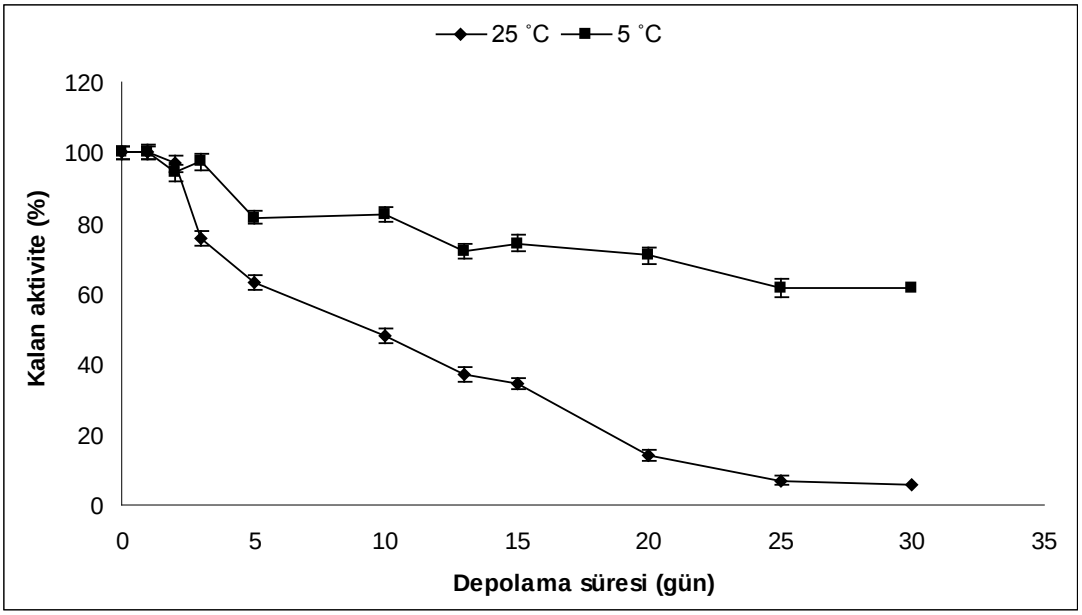
Şekil 4.7. Serbest LOX için Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest LOX için iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 ºC) termal kararlılık çalışması yapılmıştır. 24 saat süreyle inkübe edilen enzim çözeltilerinin belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri optimum koşullarda ölçülmüş ve kalan aktiviteleri (% olarak) hesaplanmıştır. Serbest LOX 35 ve 60 ºC' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %85 ve %47'sini korumuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Serbest LOX'un aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

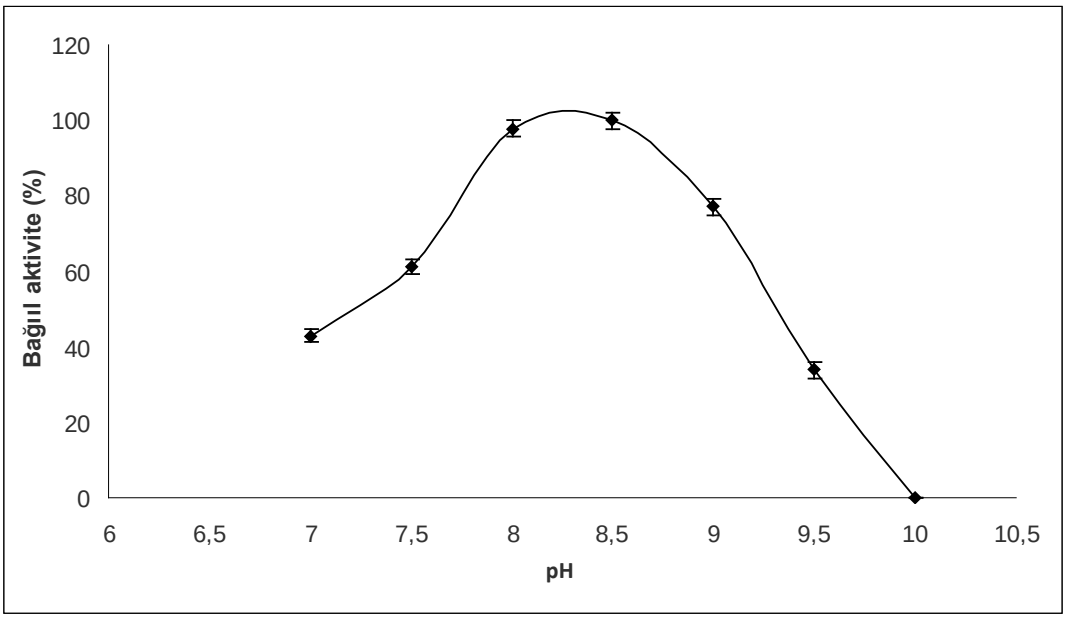
Serbest LOX, 50 mM pH 8,5 borat tamponundaki çözeltisi 5 ºC ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüş ve depolama kararlılığı belirlenmiştir. Serbest LOX, 5 ºC'de bekletildiğinde 30 gün sonra başlangıç aktivitesinin %61'ini korurken, oda sıcaklığında ise 30 gün sonra başlangıç aktivitesinin ancak % 6'sını korumuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Serbest LOX'un bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

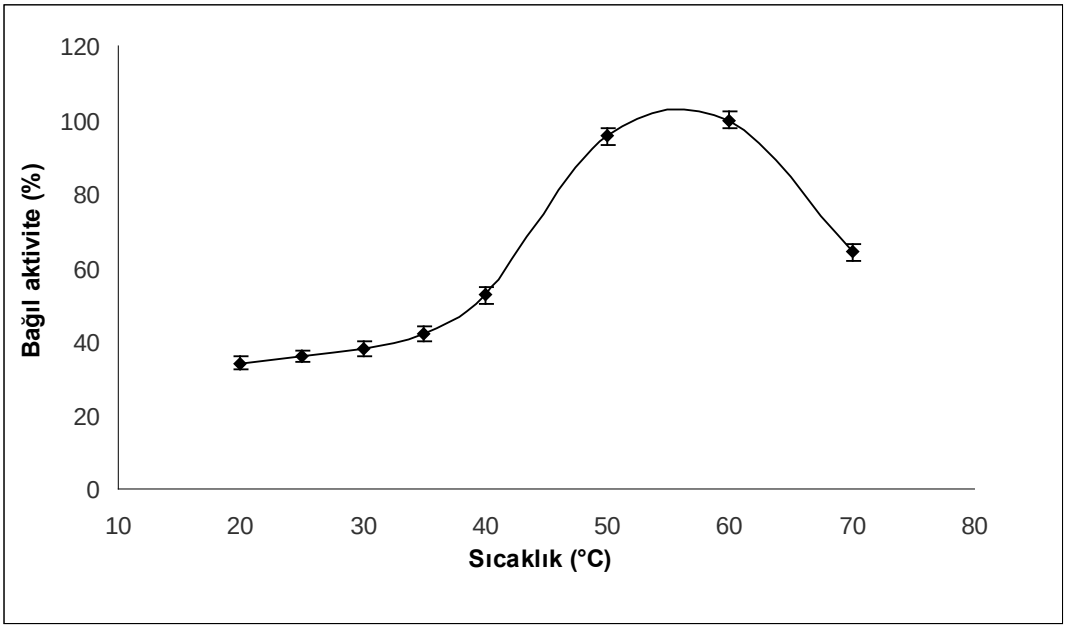
4.1.3. LOX-CLEA'nın Karekterizasyonu

Farklı pH' larda (7,0, 7.5, 8.0 fosfat, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0 borat) 50 mM derişimlerde tamponlar hazırlanarak LOX-CLEA örneklerinin aktiviteleri 25 ºC' de ölçülmüş ve maksimum aktiviteyi pH 8,5'de gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10).



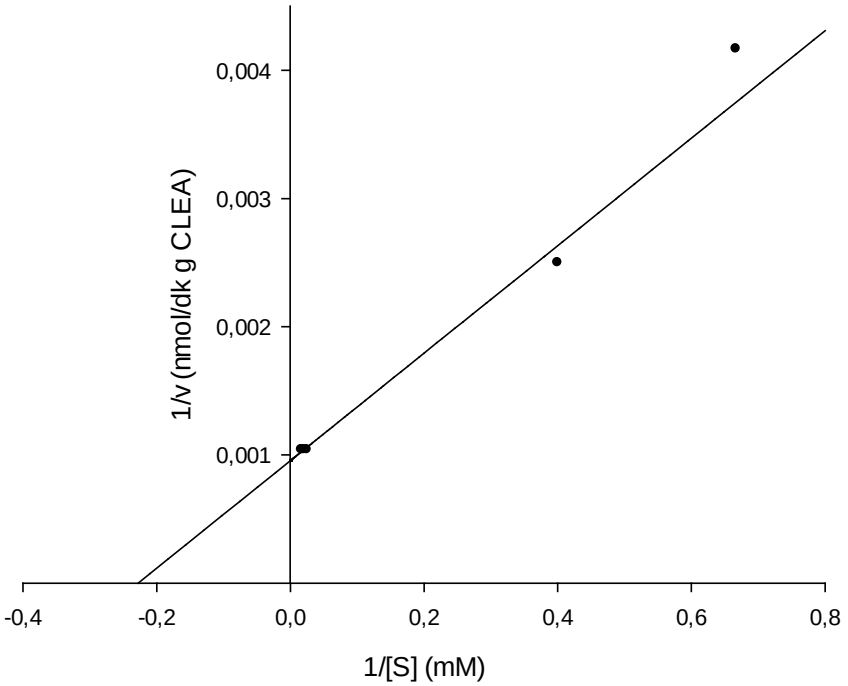
Şekil 4.10. LOX-CLEA aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

LOX-CLEA örneklerinin aktivitesi farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ve 70 ºC) ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 ºC olarak bulunmuştur (Şekil 4.11).



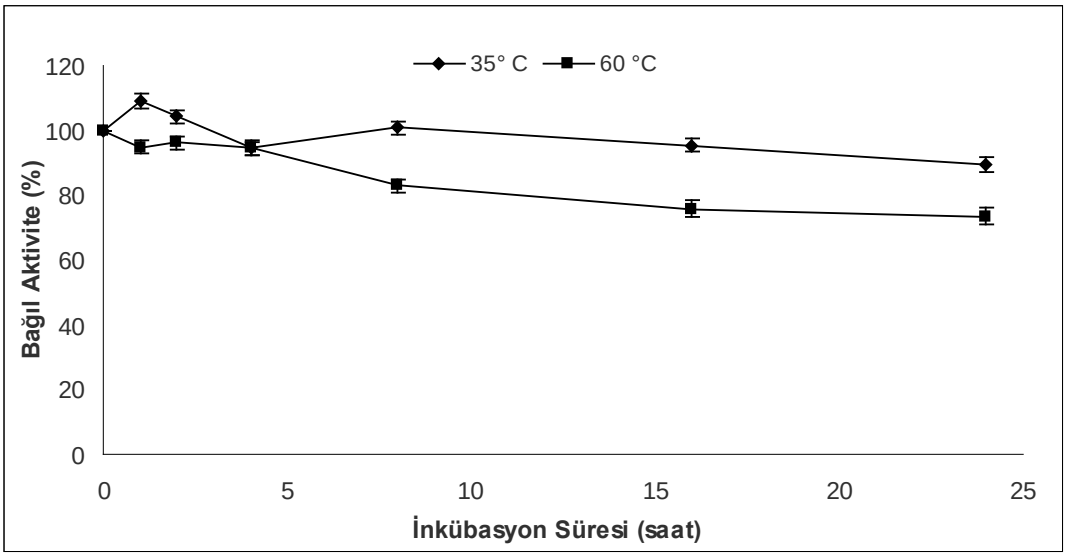
Şekil 4.11. LOX-CLEA aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde LOX-CLEA aktivitesi farklı substrat derişimlerinde (1,5-60 mM) ölçülmüş aktivite değerleri Linewear-Burk grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 4.12). LOX-CLEA için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,4 mM ve 1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. LOX-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.

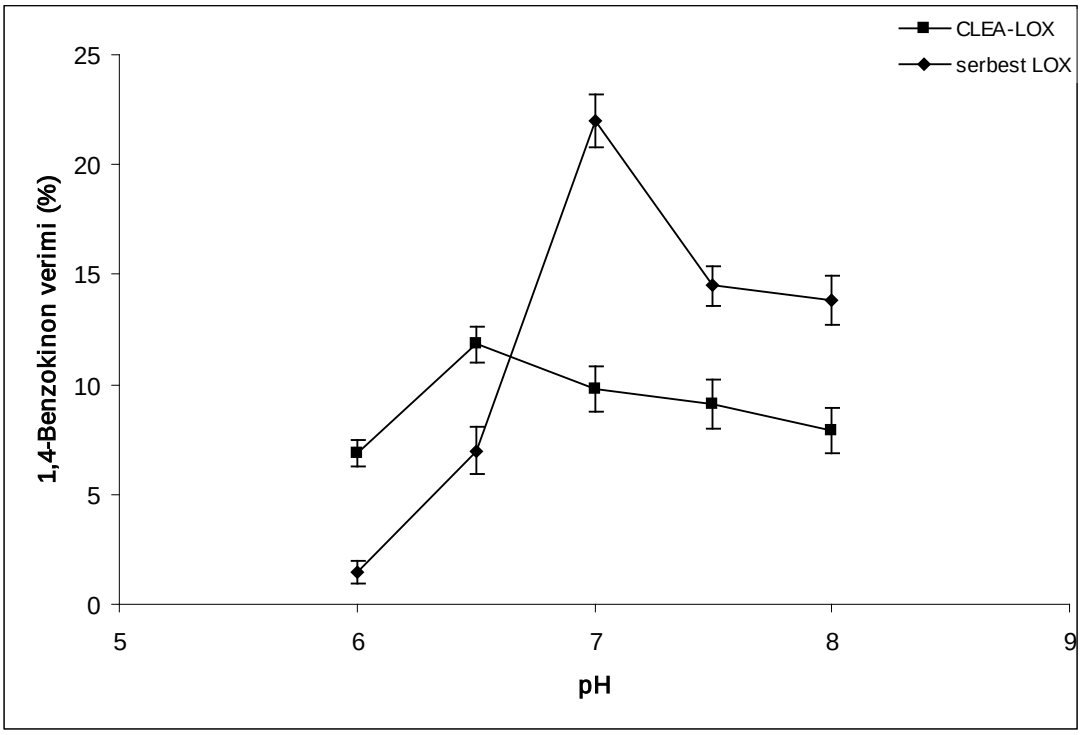
LOX-CLEA için iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 ºC) termal kararlılık çalışması yapılmıştır. 24 saat süreyle inkübe edilen enzim çözeltilerinin belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri optimum koşullarda ölçülmüş ve kalan aktiviteleri (% olarak) hesaplanmıştır. LOX-CLEA 35 ve 60 ºC' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %90 ve %73'ünü korumuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. LOX-CLEA'un aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

4.1.4. Serbest LOX ve LOX-CLEA İle Kinon Sentezleri

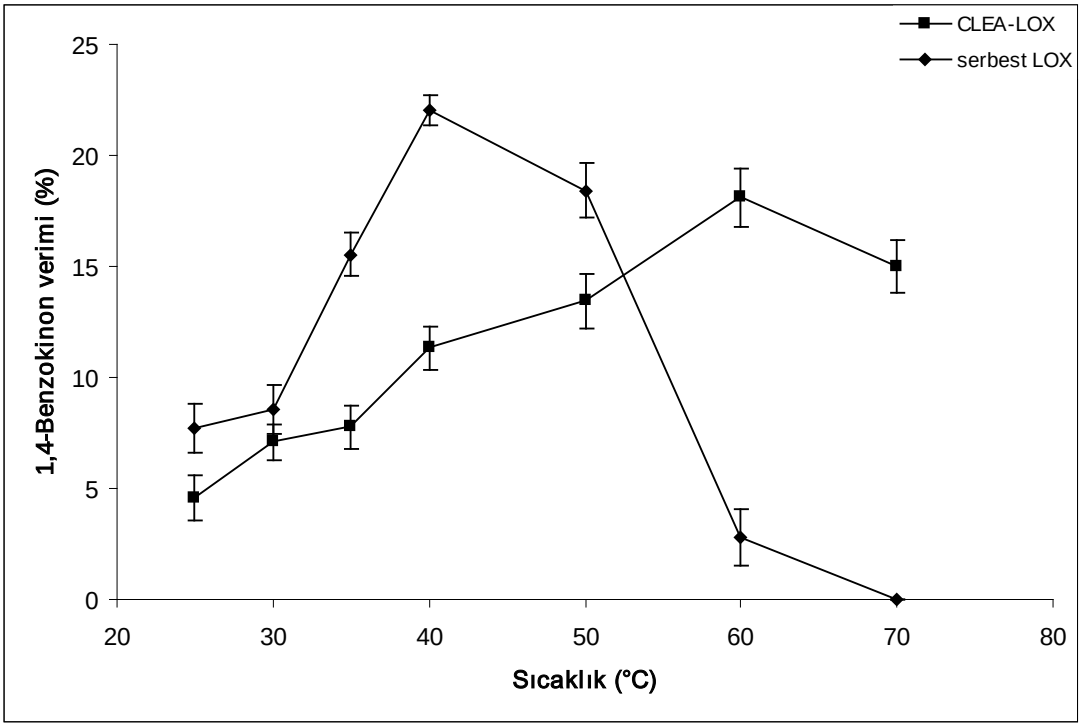
Serbest LOX ve LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezinde optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH'larda (6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0) hazırlanan tamponların 50 mM derişimindeki çözeltileri kullanılarak 40 ºC'de 1,4-Benzokinon verimleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.14' de grafiğe geçirilmiştir. Serbest LOX'un pH 7,0'de maksimum aktivitesini gösterdiği belirlenmiştir ve serbest LOX için pH 7,0'de 1,4-Benzokinon verimi %22 olarak ölçülmüştür. LOX-CLEA ise 1,4-Benzokinon sentezinde maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,5 olarak belirlenmiş ve bu pH'da LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezini %11,8 verimle gerçekleştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.14. 1,4-Benzokinon sentezi için serbest LOX ve LOX-CLEA aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.

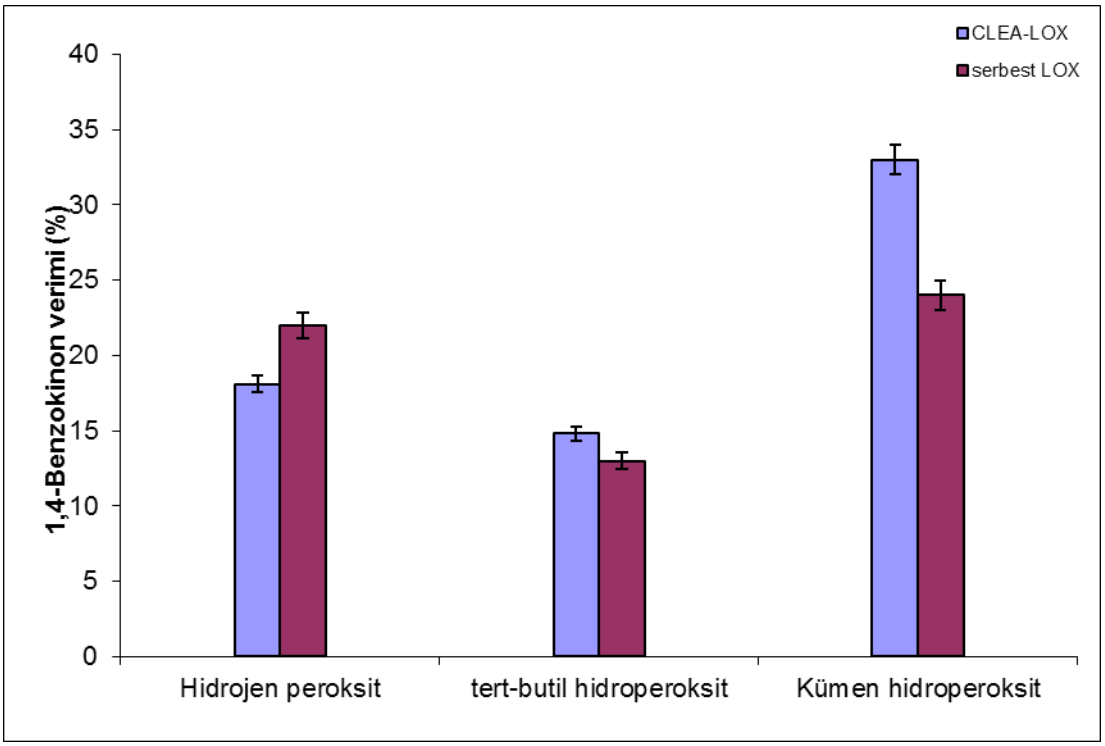
Serbest LOX ve LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezinde optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 50, 60 ve 70 ºC) belirlenen optimum pH değerlerinde 1,4-Benzokinon verimleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'da verilmiştir. Serbest LOX kullanılarak

gerçekleştirilen 1,4-Benzokinon sentezi için en yüksek verim %22 olarak 40 ºC'de ölçülmüştür. LOX-CLEA için ise 1,4-Benzokinon sentezinde en yüksek verim %18,1 olarak 60 ºC'de ölçülmüştür.



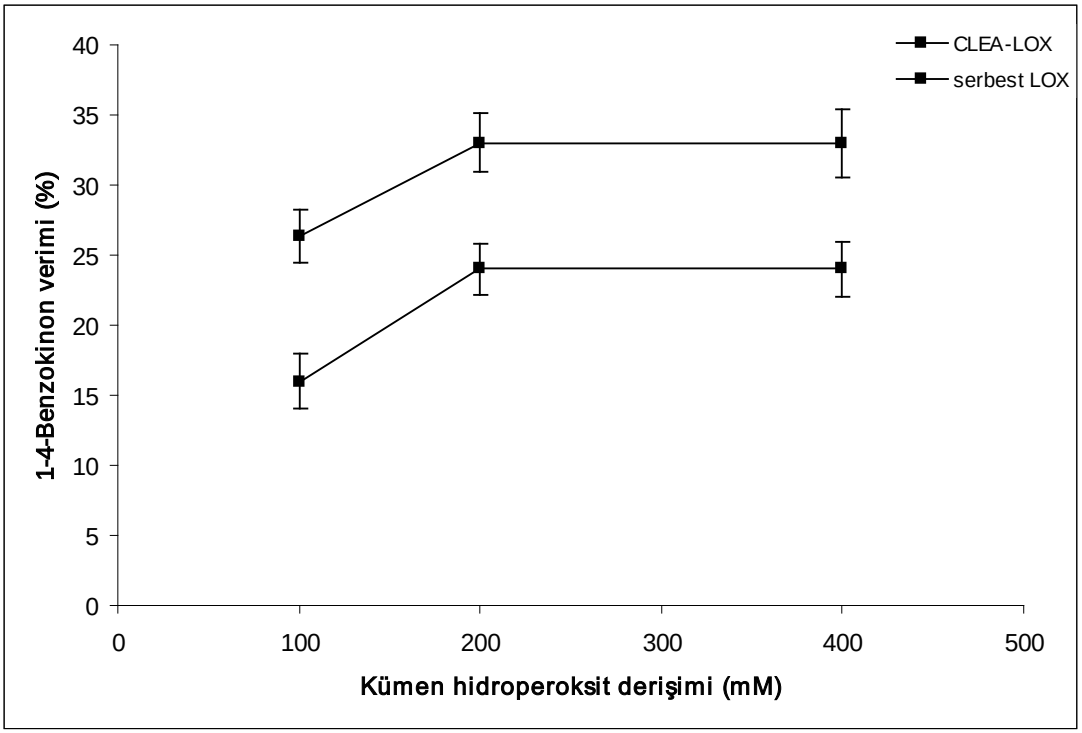
Şekil 4.15. 1,4-Benzokinon sentezi için serbest LOX ve LOX-CLEA aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Çeşitli peroksitlerin Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla 1,4-Benzokinon sentezleri her bir preparat için belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde hidrojen peroksit, tert-butil hidroperoksit ve kümen hidroperoksit kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir. Serbest LOX için en yüksek 1,4-Benzokinon verimi %24, LOX-CLEA için ise %33 olarak kümen hidroperoksit varlığında elde edilmiştir (Şekil 4.16).



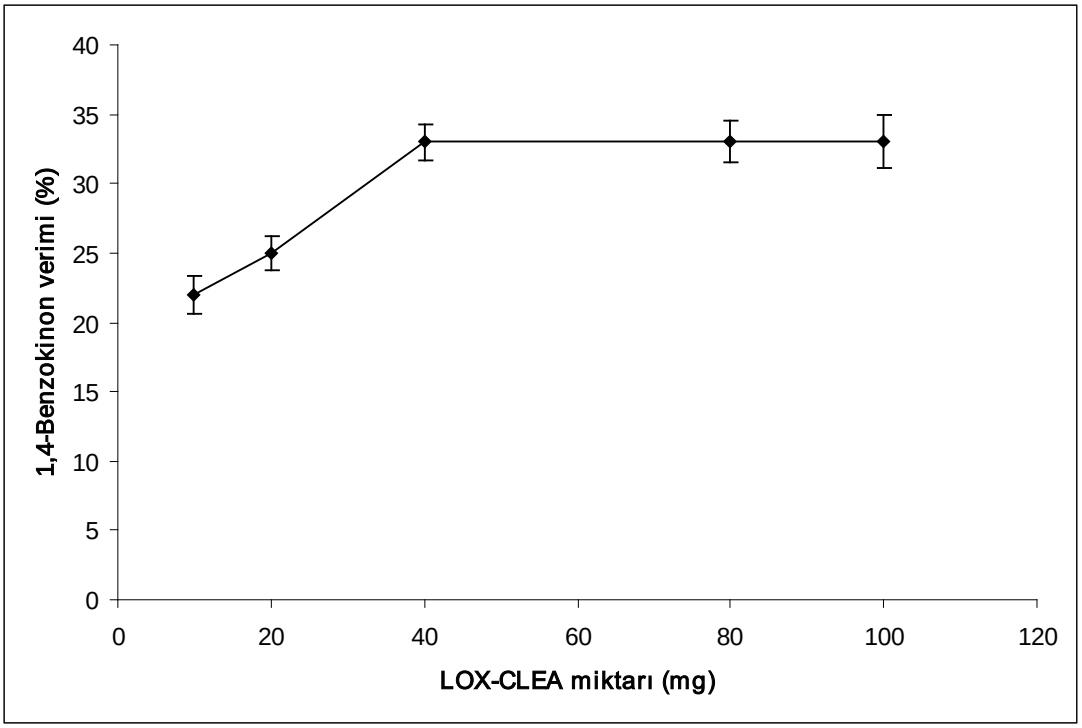
Şekil 4.16. Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine çeşitli peroksitlerin etkisi.

Kullanılan kümen hidroperoksit derişiminin serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla sentez işlemi her bir preparat için belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde farklı kümen hidroperoksit derişimlerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir. Serbest LOX ve LOX-CLEA için optimum kümen hidroperoksit derişimi 200 mM olarak belirlenmiştir.



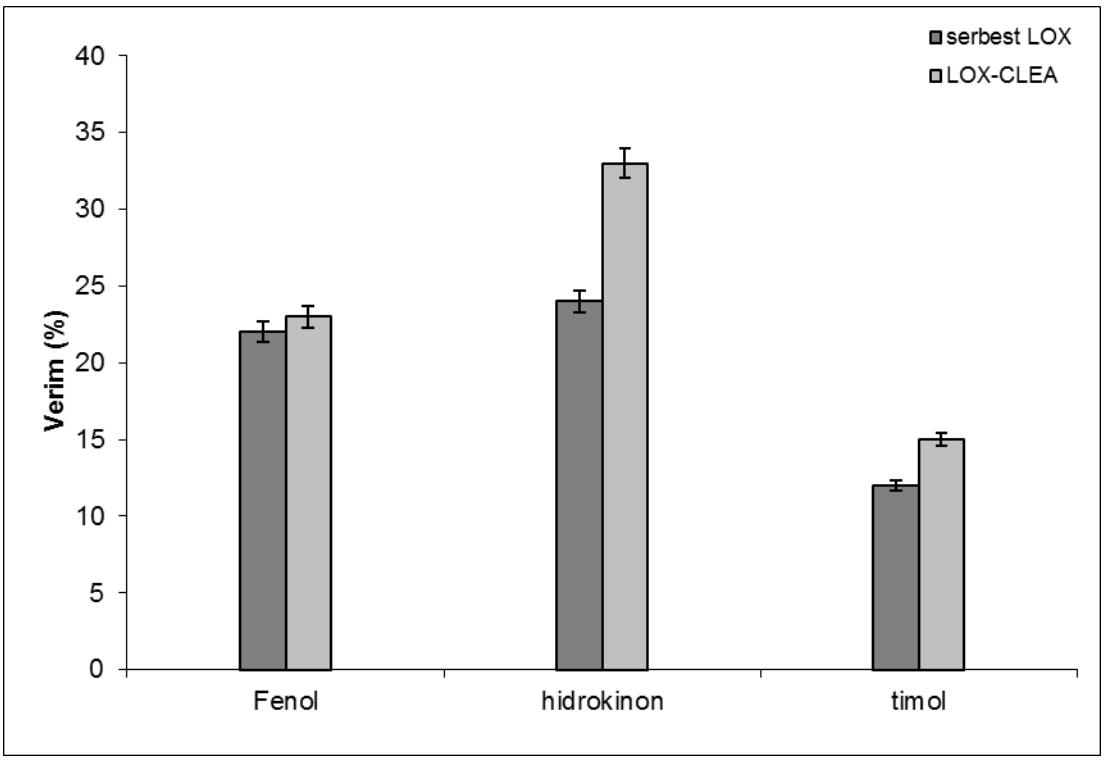
Şekil 4.17. Serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine kümen hidroperoksit derişimin etkisi.

Kullanılan LOX-CLEA miktarının 1,4-Benzokinon verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla sentez işlemi farklı miktarda LOX-CLEA kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de verilmiştir. 10 mg LOX-CLEA kullanıldığında elde edilen 1,4-Benzokinon verimi %22 olarak elde edilmiş LOX-CLEA miktarı 40 mg'a çıkartıldığında ise reaksiyon %33 verim ile gerçekleştirilmiştir. LOX-CLEA miktarının daha fazla artırılmasının ise sentez verimine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.



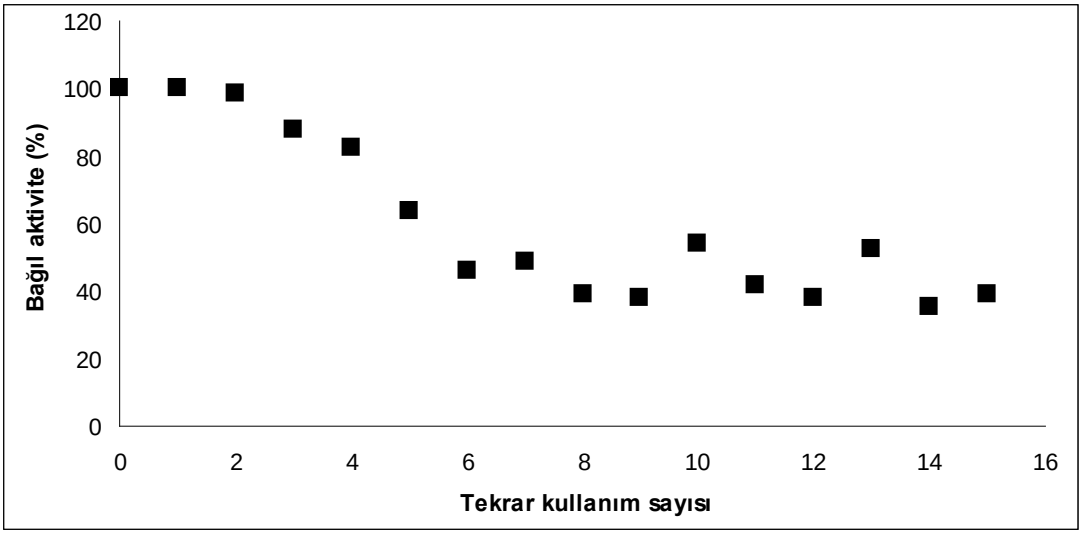
Şekil 4.18. LOX-CLEA tarafından katalizlenen 1,4-Benzokinon sentezine kullanılan katalizör miktarının etkisi.

Substrat olarak hidrokinon yerine, fenol ve timol kullanıldığında elde edilen ürün verimleri Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Fenol, hidrokinon ve timolün substrat olarak kullanıldığı reaksiyonda ürün verimleri serbest LOX için sırasıyla %22, 24 ve 12 olarak elde edilmiştir. LOX-CLEA için ise bu verim değerleri sırasıyla %23, 33 ve 15 olarak elde edilmiştir. Reaksiyon veriminin hessaplanmasında HPLC'de elde edilen piklerin alanları kullanılmıştır.



Şekil 4.19. Farklı substratlar için serbest LOX ve LOX-CLEA tarafından katalizlenen kinon sentezleri için verim değerleri.

LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezi için tekrar kullanım kararlılığı kesikli reaktörde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir. LOX-CLEA'un 15 arda arda kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %39'unu koruduğu belirlenmiştir.



. Şekil 4.20. LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezi için kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığı.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada, soya fasülyesi (*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi) lipoksijenazı amonyum sülfatla çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yoluyla çapraz bağlı lipoksijenaz enzim agregatları (LOX-CLEA) oluşturarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Yapılan literatür çalışmasında, bir çok enzimin CLEA yöntemiyle immobilizasyon çalışmalarının bulunduğu belirlenmiş ancak lipoksijenaz enziminin CLEA yöntemiyle immobilizasyonu çalışmalarına rastlanmamıştır. Örneğin, Kartal ve ark. (2011) çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak *Candida rugosa* lipazından çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlamışlardır. Sulek ve ark. (2011) peroksidazın çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) turp köklerinden başarılı bir şekilde hazırlandığını rapor etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve değisik agregat ajanları kullanılmıştır.

Yapılan deneysel aşamada, LOX-CLEA preparatlarının hazırlanmasında kimyasal aminasyon yönteminden yararlanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmi saflaştırma yapılan lipoksijenaz enzimi ile elde edilen LOX-CLEA örneklerinde tam bir çapraz bağlanma gerçekleşmediğinden oluşan küçük boyutlu LOX-CLEA örneklerinin reaksiyon ortamında çözüldüğü belirlenmiştir. LOX-CLEA

örneklerinin partikül büyüklüğünü artırmak amacıyla LOX-CLEA oluşumu farklı derişimlerde sığır serum albümini (BSA) içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Bu sayede suda çözünmeyen LOX-CLEA-BSA agregatları elde edilmiş ancak bu agregatlarda LOX aktivitesi ölçülememiştir. Bu nedenle LOX enzimin yapısındaki amino gruplarının sayısını artırarak, çapraz bağlanma miktarının artırılması amacıyla kimyasal aminasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu sayede LOX enzimin yapısındaki amino gruplarının sayısının ninhidrin yöntemiyle %15 oranında arttığı belirlenmiştir. Kimyasal aminasyon ile amino grubu artırılan LOX enzimi ile CLEA eldesi gerçekleştirildiğinde hem suda çözünmeyen LOX-CLEA agregatları elde edilmiş hem de bu agregatlarda LOX aktivitesi saptanmıştır. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarında kimyasal olarak yüzeyinde amino grupları artırılmış LOX enzimi kullanılmıştır.

LOX-CLEA preparatlarının hazırlanmasında 3-faktör ve 3-düzey Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. Yanıt olarak LOX-CLEA aktivitesi seçilmiş, aktiviteye etki eden faktörler ise yapılan literatür araştırması ve ön çalışmalar sonucunda başlangıç glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi olarak seçilmiştir. Yapılan ANOVA analizleri sonucunda önerilen kuadratik model LOX-CLEA aktivitesini %96 başarıyla belirlemiştir. LOX-CLEA preparatlarının hazırlanmasında en uygun glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %55 ve 10 saat olarak belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda başlangıç glutaraldehit derişiminin artmasının LOX-CLEA aktivitesini azaltığı belirlenmiştir. Bu sonuç çapraz bağlayıcı miktarının artması ile daha rijit LOX-CLEA preparatları eldesi ile açıklanabilir. Benzer şekilde immobilizasyon süresinin artması ile LOX-CLEA aktivitesini azaltığı belirlenmiştir. İmmobilizasyon süresinin artması yine daha rijit LOX-CLEA preparatlarının eldesine dolayısıyla 10 saatten uzun immobilizasyon sürelerinde daha düşük LOX-CLEA aktivitelerinin eldesine neden olmuş olabilir.

Literatürde farklı enzimler kullanılarak hazırlanan CLEA preparatlarının aktivitelerinin kullanılan çöktürücünün cinsinden etkilendiği bildirilmektedir (Sheldon ve ark., 2006). Bu nedenle LOX-CLEA eldesi farklı çöktürücüler

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asetonun çöktürücü olarak kullanıldığı LOX-CLEA eldesinde amonyum sülfata göre LOX-CLEA aktivitesi yaklaşık 1,2 kat artmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar dikkate alındığında serbest LOX ve LOX-CLEA preparatlarının optimum pH değerleri 8,5 olarak belirlenmiştir. İmmobilizsyon işlemiyle pH'da önemli bir değişiklik gözlemlenmediği belirlenmiştir. Santano ve ark. (2002) lipoksijenazı kontrollü cam gözeneklere adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişler ve Lipoksijenazın pH 9,0 'da daha etkin olduğu bulunmuştur. Krout ve ark. (2007) soya fasulyesi lipoksijenazının tetrametoksisilan içerisine immobilizasyonu incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada da optimum pH değeri serbest ve immobilize enzim için 9,0 olarak belirlenmiştir.

Serbest LOX için optimum sıcaklık 35 ºC, LOX-CLEA örnekleri için 60 ºC olarak belirlenmiştir. Krout ve ark. (2007) soya fasulyesi lipoksijenazının tetrametoksisilan içerisine immobilizasyonu incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada serbest ve immobilize enzim için optimum scaklık değerinin 40 ºC olduğunu bildirmişlerdir. Pinto ve ark. (1996) lipoksijenazı glutaraldehit ile aktive edilmiş poliakrilamid jele immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklığı sırasıyla 30 ºC ve 35 ºC olarak bulmuşlardır.

Serbest LOX 35 ve 60 ºC' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %85 ve %47'sini korumuştur. LOX-CLEA örnekleri ise; 35 ve 60 ºC' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %90 ve %73'ünü korumuştur. Bu nedenle immobilize lipoksijenaz örneklerinin termal kararlılığının serbest enzime göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

Farklı substrat derişimlerinde ve optimum koşullarda serbest lipoksijenaz ve LOX-CLEA örneklerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Lineweaver-Burk grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Serbest lipoksijenaz için, K_m = 28 mM ve V_{max} =1593 nmol/dk mg protein olarak elde edilmiştir. LOX-CLEA için, K_m= 4,4 mM ve V_{max}=1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir. Santano ve ark. (2002) lipoksijenazı kontrollü cam gözeneklere adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişlerdir. Substrat olarak klorpromazin kullandıklarında serbest LOX için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,85 mM ve 13,7 µM/dk olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzim için K_m ve V_{max} değerleri değerleri sırasıyla 1,11 mM ve 1,58 µM/dk olarak

hesaplanmıştır. Borges ve ark. (2009) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında substrat olarak linoleik asit kullanarak serbest ve immobilize LOX için K_m ve V_{max} değerlerini, serbest LOX için sırasıyla 57,14 nmolHPOD/mg protein dk ve 0,302 nmol/L, immobilize LOX için ise; 45,85 nmol HPOD/mg protein dk ve 0,302 nmol/L olarak belirlemişlerdir. Hall ve ark. (2007) lipoksijenaz (LOX) ve hidroperoksid liyaz (HPL) aktivitesi içeren *Penicillium camemberti* ekstraktı kullanılarak immobilizasyon çalışması yapıldığını bildirmişlerdir. Eupergit C destek materyali kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmasında serbest enzim ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla 0,057 mM ve 58,49 mM olarak belirlenmiştir.

Lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesi oksijenaz aktivitesine göre daha yavaş olmasına rağmen ortama uygun bir elektron donörü ve bir peroksit kaynağı (H_2O_2 gibi) eklendiğinde artmaktadır (Delicado ve ark., 1996). Bu çalışmada serbest LOX ve LOX-CLEA preparatları fenol ve hidrokinondan 1,4-Benzokinon eldesi, timolden ise timokinon eldesi amacıyla kullanılmıştır. Hidroperoksidaz aktivitesinin optimizasyonunda substrat olarak hidrokinon kullanılmıştır. Serbest LOX ve LOX-CLEA preparatlarının 1,4-Benzokinon sentezi için optimum pH'ları sırasıyla 7,0 ve 6,5 olarak belirlenmiştir. Nunez-Delicado ticari lipoksijenaz kullanarak H_2O_2 li ortamda gerçekleştirdiği isoproterenol oksidasyonu için optimum pH'yı 6,0 olarak belirlemişlerdir. Ancak bu çalışmada reaksiyon pH'sının 6,0'dan daha düşük olduğu pH'larda serbest LOX enziminin çöktüğü ve hidroperoksidaz aktivitesinin kaybolduğu belirlenmiştir. Serbest LOX ve LOX-CLEA preparatlarının 1,4-Benzokinon sentezi için optimum sıcaklıkları sırasıyla 40 ve 60 °C olarak belirlenmiş, LOX-CLEA preparatlarının 70 °C'de halen aktif olduğu ancak serbest LOX hidroperoksidaz aktivitesinin bu sıcaklıkta tamamen kaybolduğu belirlenmiştir.

LOX-CLEA örneğinin tekrar kullanım kararlılığı 1,4-Benzokinon sentezi için incelenmiştir. 1 g LOX-CLEA'nın 15 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %39'unu koruduğu belirlenmiştir. Literatürde lipoksijenazın hidroperoksidaz aktivitesi açısından tekrar kullanım kararlılığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Borges ve ark. (2009) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında, immobilize enzimin 8 kullanım sonunda dioksijenaz aktivitesi açısından başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğunu bildirmişlerdir. Diaz ve ark.

(1993) yaptıkları çalşmada soya fasülyesi lipoksijenazının, karbonildiimizadolca aktifleştirilmiş desteğe immobilizasyonundan sonra yapılan tekrar kullanım kararlılığı çalışmalarında immobilize enzimin 7 kullanım sonunda dioksijenaz aktivitesi açısından başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Lipoksijenaz enzimi, soya fasulyesi tohumundan (*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi) amonyum sülfat ile çöktürme yöntemiyle kısmi saflaştırılıp CLEA yöntemiyle immobilize edilmiştir.
2. Optimum glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak sırasıyla %20, %55 ve 10 saat olarak belirlenmiştir.
3. Serbest LOX için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,5, 35 ºC, 28 mM ve 1593 nmol/dk mg protein olarak belirlenmiştir.
4. LOX-CLEA için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,5, 60 ºC, 4,4 mM ve 1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir.
5. Serbest LOX için en yüksek 1,4-Benzokinon ve timokinon verimleri sırasıyla %24 ve 12 olarak elde edilmiştir.
6. LOX-CLEA için en yüksek 1,4-Benzokinon ve timokinon verimleri sırasıyla %33 ve 15 olarak elde edilmiştir.

5.2. Öneriler

1. Bu çalışmada lipoksijenaz kaynağı olarak kullanılan soya fasulyesi tohumu (*Glycine max (L.) Merr. Cv.* Atakişi) lipoksijenaz enzimi için uygun kaynak olarak kullanılabilir.
2. Farklı substratlar kullanılarak lipoksijenaz enziminin substrat özgünlüğünü belirlenebilir.
3. CLEA yöntemiyle immobilize edilemeyen enzimler için kimyasal aminasyon yöntemi çözüm olarak kullanılabilir.
4. Lipoksijenaz enziminin hidroperoksidaz aktivitesinden yararlanılarak farklı kinon sentezleri gerçekleştirilebilir.

5. LOX-CLEA örneklerinde bağlanan lipoksijenaz miktarını ve bağlanma yüzdesini hesaplayabilmek için lipoksijenazın yapısında bulunan demirin AAS ile belirlenmesinden yararlanılabilir.

KAYNAKLAR

ANDERSON, M. J., and WHİTCOMB, P.J., 2005. RSM Simplified – optimizing processes using response surface methods for design of experiments, Productivity Inc., New York NY.

ASTREITWIESER, A., HEATCOCK, C.H., 1976, Introduction to Organic Chemisrty, Collier Mac Millan International Editions U.S.A Sy, 1024.U.S.A

AXELROD, B., 1974. Lipoxygenases. ACS Adv. Chem. Ser., 136:324-48

AXELROD, B., CHRİSTOPHER, J.P., PİSTORİUS, E.K., 1972. Isolation of a Third Isoenzyme of Soybean Lipoxygenase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology, 284:54-62.

BARACAT-PEREIRA, M.C., OLIVERIA, M.G.D.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., SANTORO, M.M., 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenase: Presence of soluble and membrane-bound forms. Plant Physiology and Biochemistry, 39:91-98.

BAYRAK, N., 2009. Kinonlar ve Bazı Nükleofillerden Yeni Sübstitüe Kinonların Sentezi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi., Fen Bilimleri Enstitüsü., İstanbul.

BOHN, R.M., HAAS, L.W., 1928. Chemistry and Methods of Enzymes, in Chemistry and Methods of Enzymes, Ed by Sumner JB and Somers GF, Academic Press, New York.

BORGES, R.M., ARIZAGA, G.G.C., WYPYCH, F., 2009. Immobilization of enzymatic extract from *Penicillium camemberti* with lipoxygenase activity onto a hybrid double hydroxide. Biochemical Engineering Journal, 48:93-98

BOX, G.E.P., and WILSON, K.B., 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). Journal of the Royal Statistical Society Series B, 13(1):1-45

BRASH, A.R., 1999. Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. Journal of Biological Chemistry, 274:23679-23682.

CAO, L., LANGEN, L.V., and SHELDON, R.A., 2003. Immobilized Enzyme: Carrier bound or Carrier-free. Current Opinion in Biotechnology, 14: 387-394

CHEN, H., 1994. Responce-surface methodology for optimizingcitric acid fermentation citric acid fermentation by Aspergillus foetidus, Proses Biochem., 29: 399-405.

DELICADO, E.N., GILABERT, M.P., FERRER, A.S. and CARMONA, F.G., 1997b. Hydroproxidative oxidation of diethystilbestrol by lipoxygenase. Archieves of Biochemistry and Biophysics, 348:411-414.

DELICADO, E.N., GİLABERT, M.P., FERRER, A.S., CARMONA, F.G., 1996. Hydoperxidase activity of lipoxygenase: a kinetic study of isoproterenol oxidation. Biochimica et Biophysica, 1293:17-22

DELICADO, E.N., GİLABERT, M.P., FERRER, A.S., CARMONA, F.G., 1997a. A kinetic study of the one- electron oxidation of Trolox C by the Hydroperoxidase activity of lipoxygenase. Biochimica et Biophysica, 1335:127-134

DIAZ, D.P., PIAZZA, G.J., BROWEER, D.P., MEDINA, M.B., 1993. A Method for Immobilization of Lipoxygenase. Biotechnol. Appl. Biochem., 18:359-36

FAUCONNIER, M-L., WELTI, R., BLEE, E., MARLIER, M., 2003. Lipid and oxylipin profiles during aging and sprout development in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Biochimica et Biophysica Acta, 1633:118-126.

FEUSSNER, I., WASTERNACK, C., 2002. The Lipoxygenase Pathway. Annual Review in Plant Biology, 53:275-297.

GILABERT, M.P., FERRER, A.S., CARMONA, F.G., 1994. Lipoxygenase-catalyzed oxidation of chlorpromazine by hydrogen peroxide at acidic pH. Biochimica and Biophysica Acta, 1214:203-208

GILABERT, M.P., FERRER, A.S., CARMONA, F.G., 1997. Oxidation of aminopyrine by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase: A new proposed mechanism of N-demethylation. Free Raical Biology and Medicine, 23:548-555.

GOVARDHAN, C.P., 1999. Crosslinking of Enzymes for improved stability and performance. Current Opinion in Biotechnology, l0:331-335.

GROSSMAN, S., TROP, M., YARONI, S., WILCHEK, M., 1972. Purification of soybean lipoxygenase by affinity chromatography. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 289:77-81

HALL, C.E., KARBOUNE, S., FLORENCE, H., and KERMASHA, S., 2007. Immobilization of a Enzymatic Extract from *Penicillium Camemberti* Containing Lipoxygenase and

Hydroperoxide Lyase Activities. Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic, 52-53: 88-95

JACOBO-VELÁZQUEZ, D.A., HERNÁNDEZ-BRENES C., CISNEROS-ZEVALLOS, L., BENAVIDES, J., 2010. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) lipoxygenase. Food Research International, 43:1079-1085

JOGLEKAR, A.M., and MAY, A.T., 1987. Product excellence through design of experiments, Cereal Foods World, 32:(12), 857-860.

KAROUT, A., CHOPARD, C., PIERRE, A.C., 2007. Immobilization of a lipoxygenase in silica gels for application in aqueous media. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 44:117-127.

KARTAL, F., JANSSEN, M.H.A., HOLLMANN, F., SHELDON, R.A., KILINÇ, A., 2011. Improved Esterification Activity of *Candida Rugosa* Lipase in Organic Solvent by Immobilization as Cross Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71:85-89.

KULKARNI, A.P., COOK, D.C., 1988. Hydroperoxidase Activity of Lipoxygenase: Hydrogen Peroxide Dependent Oxidation of Xenobiotics. Biochemical and Biophysical Research Communications, 155:1075-1081.

LOPEZ-GALLEGO, F., MONTES, TAMARA., FUENTES, M., ALANSO, N.,GRAZU, V., BETANCOR, L., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2005. Improved Stabilization of Chemically Aminated Enzymes Via Multipoint Covalent Attachment on Glyoxyl Supports. Journal of Biotechnology, 116:1-10

LOWRY, O., 1951. Rosebrough A., Farr A., Randall R., Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.

LUQUET, M.P., POURPLANCHE, C., PODEVIN, M., THOMPSON, G., LARETTA-GARDE, V., 1993. A new possibility for the direct use of soybean lipoxygenase on concentrated triglycerides. Enzyme and Microbial Technology, 15:842-848.

MATEO, C., TORRES, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LOPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J.M., BETANCOR, L., PESSELA, B.C.C., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE,

R., 2003. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. Biomacromolecules, 4:772-777

MONTGOMERY, D.C., 1996. Desing and analysis of experiments 4th ed. John Wiley and Sons Ltd., USA, 575-651.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., 1995. Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

NAIDU, A.K., KULKARNI, A.P., 1991a. Aldrin Epoxidation: Catalytic Potential of Lipoxygenase Coupled with Linoleic Acid Oxidation. Drug Metabolism and Disposition, 19:758-763.

NAIDU, A.K., KULKARNI, A.P., 1991b. Role of Lipoxygenase in Xenobiotic Metabolism: Sulfoxidation of Thiobenzamide by Purified Soybean Lipoxygenase. Research Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 71:175-188.

NAIDU, A.K., KULKARNI, A.P., 1991c. Role of Lipoxygenase in Xenobiotic Oxidation: Parathion Metabolism Catalyzed by Highly Purified Soybean Lipoxygenase. Pesticide Biochemistry and Physiology, 41:150-158.

OSIPOVA, E.V., LANTSOVA, N.V., CHECHETKIN, I.R., MUKHITOVA, F.K., HAMBERG, M., GRECHKIN, A.N., 2010. Hexadecanoid Pathway in Plants: Lipoxygenase Dioxygenation of (7Z,10Z,13Z)-hexadecatrienoic Acid. Biochemistry (Moscow), 75:708-716.

PADILLA, M.N., HERNÁNDEZ, M.L., Sanz, C., MARTÍNEZ-RIVAS, J.M., 2009. Functional Characterization of two 13-lipoxygenase Genes from Olive Fruit in Relation to the Biosynthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57:9097-9107.

PINTO, M.C., MACIAS, P., 1996. Synthesis of Linoleic Acid Hydroperoxide Using Immobilized Lipoxygenase in Polyacrylamide Gel. Applied Biochemistry and Biotechnology, 59:309-318

REDREJO-RODRIGUEZ, M., TEJEDA-CANO, A., DEL CARMEN PINTO, M., MACIAS, P., 2004. Lipoxygenase inhibition by flavonoids:semiempirical study of the structure–activity relation. Journal of Molecular Structure, 674:121-124.

ROY, P., KULKARNI, A.P., 1997. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. Food Chemical Toxicology, 34:563-570.

SANTANO, E.S., PINTO, M.D.C., MACIAS, P., 2002. Xenobiotic oxidation by hydroperoxidase activity of lipoxygenase immobilized by adsorption on controlled pore glass. Enzyme and Microbial Technology, 30:639-646.

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M.W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A.P.G., RANTWICK, F., WIELEN, L.A.M., SHELDON, R.A., 2004. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates. Biotechnol and Bioengineering, 87:754-762.

SHAH, S., SHARMA, A., GUPTA, M.N., 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. Analytical Biochemistry, 351:207–213.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L.M., 2005. Crosslinked Enzyme Aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). Biocatalysis and Biotransformation, 23:141-147.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L.M., 2006. Cross-Linked Enzyme Aggregates, Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition, ed: Guisan J.M., Humana Press, New Jersey, pp:31.

SIEDOW, J.N., 1991. Plant lipoxygenase: Structure and Function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42:145-88

SULEK, F., FERNANDEZ, D.P., KNEZ, Z., HABULIN, M., SHELDON, R.A., 2011. Immobilization of Horseradish Peroxidase as Crosslinked Enzyme Aggregates (CLEAs). Process Biochemistry, 46: 765-769.

SUURMEIJER, C.N.S.P., GILABERT, M.P.G., HIJDEN, H.T.W.M., VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G., 1998. Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. Plant Physiology and Biochemistry, 36:657-663.

SZYMANOWSKA, U., JAKUBCZYK, A., BARANIAK, B., KUR, A., 2009. Characterisation of Lipoxygenase from Pea Seeds (*Pisum sativum var*. *Telephone* L.). Food Chemistry, 116:906-910.

THEORELL, H., HOLMAN, R. T., AKESON, A., 1947. Cristalline lipoxidase. Acta Chem. Scand, 1:571-576.

TISCHER, W., WEDEKIND, F., 1998. Immobilized enzymes: Methods and applications, Topics in Current Chemistry,20:96-126.

TURAN, M.D., ALTUNDOĞAN, H.S., 2011. Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin kullanımı, Madencilik, 50;3:11-23.

TÜRK, B., 2008. İmmobilize lipaz enzimi kullanılarak etil bütirat üretimi, A.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

TWYMAN, R.M., 2005. Immobilized Enzymes. Encyclopedia of Analytical Science 523-529.

VILLAVERDE, J.J., VAN DER VLIST, V., SANTOS. S.A.O., HAARMANN, T., LANGFELDER, K., PIRTTIMAA, M., NYYSSÖLA, A., JYLHA, S., TAMMINEN, T., KRUUS, K., DE GRAAFF, L., NETO, C.P., SIMOES, M.M.Q., DOMİNGUES, M.R.M., SİLVESTRE, A.J.D., EİDNER, J., BUCHERT, J.,2012. Hydroperoxide Production From Lioleic Acid by Heterologous *Gaeumannomyces Graminis Tritici* Lipoxygenase: Optimization and Scale-Up. Chemical Engineering Journal, 217: 82-90

WANG, R., SHEN, W., LIU, L., JIANG, L., LIU, Y., SU, N., WAN, J., 2008. A Novel Lipoxygenase Gene from Developing Rice Seeds Confers Dual Position Specificity and Responds to Wounding and Insect Attack. Plant Molecular Biology, 66:401-414.

WOO, C.C., KUMAR, A.P., SETHİ, G., TAN, K.H.B., 2012. Thymoquinone: Potential cure for Inflammatory Disorders and Cancer. Biochemical Pharmocology, 83:443-451.

YANAROĞLU, S., 2011. Çörekotunun (*Nigella sativa L.)* biyolojik etkileri üzerine bir araştırma. Yüksek lisans projesi, Yakın Doğu Üniversitesi., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Lefkoşa

YANG, X., KULKARNI, A.P., 1998. N-dealkylation of Aminopyrine Catalyzed by Soybean Lipoxygenase in the Presence of Hydrogen Peroxide. Journal of Biochemical Toxicology, 12:175-183.

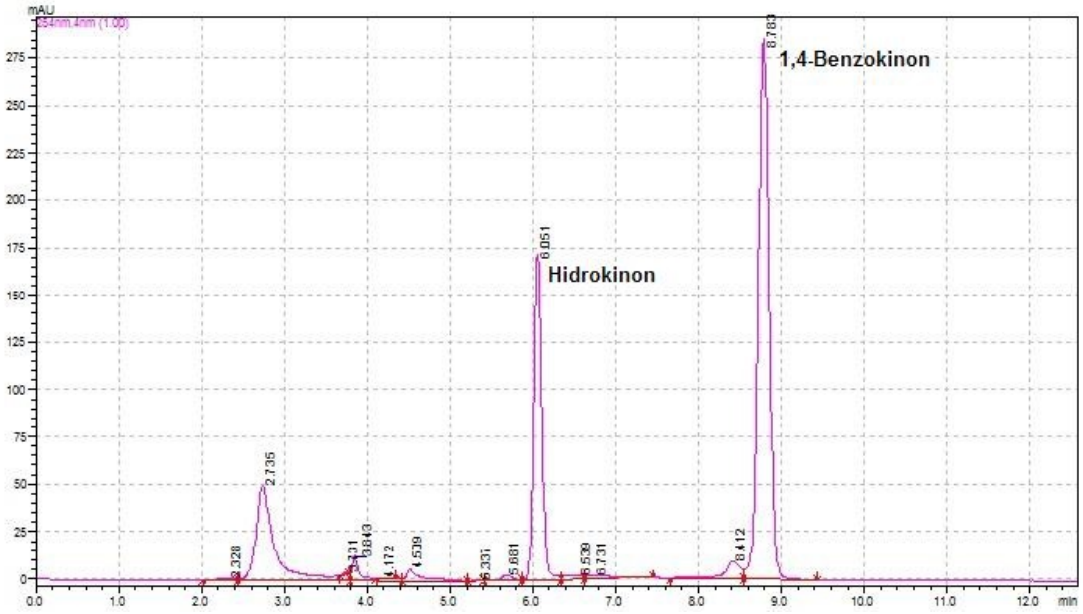
YILDIRIM, D., 2003. Lipoksijenazın Soya Fasulyesinden Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi., Fen Bilimleri Enstitüsü., Adana

YOU XU, D., YU CHEN, Y., YANG, Z., 2011. Use of Cross-Linked Tyrosinase Aggregates as Catalyst for Synthesis of l-DOPA. Biochemical Engineering Journal, 63:88-94.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Trabzon ilinin ÇAYKARA ilçesinde dünyaya geldi. İlköğrenimine Hasanbey Köyü İlkokulunda başladı ve J&J Konuralp İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise öğrenimini de Şht.Yzb. H.İ. Sert Lisesinde (YDA) tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2011 yılından itibaren yüksek lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'nde devam etmektedir.

EKLER



Ek 1. Hidrokinon ve 1,4-Benzokinon için HPLC kromatoğramı

Kolon: Phenomenex Luna C18 (5µm, 250x4,6 mm)

Haraketli faz: (60/40 (v/v) su/asetonitril)

Akış hızı: 0,5 mL/dk)

Dedektör: (Diyod array, 254 nm)