

Polifenol Oksidaz Enziminin Aktif Karbonla Adsorpsiyonunun İzoterm ve Kinetik Analizi

Salih ALKAN¹, Ali Rıza KUL^{2*}, İhsan ALACABEY², Necmi EROL³

¹ Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Ordu, Türkiye.

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Van, 65080, Türkiye.

³ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Van, 65080, Türkiye

Özet

Trabzon yöresinden alınan fındık kabukları $ZnCl_2$ ile aktive edilerek elde edilen aktif karbon üzerine polifenol oksidaz enziminin adsorpsiyonu incelenmiştir.

Farklı pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C) ve derişimlerde (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 M) çalışmalar yapılmıştır. Lagergreen yalnızca birinci dereceden hız denklemi dikkate alınarak adsorban maddenin adsorplama gücünün bir ölçüsü olan q_1 ve k_1 değerleri elde edilmiştir. Termodinamik parametrelerden adsorpsiyon entalpisi (ΔH), Gibbs serbest entalpisi (ΔG) ve adsorpsiyon entropisi (ΔS) değerleri hesaplanmıştır.

Sonuç olarak elde edilen verilerden, $ZnCl_2$ ile hazırlanan aktif karbonun iyi adsorplama özelliği gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aktif Karbon, Enzim, Adsorpsiyon, Polifenol oksidaz, Kimyasal Aktivasyon, İmmobilizasyon

Isotherm and kinetic analysis of adsorption of polyphenol oxidase enzyme by activated carbon

Abstract

The hazelnut crusts taken from Trabzon region were activated with $ZnCl_2$ and adsorption of polyphenol oxidase enzyme on active carbon was carried out.

Studies have been done at different pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) and different temperatures (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C). Taking in to the account the Lagergreen's first-order equation for adsorption kinetics, q_1 and k_1 values, are a measure of adsorbance's strength were obtained. The values of adsorption enthalpy (ΔH), Gibbs free enthalpy (ΔG) and adsorption entropy (ΔS) were thermodynamics parameters.

Calculated from in conclusion, it has been proved from the gathered results that the active carbon sample prepared with $ZnCl_2$ exhibits a good adsorption ability.

Key Words: Active carbon, enzyme, adsorption, polyphenoloxidase, chemical activation, immobilization

*Yazışma Adresi: e-mail: alirizakul@yyu.edu.tr

1. Giriş

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizlemeleri, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, tarım ve ziraat alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptirler.

Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon sonucunda enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişebilmektedir. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kovalent bağlanması sonucu yükü ve kimyasal yapısı değişir. Teorik olarak aktivitesinde düşme beklenir. Bunun yanında aktivitesinin arttığı veya değişmediği durumlar da gözlenebilmektedir.

Aktif karbon büyük kristal formu ve oldukça geniş iç gözenek yapısı ile karbonlu adsorbanlar ailesini tanımlamada kullanılan genel bir terimdir. Aktif karbonlar insan sağlığına zararsız kullanışlı ürünler olup oldukça yüksek bir gözenekliliğe ve iç yüzey alanına sahiptirler. Aktif karbonlar çözeltilerdeki molekül ve iyonları gözenekleri vasıtasıyla iç yüzeylerine doğru çekebilirler ve bu yüzden adsorban olarak adlandırılırlar.

Adsorpsiyon bir yüzey veya ara kesit üzerinde bir maddenin birikmesi ve derişiminin artması olarak tanımlanmaktadır. Tanımda kullanılan ara yüzey bir sıvı ile bir gaz katı veya bir başka sıvı arasındaki temas yüzeyi olabilir. Başka bir tanımlama ile adsorpsiyon yüzeye saldırma kuvvetlerinden dolayı moleküllerin yüzeye yapışması olayıdır.

Polifenol oksidaz, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak görülen bir enzimdir. Bitkilerde tüm kısımlarda bulunabilirken, gelişmiş hayvanlarda deri, saç, tüy ve gözlerde bulunur. Bitkisel dokularda öncelikle inaktif formda sentezlen-

mekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, proteazlar ve etilen gibi bir takım solunum metabolitlerince aktif hale gelmektedir (Mayer, 1979). Yenilebilir bitkilerdeki Polifenol oksidaz dağılımı, birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Son yıllarda farklı kaynaklardan da izole edilmiş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Polifenol oksidaz aktivitesine rastlanan bazı gıda ürünleri; çay, muşmula, enginar, Cassava bitkisi, ananas, Napolyon üzümü, patlıcan, Anamur muzunu, elma, zambak ve çilek olarak sayılabilir. Bitkilerdeki Polifenol oksidaz miktarı çeşit, kültürel işlemler, olgunluk ve yaşa bağlıdır (Spille, 1997).

Rapeanu ve ark. (2006) Güney Afrika'da yetişen Viktorya üzümünden ekstrakte edilen Polifenol oksidaz enziminin biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. McIlvaine tamponu içindeki 10 mM katekol substratı ile enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla, pH 5 ve 25 °C bulunmuştur. Çalışmada sekiz inhibitör test edilmiş ve en etkili inhibitörler olarak askorbik asit, L-sistein ve sodyum metabisüfit bulunmuştur. Termal inaktivasyon çalışmalarında Viktorya üzümü Polifenol oksidaz enziminin termal inaktivasyonunun, $E_a = 225 \pm 13.5$ kJ.mol⁻¹'lük bir aktivasyon enerjisi ile, birinci dereceden kinetiğe uyduğunu göstermiştir.

Weurman ve Swain (1996), Polifenol oksidaz enziminin optimum pH'sı enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle pH aralığı 4 ile 7 arasındadır. Tatlı kirazdan elde edilen enzim numunesini 4-metil katekol substratıyla optimum pH 4.0, katekol ile 4.2, klorojenik asit ile 4.5, katekin ile 7.5 olarak rapor edilmiştir.

Tsai ve ark.(2001), şeker kamışı atıklarını 500 °C de 0-5 saat ZnCl₂ ile kimyasal aktivasyon işlemine tabi tutarak aktif karbonlar hazırlamışlardır. Bu adsorbanların Langmuir yüzey alanı ve toplam gözenek bu maddelerin ortalama gözenek çapını tahmin için kullanılmıştır. Adsorpsiyonda kullanılan adsorbanların kapasiteleri 20 ve 40 °C' de ölçülmüştür. Adsorpsiyon olayının genel adsorpsiyon denklemlerine uyduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan adsorbentlerin fiziksel özelliklerinin izoterm bağlantılarından elde edilenler ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

Kullanılan kimyasal maddeler

- Polifenol oksidaz enzimi (E.C.1.14.18.1)
- Çinko klorür
- Gümüş Nitrat
- Saf su

Aktif karbon hazırlanması: Trabzon yöresinde yetişen fındık kabuklarından 200'er gramlık dört ayrı örnek alındı. Örnek 200 gr $ZnCl_2$ 'nin 500 ml saf suda çözünmesi ile oluşan çözeltiliye eklendi. Oluşturulan örnek, gün ışığı görmeyecek şekilde karanlık bir yerde en az 24 saat süre ile bekletildi.

Bu şekilde hazırlanan örnek 350-400 °C lik fırında inert (azotlu) ortamda yaklaşık bir saat süre ile yanması sağlandı. Kimyasal aktifleşme ile aktifleştirilen kabuklar bol miktarda saf su ile yıkandı. İşlem sonrasında hazırlanan 0,1M $AgNO_3$ çözeltisi ile klorür tayini yapıldı. Klorür kalmadığından emin olunduktan sonra çözelti kurutulmak üzere 60 °C' de etüvde kurumaya bırakıldı.

Substrat çözeltisi: Substrat çözeltisi olarak 0,1M katekol kullanılmıştır. 1,2-dihidroksibenzen olarak bilinen katekolün formülü $C_6H_4(OH)_2$ 'dir. Katekol hızlı bir şekilde su içerisinde çözünen beyaz kristaller olarak ortaya çıkar.

0,1 Molar Sodyum fosfat tamponu (pH=7): 14,2 gram Na_2HPO_4 yaklaşık 1000 mililitre su içinde çözünür, pH metre kullanılarak pH= 7'ye kadar 1M HCl ilave edilir. Hacim saf su ile 1 litreye tamamlanır.

Yöntem: Bu çalışmada adsorban olarak Trabzon yöresinde yetişen fındık kabuklarından elde edilen aktif karbon kullanıldı. Enzim olarak da elmadan elde edilen ve hazır olarak temin edilen polifenol oksidaz enzimi kullanıldı.

Polifenol oksidaz enziminin aktif karbon üzerindeki adsorpsiyonu için değişik zaman periyotlarında sabit pH'da (pH=7) 0,1M sodyum fosfat tamponu ile belirli konsantrasyonlarda süspanse edildi. Polifenol oksidaz enzimi bu süspanسیون ile farklı sürelerde ve farklı oranlarda muamele edilerek adsorpsiyon şartları belirlendi (Optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet).

$ZnCl_2$ ile hazırlanan aktif karbon örneğinden

1,5 gram alınarak 60 ml saf suda karışması sağlandı. Bu karışımdan alınan 4 ml ve 1 ml saf enzim karıştırılarak bir saat süre ile vortekse konuldu. Vorteksten alınan örnek 15 dakika boyunca (3000devir/dakika) santrüfüjlendi. Santrüfüjden alınan örnek üzerindeki sıvı aktarılarak kalan katıya 5 ml fosfat tamponu (0,1 M, pH=7) ilave edilerek tekrar 15 dakika santrüfüjlendi.(3000 devir/dk) Alınan örneğin üzerindeki sıvı tekrar aktarılarak aynı tampon ile 5 ml yapıldı. 5 ml örnek bir behere aktarıldı. Aynı yöntem ile 25 ml bağlı enzimin bulunduğu örnek hazırlanır.

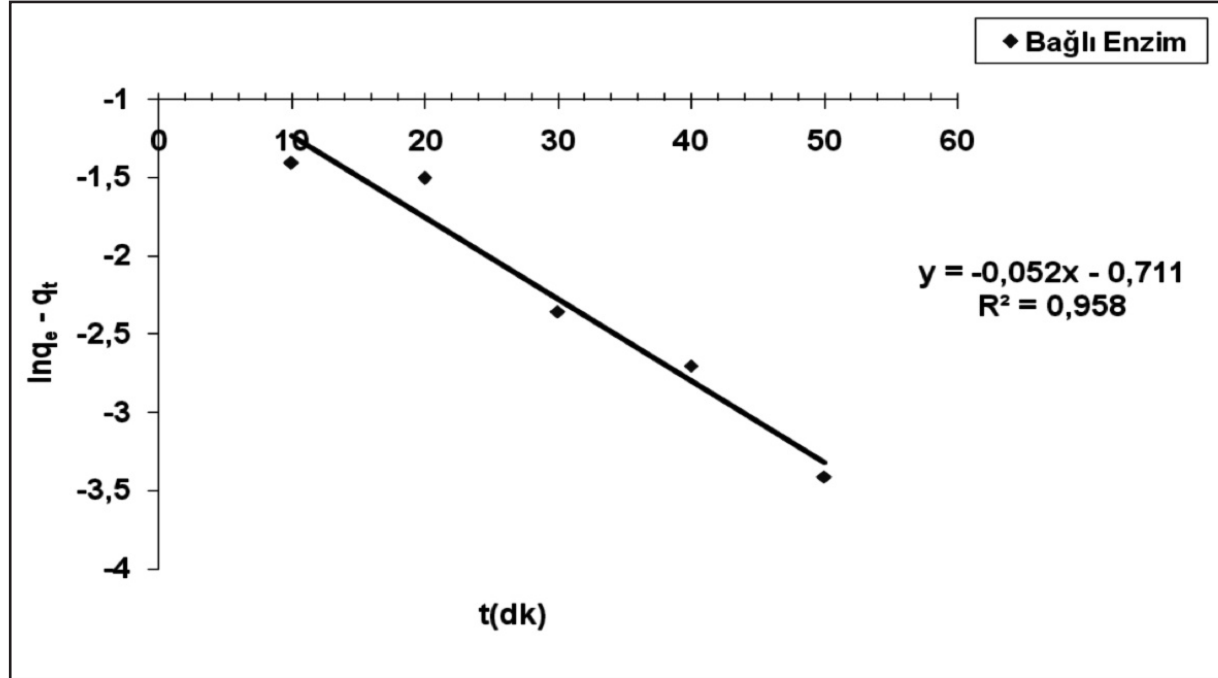
Aktif karbon ve $ZnCl_2$ süspanسیونundan alınan 4 ml'lik karışım üzerine 1 ml'lik saf enzim (Polifenol oksidaz) ilave edilerek 10 dakika vortekte karıştırıldı. Vorteksten alınan örnek iki kez 15'er dakikalık süreler ile santrüfüjlendi ve her seferinde pH'ı 7 olan fosfat tamponu ile hacmi tekrar 5 ml yapıldı. Bu şekilde hazırlanan örnekler 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika vortekte bekletilerek, 420 nm'de adsorbans ölçümleri yapıldı. Böylece elde edilen serbest enzim ve bağlı enzim çözeltileri üzerine pH, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisini tespit etmek için denemeler yapıldı. Ayrıca Linewaver- Burk denkleminde yararlanılarak K_m ve V_{max} tayinleri yapıldı.

Çalışmanın ikinci aşamasında 0,1M Sodyum fosfat tamponu içerisinde serbest ve bağlı enzim çözeltilerinin aktivitelerine pH'ın etkisini incelemek üzere yapılan denemelerde pH=3-9 aralığı kullanıldı. Serbest ve bağlı enzim üzerine sıcaklık etkisinin tayini içinde 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C de 15 dakika süre ile inkibatörde bekletilen örneklerin analizleri yapıldı. Enzimlerin aktivitelerine iyonik şiddetin etkisini tespit etmek amacıyla da 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M'lık konsantrasyonlarındaki fosfat tamponları kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

$ZnCl_2$ ile muamele edilmiş aktif karbon adsorpsiyonunun kinetik parametreleri saptanmıştır. Denge zamanına kadar geçen sürede adsorpsiyonun durumuna bakılarak elde edilen veriler grafiğe alınmıştır. Bu grafikten Lagergren yalancı birinci derece hız denklemi dikkate alınarak $(\ln q_c - q_t) - t$ grafiğinin eğim ve kaymasından yararlanılarak k_1 ve q_e değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 1. İmmobilize enzim için $(\ln q_e - q_t) - t$ çizelgesi

t	10	20	30	40	50
$\ln q_e - q_t$	-1,4064	-1,5005	-2,3538	-2,7030	-3,4112
Enzim ünitesi	0,630	0,652	0,780	0,808	0,842

**Şekil 1.** Aktif karbon üzerine $ZnCl_2$ çözeltisinin adsorpsiyonu ile ilgili Lagergren yalancı birinci derece hız denkleminin grafiği (T: 25 °C)

Şekil 1’de aktif karbon üzerinde $ZnCl_2$ çözeltisinin adsorpsiyonu ile ilgili Lagergren yalancı birinci derece hız denkleminin grafiği verilme-

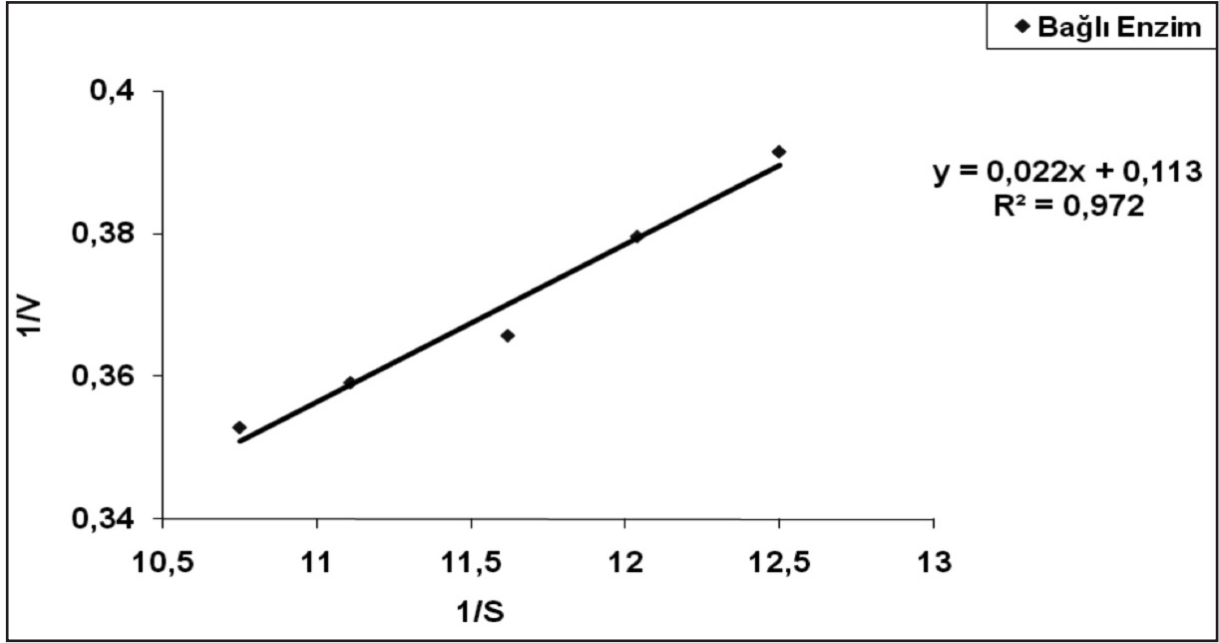
tedir. Bu grafiğe ait kinetik parametreler Çizelge 2’ de verilmiştir.

Çizelge 2. $ZnCl_2$ çözeltisinin adsorpsiyonu ile ilgili Lagergren yalancı birinci derece hız denklemleri ve kinetik parametreleri.

	q_e (mg.g ⁻¹)	k_e (dk ⁻¹)	R^2	Denklem
$ZnCl_2$ ’lü aktif karbon	2.036	$5.21 \cdot 10^{-2}$	0.9584	$y = -0.052x - 7114$

Çizelge 3. $ZnCl_2$ ile aktifleştirilmiş aktif karbona immobilize edilen enzimin kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesinde kullanılan substrat ve enzim miktarları

Substrat miktarı	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4
Enzim Ünitesi	0,850	0,835	0,820	0,790	0,766
V	2,8333	2,7833	2,7333	2,6333	2,5533
S	0,093	0,090	0,086	0,083	0,080



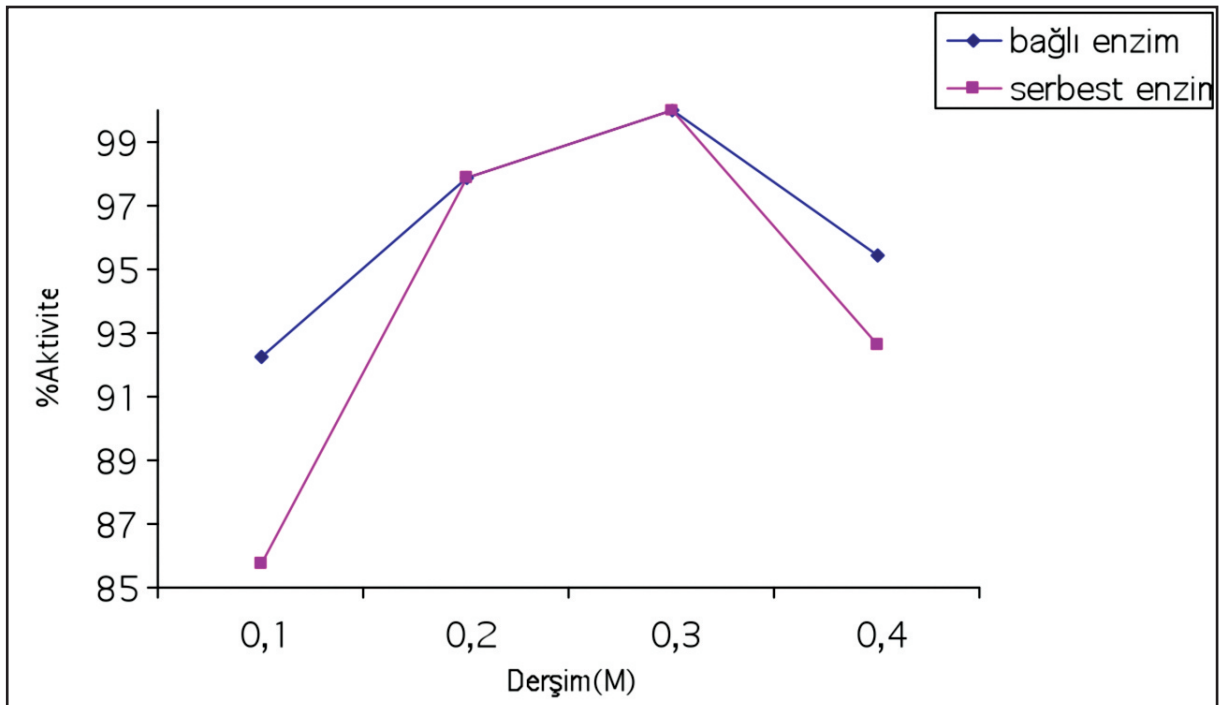
Şekil 2. İmmobilize enzim için K_m ve V_{max} grafiği

Şekil 2'de $1/S$ ve $1/V$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk denkleminde K_m ve V_{max} değerleri belirlendi. Bağlı enzim için K_m ve

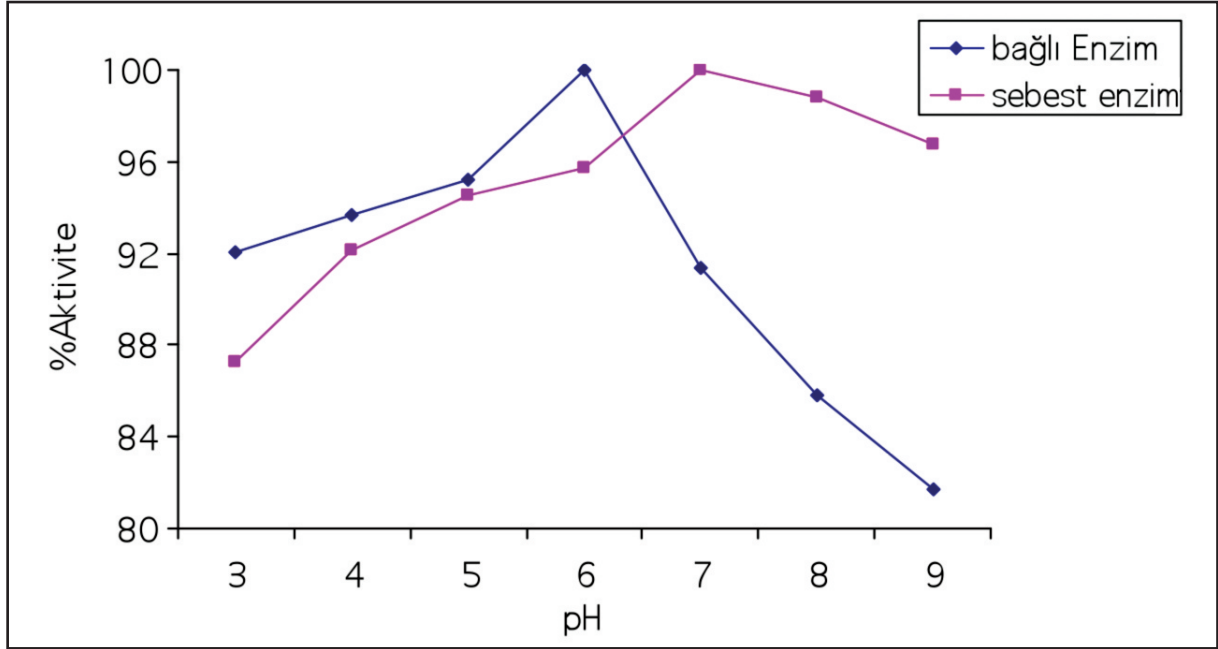
V_{max} değerleri sırasıyla 1,9mM ve 8,81 μ mol/dk olarak bulunmuştur.

Çizelge 4. Serbest enzim - Bağlı Enzim için iyonik şiddet

	Serbest enzim için iyonik şiddet				Bağlı Enzim için iyonik şiddet			
Derişim (M)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4
Enzim Ünitesi	0,163	0,186	0,190	0,176	0,835	0,886	0,905	0,864
Aktivite	85,78	97,89	100	92,63	92,26	97,9	100	95,46



Şekil 3. Serbest ve bağlı enzim üzerine derişimin etkisi



Şekil 4. Serbest ve bağlı enzime pH etkisi

ZnCl₂ ile serbest enzimin pH aktivite etkisi şekil 4'de görülmektedir. ZnCl₂ maksimum

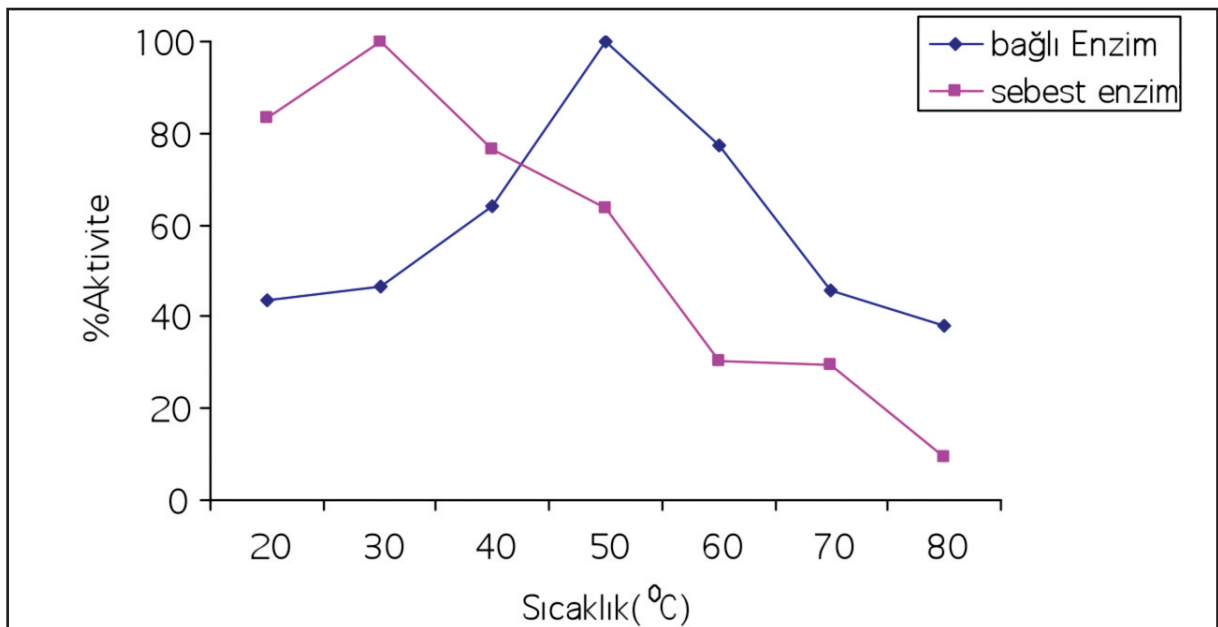
aktiviteye pH 6'da ulaşmaktadır. Burada bağlı enzim spesifik asit katalizlidir.

Çizelge 5. Serbest Enzim için sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70	80
Enzim Ünitesi	0,140	0,157	0,120	0,100	0,075	0,046	0,015
Aktivite	53,17	100	76,43	63,69	30,36	29,29	9,55

Çizelge 6. Bağlı Enzim için sıcaklık

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70	80
Enzim Ünitesi	0,600	0,640	0,885	1,380	1,070	0,615	0,525
Aktivite	43,47	46,37	64,13	100	77,53	44,56	38,04



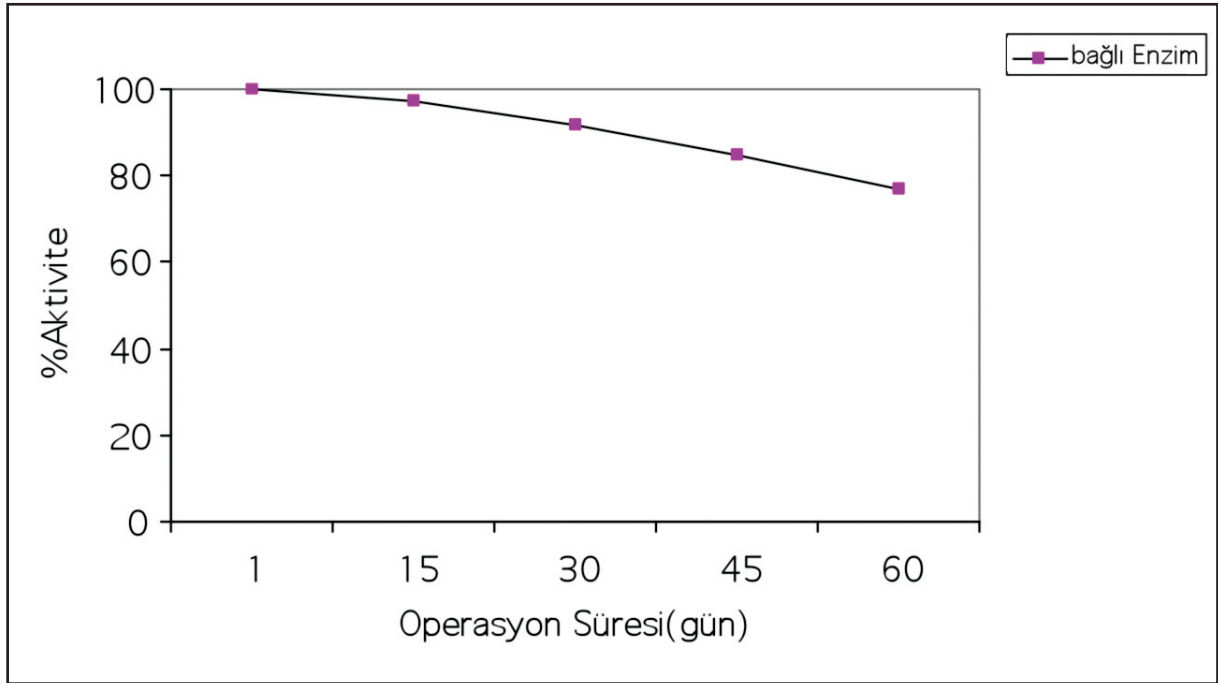
Şekil 5. Serbest ve bağlı enzime üzerine sıcaklık etkisi

Serbest enzim 30 °C'de maksimum aktivite gösterirken bağlı enzim 50 °C'de maksimum

aktivite göstermektedir. Sıcaklık artıkça aktivitede düşüş görülmektedir.

Çizelge 7. Bağlı Enzim için iki ay süresince aktivite değişimi

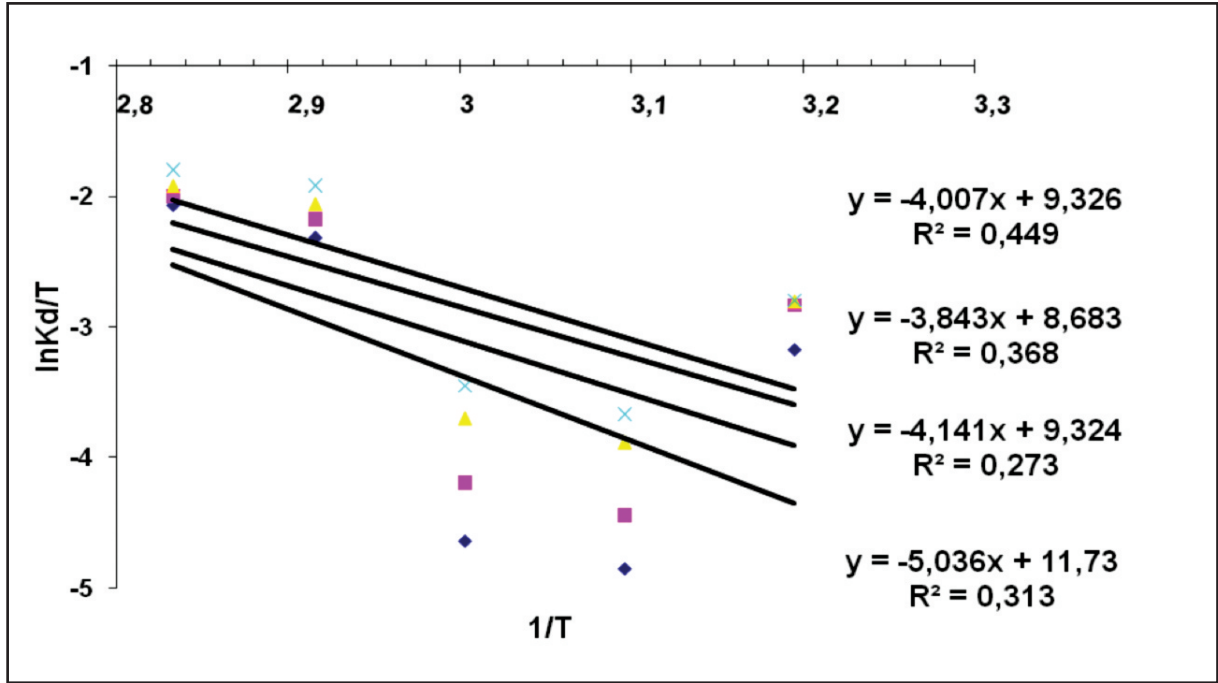
Zaman(Gün)	1	15	30	45	60
Enzim Ünitesi	0,808	0,784	0,742	0,684	0,622
Aktivite	100	97,02	91,83	84,65	76,98



Şekil 6. Bağlı enzimin iki ay süresince aktivite değişimi.

Çizelge 8. ZnCl₂ ile hazırlanan aktif karbon örneğine ait immobilize edilen enzim için hesaplanan değerler

Derişim (M)	0.1	0.2	0.3	0.4
Denklem	-5,0361x+11,739	-4,1417x+9,3242	-3,8434x+8,6832	-4,0078x+9,3262
R ²	0,3137	0,2736	0,3686	0,4499
ΔH	41,8701	34,4340	31,9540	33,3208
ΔS	97,5980	77,5213	72,1921	77,5380
ΔG ₃₁₃	-30506,3039	-24229,7329	-22564,1733	-24236,0732
ΔG ₃₂₃	-31482,2839	-25004,9549	-23286,0943	-25011,4532
ΔG ₃₃₃	-32458,2689	-25780,1589	-24008,0153	-25786,8332
ΔG ₃₄₃	-33428,0699	-26555,3719	-24729,9363	-26562,2132
ΔG ₃₅₃	-34410,2239	-27330,5849	-25451,8573	-27337,5932



Şekil 6. $ZnCl_2$ ile hazırlanan aktif karbon örneğine $(\ln K_d/T) - 1/T$ grafiği

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma kapsamında Trabzon yöresine ait fındık kabuklarının $ZnCl_2$ ile aktifleştirilmesi sonucu aktif karbon elde edilmiştir. Elde edilen aktif karbon örneklerine polifenol oksidaz enziminin (E.C.1.14.18.1) tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu amaçlanmış ve immobilize enzimin bazı kinetik özellikleri spektrofotometrik olarak araştırılmıştır.

Enzimlerin hücrelerde önemli metabolik görevleri bulunmaktadır. Enzimler endüstride ve biyoteknolojide çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımına ilişkin ortaya çıkan pek çok sorunu olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır (Telefoncu, 1997).

Oksido - redüktaz enzim sınıfına ait olan polifenol oksidazlar (EC.1.14.18.1) muz, elma, şeftali, dut, enginar, patlıcan, patates, yerelması, kahve, kakao tohumu vb. pek çok meyve ve sebzede bulunabilir. Bunun yanında Denizli ilinde yetişen nardan afinite kromatografisi kullanılarak polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmıştır

(Lattanzio vd., 1994, Espin vd., 1997, López-Molina vd., 2003, Aydemir, 2004, Doğan vd., 2005).

V_{max} reaksiyon hızı ve K_m Michaelis-Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunmuştur. K_m enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir (Yıldız vd., 2006). K_m kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür. Bu değer küçüldükçe enzim ve substrat o kadar zor dissosiyasyon olur. V_{max} sabiti ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Enzim ne kadar aktif ise V_{max} o derece yüksektir. Michaelis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerini belirleyebilmek için çeşitli substrat konsantrasyonlarında (0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M) enzim aktivitesi ölçülmüştür. Lineweaver - Burk grafiği kullanılarak her bir örnek için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Belirlenen değerler $K_m = 1,9mM$, $V_{max} = 8,81\mu mol/dak$ olarak tespit edilmiştir.

İmmobilize formlarda K_m değerinin artması enzimin substratına karşı serbest enzimden daha düşük bir affiniteye sahip olduğunu gösterir. Katı bir destek üzerine immobilize edilmiş serbest enzim için farklı kinetik davranışların birkaç sebebi olduğu gözlenmiştir: Öncelikle immobilizasyon, enzimin molekül yapısında

bazı konformasyonel değişimlere neden olabilir. İkinci olarak immobilize enzim serbest çözeltide olduğundan farklı bir ortama yerleştirilmiş ve bu kinetik üzerine belirgin bir etki edebilir. Son olarak çözelti ve destek arasında bir bölünme vardır. Bu nedenle enzimin çevresindeki substrat konsantrasyonu toplam çözelti hacminden önemli derecede farklı olabilir (Şahin vd., 2005).

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir pH veya pH aralığı vardır. Bu optimum pH'nın altında ve üzerinde aktiviteleri düşer. Enzimler kuvvetli asit ve bazlarla fazla dayanıklı değildirler. Ortam pH'sındaki aşırı olmayan değişikliklere neden olur. Enzimler kendileri için aşırı pH değerlerinde aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların yapılarında değişimler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar (Koolman ve Roehm,2005).

Aktif karbona immobilize edilen polifenol oksidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'sını belirleyebilmek için standart reaksiyon karışımında pH'sı 3.0 ve 9.0 arasında değişen tamponlar kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % aktivite olarak Şekil 4'te gösterilmiştir. pH değeri 3.0 dan 7.0'a doğru arttırıldıkça aktivitede artmış, serbest enzimde en yüksek aktivite pH 7.0' de, ZnCl₂ en yüksek aktivite ise pH 6.0'da görülmüştür. Optimum pH'dan sonra aktivitede düşme görülmüştür. Enzim genel olarak geniş bir pH aralığında yüksek bir aktiviteye sahiptir. PH 3.0 ve 7.0 arasında enzimin aktivitesi pH 6'da %100 dür.

Kimyasal reaksiyonların hızları genellikle sıcaklıktaki artış ile artar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları da sıcaklık ile artmakla birlikte enzimler protein yapısında olduklarından dolayı yüksek sıcaklıklarda yapıları bozunur ve aktivitelerini kaybederler. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum aktivitesi 30 - 40 °C'dir ve 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatü-

rasyon başlar. Bu çalışmada aktif karbona immobilize edilen polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 20 - 80 °C arasındaki enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % aktivite olarak Şekil 5' te görülmektedir. Ölçümlerde standart reaksiyon karışım kullanılmıştır. Şekillerde görüldüğü gibi enzim 20 - 80 °C' gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında yüksek aktivite göstermektedir. Serbest Enzimin 30 °C' de bile maksimum aktivite gösterirken, bağlı enzim 30 °C' de maksimum aktivite göstermektedir. Sıcaklık arttıkça aktivitede düşüş görülmektedir.

Bu çalışmada enzimlerin immobilize formlara bakıldığında genel olarak aktivitelerini korudukları hatta arttırdıkları görülmüştür. Sonuç olarak enzim immobilizasyonunun enzimin termal kararlılığını olumlu yönde geliştirdiği söylenebilir.

İyonik şiddet, enzim aktivitesi üzerine etki eden önemli parametrelerden birisidir. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirleyebilmek için 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M'lık konsantrasyonlarda aktivite tayinleri yapılmıştır. Bütün örneklerde maksimum aktivitenin 0.3 M'lık konsantrasyonda olduğu tespit edilmiş ve immobilizasyon için ZnCl₂ ile aktiveleştirilen aktif karbon materyalinin verdiği sonuçlar Şekil 1-7'de görülmektedir.

Gaz veya sıvı fazdaki atom, iyon veya moleküller bir katı yüzeyine adsorplandıklarında hareketlerinde bir azalma olur ve entropileri düşer. Çözelti ortamında adsorpsiyon durumlarında entropi değişimi bazen pozitif olabilmektedir. Sabit sıcaklık ve basınçta adsorpsiyon genellikle kendiliğinden gerçekleştiği için adsorpsiyon esnasındaki serbest entalpi değişimi veya Gibbs serbest enerjisi negatif işaretli olur. Gibbs serbest enerjisi, entropi ve entalpi arasındaki ilişki $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ bağıntısıyla gösterilebilir (Yadava ve ark., 1991). Gibbs serbest enerji ile entropinin negatif olması, adsorpsiyon entalpisi ΔH ın genellikle negatif olmasını gerektirir. Adsorpsiyon entalpisi ΔH 'ın negatif olması ise adsorpsiyonun ekzotermik olduğuna işaret eder (Erdik ve Sarıkaya, 1984).

Lagergren yalancı birinci derece hız denklemi dikkate alınarak $(\ln q_e - q_t) - t$ grafiğinin eğim

ve kaymasından yararlanılarak k_1 $5.21.10^{-2} \text{ dk}^{-1}$ ve q_e 2.036 mg.g^{-1} değerleri belirlenmiştir.

Termodinamik sabitler ΔG , ΔH ve ΔS deerleri Çizelge 8 de verilmiştir. ΔH değerleri pozitif olarak bulunmuştur. ΔH nın pozitif olması sorbent üzerindeki adsorpsiyonun endotermik olduğunu gösterir. ΔS 'nin pozitif değer olması ise entropi değişimlerinin adsorbantla adsorplanan madde arasındaki bazı yapısal değişik-

liklere bağlı olabilir. Ayrıca entropinin pozitif değerleri adsorpsiyon esnasında katı sıvı ara yüzeyinde düzensizliğin arttığını gösterir. Gibbs serbest enerji (ΔG) değerlerinin negatif olması adsorpsiyonun kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir.

R^2 değerinin 0.958 gibi bir değerde olması mekanizmanın birinci derece kinetiği ile açıklanabilirliğini gösterir.

Kaynaklar

1. T. Aydemir, *Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.) heads*, *Food Chemistry*, 87, 59-67, (2004).
2. S. Doğan, Y. Turan, H. Ertürk, & O. Arslan, *Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.)*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53(3):776-785, (2005).
3. E. Erdik ve Y. Sarıkaya, Temel Üniversite Kimyası, Hacettepe – Taş Kitapçılık LTD. ŞTİ., Ankara, (1984).
4. J. C. Espin, J. Tudela, & F. G. Canovas, *Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.) heads*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 30: 819-825, (1997).
5. J. Koolman, K.H. Roehm, *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd edition, Thieme Stuttgart New York, (2005).
6. V. Lattanzio, A. Cardinali and S. Palmieri, The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases, *Italian Journal of Food Science*, 1: 3-22, (1994).
7. D. López-Molina Hiner ANP, J. Tudela, F. García-Cánovas, JN. Rodríguez-López, Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (Cynara scolymus L.) extracts. *Enzyme Microb Technol*, 33: 738-742; (2003).
8. A.M. Mayer, E. Harel and R. Ben-Shaul, Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783, (1966).
9. G. Rapeanu ve M. Bulancea, Thermal Inactivation Kinetics of Polyphenoloxidase Extracted from White Grapes, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, Vol. IX, no.1, (2005).
10. G. A. Spille, Caffeine, Chapter 3. Tea: The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage, *CRC Press*, 1-38, (1997).
11. F. Şahin, G. Demiral, H. Tümtürk, A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *Journal of Biological Macromolecules*, 37:148-153, (2005).
12. A. Telefoncu, *İmmobilize enzimler*, Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası-Aydın, 193-247, (1997).
13. W.T. Tsai, C.Y. Chang, C.H. Ing, C.H. Chang, Adsorption of acid dyes from aqueous solution on activated bleaching earth. *J. call Int.Sci*, 275:72-78, (2001).
14. C. Weurman, T. Swain, Changes in the enzymic browning of Bromley's seedling apples during their development. *J. Sci Food Agr.*, 6, 186, (1955).
15. K.P. Yadava, B.S. Tyagi, V.N. Singh, Effect of temperature on the removal of lead (II) by adsorption on China clay and wollastonite, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51(1), 47-60, (1991).
16. H.B. Yıldız, L. Toppare, Y. Hepuzer Gursel, Y. Yagci, Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4):945-948, (2006).