

PAPER DETAILS

TITLE: Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Parametre Etkilerinin UV Spektrofotometre ile
Yerinde Analiz Edilmesi

AUTHORS: Ilker Polatoglu

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/221114>

Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Parametre Etkilerinin UV Spektrofotometre ile Yerinde Analiz Edilmesi

İlker Polatoğlu*

Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 45140 Manisa,
ilker.polatoglu@cbu.edu.tr

*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş: 13 Haziran (June) 2016

Kabul: 14 Ağustos (August) 2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.18466/cbujos.13757>

Özet

Birçok uygulama alanına sahip tirozinaz enziminin etkinliğini arttırmaya yönelik olarak bu çalışmada tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etki eden karıştırma hızı, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu gibi reaksiyon parametreleri UV spektrofotometre ile yerinde analiz edilmiştir. Enzim aktivitesi enzimatik o-kuinon ürününün 390 nm de verdiği absorpsiyon değerine bağlı olarak hesaplanmış ve kinetik parametreler (V_m ve K_m) Michealis Menten model denklemi kullanılarak bulunmuştur. Yerinde analiz yöntemi ile tirozinaz enzim aktivitesinin nukleofilik ajan kullanımına gerek kalmadan doğru bir şekilde tespit edilebileceği reaksiyon ortamının reaksiyon öncesi ve sonrası tarama profillerinden ve enzimatik o-kuinon ürününün zamanla oluşum grafiğinden anlaşılmıştır. 300 dev/dk karıştırma hızının yeterli olduğu, daha yüksek karıştırma hızlarında aktivitenin değişmediği ve bu eğilimin tüm enzim konsantrasyonlarında aynı olduğu sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri 7.4 olarak saptanmış ve asidik pH değerlerine nispeten bazik pH değerlerine gidildikçe enzimin aktif gruplarındaki yapısal değişimlerden dolayı aktivitede daha fazla bir azalma olduğu görülmüştür. Enzimin en aktif olduğu sıcaklık 50 °C olarak tespit edilirken bu sıcaklıktan sonra enzim yapısı bozunduğundan aktivitede azalma gözlemlenmiştir. Deneysel veriler Michealis Menten model denklemi ile yüksek korelasyon (%99) göstermiştir. Maksimum hız (V_m) ve Michealis sabiti (K_m) sırası ile 1.046 $\mu\text{mol/dk}$ ve 0.228 mM olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak tirozinaz enzim aktivitesi üzerine reaksiyon parametre etkilerinin UV spektrofotometre kullanılarak yerinde tayin edilmesi, enzim inhibisyon mekanizmasını temel alan ve fenolik bileşiklerin, tarım ilaç kalıntılarının, patojenlerin ve GDO tespiti için geliştirilen enzimatik biyosensörlerin etkinliklerinin artırılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler — Michaelis sabitleri, pH, Sıcaklık, Karıştırma Hızı, Tirozinaz enzimi, UV spektrofotometre.

In-situ Analysis of Reaction Parameter Effects on Tyrosinase Enzyme Activity by UV Spectrophotometer

Abstract

In this study the effect of reaction parameters such as stirring speed, pH, temperature and substrat concentration on tyrosinase enzyme activity were analyzed in-situly by UV spectrophotometer with the aim of increasing the efficiency of tyrosinase enzyme activity having huge number of application area. Enzyme activity was evaluated depending on absorbance of o-quinone at 390 nm and kinetic parameters (V_m and K_m) were found by using the Michealis Menten model equation. The ability to accurate determination of tyrosinase enzyme activity without using nucleofilic reagent by in-situ methot was understood from scanning profiles of reaction medium before and after the reaction and diagram of enzymatically produced o-quinone with time. It is concluded that 300 RPM stirring speed is sufficient, no change in activity at higher stirring speed and this trend is the same for all enzyme concentrations. The maximum enzyme activity was detected at pH:7.4 and high decrease in enzyme activity was observed towards basic pH condition with

respect to acidic ones due to structural change in enzyme active sites. While the temperature at which the enzyme most active is detected as 50 °C, the decrease in enzyme activity above that temperature was observed due to denaturation of enzyme structure. Experimental values shows high correlation (99 %) with Michealis Menten model equations. Maximum velocity (V_m) and Michealis constant (K_m) were calculated as 1.046 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 0.228 mM. Consequently in-situ analysis of reaction parameter effects on tyrosinase enzyme activity by UV spectrophotometer will contribute to increase in the efficiency of enzymatic biosensor developed for determination of phenolic compounds, pesticides, pathogens and GMO based on enzyme inhibition mechanism.

Keywords — Michaelis constants, pH, Temperature, Stirring Speed, Tyrosinase enzyme, UV spectrophotometer

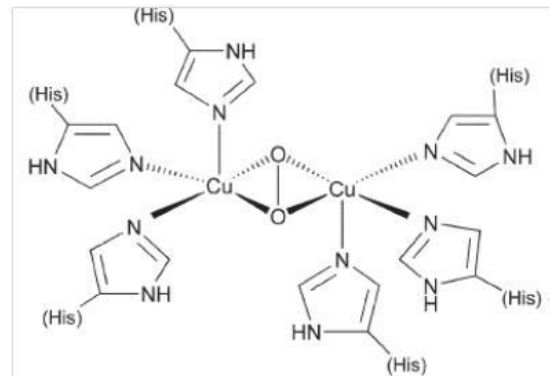
1 Giriş

Tirozinaz enzimi çift çekirdekli bakır kümeleri içeren polifenoloksidaz enzimlerinin önemli bir üyesidir. Şekil 1 de gösterildiği gibi enzimin aktif bölgesindeki histidin aminoasidi içeren altı adet nitrojen atomu ile çevrelenmiş bir çift bakır atomu moleküler oksijen ile etkileşim halindedir [1, 2]. Bu enzim ilaç sanayinde, melanom hastalığının tedavisinde, fenolik bileşiklerin zehirli etkilerinin giderilmesinde, fenolik bileşiklerin, tarım ilaç kalıntılarının, patojenlerin ve GDO tespiti için enzimatik sensorlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde, hayvanlarda ve diğer organizmalarda melanin sentezindeki esmerleşme reaksiyonlarında görev alırlar [3-6]. Mantardan izole edilen tirozinaz enzimi 120 kDa molekül ağırlığında olup izoelektrik noktası 4.5 dir. Bu nedenle pH 4.5'in üzerinde olan ortamlarda tirozinaz enzimi negatif yüke sahip olur. Enzimin en aktif olduğu pH değerleri 4 ile 8 aralığındadır [7-9].

Enzimin doğası, substratın konsantrasyonu, pH, sıcaklık, organik çözücüler, ağır metaller ve diğer fiziksel ve mekaniksel dış etkenler (reaksiyon ortamını karıştırma hızı) enzim aktivitesi üzerine etki eden önemli parametrelerdir [10, 11].

Enzimler ortam pH'ına göre protone olan ya da olmayan çok sayıda polar aminoasit grupları içerir. Ortam pH'ında meydana gelecek herhangi bir değişim enzimin aktif bölgesindeki yük dağılımını da kontrol eder. Bu durum enzimin konformasyonunu değiştirerek, substratın enzime bağlanmasını dolayısı ile reaksiyon hızını etkiler. Bunun gibi sıcaklıkta enzimlerin aktivitesini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Elverişsiz pH ve sıcaklık koşulları enzimin enzim aktif bölgesindeki yapılanmayı bozarak enzimin biyolojik aktivitesini azaltabilir ya da yok eder [9, 10, 12]. Reaksiyon

ortamının karışım hızı, iç ve dış kütle transfer dirençlerini belirleyen diğer önemli bir parametredir. Maksimum hız (V_m) ve Michaelis sabiti (K_m) gibi reaksiyon hakkında önemli bilgiler veren kinetik parametreler Michaelis-Menten denklemlerini kullanarak hesaplanmaktadır ki bu denklemin uygulanabilmesi bahsi geçen kütle transfer dirençlerini minimize etmekle olur [13]. Herhangi bir destek malzemeye tutturularak hazırlanan filmlerin kullanıldığı bir enzimatik reaksiyondaki kütle transfer katsayısının karıştırma hızına bağlı olduğu Cussler tarafından [14] geliştirilen deneysel bir denklemlerle açıkça ifade edilmiştir. Özellikle dış kütle transfer direncini minimize etmenin yolu ortamın iyi bir şekilde karıştırılması ile mümkün olur [15]. Dolayısı ile yüksek enzim aktivitesi elde etmek için, ortam pH'ı, sıcaklık, karıştırma hızı, substrat konsantrasyonu gibi parametrelerin kontrol edilerek optimize edilmesi gerekmektedir.



Şekil 1. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi.

Tirozinaz enzim aktivitesini birkaç metatla tespit etmek mümkündür. Bunlar

- Enzimatik ürün olan o-kuinonu yakalıyarak kromatografik bileşenler oluşturan nükleofilik ajanlar kullanmak

• Askorbik asit gibi indirgenme ajanlarının enzimatik ürün olan o-kuinonlar la oksidasyonu sonucu azalan miktarlarını ölçmek

• Oksijen tüketimini ölçmek

• Doğrudan enzimatik o-kuinon ürününün miktarını ölçmek

O-kuinonlar hidroksi fenollerin tirozinaz enzimi ile katalizlenmesi sonucu ortaya çıkan enzimatik bir üründür [16]. Doğrudan enzimatik o-kuinon ürününün miktarını ölçmek bahsi geçen ölçüm metodları arasında en hızlı, pratik ve doğru olanıdır [9]. Ancak bu metoddaki tek engel enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan reaksiyon başlangıç hızının çok kısa bir süre için doğrusal devam ediyor olmasıdır. Bunun nedeni o-kuinonların enzimatik olmayan reaksiyonlarla çabucak parçalanmasıdır [17]. Dolayısı ile tirozinaz enzim aktivitesini kısa bir sürede enzimatik o-kuinon ürününün miktarını ölçme metodu ile saptamak gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Geniş bir uygulama alanına sahip olan bu enzimin hızlı ve doğru bir şekilde aktivite tayininin yapılması özellikle enzim inhibisyon mekanizmasını temel alan enzimatik biyosensörlerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı ortam karıştırma hızı, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu gibi parametrelerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini UV spektrofotometre ile yerinde tayin ederek enzimin uygulama alanlarındaki etkinliğini arttırmaktır..

2 Materyal ve Metot

2.1 Materyal

Enzim olarak mantar kökenli tirozinaz (T3824), substrat olarak kateşol (C9510) Sigma Aldrich firmasından, tampon çözelti hazırlamak için di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve sodyum-dihidrojen fosfat monohidrat Merck firmasından temin edilmiş ve kullanılmıştır. Tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında ultrasaf su dan (18.2 MΩ) yararlanılmıştır. Enzim aktivitesi UV görünür spektrofotometre kullanılarak (Thermo Scientific (Evolution 201) tayin edilmiştir.

2.2 Metot

50 mM sodyum hidrojen fosfat (pH: 9.3) ve sodyum-dihidrojen fosfat monohidrat (pH: 4.4) çözeltileri pH: 6.5 olacak şekilde birbirleri ile karıştırılmış ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) elde edilmiştir. Bu pH değerindeki tampon çözelti, Michaelis sabitlerinin (V_m

ve K_m) bulunmasında, enzimatik reaksiyonun karakterizasyonu çalışmalarında, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi parametrelerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Toz formundaki tirozinaz enzimi (7.9 mg) 3 ml PBS (pH: 6.5, 50 mM) içerisinde çözündürülerek sıvı hale getirilmiştir ve bu stok çözelti gerektiği zamanlarda kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmiştir. Kateşol stok çözeltisi 2 mM olarak pH:6.5 teki PBS içerisinde hazırlanmış ve seyreltilerek kullanılmıştır.

Tüm enzimatik ölçümler 3 ml kuartz küvet içerisinde peltier sistem (karıştırma ve sıcaklık kontrolü sağlayan bir sistem) kullanılarak tayin edilmiştir. Öncelikle 250-750 nm dalga boylarında reaksiyon öncesi (ortamda sadece kateşol varken) ve reaksiyon başlatıldıktan 3 dk sonra bir tarama yapılmış ve bu sayede kateşolün ve oluşan o-kuinon ürününün maksimum absorbans verdiği dalga boyları tespit edilmiştir. Bu tarama ile aynı zamanda muhtemel enzimatik olmayan reaksiyonların seyri de takip edilebilmiştir. Enzim aktivitesi, belli bir sıcaklıktaki reaksiyon ortamını manyetik bir şekilde karıştırırken (in-situ analiz), oluşan o-kuinon ürününün, maksimum absorbansda verdiği dalga boyunda zamana karşı (1 dk boyunca) artış miktarı baz alınarak hesaplanmıştır. Reaksiyon parametreleri olarak nitelendirilen Michaelis sabitleri (V_m ve K_m) in-situ analiz metodu ile farklı substrat konsantrasyonlarında (0.05-2 mM) 25 °C' de, pH:6.5 PBS içerisinde 700 dev/dk da karıştırılarak tespit edilen deneysel değerlerin, Michaelis Menten model denklemine (denklem 1) hatayı minimize ederek (denklem 2) uydurulması ile tespit edilmiştir.

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad \text{denklem 1}$$

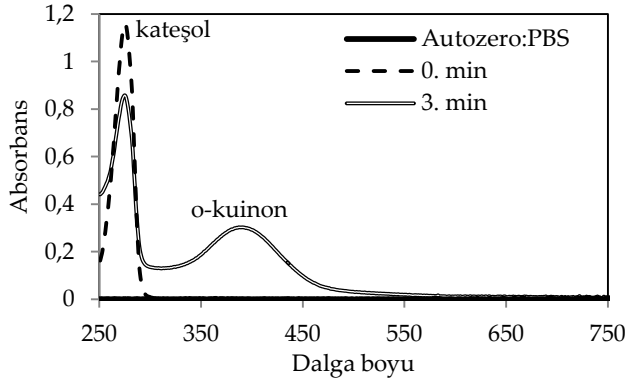
$$\text{Hata: } \sum [V_{\text{deneysel}} - V_{\text{hesaplanan}}] \quad \text{denklem 2}$$

Burada V_m maksimum reaksiyon hızı, K_m ise maksimum hızın yarısına denk gelen substrat konsantrasyonudur.

Diğer reaksiyon parametrelerinden sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 10-60 °C arasında pH:6.5 PBS içerisinde 700 dev/dk da karıştırılarak, pH'nin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 5.6-8.8 değer aralıklarında 25 °C' de, 700 dev/dk da karıştırılarak, karıştırma hızının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 25 °C' de, pH:6.5 PBS içerisinde reaksiyon ortamı 300-1000 dev/dk aralığında karıştırılarak in-situ analiz metodu ile tespit edilmiştir.

3 Bulgular ve Tartışma

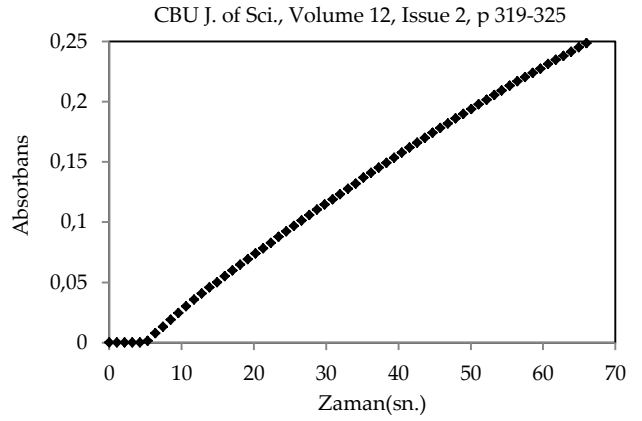
Tirozinaz enziminin ve kateşolün bir araya getirilmesi ve uygun bir dev/dk da karıştırılması ile enzimatik olarak oluşan o-kuinon ürününün UV spektrofotometrede verdiği maksimum absorbands pikini tespit etmek için yapılan 250-750 nm dalga boylarında bir taramanın sonuçları Şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2. Reaksiyon ortamının reaksiyon öncesi (sadece kateşol varken) ve 3 dk. lık reaksiyon sonrası (hem kateşol hemde enzimatik ürün olan o-kuinon varken) tarama profili

Reaksiyon öncesi ortamda sadece kateşol varken 275 nm dalda boyunda pik gözlemlenmiş, 3 dk lık reaksiyon sonrasında ise 275 nm deki kateşola ait olan pikde azalma buna mukabil 390 nm dalga boyunda o-kuinona ait yeni bir pikin varlığı literatüre uyumlu bir şekilde [18, 19] tespit edilmiştir. Farklı dalga boylarında herhangi başka bir pikin gözlenmemesi enzimatik o-kuinon ürününün bu sure zarfında stabil olduğunun ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla bozunmadığının bir kanıtıdır. Dolayısı ile çıkan sonuç enzim aktivitesinin 3 dk lık bir süre içerisinde doğru bir şekilde tayin edilebileceğini ifade etmektedir. Şekil 3, 390 nm dalga boyunda enzimatik o-kuinon ürününün 1 dk lık zaman içerisindeki oluşum grafiğini göstermektedir.

Şe



Şekil 3. Enzimatik o-kuinon ürününün 390 nm dalda boyunda zamanla oluşum grafiği

Çalışmamızda herhangi bir nükleofilik ajan kullanılmamış ve aktivite doğrudan enzimatik ürünün (o-kuinon) zamanla oluşum miktarına bağlı olarak yerinde test edilmiştir. Şekil 3 den de anlaşıldığı üzere, reaksiyon ortamında belli bir konsantrasyonda kateşol varken ortam peltier sistem kullanılarak belirli bir sıcaklıkta karıştırmaya başlanmıştır. 4-5 sn sonra ortama tirozinaz enzimi ilave edilerek sıfır anından itibaren çok kısa süren doğrusal artış grafiğinde oluşan o-kuinon ürününün başlangıç miktarları da takip edilebilmiş ve böylelikle yerinde analiz metodu ile reaksiyon hızının daha doğru hesaplaması sağlanabilmiştir. Bu metot tirozinaz enzimi ile yapılacak inhibisyon çalışmalarında (fenol, pestisit, GDO, patojen taylorleri) kullanılabilir. Çalışmamızda reaksiyon parametreleri değerlendirilerken hesaplanan enzim aktiviteleri için gerekli olan deneysel veriler yukarıda bahsedildiği gibi yerinde analiz metodu ile UV spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

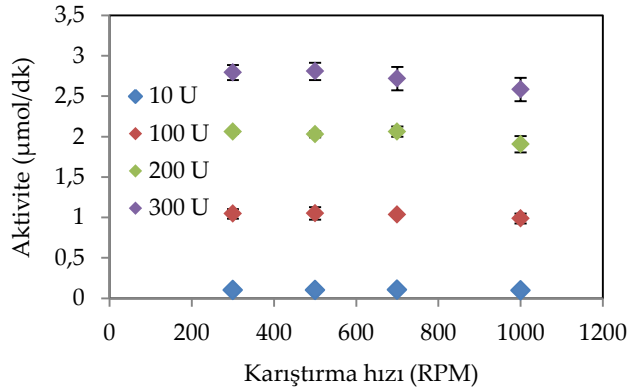
Enzim aktivitesini hesaplamak için Şekil 3 deki gibi reaksiyon başlangıcından itibaren elde edilen doğrusal grafiğin ilk 30 sn deki eğimi (dA/dt) Beer-Lambert denklemimde (denklem 3) yerine konarak hesaplanmıştır [20].

$$A = \epsilon c l \quad \text{denklem 3}$$

Burada "A" absorbands değeri "c" ürünün konsantrasyonu (c = P), "ε" ekstinksiyon katsayısı (390 nm deki o-kuinon ürün için: 1417 M⁻¹cm⁻¹ [4]) ve "l=1 cm" kuartz kuvetin ışık yolu uzunluğudur. Bu sayede kinetik eğrinin (Şekil 3) eğimi tirozinaz enzim aktivitesini (μmol/dk) ifade eden sayısal bir değere denklem 4 kullanılarak dönüştürülür.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dA}{dt} \frac{1}{\epsilon l} \quad \text{denklem 4}$$

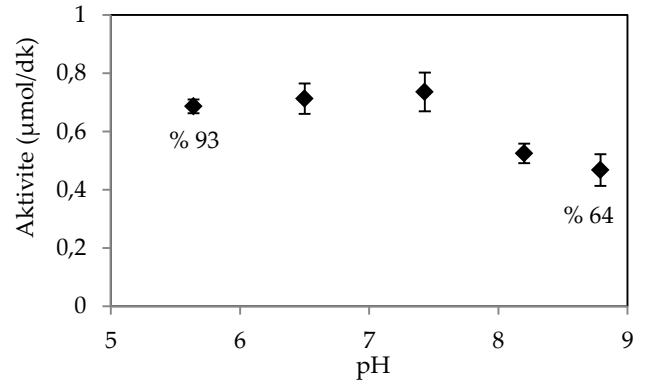
Reaksiyon parametrelerinden ilk olarak önemli bir tanesi olan karıştırma hızının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Yetersiz karıştırma hızı olduğunda substrat ile enzimin buluşması ve ürün oluşum hızı yavaşlar. Ayrıca oluşan ürünler enzimlerin çevresinde bir difüzyon tabakası oluştururlar. Yeni bir ürünün oluşması için substrat bu difüzyon tabakasını aşarak enzime ulaşmak zorundadır. Buda uygun bir karıştırma hızı ile mümkün olur. Şekil 4 de karıştırma hızının tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisini gösterilmektedir.



Şekil 4. Karıştırma hızının tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (pH:6.5, T: 25 °C, kateşol konsantrasyonu: 2 mM, enzim konsantrasyonu: 10-300 unit).

Farklı enzim konsantrasyonları kullanılarak yapılan deneylerde 300, 500, 700 ve 1000 dev/dk karıştırma hızları denenmiştir. Sonuçlar karıştırma hızlarının enzim aktivitesi üzerinde aynı etkiyi gösterdiği yönündedir. Buradan substratın difüzyon tabakasını aşmasının da 300 dev/dk karıştırma hızının yeterli olduğu anlaşılmaktadır. Sonuçlar tüm enzim konsantrasyonlarında aynı eğilimi göstermiştir. Diğer reaksiyon parametrelerinin enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini incelerken yukarıda bahsedilen sonuçlar dikkate alınmış ve reaksiyon ortamında vortex oluşturmeyen 700 dev/dk karıştırma hızı seçilmiştir.

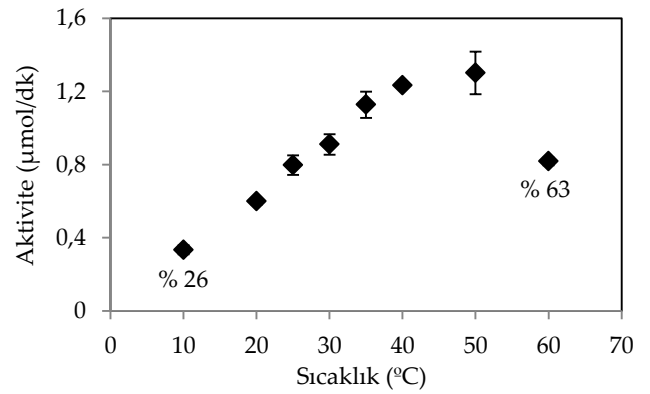
Diğer önemli bir reaksiyon parametresi olan ortam pH'sının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi pH: 5.6-8.8 değer aralıklarında çalışılmış ve optimum pH'nın 7.43 olduğu Şekil 5 ten anlaşılmaktadır.



Şekil 5. Ortam pH'ının tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (T: 25 °C, kateşol konsantrasyonu: 2 mM, enzim konsantrasyonu: 50 unit, karıştırma hızı: 700 dev/dk).

Ortam aside doğru gittiğinde aktif grupların protone olmasından dolayı aktivitede az bir değişim olduğu (pH:5.6 da % 7 azalma), ortam baza doğru gittiğinde ise aktif gruplardaki yapısal değişimlerden dolayı aktivitede daha fazla bir azalma olduğu (pH:8.8 de %36) görülmektedir [9].

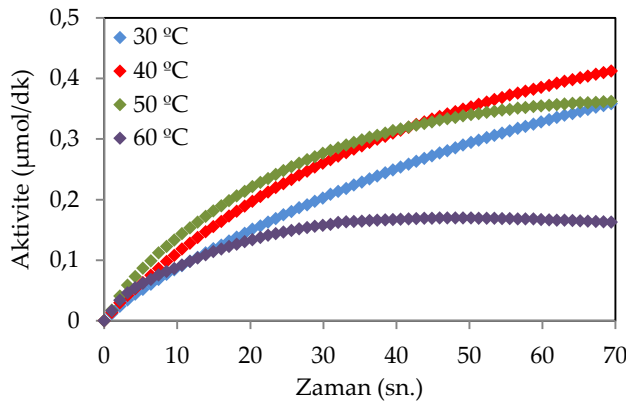
Ortam sıcaklığı enzim aktivitesini önemli ölçüde etkileyen diğer bir reaksiyon parametresidir. Bu parametrenin etkisi 10-60 °C sıcaklık aralıklarında çalışılmış ve maksimum aktivitenin 50 °C de gerçekleştiği görülmüştür. Sıcaklık arttıkça kinetik enerjinin arttığı fakat aynı zamanda bir protein olan enzimlerin bozunduğu bilinmektedir [9]. Sonuçlara göre 50 °C, tirozinaz enziminin bozunmadan kinetik enerjisinin maksimum olduğu sıcaklık değeri olarak Şekil 6 da görüldüğü üzere karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 6. Reaksiyon ortam sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (pH:6.5, kateşol konsantrasyonu: 2 mM, enzim konsantrasyonu: 50 unit, karıştırma hızı:700 dev/dk).

10 °C sıcaklık değerinde yukarıda bahsedildiği gibi kinetik enerji azaldığından enzim aktivitesinde maksimum değere göre % 74 azalma, 60 °C ise enzim

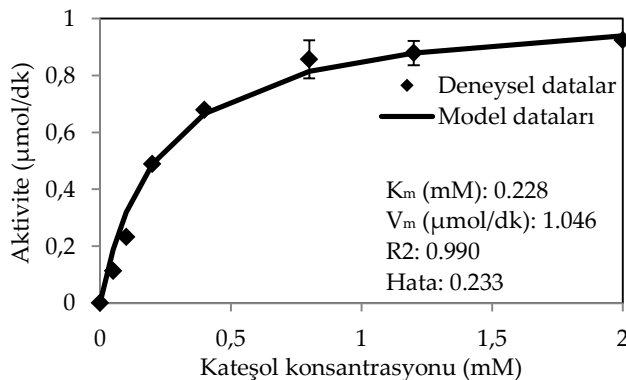
bozunduğundan dolayı % 27 azalma kaydedilmiştir. Enzimin yapısında meydana gelen bozunma bu sıcaklıklarda zamana bağlı kinetic veriler alınırken açıkça görülmektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Farklı sıcaklıkların zamanla tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (pH:6,5, kateşol konsantrasyonu: 2 mM, enzim konsantrasyonu: 50 unit, karıştırma hızı: 700 dev/dk).

Enzim aktivite değerlerinin reaksiyon başlangıcından itibaren elde edilen doğrusal grafiğin ilk 30 sn deki eğimi dikkate alınarak hesaplandığı düşünülürse, Şekil 7 de görüldüğü gibi 30 °C ve 40 °C'ye ait grafiklerin ilk 30 sn deki doğrusallıklarında sapma olmazken, 50 °C den sonra özellikle 60 °C deki grafikte doğrusallıktan sapma gözlemlenmektedir. Bu durum 50 °C den sonra enzimin zamanla bozunduğunun bir ifadesidir.

V_m ve K_m gibi reaksiyon parametreleri deneysel verilerin Michaelis Menten model denkleminde yerine konması ve hatanın minimize edilmesi ile hesaplanmıştır. Şekil 8 den görüldüğü gibi deneysel veriler ile model arasında yüksek bir korelasyon katsayısı (%99) bulunmuştur.



Şekil 8. Kateşol konsantrasyonunun tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (pH:6,5, T: 25 °C, enzim kon-

Enzim substrat kinetiği hakkında önemli bilgiler aktaran Michaelis sabiti (K_m : reaksiyon hızının yarı-maksimum olduğu substrat konsantrasyonu) 0.228 mM olarak hesaplanmıştır. Substratın enzime bağlanma ilgisinin bir ölçüsü olan K_m değerinin küçük olması, substratın enzime karşı yüksek bir ilgisi olduğunu ifadesidir [21]. Bunun yanında V_m değeri ise 1.046 µmol/dk olarak bulunmuştur

4 Sonuç

Bu çalışmada ortam karıştırma hızı, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu gibi parametrelerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri yerinde analiz metodu ile UV spektrofotometrede peltier sistem kullanılarak araştırılmıştır. Reaksiyon ürünü olan o-kuinonun 390 nm dalga boyunda pik vermesinden dolayı, enzim aktivite değerleri bu dalga boyundaki kinetik eğrinin Beer-Lambert denkleminde yerine konması ile elde edilmiştir. Sonuçlar herhangi bir nükleofilik ajan kullanmadan enzim aktivitesinin bu metotla uygun bir şekilde hesaplanabileceğini göstermiştir. 300 dev/dk karıştırma hızının substrat için difüzyon tabakasını aşmasında yeterli olduğu anlaşılmıştır. Maksimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırası ile pH: 7.4 ve T: 50 °C olduğu ve bu değerler dışında enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Deneysel verilerin Michaelis Menten model denklemleri ile iyi uyum sağladığı ve K_m ve V_m değerlerinin sırası ile 0.228 mM ve 1.046 µmol/dk olduğu saptanmıştır.

5 Teşekkür

Bu çalışma 114Z417 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

6 Referanslar

- [1] Garcia-Molina, F.; Munoz, J.L.; Varon, R.; Rodriguez-Lopez, J.N.; Garcia-Canovas, F.; Tudela, J. A Review on Spectrophotometric Methods for Measuring the Monophenolase and Diphenolase Activities of Tyrosinase. J. Agric. Food Chem. 2007; 55, 9739-9749.
- [2] Koval, I.A.; Gamez, P.; Belle, C.; Selmeçzi, K.; Reedijk, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. J. Chem. Soc. Rev. 2006; 35, 814-840.
- [3] Selinheimo E. Tyrosinase and laccase as novel cross-linking tools for food biopolymers. E publishing. Helsinki, 2008.
- [4] Aytar, B.S.; Bakir, U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. Process Biochem. 2008; 43, 125-131.

- [5] Xue, C.B.; Luo, W.C.; Ding, Q.; Liu, S.Z.; Gao, X.X. Quantitative structure–activity relationship studies of mushroom tyrosinase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.* 2008; 22, 299–309.
- [6] Franssen, M.C.R.; Steunenberg, P.; Scott, E.L.; Zuilhofac, H.; Sanders, J.P.M.; Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chem Soc Rev.* 2013; 42, 6491–6533.
- [7] Mohammadi, A.; Moghaddam, A.B.; Dinarvand, R.; Zarchi, S.R. Direct Electron Transfer of Polyphenol Oxidase on Carbon Nanotube Surfaces: Application in Biosensing. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2009; 4, 895–905.
- [8] Xie, L.P.; Chen, Q.X.; Huang, H.; Wang, H.Z.; Zhang, R.Q. Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemistry (Moscow).* 2003; 68, 487–491.
- [9] Yoruk, R.; Marshall, M.R. Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A Review. *Journal of Food Biochemistry.* 2003; 27, 361–422.
- [10] Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*; Springer, 2008.
- [11] Missen, R.W.; Mims, C.A.; Saville, B.A. *Introduction to Chemical Reaction Engineering and Kinetics*; John Wiley & Sons: New York, 1999.
- [12] Drauz, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; WILEY-VCH: Germany, 2002.
- [13] Marangoni, A.G. *Enzyme Kinetic; A Modern Approach*: U.S.A., 2003.
- [14] Cussler, E.L. *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*; U.S.A., 1984.
- [15] Bisswanger, H. *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*; 2nd Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008.
- [16] Munoz, J.L.; Garcia-Molina, F.; Varon, R.; Rodriguez-Lopez, J.N.; Garcia-Canovas, F.; Tudela, J. Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Analytical Biochemistry.* 2006; 351, 128–138.
- [17] Fiorentino, D.; Gallone, A.; Fiocco, D.; Palazzo, G.; Antonia, M. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosensors and Bioelectronics.* 2010; 25, 2033–2037.
- [18] Lee, H.S.; Kim, Y.A.; Cho, Y.A.; Lee, Y.T. Oxidation of organophosphorous pesticide for the sensitive detection by cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere.* 2002; 46, 571–576.
- [19] Ibrahim, M.E.M.; Ramadan, A.E.M. Catecholase biomimetic catalytic activity of copper(II) complexes with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. *Transition Metal Chemistry.* 2006; 31, 730–739.
- [20] Eisenthal, R.; Danson, M.J. *Enzyme Assays*; Second Edition, Oxford, 2002.
- [21] Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*; W.H. Freeman: New York, 2005.

