

2005-17



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
Thermomyces lanuginosus KÜFÜNDEN ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU
VE AYRIŞTIRILMASI**

PROJE NO: MİSAG-246

53589

15

**Makina Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant
Committee**

**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
Thermomyces lanuginosus KÜFÜNDEN ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU
VE AYRIŞTIRILMASI**

53589
PROJE NO: MİSAG-246

(15)
1-43

PROF. DR. UFUK BAKIR

**TEMMUZ 2005
ANKARA**

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: MİSAG-246
Proje Başlığı: Polifenol Oksidaz Enziminin <i>Thermomyces Lanuginosus</i> Küfünden Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Ayırıştırılması
Proje Yürüttücsü ve Yardımcı Araştırmacılar:
Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Ufuk Bakır
Araştıracı: Erhan Astarci, Didem Sutay
Projenin Yürüttüğü Kuruluş ve Adresi:
ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, İnönü Bulvarı 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1. 4. 2003 - 1. 3. 2005
Öz (en çok 70 kelime): <p>Bu çalışmada termofilik bir küp olan <i>Thermomyces lanuginosus</i>'un hücre dışı polifenol oksidaz üretimi incelenmiş, çeşitli besin kaynaklarının, indükleyici bazı maddelerin ve değişik fermantasyon parametrelerinin (pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen konsantrasyonu) enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmış, enzim kısmı olarak saflaştırılıp karakterize edilmiştir. <i>Thermomyces lanuginosus</i>'a göre daha yüksek polifenol oksidaz üretimi gerçekleştirebilen <i>Scytalidium thermophilum</i> polifenol oksidazları ise kolon kromatografi ile saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Biyokimyasal karakterizasyon için pH ve ısıl dayanıklılık, pH ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi, kinetik sabitleri, molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası tespit edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, lakkaz, termofilik küp, <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i> , biyokimyasal karakterizasyon, enzim üretimi.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: SCI kapsamında uluslararası bir dergide yayınlanmak üzere bilimsel bir makale hazırlanmaktadır.
Bilim Dalı: Biyoteknoloji
Doçentlik Bilim Dalı Kodu: Biyoteknoloji

ÖNSÖZ

Bu rapor, TÜBİTAK tarafından desteklenen MİSAG- 246 nolu ve “Polifenol Oksidaz Enziminin *Thermomyces Lanuginosus* Küfünden Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Ayırıştırılması” isimli Prof. Dr. Ufuk Bakır’ın yürütücülüğünü yaptığı projenin sonuç raporudur.

Proje kapsamında, termofilik bir küf olan *Thermomyces lanigunosus*’un hücre dışı polifenol oksidaz üretimi incelenmiş olup, çeşitli besin kaynaklarının, indükleyici bazı maddelerin ve değişik fermantasyon parametrelerinin enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmış, biyoreaktör koşulları optimize edilmiş ve üretilen enzim kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Bunun yanısıra, yine termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*’un *Thermomyces lanigunosus*’a oranla daha yüksek polifenol oksidaz ürettiği tespit edilmiş ve bu nedenle *Scytalidium thermophilum* polifenol oksidazı, kolon kromatografi yöntemiyle başarılı bir şekilde saflaştırılıp karakterize edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet.....	9
Abstract.....	10
1.Giriş.....	11
1.1.Literatür Taraması.....	11
1.2.Araştırmada Kullanılan Deneysel Yöntemler.....	13
2.Gelişme.....	22
2.1.Fermantasyon Çalışmaları.....	17
2.2.Polifenol Oksidazların Konsantre Edilmesi ve Saflaştırılması.....	29
2.3.Polifenol Oksidazların Karakterizasyonu.....	34
3.Sonuç.....	42
Kaynakça	44
Appendix.....	46

Tablo Listesi**Sayfa**

Sayfa Listesi

Sayfa

Tablo-1 : Karbon kaynağının polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 22

Tablo-2 : Azot kaynağının polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 24

Tablo-3 : Maya özütü konsantrasyonunun polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 25

Tablo-A1: BSA ile standart protein grafiği seyreltme oranları..... 47

İşlemler ve Aşamalar

Şekil-1: Karbon kaynağına Mg^{2+} eklenmesiyle polifenol oksidaz üretimi ortaya

üretilenin etkisi

24

Şekil-2: Diferit maddelerin polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 25

Şekil-3: Fermentasyon tekniklerinin polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 26

Şekil-4: Fermentasyon pH'sının polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 27

Şekil-5: Çözümdeki temsili maddelerin polifenol oksidaz üretimine etkisi..... 28

Şekil-6: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 29Şekil-7: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 30Şekil-8: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 31Şekil-9: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 32Şekil-10: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 33Şekil-11: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 34Şekil-12: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 35Şekil-13: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 36Şekil-14: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 37Şekil-15: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 38Şekil-16: *S. thermophilum* PPO'yu içeren bir maddenin temsili örnekleri..... 39

Şekil Listesi	Sayfa
Şekil-1: Kültür ortamına %1 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.....	23
Şekil-2: Kültür ortamına %2 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.....	23
Şekil-3: Kültür ortamına %3 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.....	24
Şekil-4 : Bakır sülfat konsantrasyonunun polifenol oksidaz üretimine etkisi.....	26
Şekil-5: Fenolik maddelerin polifenol oksidaz üretimine etkisi.....	26
Şekil-6: Fermentasyon sıcaklığının polifenol oksidaz üretimine etkisi.....	27
Şekil-7: Fermentasyon pH'ının enzim üretimine etkisi.....	28
Şekil-8: Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi.....	29
Şekil-9: <i>S. thermophilum</i> - <i>T. lanuginosus</i> PPO aktivitesi karşılaştırması.....	31
Şekil-10: <i>S. thermophilum</i> PPO iyon-değişim kromatografisi kromatogram sonucu..	33
Şekil-11: <i>S. thermophilum</i> PPO iyon-değişim kromatografisi aktivite sonucu.....	33
Şekil-12. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının Michaelis-Menten grafiği.....	34
Şekil-13. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının Lineweaver-Burk grafiği.....	35
Şekil-14. Sıcaklığın <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının aktivitesine etkisi.....	35
Şekil-15. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının termostabilitesi	36
Şekil-16. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının aktivitesine pH etkisi.....	37
Şekil-17. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının pH stabilitesi.....	37
Şekil-18. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının uzun zamanlı pH stabilitesi.....	38
Şekil-19. <i>T. Lanuginosus</i> lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri.....	39

Şekil-20. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının SDS-PAGE sonucu.....	40
Şekil-21. <i>T. lanuginosus</i> polifenol oksidazının izoelektrik nokta incelemesi sonucu.....	41
Şekil-22. <i>S. thermophilum</i> polifenol oksidazının SDS-PAGE sonucu.....	41
Şekil-A1. Bradford protein standart grafiği.....	47

ÖZET

Bu çalışmada termofilik bir küp olan *Thermomyces lanuginosus*'un hücre dışı polifenol oksidaz üretimi incelenmiş olup, çeşitli besin kaynaklarının, induksiyon ve değişik fermantasyon parametrelerinin enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi (97 U/ml), bioreaktör ile 50°C, 400 rpm ve pH 8.0 de yapılan fermantasyonlarda %1.4 maya özütu, %0.3 MgSO₄, %1 KH₂PO₄, %0.003 CuSO₄ ve %0.032% gallik asit içeren ortamda görülmüştür.

ür biochemical characterization studies, the enzyme was enriched by electrophoresis. Biyokimyasal karakterizasyon için, enzim elektroforez ile saflaştırılmıştır. Enzim için en uygun sıcaklık ve pH değerleri sırası ile 60°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir. Enzim 80°C de 1 saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %67ini, pH 9 ve oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon sonrasında da aktivitesinin %87ini koruduğu gözlenmiştir. Enzimin Michealis-Menten kinetikine uydugu görülmüş, K_m ve V_{max} değeri sırası ile 5 mg/ml katekol ve 38 U/ml moleküler ağırlığı 29 kDa ve izoelektrik noktası da 6.0 civarında tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Polifenol oksidaz, lakkaz, termofilik fungus, *Thermomyces lanuginosus*,
Key words: Polyphenol oxidase, laccase, thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*,
biyokimyasal karakterizasyon, enzim üretimi
biochemical characterization, enzyme production.

ABSTRACT

In this study, a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* was evaluated in terms of polyphenol oxidase production. The effect of different nutrient sources, inducers and fermentation parameters on enzyme production were investigated and maximum PPO activity of 97 U/ml was observed in bioreactor experiments at 50°C, 400 rpm and pH 8.0 in a fermentation medium containing 1.4% yeast extract, 0.3 MgSO₄, %1 KH₂PO₄, %0.003 CuSO₄, 0.032% gallic acid. *Thermomyces lanuginosus* laccase containing 4.2 mg/ml optimum substrate concentration decolorized catechol and Kaffir lime extract during the incubation period. For biochemical characterization studies, the enzyme was enriched by electrophoresis. Temperature and pH optima for the enzyme were determined as 60 °C and 8.0, respectively. Enzyme retained 67 % activity after 1 h incubation at 80°C and retained 87% of its activity after 1 hour of incubation at pH 9.0 at room temperature. The enzyme obeys Michealis-Menten kinetics with K_m and V_{max} values being 5 mg/ml catechol and 38 U/ml, respectively. Molecular weight of the enzyme was determined as 29 kDa and isoelectric point of enzyme was found to be approximately 6.0.

Key words: Polyphenol oxidase, laccase, thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*, enzyme production, biochemical characterization.

1. ARAŞTIRMA GİRİŞ

Çevredeki besinlerin oksidasyonunu ve bu olaylara belirlemektedir. Bu konuda bir

1.1. Literatür Taraması

Polifenol oksidaz (1,2-benzendiol:oksijen oksidoreduktase; EC 1.10.3.1) sıkılıkla tyrosinaz, polifenolaz, katekol oksidaz, kresolaz ve katekolaz gibi isimlerle de bilinen, mikroorganizma, bitki, hayvan ve insanlarda bulunan bir enzimdir. Tyrosinaz adı memelilerde bulunan enzimin tyrosini substrat olarak kullanmasından dolayı verilmiştir ama bu enzim dihidroksifenilalanin oksidasyonunu da katalize eder. Bitki ve küflerin ürettiği enzim ise çok değişik mono ve di-fenolik kimyasalları katalize etmektedir (Whitaker, 1994).

Diğer birçok enzimin aksine fenolaz, fenolik substratların iki ayrı reaksiyonunu katalize eder. Bu reaksiyonların ilkinde monofenoller o-difenoller haline çevirir; ikincisinde ise o-difenollerin hidrojenlerini ayırarak o-quionone haline çevirir. Bu reaksiyonların ikisinde de oksijen ikinci substrat olarak görev yapmaktadır. Bazı kaynaklarda bu reaksiyonların ilkine (monofenol monooksijenaz; EC 1.14.18.1) ve ikincisine (catekol oksidaz; EC 1.10.3.1) değişik enzim numaraları verildiği gözlenmektedir (Osuga ve ark., 1994; Dixon ve ark., 1979). Bu grupta karışıklığa neden olan fenolaza benzeyen diğer enzim de monofenoller p-difenole ve sonradan p-benzoquinone haline çeviren lakkaz (benzendiol:oksijen iksidoreduktaz, EC 1.10.3.2)'dır (Whitaker, 1994). Her ne kadar polifenol oksidazların substratları mono ve difenoller olarak sadece iki substratmış gibi görülse de, bu kimyasallar yapılarında barındırdıkları diğer gruplara bağlı olarak çok çeşitli isimler almaktadır ve değişik organizmalardan üretilen polifenol oksidazlar bu kimyasalların sadece bir bölümyle reaksiyona girebilmektedir.

Çok değişik organizmalarda bulunan polifenoloksidazların fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber insanda deri renklenmesi ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bitkilerde ise oluşan yaraların üzerini melaninle kapatarak dış ortamdan ayırmak olduğu, fungslarda ise melanin üretimi (renklenme) ve lignin parçalanması ile ilgili olduğuna dair deliller vardır (Osuga ve ark., 1994). Değişik sistemlerden izole edilen fenolaz enzimlerinin yapıları birbirinden çok farklılıklar göstermekle beraber değişimyen özelliği aktif bölgesinde histidinlere bağlanan bakır içeren metaloprotein olmasıdır. Örneğin mantardan izole edilen fenolaz 4 subunitten meydana gelmiş her aktif merkezine 2 bakır bağlanan 4 aktif merkeze sahip, 128,000 Da ağırlığında bir enzimken, *Neurospora crassa*'dan üretilen fenolaz 46,000 Da büyüklüğünde bir aktif merkezli küçük bir protein olarak görülmektedir. *Streptomyces glaucescens* ve *S. antibioticus*'dan üretilen fenolazlar da *N. crassa*'dan üretilen enzim ile %24'lük bir homoloji göstermektedir. Değişik kaynaklardan izole edilen fenolazların bir bölümünde de reaksiyon sırasında geçiş-durumu-kompleksi (transition-state complex) tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir (Whitaker, 1994).

Tarihte ilk olarak Schoenbein tarafından 1856 yılında mantardan izole edilen bu enzime fenolaz adı 1915'te Onslow tarafından verilmiştir. Bu enzimler başta mantar olmak üzere papates, elma, şeftali, muz, avacado gibi birçok meyvede yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Bitkilerde değişik bölgelerde bulunan fenoliklerle, fenolazlar hücre parçalanması esnasında bir araya gelerek reaksiyona girerler ve oluşan quinonlar enzimatik olmayan reaksiyonlarla melaninlere çevrilir, sonuç olarak istenmeyen renkler meydana çıkar. Dolayısıyla fenolazlar, meyve sebzelerin işlenmesi ya da depolanması sırasında büyük problemlere yol açarlar. Bundan dolayı da literatürde genellikle fenolazların inaktivasyonu ile yayınlar mevcuttur (Schwimmer, 1981).

Fenolazların analitik ve endüstriyel amaçlarla kullanımlarına ilişkin son yıllarda literatürde yayınlar görülmeye başlanmıştır. Fenolaz enzim elektrodları ile ilişkin elektrod yapımı ve sularda fenolik tayini ile ilgili yayınlar mevcuttur (Wohlschlager ve ark., 1998; Zhang ve ark., 1999; Russel ve Burton, 1999). Ayrıca atık sulardan fenoliklerin ayrılması ile ilişkin 3 adet çalışmalar mevcuttur (Edwards ve ark., 1999a ve b, Greco ve arkadaşları; 1999).

Bitirilen proje ile proje önerisinde amaç, kapsam ve yöntem açısından bir farklılık yoktur. Proje önerisinde yapılması planlanan araştırma tamamıyla tamamlanmıştır.

1.2. Araştırmada Kullanılan Deneysel Yöntemler

1.2.1. Enzim (Polifenol Oksidaz) Aktivitesi Tayini

Çalışmada enzim aktivitesini tayini için 100 mM katekol pH 7'de 0.2 M fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0.11 g katekol daha önceden 50°C'ye ısırılmış 10 ml pH 7 0.2 M fosfat tamponunda çözülmüştür. Reaksiyon karışımı; 1 ml 0.2 M pH 7 fosfat tamponu, 0.5 ml kültür örneği ve 0.5 ml katekol solüsyonu içermektedir. Referans çözeltide ise 1.5 ml 0.2 M pH 7 fosfat tamponu ve 0.5 ml katekol solüsyonu bulunmaktadır. Reaksiyon karışımı 50°C'de 3 dakika inkübe edilmiş ve 410 nm'de absorbans değişimini kaydedilerek aktivitesi belirlenmiştir (Maria ve ark., 1981).

Bir polifenol oksidaz aktivitesi birimi (U), 50°C'de pH 7'de 410 mn dalga boyunda dakikada 0.01 absorbans değişimi için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim tarafından katalizlenen katekolün oksidasyonu reaksiyonu boyunca toplanan

spektrofotometrik ölçüm dataları (absorbans) zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen eğrilerin lineer kısmının eğiminden aktivite hesaplanmıştır.

1.2.2. Protein Konsantrasyonu Tayini

Enzim örneklerinin protein konsantrasyonu modifiye Bradford (1976) metoduyla ölçülmüştür. Bu metodda orijinali kırmızı olan Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlandığında maviye dönüşmesi esas alınmaktadır.

Deneyde öncelikle 5x Bradford çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 500 mg Brilliant Blue G boyası, 250 ml %95'lik etanol ve 500 ml %85'lik ortofosforik asitte çözülmüştür. Çözeltinin hacmi 1000 ml olacak şekilde saf su eklenmiş, süzülmüş ve 4°C'de stok solüsyon olarak saklanmıştır. Deney yapılabacağı zaman 1 gün 25°C'de bekletilmiş olan 5x Bradford solüsyonu 1:4 oranında saf suyla seyreltilmiştir.

BSA (bovine serum albumin) kullanılarak protein standart grafiği elde edilmiştir. Bu amaçla 10 mg/ml BSA stok solüsyonu hazırlanmış ve Tablo-A1'de verilmiş olan oranlarda seyreltilerek 0-0.03 mg/ml konsantrasyon aralığında BSA çözeltileri hazırlanmıştır.

Alınan 2 ml BSA çözeltisinin üzerine 2 ml Bradford solüsyonu eklenip karıştırıldıktan 10 dakika sonra, örneğin absorbansı 595 nm'de okunmuş ve protein standart grafiği hazırlanmıştır (Ek-A). Enzim örneklerinin de 2 ml'si üzerine 2 ml Bradford solüsyonu eklenip 595 nm'de absorbansına bakılmış ve bu data kullanılarak protein standart grafiğinden örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

1.2.3. Fermentasyon Çalışmaları

Bu çalışmada termofilik bir fungus olan *Thermomyces lanuginosis* (IMI-84400 suşu) polifenol oksidaz üretimi açısından incelenmiştir.

Thermomyces lanuginosis standart agar kaplarında sporlanıncaya kadar 45°C'de büyütülmüş, daha sonra 20°C'de inkübatörde saklanmıştır. Her üç haftada bir stok kültürden alt kültürler hazırlanmıştır.

En yüksek polifenol oksidaz üretim koşullarının tespiti için farklı karbon ve azot kaynakları denenmiştir. Ayrıca, fermentasyon ortamına eklenen bakırın üretime etkisi de incelenmiştir.

Karbon kaynağı olarak selüloz, glikoz, sükroz, fruktoz ve xyloz, %1.43 maya özü, %0.3 MgSO₄ ve %1 KH₂PO₄ içeren fermentasyon ortamına 3% konsantrasyonda eklenmiş ve fermentasyon çalkalamalı inkübatörde erlenlerde 50°C'de 6-7 gün sürdürülmüştür. Her karbon kaynağı en az iki erlende denenmiştir. Düzenli aralıklarla fermentasyon ortamından örnekler alınıp aktivitesine bakılmış, hücre büyümesi kuru hücre kütlesinin ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kuru hücre kütlesinin tesipiti için, hücreler Whatman No.1 filtre kağıdı kullanılarak süzülmüş ve 60°C'de sabit kütleye ulaşılınca kadar kurutulmuştur.

Farklı azot kaynaklarının polifenol oksidaz üretimine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, organik (maya özü, kazein+pepton) ve inorganik (sodyum nitrat, amonyum sülfat) azot kaynakları kullanılmıştır. Organik kaynaklar %1.5, inorganik kaynaklar %2 oranında ortama eklenmiştir. Düzenli aralıklarla fermentasyon ortamından örnekler alınıp aktivitesine

bakılmış, hücre büyümesi kuru hücre kütlesinin ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Bu çalışmaya takiben, %0.5-3 arasında değişen oranlarda maya özütı kullanılarak fermentasyon yapılmıştır.

Polifenol oksidazların aktif bölgelerinde bakır bulunması nedeniyle bakırın fermentasyon ortamına eklenmesinin üretimi artıracığı düşünülmüş ve bu amaçla 0-80 ppm konsantrasyon aralığında bakır sülfat denenmiştir.

Enzim üretimini artırması amacıyla farklı fenolik maddeler; gallik asit, koumarik asit, kafeik asit, *p*-kresol, l-dopa, 1-3 mM konsantrasyon aralığında, ayrıca, çay özütı ve yağ proses atık suyu gibi fenolik madde açısından zengin kaynaklar da %2 oranında kültür ortamına eklenmiştir.

Fermentasyon çalışmaları biyoreaktörde sürdürülmüştür. Fermentasyon pH'ının enzim üretimine etkisinin incelenmesi ve optimum pH değerinin belirlenmesi için 7.0-9.0 pH aralığında deneyler 3 litrelük biyoreaktörde (Probiotem) gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma her zaman kültür ortamının pH'ını düşürecek yönde etki gösterdiğinden, kültür ortamının pH kontrolü için sadece NaOH kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarıyla kültür ortamından alınan örneklerdeki enzim aktivitesine bakılmıştır.

Çözünmüş oksijen konsantrasyonun enzim üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla biyoreaktörde %70-90 oksijen konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Bu amaçla, fermentör önce sıfır oksijen konsantrasyonuna azot ile kalibre edilmiş, ardından %100 oksijen konsantrasyonuna saf oksijen ile kalibre edilmiştir. Kompresör yardımıyla %70-90 aralığında istenen oksijen konsantrasyonlarına ulaşılmıştır.

1.2.4. Polifenol Oksidazın Konsantre Edilmesi ve Saflaştırılması

Konsantre etme ve kısmi saflaştırma çalışmalarına kültür ortamının süzülmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla, 50°C sıcaklık ve 155 rpm çalkalama hızı koşullarında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen 4 günlük kültür ortamı, 14,000 x g'de 25°C'de 16 dakika santrifüj edilmiş ve Whatman No.1 filtre kağıdından süzülmüştür. Elde edilen filtrat amonyum sülfatla çöktürme, sükrozla konsantre etme ve ultrafiltrasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

1.2.4.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme

Oda sıcaklığında katı halde bulunan amonyum sülfat tuzu, 100 ml filtrata % 50-80 doygunluk düzeyi aralığında eklenmiş ve polifenol oksidazın çökme değerleri incelenmiştir. İstenilen doygunluğa ulaşıldıktan sonra, solüsyon en az 1 saat karıştırılmış, kültür özütı 14,000 x g'de 25°C'de 16 dakika santrifüj edilmiş ve çöken kısım, mümkün olan en küçük hacim pH 7 sodyum fosfat tamponunda çözülmüştür. Elde edilen solüsyon 1 gün aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir.

1.2.4.2. Sükrozla Konsantre Etme

Sükrozla konsantre etme işleminin PPO için yararlı olup olmadığı tespit edilmesi amacıyla 25 ml (0.25 mg protein/ml) süzülmüş kültür ortamı diyaliz tüpüne konmuş, doygun sükroz çözeltisinin içeresine yerleştirilmiş ve ortam hacmi yarıya düşene kadar karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra solüsyon 50 mM pH 7 sodyum fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiş, enzim aktivitesi miktaeındaki değişim tespit edilmiştir.

1.2.4.3. Ultrafiltrasyon

Fermentasyonun 3. ve 4. gününden alınan 50 ml ham özüt (0.65 mg/ml), 2.5 bar basınç altında 10,000 NMWC membran ile ultrafiltrasyona tabi tutulmuştur. İşlem, hücrede 10 ml özüt kalana kadar devam ettirilmiş, bu sayede 5 kat konsantrasyona ulaşılmıştır.

1.2.4.4. Kolon Kromatografi

Karakterizasyon: Hazırlanan dialisiz torbası elektroforez tamponuna entegre edilip ve 100 mA akım hızı yürürlüğünde. Silo sonunda tampon çözeltiye geçeris iki kromatografik yöntem; hidrofobik etkileşim ve anyon-değişim kromatografileri, PPO saflaştırma için ÄKTA Prime FPLC (hızlı sıvı kromatografi) sisteminde test edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi oktil, fenil yüksek substrat bağlama ve fenil yüksek performans kolonları ile denenmiştir. Anyon –değişim kromatografisi ise HiPrep 16/10 Q XL kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.2.5. Polifenol Oksidazların Karakterizasyonu

1.2.5.1. Polifenol Oksidazların Elektroforetik Ayırıştırılması

Thermomyces lanuginosus fenol oksidazları farklı tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla SDS-poliakrilamat jeliyle elektroforetik olarak ayırtılmuştur. Üç temel grup olan fenol oksidazlar; lakkaz, peroksidaz ve katekol oksidaz, ayırtırma sonrası aktivite boyaması yöntemiyle tespit edilmeye çalışılmıştır (Rescigno ve ark., 1997). Bu amaçla, jel 5 dakika oda sıcaklığında pH 7 fosfat tamponunda bekletilmiş, ardından lakkaz aktivitesinin belirlenebilemesi için 25 mM 4-

amino-N-N-dietilenalenin (ADA) ile 50°C'de inkübe edilmiştir. Aynı jel peroksidaz aktivitesinin tespiti için 10 mM H₂O₂'de bekletilmiştir. Katekol oksidaz aktivitesinin tayini için jel 25 mM 4-butil-katekol ile aktivite boyamasına tabi tutulmuştur.

Aktivite gözlemlenen banttaki enzim jelden elektroforetik olarak geri kazanılmış, enzimin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasının belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla, jelin boyanmamış parçası ayrılmış ve küçük parçalar halinde kesilerek 3 ml 100 mM pH 7 fosfat tamponu içeren diyaliz torbasına konmuştur. Hazırlanan diyaliz torbası elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 100 mA'de 2-3 saat yürütülmüştür. Süre sonunda tampon çözeltiye geçmiş olan enzimler alınmış, santrifüj edilerek jel parçalarından ayrılmış ve ileri aşamadaki karakterizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

1.2.5.2. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında polifenol oksidazın kinetik incelemesi yapılmış, sıcaklık ve pH'ın enzim aktivitesi ve stabilitesine etkisi incelenmiş, enzimin tipi, moleküller ağırlığı ile izoelektrik noktası tespit edilmiştir.

1.2.5.2.1. Polifenol Oksidazın Kinetik Analizi

Polifenol oksidazın kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi amacıyla 0.25-20 mg/ml konsantrasyon aralığında katekol kullanılarak başlangıç reaksiyon hızları bulunmuştur. Bulunan reaksiyon hızları substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyup uymadığı tespit edilmiştir.

Polifenol oksidazın kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için (reaksiyon hızı)⁻¹ (substart konsantrasyonu)⁻¹, a karşı çizilerek Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur. Grafikten K_m ve V_{\max} değerleri belirlenmiştir.

1.2.5.2.2. Sıcaklığın Polifenol Oksidaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi

Sıcaklığın PPO aktivitesine etkisinin belirlenebilmesi için 50 ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda çalışılmıştır.

Enzimin termostabilitesinin tayini içinse enzim solüsyonu 200 mM pH 7 fosfat tamponuyla 1 saat boyunca 40 ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda enzim solüsyonları soğumaya bırakılmış ve kalan enzim aktivitesi ölçülmüştür.

1.2.5.2.3. Fenol Oksidaz Aktivitesi ve Stabilitesine pH Etkisi

Fenol oksidaz aktivitesine pH etkisinin belirlenebilmesi için 4 ile 10 arasında değişen pH değerlerinde çalışılmıştır.

Enzimin pH stabilitesinin tayini içinse enzim solüsyonları 5 ile 9 pH aralığında değişik 200 mM tampon çözeltilerde 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kalan enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Enzimin uzun zamanlı pH stabilitesinin tayini içinse solüsyonlar 18 saat boyunca değişik pH değerlerinde inkübe edilmiştir.

1.2.5.2.4. Polifenol Oksidaz Molekül Ağırlığı Tayini

Aktivite boyaması sonrası jelden geri kazanılan *T. lanuginosus* fenol oksidazının hacmi membran konsantratör kullanılarak 3 ml'den 0.1 ml'ye indirilerek konsantre edilmiş ve molekül ağırlığı tayini için SDS-PAGE yönteminde kullanılmıştır (Laemmli, 1970).

Konsantre 10 µg protein içeren örnekler %2 (w/v) SDS, %5 β-mercaptoethanol, %10 glycerol, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)'den oluşan örnek uygulama tamponuyla 5 dakika kaynayan suda bekletilmiştir. Standart olarak kullanılan proteinlerin ise moleküller ağırlıkları 14-116 kDa arasında değişmektedir. SDS-PAGE deneyi sabit 50 ve 80 V'da oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel coomassie brilliant blue ile boyanmıştır. *S. thermophilum* polifenol oksidazının karakterizasyonu için enzim önce kolon kromatografi ile saflaştırılmış, ardından SDS-PAGE ile jelde yürütülmüş ve gümüş boyama metodu ile boyanarak moleküller ağırlığı tespit edilmiştir.

1.2.5.2.5. Polifenol Oksidaz İzoelektrik Noktası Tayini

İzoelektrik noktası tayini pH 3 ile 10 arasında değişen amfolitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart proteinler ve enzim örnekleri jele 3 µl hacminde yüklenmiştir. Jel, ilk 15 dakika 100 V, sonraki 15 dakika 200 V ve son 30 dakika boyunca 300 V sabit voltta yürütülmüştür. Koması parlak mavi ile boyanan jelde polifenol oksidazın izoelektrik noktası tespit edilmiştir.

2. GELİŞME

2.1. Fermentasyon Çalışmaları

Thermomyces lanuginosus polifenol oksidaz üretim koşullarının optimizasyonu için farklı karbon ve azot kaynakları denenmiştir. Ayrıca, fermentasyon ortamına eklenen bakırın üretme etkisi de incelenmiştir.

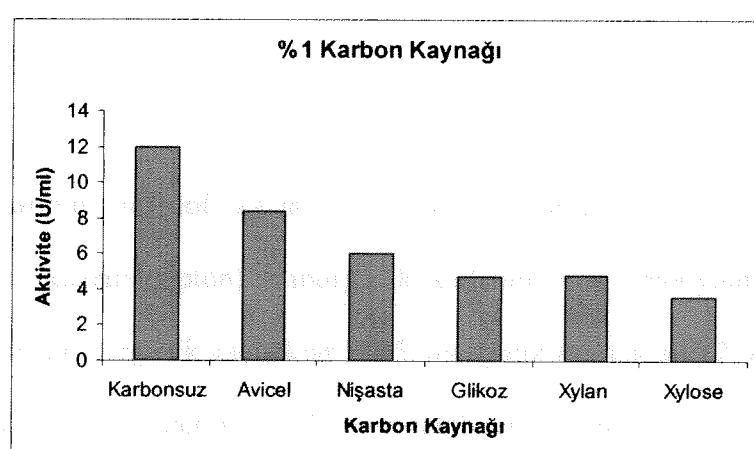
Karbon Kaynağı

Karbon kaynağı olarak selüloz, glikoz, sükroz, fruktoz ve xyloz, %1.43 maya özü, %0.3 MgSO₄ ve %1 KH₂PO₄ içeren fermentasyon ortamına 3% konsantrasyonda eklenmiş ve fermentasyon çalkalamalı inkübatörde erlenlerde 50°C'de 6-7 gün sürdürmüştür. Tablo-1'den de görüldüğü gibi, hiçbir karbon kaynağı polifenol oksidaz üretimini arttırmamıştır. En yüksek enzim aktivitesi ve özgü aktivite fermentasyonun 4. gününde hiç karbon kaynağı kullanılmamış olan ortamdan elde edilmiştir.

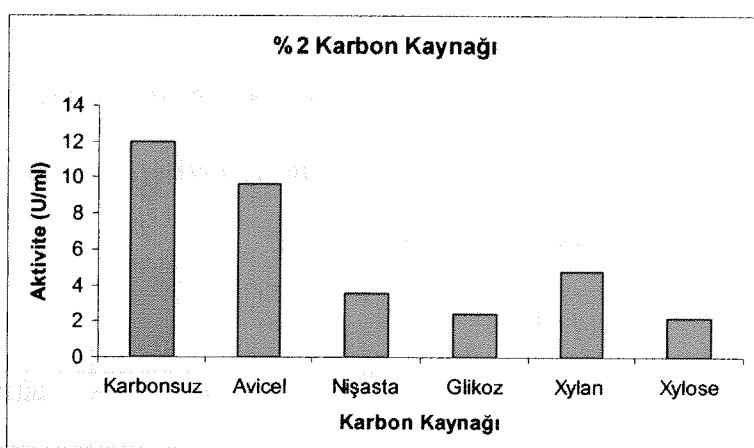
Tablo-1 : Karbon kaynağının polifenol oksidaz üretimine etkisi

Karbon Kaynağı	Aktivite (U/ml)	Hücre Konsantrasyonu (mg/ml)	Özgül Aktivite (U/mg hücre)
-	12 ± 2	0.508 ± 0.003	23.6
Avicel	7 ± 2	0.549 ± 0.006	12.7
Nişasta	6 ± 2	0.585 ± 0.015	10.2
Glikoz	6.3 ± 0.9	0.589 ± 0.001	10.6
Xylan	1.1 ± 0.1	0.399 ± 0.002	2.75
Xyloz	0	0.215 ± 0.005	0
Fruktoz	0	0.228 ± 0.004	0

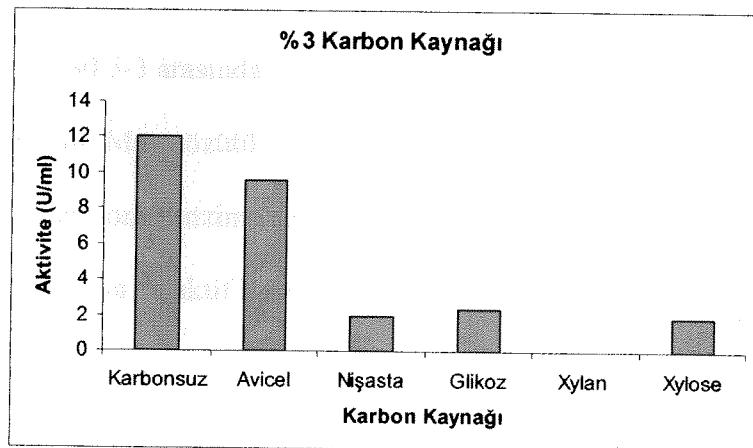
İlk deneylerde karbon kaynağı olarak selüloz, glikoz, sükroz, fruktoz ve ksiloz, %1.43 maya özütü, %0.3 MgSO₄ ve %1 KH₂PO₄ içeren fermentasyon ortamına 3% konsantrasyonda eklenmiştir. Daha sonra deneyler %1, 2 ve 3 konsantrasyonlara genişletilmiştir. Şekil 1-2 ve 3'te de görüldüğü gibi, kullanılan tüm karbon kaynakları hiç karbon kaynağı kullanılmayan duruma göre daha düşük bir aktiviteye neden olmuştur. En yüksek aktivite, karbon kaynağı kullanılmayan kültür ortamında 4. günde gözlenmiştir.



Şekil-1: Kültür ortamına %1 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.



Şekil-2: Kültür ortamına %2 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.



Şekil-3: Kültür ortamına %3 konsantrasyonda eklenen karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.

Farklı azot kaynaklarının polifenol oksidaz üretimine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, organik (maya özütü, kazein+pepton) ve inorganik (sodyum nitrat, amonyum sülfat) azot kaynakları kullanılmıştır. Organik kaynaklar %1.5, inorganik kaynaklar %2 oranında ortama eklenmiştir. En yüksek enzim üretimi %1.5 maya özütünün kullanıldığı fermentasyonun 4. gününde elde edilmiştir (Tablo-2). Her ne kadar sodyum nitrat kullanımı en yüksek özgü aktiviteyi verse de, enzim üretimi maya özütünün kullanıldığı fermentasyondaki enzim üretiminin %25 kadardır.

Tablo-2 : Azot kaynağının polifenol oksidaz üretimine etkisi

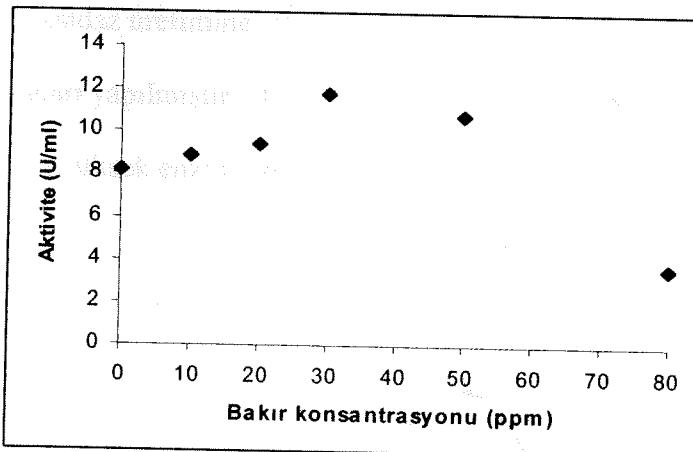
Azot Kaynağı	Aktivite (U/ml)	Hücre Konsantrasyonu (mg/ml)	Özgül Aktivite (U/mg hücre)
Amonyum sülfat	3.4 ± 0.4	0.268 ± 0.002	12.6
Sodyum nitrat	3.8 ± 0.2	0.115 ± 0.002	33.04
Maya özütü	12.75 ± 1	0.570 ± 0.01	22.3
Kazein+Pepton	0	0.117 ± 0.003	0

Bu çalışmayı takiben, %0.5-3 arasında değişen oranlarda maya özütları kullanılarak fermentasyon yapılmıştır. Maya özütları %2'ye kadar arttırıldığında enzim üretiminde artış görülmüş ancak %2'den sonra enzim üretiminde keskin bir düşüş gözlenmiştir (Tablo-3). Bu düşüşün ortamda üretilen ya da aktif hale gelen proteolitik enzimler nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Tablo-3 : Maya özütlüğü konsantrasyonunun polifenol oksidaz üretimine etkisi

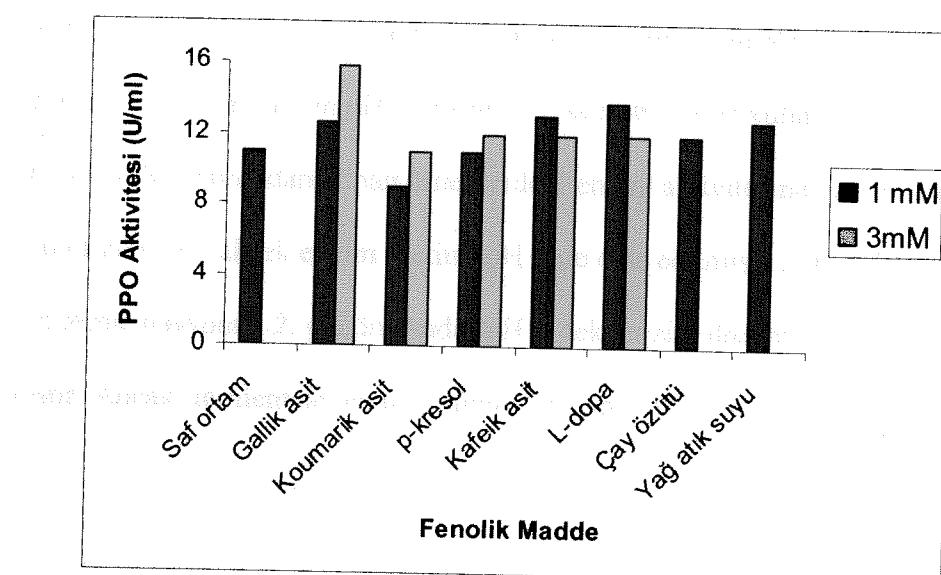
Maya Özütlüğü Konsantrasyonu	Aktivite (U/ml)	Hücre Konsantrasyonu (mg/ml)	Özgül Aktivite (U/mg hücre)
0.5	7.2 ± 0.4	0.350 ± 0.008	20.5
1.0	8.2 ± 0.4	0.498 ± 0.005	16.45
1.5	14.1 ± 0.4	0.625 ± 0.009	22.5
2.0	14.4 ± 1.6	0.771 ± 0.022	19.0
2.5	8.4 ± 0.2	0.610 ± 0.011	13.75
3.0	0	0.476 ± 0.005	0

Polifenol oksidazların aktif bölgelerinde bakır bulunması nedeniyle bakırın fermentasyon ortamına eklenmesinin üretimi artıracığı düşünülmüş ve bu amaçla 0-80 ppm konsantrasyon aralığında bakır sülfat denenmiştir. Şekil-4'de de görüldüğü gibi bakır sülfat konsantrasyonunun 30 ppm'e kadar arttırılması enzim üretimini attırmış ancak 30-80 ppm arasında eklenmesi üretimi azaltıcı yönde etki yapmıştır.



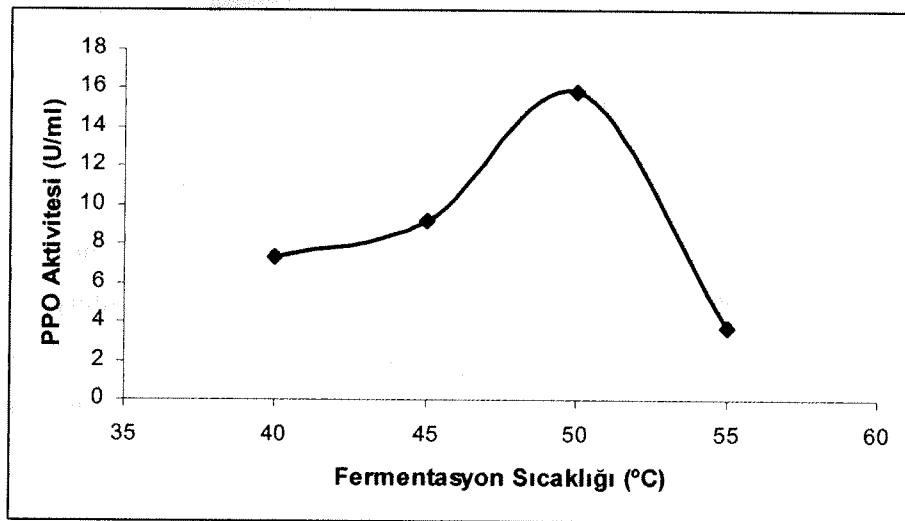
Şekil-4 : Bakır sülfat konsantrasyonunun polifenol oksidaz üretimine etkisi

Literatürde, aromatik bir madde olan ve indirgeyici bileşen olarak polifenol oksidaz üretim ortamına eklenen *p*-anisidine ile enzim üretiminin 2-10 kat arttığı rapor edilmiştir (Gigi *et al.*, 1980). Bu bilgi ışığında, gallik asit, koumarik asit, kafeik asit, *p*-kresol, L-dopa gibi değişik fenolik maddeler 1-3 mM konsantrasyon aralığında, ayrıca, çay özü ve yağ proses atık suyu gibi fenolik madde açısından zengin kaynaklar da %2 oranında kültür ortamına eklenmiştir. Ancak, sadece 3 mM gallik asitin enzim üretimini ciddi biçimde (%40) etkilediği görülmüştür (Şekil-5). Diğer fenoliklerin etkisi %20 civarında kalmıştır.



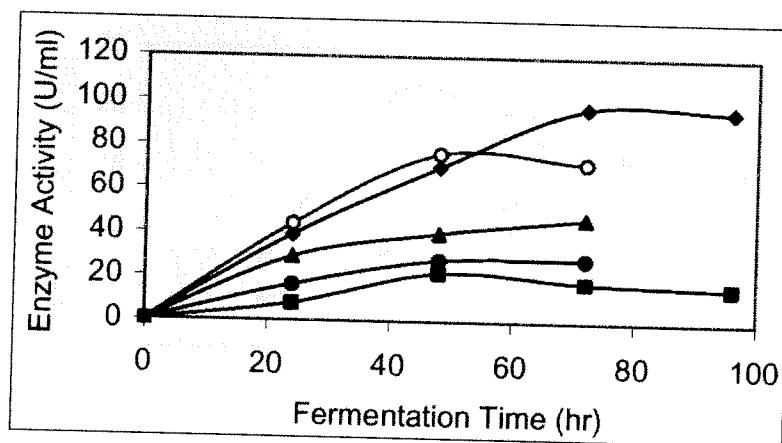
Şekil-5: Fenolik maddelerin polifenol oksidaz üretimine etkisi

Sıcaklığın polifenol oksidaz üretimine etkisinin incelenmesi için 40-55°C arasında fermentasyon çalışmaları yapılmıştır. Dört değişik sıcaklıkta (40,45,50 ve 55°C) yapılan deneyler sonucunda en yüksek enzim üretimine 50°C'de ulaşılmıştır (Şekil-6).



Şekil-6: Fermentasyon sıcaklığının polifenol oksidaz üretimine etkisi

Fermentasyon pH'ının enzim üretimine etkisinin incelenmesi ve optimum pH değerinin belirlenmesi için 7.0-9.0 pH aralığında fermentasyon deneyleri 3 litrelilik biyoreaktörde gerçekleştirılmıştır. Mikroorganizma her zaman kültür ortamının pH'ını düşürecek yönde etki gösterdiğiinden, kültür ortamının pH kontrolü için sadece NaOH kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarıyla kültür ortamından alınan örneklerdeki enzim aktivitesine bakılmıştır. Şekil 7'de de görüldüğü gibi, en yüksek enzim üretimi pH 8'de elde edilmiştir. pH 8.5'te enzim üretim miktarının fermentasyonun 2. gününe kadar pH 8'deki enzim üretim miktarına eşit olduğu gözlenmiştir. Ancak, fermentasyonun 2. gününden sonra düşüş saptanmıştır.

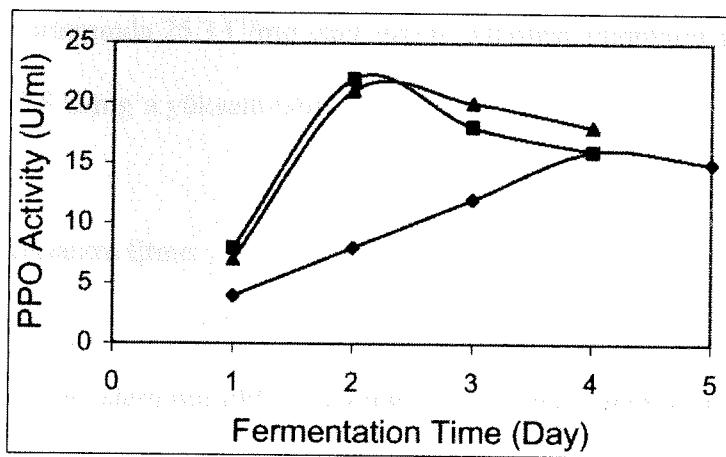


Şekil-7: Fermentasyon pH'ının enzim üretimine etkisi.

Fermentasyon ortamı: 1.4% maya özütu, 0.3% $MgSO_4$, 1% KH_2PO_4 , 0.003% $CuSO_4$, 0.032% gallik asit. Fermentasyonlar 3 L biyoreaktörde, 50 °C, 400 rpm, 80% çözünmüş oksijen konsantrasyonunda, değişen pH'larda (pH 7.0 (•), 8.0 (◆), 8.5 (○), 9.0 (▲) ve pH kontrolsüz (■) gerçekleştirilmiştir.

Literatüre bakıldığından, *Phanerochate chrysosporium* (Edward ve ark., 1998) ve *Trametes sp.* *Alternaria tenius* (Oyashiki ve ark., 1990, Motoda, 1998) fenol oksidazlarının asidikten nötrale, düşük pH değerlerine sahip olduğu görülmektedir. En yüksek enzim üretimine pH 8'de ulaşılan *Thermomyces lanuginosus*'un yüksek (alkali) pH değeri gerektiren koşullarda kullanılabilecek olması avantaj olarak göze çarpmaktadır.

Cözünmüş oksijen konsantrasyonun enzim üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla 3 L'lik biyoreaktörde %70-90 oksijen konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Şekil-8'den de görüldüğü gibi en yüksek enzim üretimi %80 çözünmüş oksijen konsantrasyonunda elde edilmiştir ancak %80 ile %90 değerleri arasında da fazla fark gözlenmemiştir.



Şekil-8: Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi

Fermentasyon ortamı: 1.4% maya özütü, 0.3% $MgSO_4$, 1% KH_2PO_4 , 0.003% $CuSO_4$, 0.032% gallik asit. Fermentasyonlar 3 L biyoreaktörde, 50 °C, 400 rpm, 80% çözünmüş oksijen konsantrasyonunda, değişen çözünmüş oksijen konsantrasyonlarında [70% (•), 80% (■), 90% (▲)] gerçekleştirılmıştır.

2.2. Polifenol Oksidazların Konsantre Edilmesi ve Saflaştırılması

Konsantre etme ve kısmi saflaştırma çalışmalarına kültür ortamının süzülmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla, 50°C sıcaklık ve 155 rpm çalkalama hızı koşullarında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen 4 günlük kültür ortamı, 14,000 x g'de 25°C'de 16 dakika santrifüj edilmiş ve Whatman No.1 filtre kağıdından süzülmüştür. Elde edilen filtrat amonyum sülfatla çöktürme, sükrozla konsantre etme ve ultrafiltrasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

2.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme

Oda sıcaklığında katı halde bulunan amonyum sülfat tuzu, 100 ml filtrata % 50-80 doygunluk düzeyi aralığında eklenmiş ve polifenol oksidazın çökme değerleri incelenmiştir. Sonuçta, en yüksek aktiviteye %80 doygunlukta ulaşılmıştır. Bu aşamada, yaklaşık 4 kat saflaştırmaya

ulaşılmıştır. Kültür ortamında 25.3 U/mg olan enzim aktivitesi amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra 97.5 U/mg'a yükselmiştir.

2.2.2. Sükrozla Konsantr Etme

Sükrozla konsantr etme işleminin PPO için yararlı olup olmadığı tespit edilmesi amacıyla 25 ml (0.25 mg protein/ml) süzülmüş kültür ortamı diyaliz tüpüne konmuş, doygun sükroz çözeltisinin içeresine yerleştirilmiş ve ortam hacmi yarıya düşene kadar karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra solüsyon diyaliz edilmiştir. Bu aşamadan sonra aktivite 25 U/mg'dan 80 U/mg'a yükselmiştir.

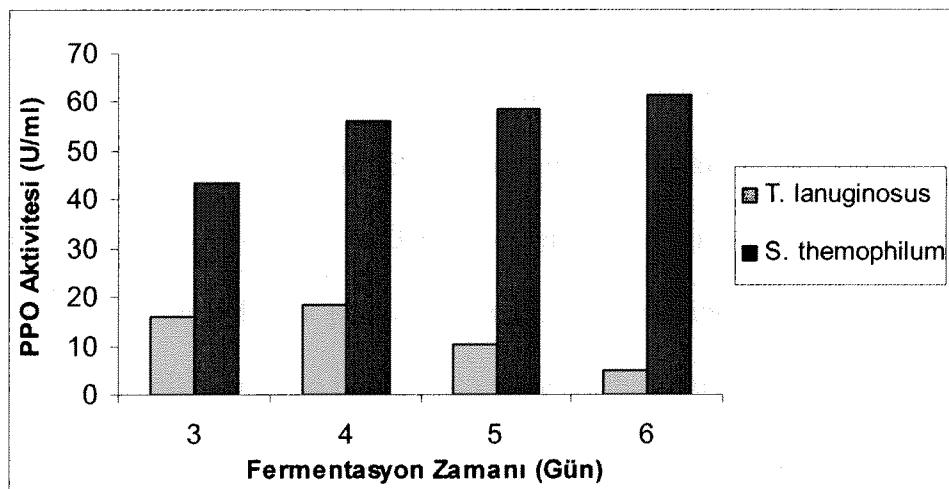
2.2.3. Ultrafiltrasyon

Fermentasyonun 3. ve 4. gününden alınan 50 ml ham özüt 10 ml kalana kadar filtre edilmiştir, bu sayede 5 kat konsantrasyona ulaşmıştır. Bu aşamada elde edilen konsantr özütte enzim aktivitesi 25 U/mg'dan 71 U/mg'a yükselmiştir.

Saflaştırma deneylerinin sonuçlarına göre, *T. lanuginosus* PPO aktivitesinin en çok arttığı yöntem amonyum sülfatla çöktürme yöntemidir. Bu yöntemi, sükrozla konsantrasyon ve ultrafiltrasyon teknikleri takip etmektedir. Ancak, sonuçlardan da görüldüğü üzere, elde edilen aktiviteler çok da farklı değildir.

2.2.4. Kolon Kromatografi

Kolon kromatografi deneyleri öncesinde *T. lanuginosus* ve *S. thermophilum* PPO üretimi performansları açısından karşılaştırılmış ve daha yüksek aktivite gösteren mikroorganizmanın enzimi ile saflaştırma çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, her iki mikroorganizmanın fermentasyonun 3, 4, 5 ve 6. günlerinde alınan örneklerdeki PPO aktiviteleri incelenmiş ve Şekil-9'da gösterildiği gibi tespit edilmiştir. Sonuca göre, *S. thermophilum* PPO aktivitesi *T. lanuginosus*'a oranla çok daha fazladır. Bu nedenle, kolon kromatografisi deneyleri *S. thermophilum* PPO ile gerçekleştirilmiştir.

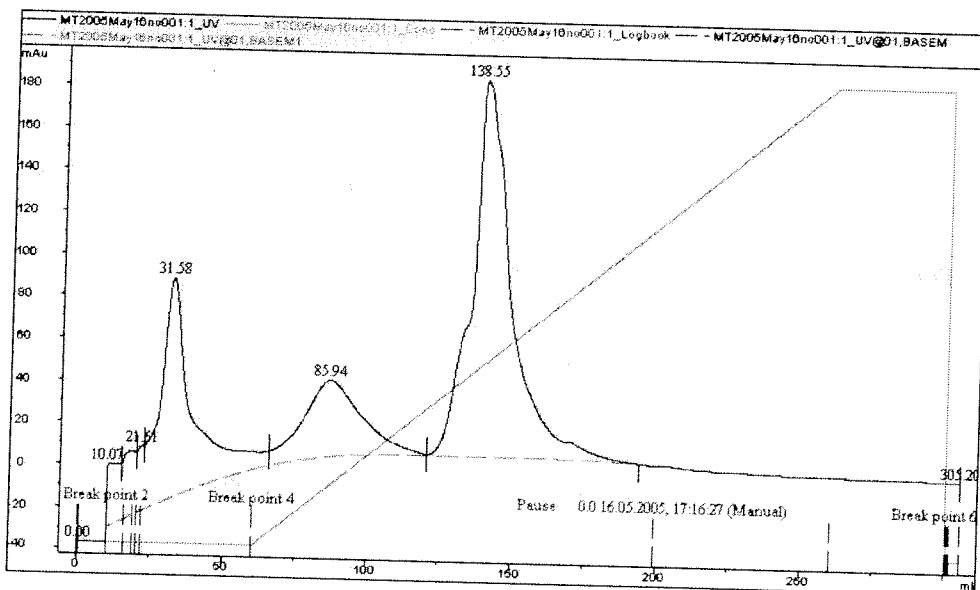


Şekil-9: *S. thermophilum* - *T. lanuginosus* PPO aktivitesi karşılaştırması

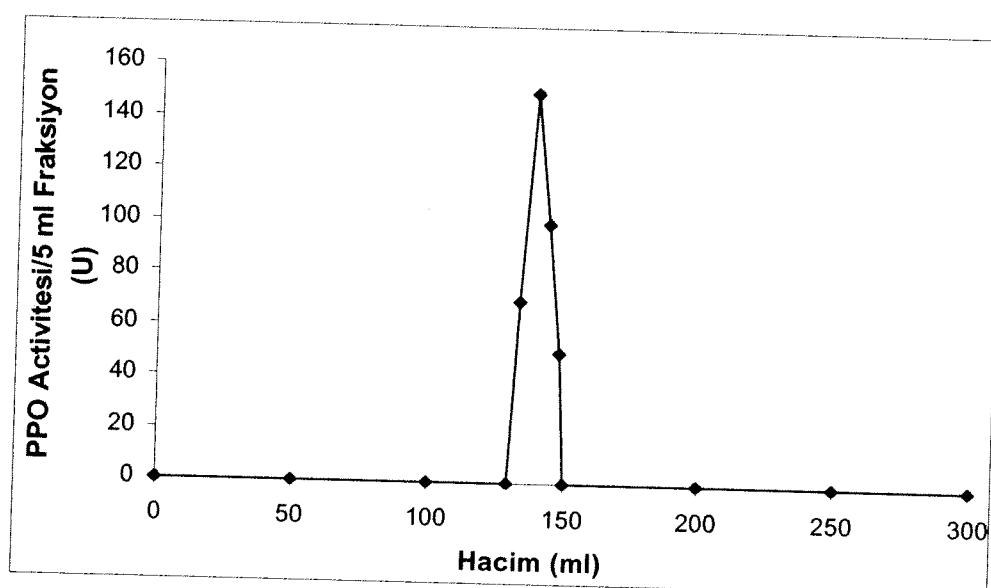
İki kromatografik yöntem; hidrofobik etkileşim ve anyon-değişim kromatografileri, *S. thermophilum* PPO saflaştırması için ÄKTA Prime FPLC (hızlı sıvı kromatografi) sisteminde test edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi oktil, fenil yüksek substrat bağlama ve fenil yüksek performans kolonları ile denenmiştir. Anyon-değişim kromatografisi ise HiPrep 16/10 Q XL kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Oktıl test kolonu pH 7'de 2, 3 ve 4M NaCl ile, fenil yüksek substrat bağlama kolonu ise pH 72de 3M NaCl ile denenmiştir. Belirtilen deneysel koşullarda kolona PPO bağlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumda, oktil ve fenil yüksek substrat bağlama kolonlarının *S. thermophilum* PPO saflaştırması için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Fenil yüksek performans (HP) kolonu iki değişik tuz, amonyum sülfat ve sodyumklorür kullanılarak test edilmiştir. Bu kolonda pH 7'de 3 ve 4M amonyum sülfat ve pH 6.5, 7 ve 7.5'ta sırasıyla 2, 2-3-4 ve 4M NaCl ile çalışılmıştır. Ancak bu kolonla da belirtilen şartlarda PPO saflaştırma için güzel sonuçlar elde edilememiştir.

Bir sonraki aşamada iyon-değişim kromatografisi kullanılmıştır. Daha önceki çalışmada (Mete, 2003) *S. thermophilum* PPO için izoelektrik nokta belirlemesi yapılmış ve 5.4 olarak tespit edilmiştir. Bu bilgiden hareketle, pH 8'de çalışacak anyon-değişim kromatografisi denenmesi uygun görülmüştür. Bu amaçla HiPrep 16/10 Q XL kolon kullanılmıştır. 1M NaCl ile yapılan denemeler sonucu kolondan 3 ana protein piki çıktıgı gözlemlenmiştir. Şekil-10'da da gösterildiği gibi, elde edilen ilk pik kolona örnek yüklenmesinden hemen sonra gözlemlenmiştir. Bu pikte bulunan proteinler, kolona hiç bağlanmadan çıkan ve yüklenen toplam proteinin %32'lik kısmını oluşturan proteinlerdir. İlk pikte hiç PPO aktivitesi bulunmamıştır. İkinci protein pikinde toplam yüklenen proteinin %16'sı kolondan çıkmıştır ve yine PPO aktivitesi gözlenmemiştir. Üçüncü pikte toplam proteinin %52'lik kısmı çıkmış, bu proteinlerin ise %80'lik kısmı PPO aktivitesi göstermiştir (Şekil-11). Sonuç olarak, iyon-değişim yöntemiyle, yüklenen toplam PPO aktivitesi %93 verimle kolondan alınmış ve 2.2 kat saflaştırmaya ulaşılmıştır.



Şekil-10: *S. thermophilum* PPO iyon-değişim kromatografisi kromatogram sonucu

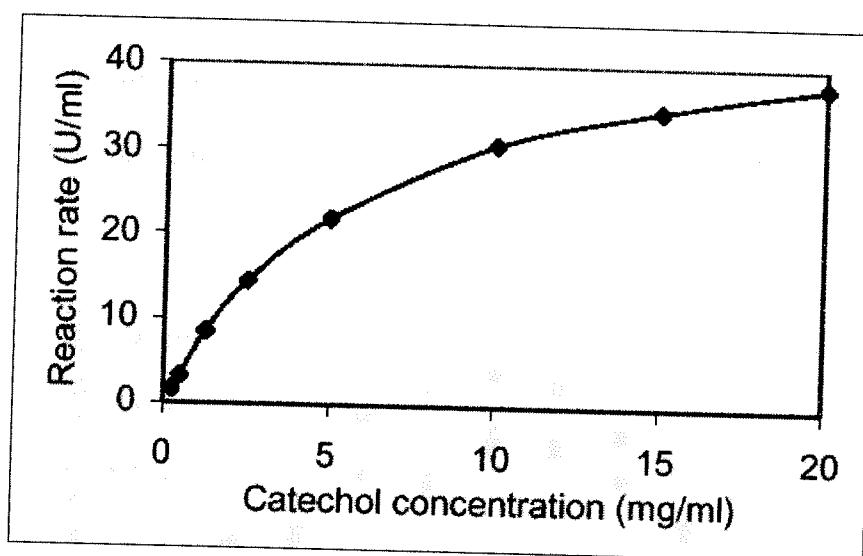


Şekil-11: *S. thermophilum* PPO iyon-değişim kromatografisi aktivite sonucu

2.3. Polifenol Oksidazların Karakterizasyonu

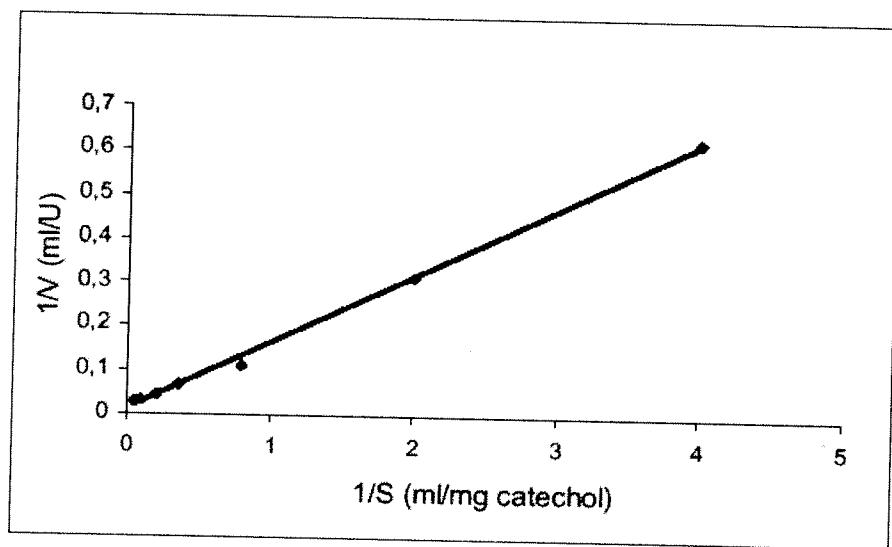
Karakterizasyon çalışmaları kapsamında fenol oksidazın kinetik incelemesi yapılmış, sıcaklık ve pH'in enzim aktivitesi ve stabilitesine etkisi incelenmiş, enzimin tipi, moleküler ağırlığı ile izoelektrik noktası tespit edilmiştir.

T. lanuginosus polifenol oksidazının kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi amacıyla 0.25-20 mg/ml konsantrasyon aralığında katekol kullanılarak başlangıç reaksiyon hızları bulunmuştur. Şekil-12'de görüldüğü gibi, bulunan reaksiyon hızları substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu görülmüştür.



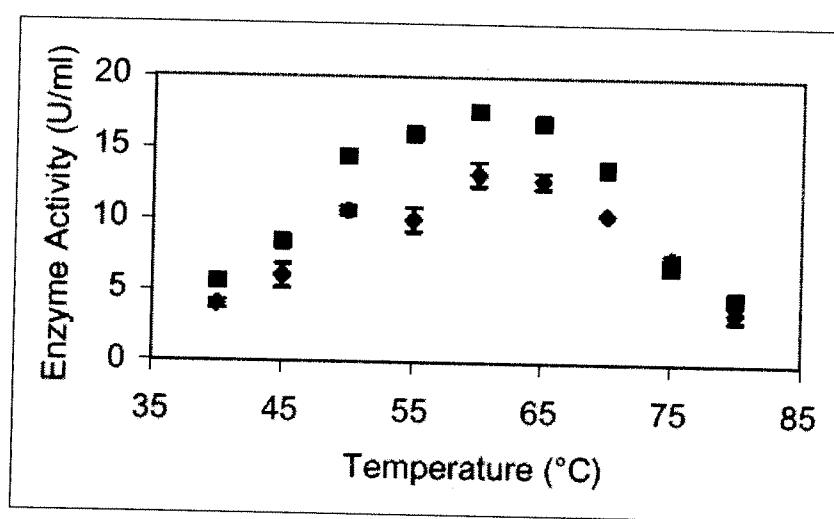
Şekil-12. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının Michaelis-Menten grafiği

Kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için $(\text{reaksiyon hızı})^{-1}$ ($\text{substrat konsantrasyonu}^{-1}$), a karşı çizilerek Lineweaver-Burk grafiği (Şekil-13) oluşturulmuştur. Grafikten K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 5 mg/ml ve 38 U/ml olarak tespit edilmiştir.



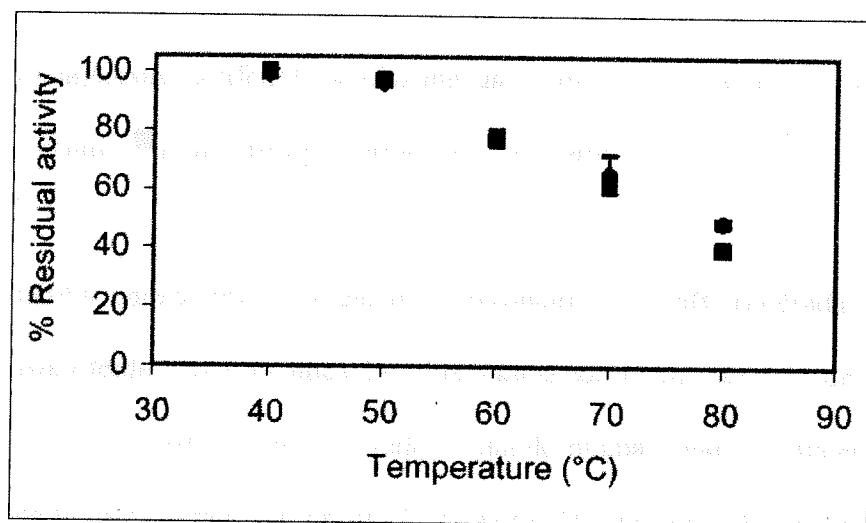
Şekil-13. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının Lineweaver-Burk grafiği

Sıcaklığın *T. lanuginosus* poli fenol oksidaz aktivitesine etkisinin belirlenebilmesi için 50 ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda çalışılmıştır. Şekil 14'te görüldüğü gibi, en yüksek aktivite 60°C'de gözlemlenmiştir.



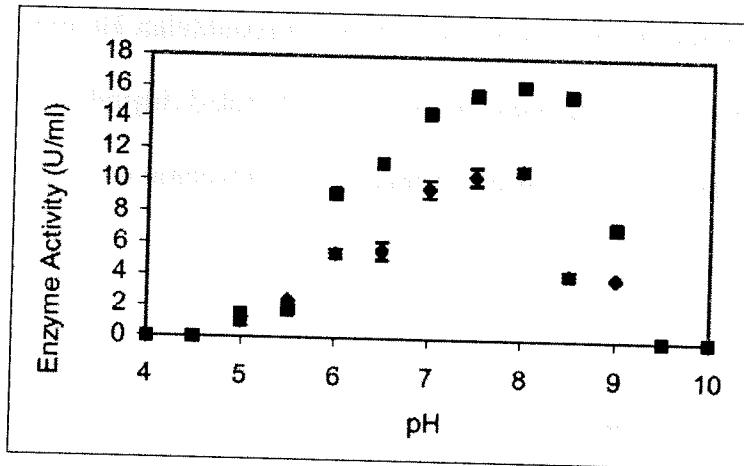
Şekil-14. Sıcaklığın *T. lanuginosus* polifenol oksidazının aktivitesine etkisi: (♦) saflaştırılmamış fermentasyon ortamı, (■) saflaştırılmış fermentasyon ortamı.

Enzimin termostabilitesinin tayini içinse enzim solüsyonu 200 mM pH 7 fosfat tamponuyla 1, saat boyunca 40 ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Şekil-15'te görüldüğü gibi, saflaştırılmış ve saflaştırılmamış enzimler 50°C'de aktivitelerinin %97'sini korumuşlardır. Saflaştırılamamış enzimin saflaştırılmış \square rilli \square ril daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. 60°C'de ise enzim aktivitesinin %78 oranında korunduğu saptanmıştır. Ancak, saflaştırılmış enzimin 80°C'de aktivitesinin %70'ini kaybettiği göze çarpmaktadır.



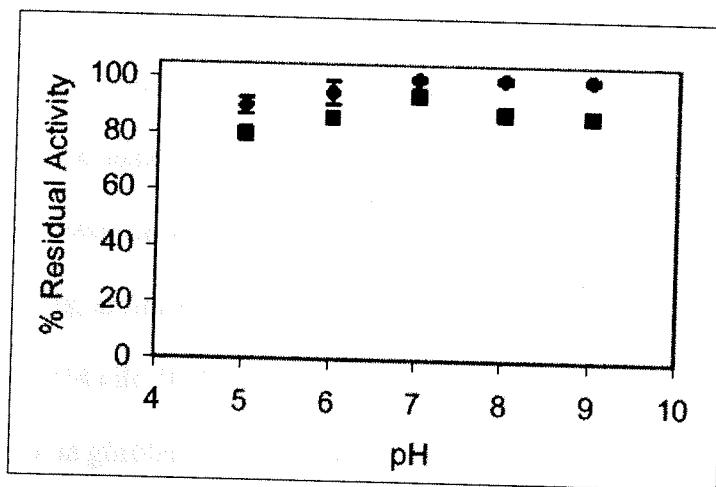
Şekil-15. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının termostabilitesi: (●) saflaştırılmamış fermentasyon ortamı, (■) saflaştırılmış fermentasyon ortamı.

T. lanuginosus poli fenol oksidaz aktivitesine pH etkisinin belirlenebilmesi için 4 ile 10 arasında değişen pH değerlerinde çalışılmıştır. Şekil-16'da görüldüğü gibi, en yüksek aktivite pH 8'de gözlemlenmiştir.



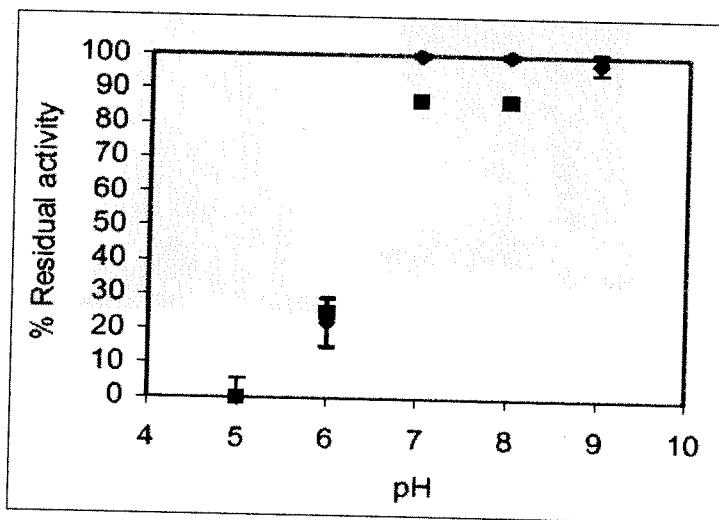
Şekil-16. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının aktivitesine pH etkisi: (♦) saflaştırılmamış fermentasyon ortamı, (■) saflaştırılmış fermentasyon ortamı.

Enzimin pH stabilitesinin tayini içinse enzim solüsyonları 5 ile 9 pH aralığında değişik 200 mM tampon çözeltilerde 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. Şekil-17'de görüldüğü gibi, saflaştırılmış ve saflaştırılmamış enzimler 1 saatlik inkübasyondan sonra en fazla %20'lik aktivite kaybına uğramışlardır. pH 7'de enzim aktivitesinin %97 oranında korunduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre, enzimlerin oldukça stabil oldukları söylenebilir.



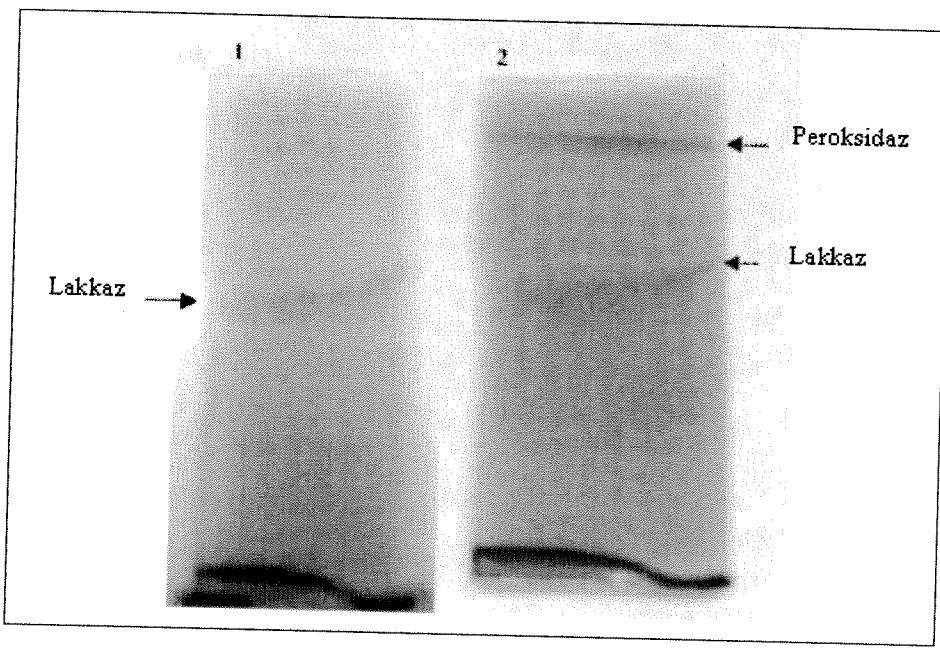
Şekil-17. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının pH stabilitesi: (♦) saflaştırılmamış fermentasyon ortamı, (■) saflaştırılmış fermentasyon ortamı.

Enzimin uzun zamanlı pH stabilitesinin tayini içinse solüsyonlar 18 saat boyunca değişik pH değerlerinde inkübe edilmiştir. Şekil-18'den de görüldüğü gibi pH 7, 8 ve 9 değerlerinde enzimler aktivitelerini %80 oranında korumuşlardır. Ancak, pH 5 ve 6'da aktivitelerinin %60'ını kaybetmişlerdir.



Şekil-18. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının uzun zamanlı pH stabilitesi: (●) saflaştırılmamış fermentasyon ortamı, (■) saflaştırılmış fermentasyon ortamı.

Thermomyces lanuginosus polifenol oksidazları farklı tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla SDS-poliakrilamat jeliyle elektroforetik olarak ayırtırılmıştır. Üç temel grup olan fenol oksidazlar; lakkaz, peroksidaz ve katekol oksidaz, ayırtırma sonrası aktivite boyaması yöntemiyle tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, jel 5 dakika oda sıcaklığında pH 7 fosfat tamponunda bekletilmiş, ardından lakkaz aktivitesinin belirlenebilemesi için 25 mM 4-amino-N-N-dietilenalenin (ADA) ile 50°C'de inkübe edilmiştir. 5 dakikalık inkübasyon süresi sonunda Şekil-19a'da da görülen lakkaz bandı gözlemlenmiştir. Aynı jel peroksidaz aktivitesinin tespiti için 10 mM H₂O₂'de bekletilmiş ve Şekil-19b'de görülen peroksidaz bandı gözlemlenmiştir.

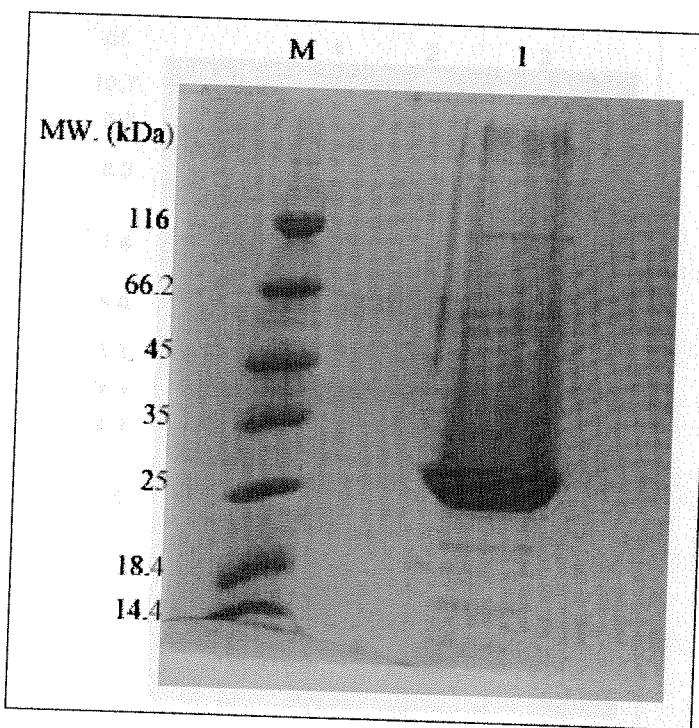


Şekil-19. *T. Lanuginosus* lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri: (a) ADA (b) H_2O_2 ile aktivite boyaması

Katekol oksidaz aktivitesinin tayini için jel 25 mM 4-butyl-catechol ile aktivite boyamasına tabi tutulmuş ancak herhangi bir bant oluşumu gözlenememiştir.

Gözlemlenen lakkaz jelen elektroforetik olarak geri kazanılmış, enzimin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasının belirlenmesinde kullanılmıştır.

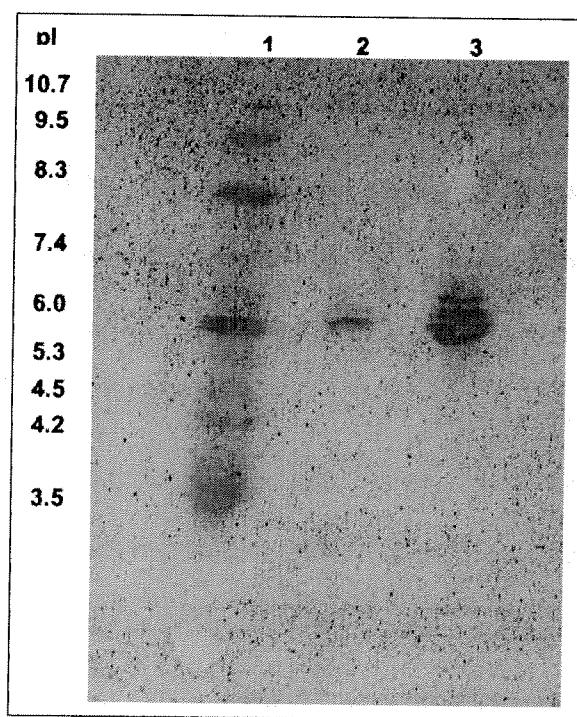
Aktivite boyaması sonrası jelen geri kazanılan fenol oksidazın hacmi membran konsantratör kullanılarak 3 ml'den 0.1 ml'ye indirilerek konsantre edilmiş ve molekül ağırlığı tayini için SDS-PAGE yönteminde kullanılmıştır. Elde edilen jel koması parlak mavi ile boyanmış ve Şekil-20'den de görüldüğü gibi enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 29 kDa olarak tespit edilmiştir.



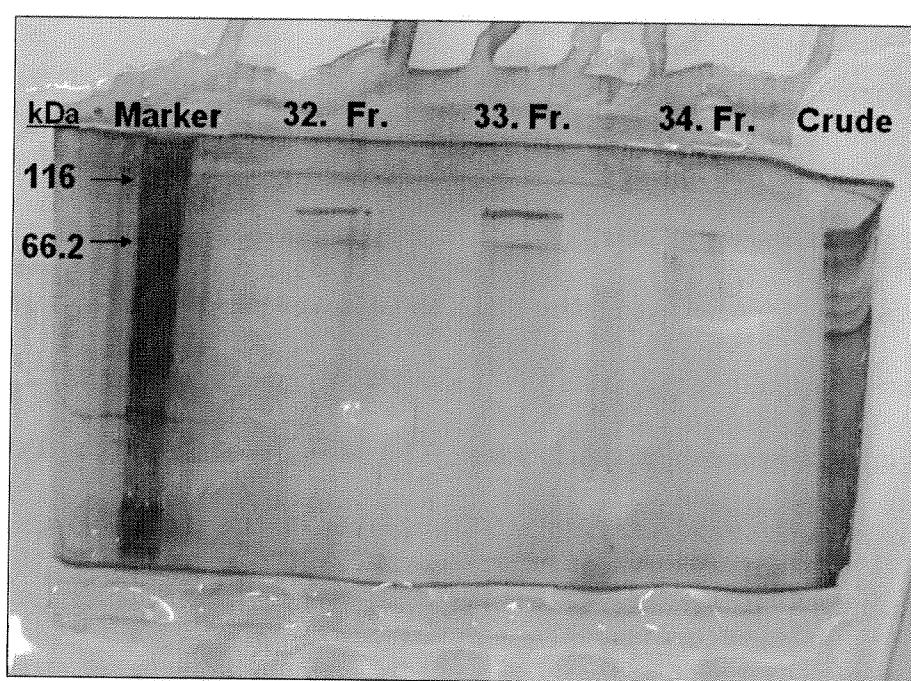
Şekil-20. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının SDS-PAGE sonucu. M: Marker proteinler, I: Polifenol oksidaz

İzoelektrik noktası tayini pH 3 ile 10 arasında değişen amfolitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Coomassie brilliant blue ile boyanan jelden (Şekil-21) fenol oksidazın izoelektrik noktası 6 olarak tespit edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında anyon-değişim kromatografisiyle saflaştırılmış olan *S. thermophilum* PPO molekül ağırlığı tayini de yapılmıştır. SDS-PAGE yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmada, kolondan alınan PPO aktivitesi içeren üç fraksiyon poliakrilamat jelde yürütülmüş ve sonuçta Şekil-22'den de görüldüğü gibi, *S. thermophilum* PPO molekül ağırlığı yaklaşık 90 kDa olarak tespit edilmiştir.



Şekil-21. *T. lanuginosus* polifenol oksidazının izoelektrik nokta incelemesi sonucu. M: Marker proteinler, 1 ve 2: Değişik konsantrasyonda saflaştırılmış (sırasıyla 0.02 ve 0.2 mg/ml) polifenol oksidaz.



Şekil-22. *S. thermophilum* polifenol oksidazının SDS-PAGE sonucu.

3. SONUÇ

Proje kapsamında, termofilik bir küf olan *Thermomyces lanuginosus*'un (IMI-84400 suçu) hücre dışı polifenol oksidaz üretimi incelenmiştir. En yüksek polifenol oksidaz üretim koşullarının tespiti için farklı karbon ve azot kaynakları denenmiştir. Ayrıca, fermentasyon ortamına eklenen bakırın ve değişik fenolik maddelerin üretime etkisi de incelenmiştir. Karbon kaynağı olarak selüloz, glikoz, sükroz, fruktoz ve xyloz denenmiş, kullanılan tüm karbon kaynakları hiç karbon kaynağı kullanılmayan duruma göre daha düşük bir aktiviteye neden olmuştur. En yüksek aktivite, karbon kaynağı kullanılmayan kültür ortamında 4. günde gözlenmiştir. Farklı azot kaynağı olarak organik (maya özütü, kazein+pepton) ve inorganik (sodyum nitrat, amonyum sülfat) kültür ortamına eklenmiş, en yüksek enzim üretimi %1.5 maya özütünün kullanıldığı fermentasyonun 4. gününde elde edilmiştir. Polifenol oksidazların aktif bölgelerinde bakır bulunması nedeniyle bakırın fermentasyon ortamına eklenmesinin üretimi artıracığı düşünülmüş ve bu amaçla 0-80 ppm konsantrasyon aralığında bakır sülfat denenmiştir. Bakır sülfat konsantrasyonunun 30 ppm'e kadar artırılması enzim üretimini attırmış ancak 30-80 ppm arasında eklenmesi üretimi azaltıcı yönde etki yapmıştır.

İndükleysici olarak kullanılabilcekleri düşünülen gallik asit, koumarik asit, kafeik asit, *p*-kresol, l-dopa gibi değişik fenolik maddeler, ayrıca, çay özütü ve yağ proses atık suyu gibi fenolik madde açısından zengin kaynaklar da kültür ortamına eklenmiştir. Ancak, sadece 3 mM gallik asitin enzim üretimini ciddi biçimde (%40) etkilediği görülmüştür. Enzim için en uygun sıcaklık ve pH değerleri sırası ile 60°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir. Enzim 80°C de 1 saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %67 sini, pH 9 ve oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon sonrasında da aktivitesinin %87 sini koruduğu gözlenmiştir. Biyoreaktör çalışma parametreleri de optimize edilmiş, en yüksek enzim üretimi pH 8 ve %80 çözünmüş oksijen konsantrasyonunda elde edilmiştir.

T. lanuginosus polifenol oksidazı amonyum sülfatla çöktürme, sükrozla konsantr etme ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edilmiş, enzimin moleküler ağırlığı 29 kDa ve izoelektrik noktası da 6.0 civarında tespit edilmiştir. Yine termofilik bir küp olan *S. thermophilum*'un *T.laniginosus*'a oranla daha yüksek polifenol oksidaz ürettiği tespit edilmiş ve bu nedenle *S. thermophilum* polifenol oksidazı, anyon-değişim kromatografi yöntemiyle 2.2 kat saflaştırılıp karakterize edilmiştir. *T.laniginosus* polifenol oksidazı aktivite boyamasıyla lakkaz olarak tespit edilmiştir. *S. thermophilum* polifenol oksidazının ise ABTS, siringaldazin gibi bazı lakkaz-spesifik substratları okside etmediği laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda saptanmıştır (Yüzügüllü, MS). Bu nedenle *S. thermophilum* polifenol oksidazının *o*-difenolik maddelerin oksidasyonunu katalizleme yetisine sahip katekol oksidaz olduğu düşünülmektedir. *S. thermophilum* polifenol oksidazının moleküler ağırlığı yaklaşık 90 kDa olarak bulunmuştur.

Her iki mikroorganizmayla üretilen polifenol oksidazlar termofilik olmaları nedeniyle endüstriyel prosesler için avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, enzimlerin hücre dışı üretimi de dikkate değer bir özelliktir. Enzimin ilk biyoreaktör çalışmaları gerçekleştirilmiş, daha yüksek skala da çalışılması için gerekli önbilgi elde edilmiştir. Endüstriyel üretimden sonra saflaştırma için sulu-2-faz yöntemi uygun bir metod olarak düşünülmektedir. Farklı substrat seçicilikleri tespit edilmiş *T.laniginosus* ve *S. thermophilum* polifenol oksidazlarının bu özellikleriyle, bünyesinde çok farklı tipte fenolik maddeler bulunduran zeytin yağı fabrikası gibi fabrikaların endüstriyel atık sularından fenolik gidermede kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 248-254, (1976).

Dixon M., Webb E.C., Thorne CJR ve Tipton K.F, *Enzymes*, ed. Longman, (1979).

Edward W, Bownes R, Leukes W.D, Jacobs E .P, Sanderson R, Rose P.D, Burton S.G., A capillary membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols industrial effluents, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 24, 209-217, (1999).

Edwards W., Leukes W.D., Rose PD., Burton S.G., Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 25, 769-773, (1999).

Gigi, O., Marbach, I., Mayer, A., Induction of laccase formation in *Botrytis*", *Phytochemistry*, Vol. 19, 2273-2275, (1980).

Greco, G, Toscanoa G, Cioffi M, Gianfreda L and Sannino F., *Wat. Res.*, Vol. 33, 3046-3050, (1999)

Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, Vol. 227, 680-685, (1970).

Maria, A., Galeazzi, M., Valdemo, C., Garbieri, S., Spiros, M., Isolation, purification and physicochemical properties of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana, *Journal of Food Science*, Vol.46, 150-155, (1981).

Mete, S., *Scytalidium thermophilum polyphenol oxidase: production and partial characterization*, (Yüksek Lisans Tezi), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2003).

Motoda, S., Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Trametes sp.*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* , Vol. 87, 137-143, (1998).

Osuga D., Van der Schaaf, A. ve Whitaker, J.R. , In Protein structure-function relationships in foods. Yada R.Y., Jackman R.L. ve Smith J.L. Edt. 62-88, (1994).

Oyashaki H., Uchida, M., Takayama, T., Akira, O., Oka, S., Screening for strains of *Aspergillus oryzae* that degrade carbamide for use in sake brewing, *Journal of Fermentation and Bioengineering* , Vol. 71, 126-127, (1990).

Rescigno, A., Sanjust, E., Montanari, L., Sollai, F., Soddu, G., Rianldi, A.C., Detection of laccase, peroxidase and polyphenol oxidase on a single polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Letters*, Vol. 30, 2211-2220, (1997).

Schwimmer S. Sourcebook of food enzymology, the AVI comp., 267-297, (1981)

Whitaker, J.R. in: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 543-556, Marcel Dekker, 2nd edt., (1994).

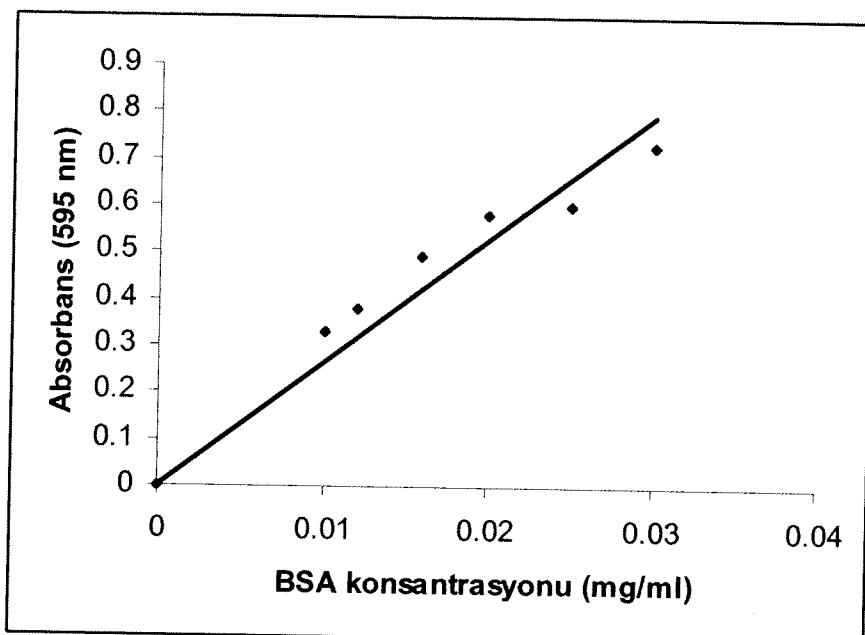
EK - A

BSA (bovine serum albumin) kullanılarak protein standart grafiği elde edilmiştir. Bu amaçla 10 mg/ml BSA stok solüsyonu hazırlanmış ve Tablo-1'de verilmiş olan oranlarda seyreltilerek 0-0.03 mg/ml konsantrasyon aralığında BSA çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo-A1 : BSA ile standart protein grafiği seyreltme oranları

Tüp No	1	2	3	4	5	6	7
BSA (μ l)	0	200	240	320	400	500	600
dH ₂ O (μ l)	2000	1800	1760	1680	1600	2500	1400

Alınan 2 ml BSA çözeltisinin üzerine 2 ml Bradford solüsyonu eklenip karıştırıldıktan 10 dakika sonra, örneğin absorbansı 595 nm'de okunmuş ve protein standart grafiği hazırlanmıştır (Şekil-A1).



Şekil-A1: Bradford protein standart grafiği