



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**NEVŞEHİR PATATESİNDEN (*Solanum Tuberosum* L.)POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILARAK KİNETİK VE ELEKTROFORETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kabil Özcan TOZAK

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN

AKSARAY, 2013

T.C.

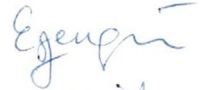
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL ve ONAY BELGESİ

Öğrenci Kabil Özcan TOZAK'ın "Nevşehir Patatesinden (*Solanum Tuberosum* L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılarak Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı lisansüstü tez çalışması, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 1302.2013 tarih ve 2013/07-05 sayılı kararı ile oluşturulan aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak **Oy Birliği** ile kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN (Aksaray Üniversitesi)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhsin KARAARSLAN (Aksaray Üniversitesi)



Üye : Doç. Dr. Murat KAYA (Aksaray Üniversitesi)



Tezin Savunulduğu Tarih : 28.02.2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 08.03.2013... tarih ve 2013/10-01 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Doç. Dr. Selçuk REİS
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Patates (*Solanum Tuberosum* L.) karbohidrat kaynakları arasında ilk sırada yer alan en önemli bitkisel besinlerden birisidir. Bol miktarda nişastanın yanı sıra kalsiyum ve C vitamini içeren patates, insan besini olduğu gibi hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Patatesin ülkemizde yaygın olarak ekimin yapıldığı ve yer olarak İç Anadolu (Nevşehir ve çevresi) olarak bilinmektedir. Polifenol oksidaz enzimi birçok meyve ve sebze de bulunan ve bitkinin hastalıklara karşı direncinin artmasını sağlayan bir metalo enzimdir. Gıda endüstrisindeki önemi ise, enzimatik kararmaya neden olmasından kaynaklanmaktadır. PPO enziminin neden olduğu bu esmerleşme reaksiyonlarının önlenilme yöntemlerinden biride enzimin inhibe edilmesidir. En etkili inhibisyon yöntemlerinin bulunabilmesi için öncelikle meyve ve sebzelerde bulunan PPO enziminin kinetik özelliklerinin, aktivatör ve inhibitörlerinin, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin bilinmesi gerekmektedir. Enzim saflaştırmada kullanılan afinite kromatografisi yöntemi ise bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede saflaştırma; çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemlerine gerek olmadan kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi süresince her türlü destek ve yardımını gördüğüm değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENİN (Aksaray Üniversitesi) ‘e, ayrıca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen kimya bölümünde ki bütün hocalarıma şükran ve teşekkürlerimi sunarım. Yine meği geçen Doç. Dr. Nahit GENÇER (Balıkesir Üniversitesi), Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR (Süleyman Demirel Üniversitesi), Uzm. Adem ERGÜN (Balıkesir Üniversitesi) ve İdris SARGIN (Aksaray Üniversitesi)’ ateşekkürlerimi sunarım.

Bu zamana kadar eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama, abime, ablalarıma ve ailemi oluşturan bütün sevdiklerime teşekkürü bir borç bilip, sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Kabil Özcan TOZAK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	2
1.2. Enzimatik Kararma.....	3
1.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası.....	6
1.3.1. Polifenol oksidaz enzimi adlandırılması	6
1.3.2. PPO'nun tabiattaki dağılımı.....	7
1.3.3. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar.....	7
1.3.4. PPO'nun substratları	8
1.3.5. PPO'nun aktivatörleri.....	12
1.3.6. PPO'nun inhibitörleri ve enzimatik kararmanın önlenmesi	13
1.3.7. PPO' nun ekstraksiyonu	14
1.3.8. PPO'nun saflaştırılması	15
1.3.9. PPO'nun homojenitesi ve molekül ağırlığı.....	16
1.3.10. Enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	17
1.3.11. PPO'nun doğada ve gıda işletmeciliğindeki rolü	18
2. LİTERATÜR ÖZETİ	20
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. Materyaller.....	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	23
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	23
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması	28

3.2.2. Amonyum sülfatla çöktürme	28
3.2.3. Diyaliz	29
3.2.4. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	29
3.2.4.1. Afinite jelinin hazırlanması.....	29
3.2.4.2. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu	32
3.2.5. SDS-PAGE elektroforezi.....	32
3.2.6. Protein tayini.....	33
3.2.6.1. Kalitatif protein tayini.....	33
3.2.6.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	33
3.2.7. PPO enziminin aktivite tayini.....	34
3.2.8. PPO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar	34
3.2.8.1. Optimum pH ve sıcaklık çalışması.....	35
3.2.8.2. Farklı substratlar için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması	35
3.2.8.3. Farklı inhibitörler için IC_{50} değerlerinin bulunması.....	35
3.2.8.4. Farklı inhibitörler için K_i değerlerinin bulunması.....	36
4. BULGULAR.....	40
4.1. L-tirozinin Sepharose-4B'ye Bağlanma Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi ..	40
4.2. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri	40
4.3. NPPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	41
4.3.1. NPPO enziminin 0.05 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş kolondan saflaştırılması.....	41
4.3.2. NPPO enziminin SDS-PAGE elektroforezi	43
4.4. NPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini ..	43
4.5. NPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	47
4.6. NPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için IC_{50} Değerlerinin Bulunması	49
4.7. NPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için K_i Değerlerinin ve İnhibisyon Türünün Bulunması	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	72

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NEVŞEHİR PATATESİNDEN (*Solanum Tuberosum*L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİİLE SAFLAŞTIRILARAK KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Kabil Özcan TOZAK

T.C.

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENİN

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip olan Nevşehir patatesinden (*Solanum Tuberosum* L.) PPO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerini takiben uygulanan afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Kullanılan afinite jeli Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit kimyasal yapısına sahiptir. Nevşehir patatesinden PPO enzimi % 15.16 verim ve 52.25 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Farklı substratlar için optimum pH ve sıcaklık taraması yapılmıştır. Saflaştırılan enzim L-tirozin ve p-kresol substratlarına karşı hiçbir aktivite göstermezken, katekol, gallik asit ve pirogallol substratlarına karşı oldukça yüksek bir aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar Nevşehir patatesi PPO enziminin monofenolaz (kresolaz) aktivitesinde yoksun olduğunu ve sadece difenolaz (katekolaz) aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında en yüksek aktiviteyi pH 7 ve 20 °C ' de katekol substratı ile elde edilmiştir. Katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla, 5 mM ve 5000 U/mL'de bulunmuştur. Altı farklı inhibitör için IC_{50} ve K_i değerleri tespit edilmiştir. Askorbik asitin enzim üzerinde en güçlü inhibitör etkisi gösterdiği gözlenmiştir.

2013, 72 sayfa

Anahtar sözcük: Nevşehir Patatesi, Polifenol Oksidaz, Afinite Kromatografisi, İnhibisyon, Optimum pH ve Sıcaklık.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM NEVŞEHİR POTATO (*Solanum Tuberosum* L.) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND INVESTIGATION OF ITS KINETIC AND ELECTROPHORETIC PROPERTIES

Kabil Özcan TOZAK

T.R.

Aksaray University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mahmut ERZENGIN

In this work, polyphenol oxidase (PPO) enzyme, which has an economic value, was purified from Nevşehir potato (*Solanum Tuberosum* L.) with affinity chromatography following the ammonium sulphate precipitation and dialysis and then it was characterized. Utilized affinity gel has chemically Sepharose-4B-L-tyrosin-p-aminobenzoic acid nature. PPO enzyme was obtained from Nevşehir potato with 15.16 % efficiency and 52.25 purification degree. Optimum pH and temperature studies were carried out for different substrates. Purified enzyme showed no activity against L-tyrosine and p-cresol, whereas it exhibited the maximum PPO activity against catechol, gallic acid, pyrogallol substrates. These results indicate that PPO enzyme in Nevşehir potato lacks in monophenolase (cresolase) activity and has only diphenolase (catecholase) activity. In optimum pH and temperature studies, catechol showed the maximum activity at pH 7.0 and 20 °C. K_M and V_{max} values for catechol substrate were determined as 5 mM and 5000 U/mLmin, respectively. IC_{50} and K_i values for six different inhibitors were determined. It was observed that ascorbic acid has the highest inhibition effect on the enzyme.

2013, 72 Pages

Keywords : Nevşehir Potato, Polyphenol Oxidase, Affinity Chromatography, Inhibition, Optimum pH and Temperature

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Melanin pigmentlerinin oluşum mekanizması.....	5
Şekil 1.2. Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi.....	8
Şekil 1.3. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.4. Katekinlerin genel yapısı.....	10
Şekil 1.5. Klorogenik asitin yapısı.....	10
Şekil 1.6. Kafeik asit ve p-kumarik asitin yapısı.....	11
Şekil 1.7. L-tirozin, L-DOPA ve Dopamin'in yapısı.....	11
Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.....	31
Şekil 3.2. Kompetitif inhibisyon için Lineweaver- Burk.....	37
Şekil 3.3. Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 3.4. Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 4.1. L-tirozinin aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanma süresi grafiği.....	40
Şekil 4.2. Bradford yöntemine göre standart protein grafiği	41
Şekil 4.3. Afinite kolonun Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH:5.00) ile yıkanması işleminde sonra NPPO enziminin 0,05 M (pH:7.00) Na ₂ HPO ₄ /1M tamponu ile elüsyonu absorbans-aktivite grafiği.....	42
Şekil 4.4. Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli ile saflaştırılan NPPO enziminin SDS-PAGE elektroforezi.....	43
Şekil 4.5. NPPO enziminin gallik asit substratı için pH-aktivite grafiği.....	44
Şekil 4.6. NPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği.....	44
Şekil 4.7. NPPO enziminin pirogallol substratı için pH-aktivite grafiği	45
Şekil 4.8. NPPO enziminin gallik asit substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	45
Şekil 4.9. NPPO enziminin katekol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği	46
Şekil 4.10. NPPO enziminin pirogallol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği.....	46
Şekil 4.11. NPPO enzimi için gallik asit substratı Linewear-Burk grafiği.....	47
Şekil 4.12. NPPO enzimi için katekol substratı Linewear-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.13. NPPO enzimi için pirogallol Linewear-Burk grafiği	48
Şekil 4.14. NPPO enzimi üzerine askorbik asit için inhibisyon etkisi	50
Şekil 4.15. NPPO enzimi üzerine sülfosalisilik asit inhibisyon etkisi.....	50
Şekil 4.16. NPPO enzimi üzerine sodyum azid inhibisyon etkisi.....	51

Şekil 4.17. NPPO enzimi üzerine p-amino benzoik asit inhibisyon etkisi.....	51
Şekil 4.18. NPPO enzimi üzerine benzoik asit inhibisyon etkisi	52
Şekil 4.19. NPPO enzimi üzerine m-aminobenzoik asit inhibisyon etkisi	52
Şekil 4.20. NPPO enzimi üzerine askorbik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,05$ mM ve $[I_2]=0,08$ mM	53
Şekil 4.21. NPPO enzimi üzerine benzoik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,05$ mM ve $[I_2]=0,08$ mM	54
Şekil 4.22. NPPO enzimi üzerine m-aminobenzoik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,01$ mM ve $[I_2]=0,04$ mM	54
Şekil 4.23. NPPO enzimi üzerine p-aminobenzoik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,01$ mM ve $[I_2]=0,04$ mM	55
Şekil 4.24. NPPO enzimi üzerine sodyum azid‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,015$ mM ve $[I_2]=0,035$ mM.....	55
Şekil 4.25. NPPO enzimi üzerine sülfosalisilik asit‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=5,5$ mM ve $[I_2]=6,5$ mM.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı	25
Çizelge 3.2. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	27
Çizelge 4.1. Nevşehir patatesi saflaştırma tablosu	42
Çizelge 4.2. NPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve sıcaklık değerleri	47
Çizelge 4.3. NPPO enziminin için üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri	49
Çizelge 4.4. NPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i ve % aktivite grafiklerinden bulunan IC_{50} değerleri ve inhibisyon türleri	56

SİMGELER DİZİNİ

E.C.	Enzim kod numarası
K_M	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu(mol/L)
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
rpm	Devir/dakika
U	Enzim ünitesi
V_{max}	Enzimin substrata doyduğu andaki hızı (Udk/mL)

KISALTMALAR DİZİNİ

EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
Ki	İnhibitör katsayısı
NPPO	Nevşehir patatesi polifenol oksidaz enzimi
PABA	p-aminobenzoik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PPO	Polifenol oksidaz enzimi
PVP	Polivinilpirolidin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N',-tetrametiletildiamin
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan

1.GİRİŞ

Enzimler gıda endüstrisinde çok büyük öneme sahiptir. Bazı durumlarda enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar gıda endüstrisi açısından faydalı sonuçlar doğururken, bazı durumlarda istenmeyen durumlar oluşmaktadır. Bunun bir örneği olarak polifenoloksidaz enzimlerince katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Siyah çay üretiminde, polifenol oksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonla istenen bir durum olan çayın başlıca karakterini veren siyah renk oluştururken meyvelerde aynı olay, rengin bozulmasına ve besin değerinin azalmasına sebep olur.

Birçokmeyve ve sebze, esmerleşme olarak bilinen renk değişimleri fenolikbileşiklerin kinonlara oksidasyonu ile meydana gelir. Değişik meyve kültürleri arasında esmerleşme derecesinin fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz (PPO) adı verilen enzim aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir ve böyle bir ilişkinin varlığı çeşitli meyve, sebze ve mantarlar için ortaya konulmuştur. Enzimatik olarak renk değişimi oksijen varlığında PPO'nun monofenolik ve difenolik maddeleri kinolik bileşiklere yükseltgemesinden kaynaklanır. Gerçekte, PPO'larla katalizlenen esmerleşme reaksiyonlarında oluşan kinonlar oldukça reaktif olup, esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşirler (Whitaker, 1972).

Enzimatik kararın için PPO, bunun etkilediği polifenolik substratlar ve oksijenin bir araya gelmeleri gerekir. Enzimatik kararın bu üç maddeden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulabilir veya azaltılabilir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında oksijenin varlığı kaçınılmazdır. Ayrıca bütün bitkilerin belirli oranlarda fenolik madde içerdiği bilinmektedir. Bu bileşikleri uzaklaştırmak kesinlikle pratik değildir. Enzimatik kararın önlenmesinde en geçerli yöntem PPO aktivitesinin kontrol altına alınmasıdır. Bu nedenle enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada afinite jeli sentezlenerek ekonomik öneme sahip Nevşehir patatesinden PPO enziminin saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen saf PPO enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla ile aşağıdaki hedefler belirlenmiştir;

- Afinite jeli sentezlenmesi,
- SDS-PAGE ile PPO enziminin yaklaşık molekül ağırlıklarının tespit edilmesi,
- Çalışılan her bir substrat için optimum pH ve sıcaklıkların belirlenmesi,

- Belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla inhibisyon türünün tespiti ve K_i sabitleri ile IC_{50} değerlerinin bulunması.

1.1. Enzimler

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden biyolojik katalizörlerdir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden; ekmek, peynir, şarap ve ilaç yapımında kullanmışlardır. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasına paralel olarak enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da hızla devam etmiştir.

Enzimler canlı organizmalardaki reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden yüzde yüzlük bir ürün verimi sağlayan, protein yapısındaki biyokatalizörlerdir. Enzimler proteinlerin çok büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil eder (Keha ve Küfrevioğlu,2005). Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir ve turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim katalaz enzimidir.

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (U) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzimünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).Enzimler molekülleri parçalar birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar. Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir.Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wisse mann, 1985). Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH aktivite eğrileri aynı şekilde değildir (Bhat, 2000).

Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir.

Sıcaklığın artması beraberinde viskositenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir. Enzimler ile katalizlenen reaksiyon 0 – 40 °C arasında reaksiyon hızı yükselir.

Fakat 40 °C de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C de enzim tamamen bozulur (Bhat, 2000). Bu noktada çözüm olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir. Endüstriyel uygulamaları hakkında birçok derleme yayınlanmıştır. Bunlardan bazıları; biyotransformasyonlar, süt, nişasta, bira, meyve suyu ve ekmek sanayisinde, bakteriyel kontaminasyon tespiti ve eliminasyon, protein zenginleştirmede, deterjan ve deri endüstrisinde yaygın olarak kullanılır.

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir (Erzengin, 2002).

1.2.Enzimatik Kararma

Sebzelerin ve meyve depolanması esnasında ve kesme, soyma gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişimlerine kararma denir. Polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltir ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna sebep olmaktadır (Laurila vd., 1998)(Şekil 1.1.).

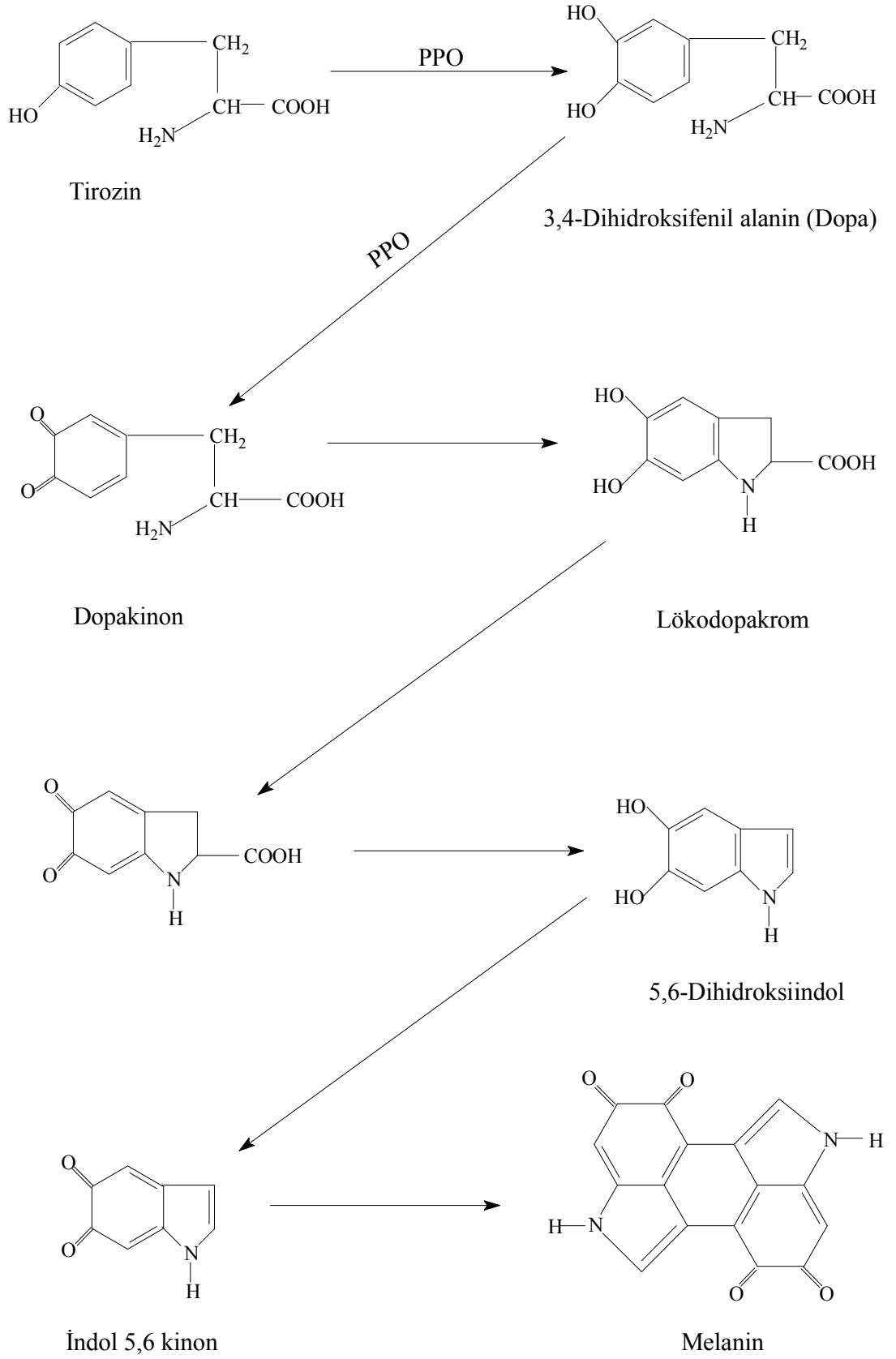
Esmerleşme reaksiyonuna yol açan sebepler üç grup altında toplanmaktadır;

- Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları.
- Enzimatik olmayan oksidatif esmerleşmeler.
- Maillard reaksiyonu sonucu oluşan esmerleşmeler.

Bu reaksiyonlarda bakırın rolü ise çeşitli kaynaklardan izole edilen PPO enziminin içerdiği bakır miktarı da farklıdır. Muz, patates ve tütünden elde edilen PPOenziminin bakır konsantrasyonları sırasıyla % 0,3, % 0,2 ve % 0,32'dir (Vamos-Vigyazo 1981).

Monofenollerin hidroksilasyonu sırasında ortamda bulunan 1 molekül O_2 aktif bakırdan elektron alarak H_2O 'ya indirgenir. Bu reaksiyon sonucunda bakır, inaktif (+2değerlikli) durumdadır. Yeniden aktiflik kazanması için oluşan o-dihidroksifenolüno-kinona yükseltgenmesi gerekmektedir.

Bu reaksiyonlar içerisinde en çok görülen enzimatik esmerleşme; fenolik madde, moleküler oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenabilir (Pekyardımcı, 1992).



Şekil 1.1. Melanin pigmentlerinin oluşum mekanizması

Melanin pigmentinin oluşumunda, çiftleşmemiş elektronlar, kolayca yeni kovalent bağları oluştururlar ve yeni bağlanmış karbonlar üzerindeki hidrojenler tekrar oksitlenecek olan hidrokinona göç ederler. Sonuçta kompleks yapıdaki büyük polimerler oluşur (Singleton, 1987).

Bu reaksiyonlarda oluşan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve herhangi bir renk bozulmasına neden olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimer oluşmakta ve bunlar daha büyük moleküllu bileşiklere polimerize olmaktadır. Renk bozulmalarının esas nedeni esmer renkli olan bu polimerlerdir. Reaksiyon sonunda oluşan renk tonu ve yoğunluğu, çevresel faktörlerin ve ortamdaki fenollerin türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir (Nicolas vd., 1994).

1.3.Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası

1.3.1.Polifenol oksidaz enzimi adlandırılması

Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir (EC 1.14.18.1). Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Birincisi; monofenollerin o-dihidroksi fenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi), ikincisi olarak o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) (Laurila vd., 1998). Enzimin sistematik adı; monofenol, L-dopa: oksijen oksido redüktaz şeklindedir. Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre az kullanılan adları da vardır. Bunlardan bazıları , tirozinaz, kresolaz, fenolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, o-difenolaz, katekol oksidaz, pirokatekol oksidaz, dopa oksidaz, monofenol monooksidaz, o-difenol oksido redüktaz, difenol oksidaz ve klorogenik oksidaz'dır (White vd., 1997).

Son yıllarda enzim isimlerindeki karışıklığını gidermek amacıyla uluslararası terminolojide bitki polifenol oksidazlarının adlandırılmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Tirozinaz (monofenol monooksijenaz) (EC.1.14.18.1) enzim kodu ile, katekol oksidaz (difenoloksidaz, difenol oksijen oksidoredüktaz) (EC.1.10.3.2) enzim kodu ile, lakkaz ise (EC.1.10.3.1) enzim kodu ile belirtilmiştir. Ancak bu yeni sınıflandırma aynı enzim önceleri kresolaz ve katekolaz aktiviteleri olarak bilinen iki reaksiyon arasında ayrımı getirdiği için pek tercih edilmemektedir.

1.3.2. PPO'nun tabiattaki dağılımı

PPO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından mantarlarda bulunmuştur(Whitaker, 1972). Birçok meyve ve sebze de bulunmasının yanı sıra ıstakoz, karides,yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarında (Simpson vd.,1988) ve bazı mikroorganizmalarda da bulunmaktadır (Pomerantz, 1963).Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin miktarı ve dağılımı, bitkinin cinsine, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır (Joslyn ve Ponting, 1951).PPO enziminin, meyve ve sebzelerin değişik kısımlarındaki dağılımı oldukça farklıdır, örneğin üzümün kabuğunda bulunan enzimin, etli kısmına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Meyve ve sebzelerin olgunlaşması süresince, içerdikleri PPO enziminin aktivitesi değişmektedir. Ham meyvelerde, PPO aktivitesi ve dolayısıyla renklenme daha fazladır. Birçok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PPO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Ragazzi ve Veronese, 1967).

1.3.3. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar

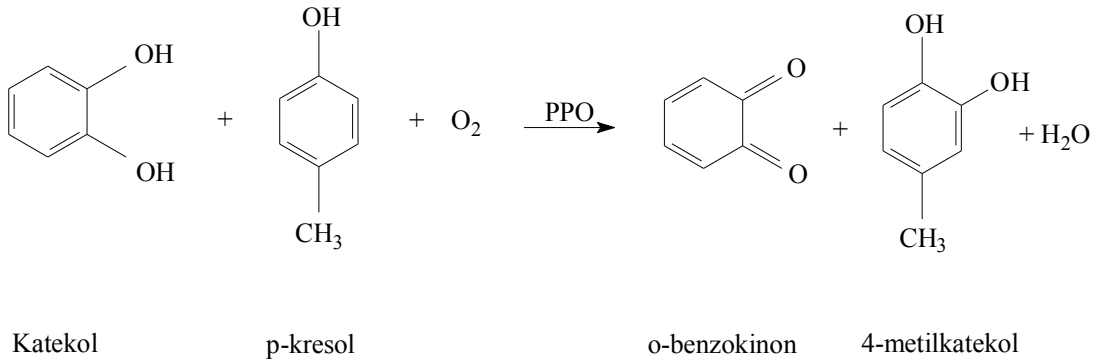
Pek çok bitkisel kaynaktan ve son zamanlarda mikroorganizmal kaynaktan PPO enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış ve böylelikle yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Kivi, marul, hurma, Anjou armudu, muz, Amasya elması, kakao tohumu, kuşburnu bitkisel kaynaklardandır. Nurospora ve Agaricus ise PPO izole edilen mikroorganizmalardandır (Pendharkar ve Nair, 1964). Yapısında bakır içeren PPO enzimi moleküler oksijen varlığında birbirinden tamamen farklı iki reaksiyon katalizlemektedir;

- Monofenollerin hidroksilasyonu ile o-dihidroksi fenollerin oluşması (kresolaz aktivitesi).
- o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) (Vamos ve Vigyazo, 1981).

Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip olduğu bildirilmektedir (Pendharkar ve Nair, 1964).

Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi birçok PPO ekstraktları her iki aktiviteye de sahip iken, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz PPO enzimlerinin monohidroksi fenollere etki etmediği bildirilmektedir (Mayer, 1987).

Oluşan kinon birimleri kendiliğinden birbirleriyle, protein ve indirgen şeker gibi bitki içerikleriyle kondense olarak kararmaya sebep olan yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluştururlar (Mayer, 1987).



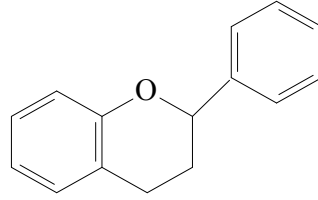
Şekil 1.2. Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi

Meyvelerde bulunan fenolik substratların çoğu dihidroksifenoller olduğundan kararma reaksiyonlarının çoğu PPO enziminin katekolaz aktivitesi sonucu meydana gelmektedir. PPO enziminin katalizlediği reaksiyonun aydınlatılması için uzun yıllar çalışılmıştır. Ancak günümüzde, bu reaksiyonun PPO enziminin aktif merkezinde bulunan bakırın redoks reaksiyonları sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir (Zemel, 1989).

1.3.4. PPO'nun substratları

Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerinin geniş bir karışımını içerirler. Ancak bunların çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olarak uygundur (Herrmann, 1976). Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyonlar sonucu sebze ve meyvelerde renk bozulmalarına sebep olmalarının yanı sıra, meyvelerin tatlarına da etkileri vardır. Polifenol bileşikler, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına sebep olurlar. Bu bileşiklerden bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden otooksidasyona uğrarlar ve oluşan bileşikler polimerleşerek koyu renkli makro molekülleri oluştururlar (Matheis ve Belitz, 1977; Herrmann, 1973).

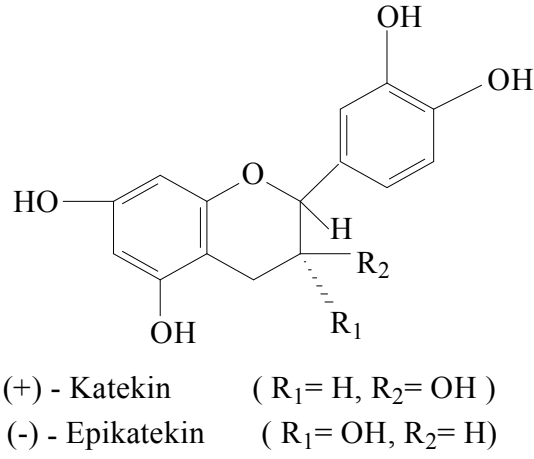
Meyve ve sebzeler, yapısında çeşitli fenolik bileşikler bulundurmaktadır. Bu substratlara başta katekol, 4-metil katekol, pirogalol, dopa olmak üzere gallik asit, tirozin, kafeik asit ve sinamik asit esterleri örnek verilebilir. Sinamik asit türevlerinden klorojenik asit ve kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) PPO enziminin yaygın olarak kullanılan substratlarıdır. Katekol (odihidroksi fenol); enzimatik oksidasyon çalışmalarında model substrat olarak kullanılmaktadır (Arslan vd., 2004). Dopa ve tirozin hemen hemen bütün bitki dokusunda bulunan aminoasitlerdir ve PPO'nun substratlarıdır (Mathew ve Parpia, 1971). PPO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Şakiroğlu, 1994).



Şekil 1.3. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

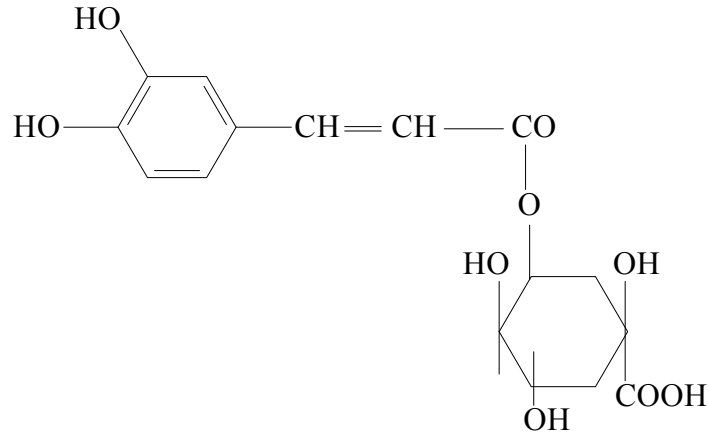
Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen “PPO enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman afinitesinin yüksek olduğu PPO substratları bulunmaz” tezini desteklemektedir (Harel, vd., 1964; Jen ve Kahler, 1974). Substrat spesifikliğı yalnız meyve ve sebzelerin cinsine bağlı değildir aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzelerin ekstrakte edildiğı kısımina ve yetiştirilişine bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler (Lavollay vd., 1963; Vamos-Vigvazo, 1978).

Katekinler; doğada (+) katekin ve onun stereoizomeri olan (-) epikatekin olarak formda bulunmaktadır. Diğer formları tabii katekinlerin sıcak seyreltik sodyumkarbonat ile muamele edilmesiyle elde edilir (Frudenberg vd., 1962).



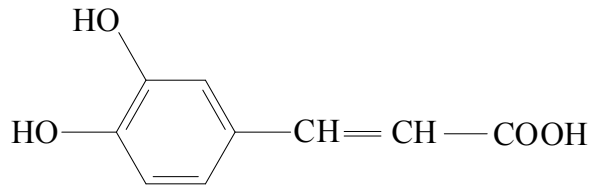
Şekil 1.4. Katekinlerin genel yapısı

PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorogenik asittir. Klorogenik asidin yapısı aşağıdaki gibidir.

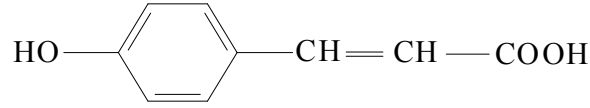


Şekil 1.5. Klorogenik asitin yapısı

Klorogenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının p-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PPO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir (Sato, 1962).



Kafeik asit
 (3,4- dihidroksi sinamik asit)



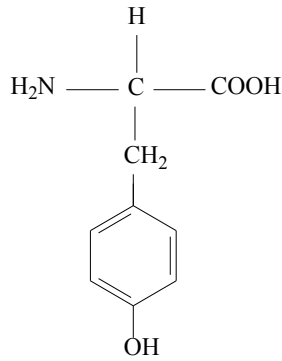
p- kumarik asit
(4- hidroksi sinamik asit)

Şekil 1.6. Kafeik asit ve p-kumarik asitin yapısı

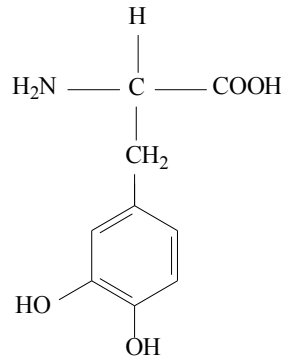
Klorogenik asidin doğada bulunan izo-klorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudoklorogenik asit ve “ Band 510 ” izomerleri de PPO’nun substratlarıdır (Sondheimer, 1964).

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil etil amin) ve tirozinin PPO ile hidroksilasyon sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin) bitki dokularında mevcuttur.

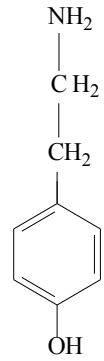
Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PPO, L-DOPA’yı dehidrogenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat p-kresolu hidroksiller (Stelzig vd., 1972).



L- tirozin



L- DOPA
(3,4- dihidroksifenil alanin)



Dopamin
(3,4-dihidroksifenil etilam

Şekil 1.7. L-tirozin, L-DOPA ve Dopamin’in yapısı

Doğal fenolik substratların her birinin sebze ve meyvede sebep oldukları enzimatik kararmaya katkıları fenollerin konsantrasyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olduğu kadar, farklı kinonlardan elde edilen makro moleküler pigmentlerin renk şiddetine de bağlıdır. Bazı meyve ve sebzelerde PPO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde bulunmayan fenolik bileşiklerdir (Gross, ve Coombs, 1975).

1.3.5. PPO'nun aktivatörleri

Enzimatik kararmanın önlenmesi ve PPO'nun inaktivasyonu üzerine çok fazla yayın varken, enzimin aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu durum şüphesiz, çoğu zaman, enzimin aktivasyonunun arzu edilmemesinden kaynaklanmaktadır. Tatlı patates dokularında substratların indüklediği aktivasyona rastlanmıştır (Schaller, 1972). SDS' in farklı avacado türlerinden hazırlanan ham ve kısmen saflaştırılmış ekstraktlardaki inaktif PPO'yu da aktive ettiği bildirilmektedir (Kahn, 1977). Üzüm PPO'su kısa bir süre için üreye yada asidik pH'ya maruz bırakıldığında 4-10 kat arasında dönüşümlü olarak aktive olmaktadır. Bu durum, kloroplastlarda olduğu gibi kısmen saflaştırılmış enzim ekstraktlarında da görülmektedir. Üre inaktif bakla PPO'sunu aktive eder ve aynı zamanda enzimin monofenoller üzerine olan etkisinde artmaya sebep olur (Lerner, 1972). Ortama Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi, turp PPO'sunun aktivitesini artırırken, benzer muamelenin patates PPO'suna etkisi olmamaktadır (Ishiguro ve Aoyama, 1970; Weaver vd., 1968). L-DOPA, PPO tarafından katalizlenen adrenalinin oksidatif döngüsünü ve renkli ara bileşiklerin oluşumunu aktive eder. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO'ların aktivasyonu sistematik olarak çalışmamasına ve belki de tam olarak anlaşılmamasına rağmen, çalışılan birkaç örneğin büyük kısmı aktivasyon sırasında proteinlerin konformasyonel değişime uğradığını göstermektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). PPO'nun aktif formu bakır içeren bir enzim monomerinin bir oligomeri gibidir (Arnaud, 1965). Aktivatörün rolü, enzimi biyolojik aktivitesiyle gerekli olan polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirmesidir. Bu durum, substrat etkisi veya prostetik iyon eklenmesiyle daha iyi anlaşılabilir. Enzim aktivitesi meyvelerde olgunlaşmayı hızlandıran gübrelerdeki eser elementler veya fiziksel muameleler gibi diğer faktörler ile de indüklenebilir (Pallidina ve Pervova 1966). Bu etki bitkideki enzim proteinin sentezinin artmasına, doğal bir inhibitörün eliminasyonuna (bu işlem inhibitörün bir metal iyonu ile kompleksleştirilmesi ile gerçekleştirilir), substratın yapısında veya hücre duvarının geçirgenliğindeki olası değişim ile ilişkilendirilebilir (Palmer ve Roberts, 1967).

1.3.6. PPO'nun inhibitörleri ve enzimatik kararmanın önlenmesi

PPO enzimlerinin inaktivasyonunda SO₂ (kükürtdioksit) kullanımı etkili olmaktadır. SO₂ ortamda bulunan oksijeni harcayarak ve oluşan yükseltgenmiş polifenollerle veya kinonlarla reaksiyon vererek enzimin aktiflik göstermesine engel olmaktadır.

Sonuçların en iyi etki mekanizmaları iyi anlaşılamayan genelde kimyasalların karışımı ile elde edilmektedir (Walker, 1975).PPO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloprotein olduğundan, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbomat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir (Laurila, vd., 1998).Bu reaktiflerden bazıları, oluşan kinonlarla da reaksiyona girerler. Muz PPO'su üzerine DIECA'nın etkisiz olduğu bulunmuştur. Bu durum saflaştırılmış enzimde bakırın bulunmayışı ile ilişkilendirilir (Galeazzi ve Sgarbieri, 1978).

Dietil ditiyokarbamat, enzimin yapısında bulunan bakır ile şelat kompleksi yaparak onun inhibisyonuna neden olmaktadır. Sistein ve diğer tiyol aminoasitlerinin ve tiyollerin inhibitör etkisi vardır. o-kinonlar sisteinin tiyol grubu ile kovalent bağ yaparlar. Metiyoninin tiyoester grubu ile protein yapısında bulunan lizinin amino grubu arasında reaksiyon meydana gelebilmektedir (Kahn, 1985).

Tütün yaprağından elde edilen PPO enziminin KCN, sodyum azid ve tiyoüre ile inhibe olduğu görülmüştür (Mathew ve Parpia, 1971).

Sitrik-askorbik asit karışımının dondurulmuş meyvelerin kararmasının engellenmesinde çok büyük rolü vardır (Joslyn ve Ponting, 1951).

Askorbik asit de enzimin prostetik grubunu şelatlayarak enzime direkt olarak etki edebilir. İnhibitörlerin bu grubunun kloroplast, mitokondrial veya çözünmüş haldeki PPO üzerine etkileri farklı olarak bulunmuştur. Örneğin, mitokondrial ve çözünür formdaki PPO'nun katekolaz aktivitesi potasyum etil ksantat, DIECA ve tiyoüreye karşı benzer davranışlar gösterirken, kloroplastlarda aynı aktivite ksantat ile inhibe edilmez iken DIECA ile kısmen inhibe edilmiştir.

Patates, kiraz, elma, kayısı ve şeftalilerden elde edilen enzimler üzerinde benzoik asit ve sinamik asidin bazı türevleri yarışmalı inhibisyon etkisi göstermektedir (Pifferi, 1974; Walker, 1976). K_i değerleri; sinamik asit<p-kumarik asit<ferulik asit<m-kumarik asit<o-kumarik asit<benzoik asit şeklindedir.

Bu bileşiklerin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar, PPO enzim molekülü içinde substrat ve inhibitörün ayrı ayrı bağlandığı fakat birbirine yakın bölgelerin olduğunu göstermektedir (Walker, 1975; Pifferi, 1974). Aromatik asit inhibitörleri, benzen halkası üzerinde konjuge pozisyonunda ya da halkaya direkt bağlı bir serbest karboksilik grubu içermelidirler.

1.3.7. PPO' nun ekstraksiyonu

PPO'nun bitki materyallerinden ekstraksiyonu işleminde üç sorun gözlenir;

- Enzimin inaktif formda olması,
- Hücre organellerine bağlı enzimin çözünürleştirilmesi,
- Bitkilerde bulunan fenollerin enzim ile oksidasyonu sonucu polimerizasyonu ve enzim üzerine çökmesinin engellenmesi.

Çoğu bitkilerde PPO aktif formda bulunmaktadır, hücre organellerine bağlı inaktif enzim kafein-sodyum benzoat ile hem aktive edilir hem de çözündürülebilirler (Mayer, 1987). Avokado'dan elde edilen ham ve kısmen saflaştırılmış preparasyonlardaki inaktif PPO sodyum dodesil sülfat (SDS) ile aktive edilebilir (Kahn, 1977). Çözündürme işlemi, genelde, Tween-80 veya Triton X-100 gibi deterjanlarla yapılabilir (Stelzig vd., 1972; Harel vd., 1996). PPO' nun herhangi bir numuneden eldesin de üzerindengelinmesi gereken en büyük zorluk; bitki materyalinin ekstraksiyonu ve taşınması esnasında pigment oluşumunun ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler enzim proteini üzerine çökebilirler ve enzimin çözünmemesine sebep olabilirler. Buna ek olarak, enzimin dönüşümsüz inaktivasyonuna sebep olabilirler. Bu tehlikeleri en az seviyeye indirmek için bütün ekstraksiyon adımları mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır. Taşıma ve homojenizasyon genelde sıvı azot veya azot atmosferinde yapılmaktadır.

Bazı durumlarda materyalin ani dondurulması ve dondurularak kurutulması enzim ekstraksiyon işleminde ilk basamak olarak tavsiye edilmektedir (Stelzig, 1972; Gross ve Coombs, 1975). Aseton çöktürmesini takiben tampon ekstraksiyonu en çok kullanılan metotlardan birisidir (Vamos-Vigyazo, 1981). Bazen uygun bir tamponla ekstraksiyon asetonla çöktürme adımının önüne geçer (Palmer, 1963). Ekstraksiyon çok farklı tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Ekstraksiyon sistemini enzimatik polifenol oksidasyonundan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler ya da kinon bağlayıcıları da katılır. Askorbik asit, sistein, sodyum metabisülfid, DIECA ve sukroz veya bazende bu bileşiklerin karışımı kullanılmaktadır (Walker, 1975).

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili bir yolu da ortamdaki substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlama da en yaygın kullanılan madde polivinilpirolidon (PVP)'dir (Loomis, 1968). PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH'da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVP, PPO'nun kısmiyarışmalı inhibitörüdür fakat PVP'nin inhibitör etkisi enzim preparasyonunun yıkanması ile elimine edilebilir. Fenollerin bağlanmasında bazen polietilen glikol (PEG) tercih edilir (Loomis, 1968). Belki de bunun sebebi ham enzim preparasyonu eldesin de,

PEG'in asetondaki çözünürlüğünün belirli avantajlar sağlamasından dolayıdır (Loomis, 1968). Poliamid (nylon) ve polikaprolaktam fenol bağlamada başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Loomis, 1968). Enzim dışındaki kazein gibi proteinler fenollerle hidrojen bağı kurmakta kullanılabilir. Proton alıcısı gibi davranan organik çözücüler (ketonlar, esterler, dimetil amid, dimetil sulfoksit ve N-metil pirolidin)'de fenollerle kompleks yapmada etkilidirler (Loomis, 1968).

1.3.8. PPO'nun saflaştırılması

Ham ekstrakt PPO preparasyonlarının saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzim kaynağına göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları farklı doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100 veya G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-Sephadex veya DEAE-selüloz anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisidir. Buna ek olarak, düşük molekül ağırlıklı safsızlıkları uzaklaştırmak için diyaliz ya da Sephadex G-25 kromatografisi bu metotların bazı kombinasyonlarının ara basamaklarında kullanılmaktadır (Mayer, 1987). Uygulanan metotların sırası değişebilir. Bazı durumlarda, bir ya da diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; mantar PPO'sunun saflaştırma prosedürü için iki amonyum sülfat çöktürme adımı bildirilmektedir, bunlardan birisi DEAE-selüloz kromatografisi öncesinde diğeri ise sonrasında tatbik edilmiştir (Sato, 1962). Mantar PPO'suna, kalsiyum fosfat jeli üzerine adsorpsiyonu takiben hidroksiapatit üzerine

adsorpsiyon kromatografisi uygulanmıştır (Smith ve Kruger, 1962). Şeftali PPO'sunun saflaştırılması için, hidroksiapatit kromatografisini takiben DEAE-selüloz kolonundan elusyon yapılmıştır (Rivas ve Whitaker, 1973). Buna yakın bir yaklaşım Yonekura ve arkadaşları tarafından at sineği tırtılı PPO enziminin saflaştırılması için kullanılmıştır (Yonekura vd., 1981). Bu araştırmacılar afinite resini olarak fenilalanin, p-amino benzoat, bir p-amino benzoat türevi ve N-asetil-L-fenilalanini kullanmışlardır. Bunlardan sadece p-amino benzoat türevi, PPO'yu belirli bir derecede bağlamıştır. Menon ve Haberman ise Sepharosa 3-iodotirozini bağlamışlardır (Menon ve Haberman, 1975). Bu taşıyıcı ile iki veya üç izoenzim formu ayrıştırılmış ve enzim kısmen saflaştırılmıştır. Lerman yüksek tuz konsantrasyonunun nonspesifik adsorpsiyonu arttırdığını bildirmesine rağmen, bu çalışmalardan hiç birisi hidrofobik adsorpsiyon veya immuno afinite kromatografisinin kullanılması olasılığını araştırmamıştır.

1.3.9.PPO'nun homojenitesi ve moleköl ağırlığı

Birçok kaynaktan elde edilen PPO enziminin farklı moleköl yapılar da olduğu bildirilmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara bağıdır. Molekül yapılarının farklı oluşu; benzer alt birimlerin değışik polimerizasyon derecelerinde birleşmelerine, farklı alt birimlerin değışik kombinasyonuna, tek bir proteinin konformasyonel değışimlerine, veya bahsedilen bu üç ihtimalin kombinasyonuna atfedilir.

Muz ve şeker kamışı kloroplastlarından elde edilen PPO'lar oldukça düşük moleköl kütlelerine (12000 ve 10000) sahip iken, genelde PPO monomerinin 30000 dalton civarında moleköl kütesine sahip olduğu ve bir bakır atomu ihtiva ettiğı kabul edilir (Palmer, 1963).

Farklı moleköl yapıdaki enzimler substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık ve inhibitörlere karşı olan davranışları bakımından farklılıklar gösterebilirler. Dehidrogenasyon ve hidroksilasyon aktivitelerinin (katekolaz:kresolaz) oranları üzerinde çok detaylı çalışmalar vardır. Genel olarak, çeşitli yapıların yalnız bir kısmı monofenollere etki eder. Hidroksilasyon aktivitesinin dehidrogenasyon aktivitesine oranla daha kararsız olduğu alkali pH şartlarında, büyük moleköl ağırlıklı yapılar hidroksilasyon aktivitelerinin çoğunu kaybederler (Gross ve Coombs, 1975).

1.3.10. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

PPO aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Enzimin reaksiyon inaktivasyonu kısa zamanda o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu yavaşlattığından dolayı her iki metotda da, reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesine dikkat edilmelidir.

Substratın tükenme hızı, genel olarak, O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresi ile manometrik olarak ya da bir oksijen elektrodu ile polarografik olarak ölçülür. Bu iki metotda aynı sonuçları vermez. Aynı şartlar altında elde edilen O₂ absorpsiyon değerleri polarografik metotda daha yüksek çıkmaktadır (Mayer vd., 1966).

Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik dansitesinin ölçümüyle spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

Bu metot oldukça basittir ve rutin analizlerde kullanılır. Katekol, klorogenik asit veya pirogallol gibi doğal substratlar spektrofotometrik metotlarda kullanılabilir. Farklı fenollerin oksidasyon ürünlerinden oluşan renkli bileşiklerin değişik dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermeleri, özellikle alkali pH'larda substratların oto oksidasyona uğrayabileceği ve klorogenik asit gibi bazı inhibitörlerin fazla miktarlarının enzimin güçlü bir inhibisyonuna sebep olabileceği göz önünde tutulmalıdır (Mihalyi ve Vamos-Vigyazo, 1976). Aktivite ölçümleri esnasında PPO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen hidrokinon ve askorbik asit gibi daha negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir. Bundan dolayı, bu reaktiflerin konsantrasyonları sabit kaldığı sürece, substratın katalitik miktarı yeterlidir. Sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bu prensibe dayanan diğer uygulamalarda, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorpsiyon verdiği 265 nm'deki konsantrasyonundaki azalma ölçülür (Heimann ve Andler, 1962). Askorbik asidin tükenme hızı enzim aktivitesi ile direkt olarak orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon $\leftrightarrow$ substrat transformasyonudur. Askorbik asit oksidaz elde edilen sonuçlara tesir eder. Bu metodun diğer bir uygulamasına göre, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki askorbik asidin tamamının tükenmesi için gereken zaman yerine, renkli kinon ürünlerinin oluşumu ölçülür. Bu kronometrik metot olarak isimlendirilir.

Askorbik asit yerine 420 nm’de absorbands veren $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm’de absorbands veren bitki materyalleri sonuca tesir etmez. Bu metodun diğ er avantajları ise, ferrosiyan r n özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre daha az hassas olması ve çözeltide de daha kararlı olmasıdır. Aynı substrat konsantrasyonu kullanıldığ ı zaman, ferrosiyanür metodu askorbik asit prosedürüne oranla yarı yarıya daha az hassastır.

Fenolik substratların ve reaksiyon ürünlerinin üzerine yapılan gaz kromatografisi çalışmaları, kolayca okside olabilen materyaller kullanılmadığında katekol substratı ile yüksek K_M değerlerinin elde edildiğini göstermiştir (Garrett, 1976).

Bu  alışmalar, reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu ve reaksiyon esnasında enzimin inaktivasyona uğradığını göstermiştir.

Reaksiyon inaktivasyonunu önlemek için çeşitli prosedürler tasarlanmıştır. Bu prosedürler reaksiyon karışımından kinonların uzaklaştırılmasına dayanır. 3-metil-2-benzotiyazolon hidrazon hidroklorik kinonlarla kondansasyon ürünleri oluşturur. Bu  r nler daha sonra kloroform ile reaksiyon karışımından ekstrakte edilir ve organik fazın absorpsiyonu 500 nm’de okunur. Kondansasyon  r nlerinin ekstraksiyonu yerine asetonda çözülmesi daha hassas sonuçlar vermektedir (Mazzocco ve Pifferi, 1976). Diğer bir metotda ise her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz bileşikler oluşturan sarı bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit anyonu kullanılır. Enzim aktivitesi 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin 412 nm’deki absorbandsındaki azalmasının spektrofotometrik olarak  l lmesiyle takip edilir (Esterbauer, 1977).

1.3.11. PPO’nun doğada ve gıda işletmeciliğindeki rolü

PPO enziminin gıda, kozmetik ve sağlık endüstrisinde çok geniş uygulama alanı vardır. PPO enzimi sebze ve meyvelerde enzimatik kararmaya neden olarak gıdaların pazar değerini düşürdüğünden öncelikle gıda sektörünün ilgisini çekmiş ve buna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu alandaki çalışmalar enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek şeklinde (Eskin, 1990). Polifenol oksidaz enziminin bitkilerde önemli rolleri vardır. Bunlardan birisi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direncinde rol oynamasıdır. Örneğin virüs enfeksiyonundan etkilenen dokular, sağlıklı dokulara oranla daha fazla PPO enzimi içermekte ve enzimatik kararmaya karşı daha fazla hassas olmaktadır. Yaralı dokuda oluşan kinonların triptofan ile etkileşerek indol

asetik asit oluşturdukları ve böylece kallus dokusu oluşturarak o bölgeyi korudukları düşünölmektedir (Yavru, 1997).PPO'nun bitkilerdeki mevcudiyeti sınırlı olmasına rağmen doğadaki rolü çok çeşitlidir. Yüksek bitkilerin solunum zincirinde görev alan terminal oksidazlardan biri olduğu bildirilmektedir fakat bu rolün önemi hala bir soru işaretidir.Patates X virüsü ile enfekte olan dokular enzimatik kararmaya karşı daha hassastır ve bu dokular sağlıklı dokulara oranla daha fazla fenol içeriği bulundurur. Diğer taraftan, lipid içeriği enfekte olmuş dokularda daha düşüktür.PPO'nun tabiattaki en önemli görevi bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır. PPO-polifenol sisteminin bitki patolojisindeki rolü hakkında çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır.Tatlı patates dokularının *Ceratocystis fimbriata* mantarından elde edilen patojenik veya patojenik olmayan bir izolatla aşılanması dokularda PPO aktivitesinin artışına nedenolmaktadır. Tatlı patates köklerinin düşük konsantrasyonlardaki etilene maruz bırakılması da aynı şekilde *Ceratocystis fimbriata* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığı gibi PPO aktivitesini de arttırmaktadır (Weber ve Stahmann, 1964).

Bitkilerin enfeksiyona karşı olan dirençlerinde PPO'nun görevi basitçe şudur; enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek su da çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi üstlenirler. Bu olay bazı araştırmacılar tarafından PPO'nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir. Lipid içeriğin azalması bu açıdan önemlidir. Çünkü, bu durum membranların geçirgenliğini etkileyebilir ve enzimin substratlarıyla temasını kolaylaştırarak “bariyerlerin” oluşumunu arttırabilir. Diğer bir teoriye göre de, polifenollerin oksidatif polimerizasyonunun ara ürünleri enzimi inaktive edebilir veya kararsız bitki enzimlerine ve virüslere bağlanır.

Zıt iklim koşullarına dirençli bitkilerde, genel olarak dirençsizlere oranla daha fazla PPO aktivitesine rastlanmıştır, örneğin kış şartlarına dayanıklı bir erik türü olan *Prunus ussuriensis* yapraklarında ve yine kış şartlarına dayanıklı asmalarda dayanıklı olmayanlara oranla daha fazla PPO aktivitesi bulunmuştur (Molchanova, 1966).

PPO'nun hidroksilasyon reaksiyonu tirozinin DOPA'ya, p-kumarik asidin kafeik aside, p-kumarilkuinik asitin klorogenik aside veya flavonoidlerin B-halkasına hidroksil grubunun katılmasıyla fenol biyosentezinde rol alır (Walker, 1975).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Son yıllarda yapılan PPO ile ilgili çalışmalarda, Huque ve arkadaşları (2013), Yüzey esmerleşme gelişimi ile ilgili olarak taze kesilmiş elma dilimleri metabolizması üzerine nitrik oksit (NO) ve ilişkili kontrol tedavileri etkisini incelemişlerdir. Taze kesilmiş elma dilimlerinde, yüzey hücreleri zararını sınırlamak için bir savunma mekanizması olarak, kesim yüzeyinde nitrik oksitin (NO) aktif fenollerin seviyesini PPO aktivitesi ile bağlantılı olarak aza indirmeye çalışıyor olabileceğini tespit etmişlerdir.

Zaini ve arkadaşları (2013), Yılan meyvesinden (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) membrana bağlı polifenoloksidaz saflaştırılması ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Membran bağlı polifenoloksidaz enzimini yılan meyvesinden Triton X-114 kullanarak ekstre etmişlerdir. % 40-80 amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında fraksiyonlara ayırmışlar ve Superdex 200 üzerinde kromatografılamışlardır. 12.35% saflaştırma derecesi ve 14.1 kat saflaştırmışlardır. Tek protein bandı native-PAGE ve SDS-PAGE ile bir monomerik protein olduğunu ve 38 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Karakterizasyon çalışmalarında yılan meyvesinde optimum pH 6,5 ve optimum sıcaklık 30 °C olduğunu bulmuşlardır. Km ve Vmax değerlerini katekol kullanarak, sırasıyla 5.46 mM ve 0.98 U /mldak olmak üzere hesaplamışlardır. Test ettikleri kimyasal inhibitörleri arasından, L-sistein en iyi inhibisyon etkisi göstermiştir. Sonrasında glutatyon, askorbik asit ardından EDTA ve sitrik asit'in etkili olduğunu bulmuşlardır.

Marri ve arkadaşları (2013), polifenol oksidaz enziminin farklı patates (*Solanum tuberosum* L.) yumruları çeşidinde saflaştırılmasını yapmışlardır. Polifenol oksidaz enzimini Sepharose ve Superdex 200 destek maddeleri üzerinde kolon kromatografisi ile izole etmişlerdir. Yapılan saflaştırma sonucunda PPO'nun izoformunun gösteren farklı molekül kütleleri bulunmuştur. Sırasıyla uygulanan SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve jel filtrasyon ile yöntemleri ile molekül ağırlıklarının 69 ve 340 kDa arasında olduğu tahmin dılmıştır.

Cabezas-Serrano ve arkadaşları (2013), taze kesilmiş enginarlarda esmerleşmeyi önlemek için sistein bazlı ön işlem çözeltisinin pH etkisi ile PPO aktivitesi arasında değişimlerine bakmıştır.

Aka ve arkadaşları (2013), termik muamele sırasında serbest fenol, L-askorbik asit, elma polifenoloksidaz (PPO) ve oksijen arasındaki etkileşimlerin modellenmesi incelenmiştir.

Yine Çin'de Liu ve arkadaşları (2013), dört mango (*Mangifera indica* L.) çeşidinin fiziko-kimyasal özelliklerine, antioksidan özelliklerine ve PPO aktivitelerine bakmışlardır.

Hong ve arkadaşları (2013), yaz ananas meyvesinde farklı sıcaklıklarda kalite değişimlerini ve depolama sırasındaki iç esmerleşme gelişmelerini, polifenol oksidaz (PPO) enizimi, peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri üzerinden incelemişlerdir.

Bibhuti ve arkadaşları (2012), patlıcan (*Solanum melongena*)’dan polifenol oksidaz (PPO)enzimini kromotografik yöntemler ile saflaştırıp,karakterizasyonunu yapmışlardır. Kaynaktansaflaştırdıkları PPO enzimini 112 kDa ve homodimer olarak bulmuşlar. PPO enzimi için4-metil katekol ile çok düşük K_M (0.34 mM) değeri ve yüksek katalitik etkinlik V_{max} (3.3×10^6) değerini tespit etmişlerdir. Yineen etkili inhibitörler olarak askorbik asit ve sodyum azidi bulmuşlardır.

Zhao-Jian(2011)yılında *Cleome gynandra* L. yapraklarından polifenol oksidaz enzimi iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Arıtma için sıralı olarak amonyum sülfat çöktürmesi ile birlikte, diyaliz, DEAE-Sepharose iyon-değişim kromatografisi ve Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisini uygulamıştır.Saflaştırılmış PPO, Coomassie, aktif boyama ve Western blot yöntemleriyle 52.6 kDa molekül ağırlığa ve monomerik yapıya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8.0 ve 60 °C’de olarak bulmuşlardır. İnhibitör olarak askorbik asit, L-sistein, β-merkaptöetanol, sodyumdiethylditiyokarbamat ve tiyürenin etkilerini incelemişlerdir.

Özel ve arkadaşları (2010), Sepharose 4B-L-tirosin-p-amino benzoik asit afinitekolonunu kullanılarak *Boletus erythropus*’dan polifenol oksidaz (PPO) enzimini saflaştırmışlardır. 4-metilkatekol substratını kullanarak optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla, 8.0 ve 20°C olarak bulmuşlardır. Enzimin +4 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra pH 3.0 ve 9.0 arasında son derece kararlı olduğunu ve aynı zamanda *B. Erythropus*’dan elde edilen PPO’nun 10 ve 30°C arasında da 4 saat inkübasyondan sonra oldukça stabil olduğunu tespit etmişlerdir. K_M ve V_{max} değerlerini Lineweaver-Burk eğrisi ile sırasıyla 2.8 mM ve 1430 U / mg protein olarak hesaplamışlardır.Enzim aktivitesini sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit tarafından inhibe edildiğini görmüşlerdir.Katekin substrat olarak kullanıldığında PPO’su, dikloroetan ve tolüen diklorometan gibi seçilen organik çözücüler içinde etkili bir biyokatalizör olduğunu görmüşlerdir. *B. Erythropus*’tan elde

edilen PPO'nundiger bitki PPO' larına benzer biyokimyasal ve kinetik özelliklere sahip olduğunu gözlemişler.

Kwanele (2005)'te Marula meyvesinden polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz enzimini kısmen Triton X-114, DEAE-iyon, ısı ile indüklenen faz ayırmakombinasyonu ve Sephadex G100 jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırmıştır. Enzimleri; enzim konsantrasyonu-tepkime hızı ilişkisi, termal stabilite, pH aktivite ve stabilite, molekül ağırlığı, izoelektrik noktası (PI) ve kinetik parametreleri bakımından karakterize etmiştir. PPO ve peroksidazı aynı moleküler ağırlığa (71 kDa) sahip olarak bulmuştur.PPO için optimum pH katekol ile 7.0' de bulmuştur.

Yüksek lisans tezinde polifenol oksidaz (PPO)enzimini, yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Lactarius piperatus*'tan, Sepharose-4B-L-tirosin-p-aminobenzoikasit afinite jeli kullanarak,afinite kromatografisi ile saflaştırıp ve karakterize etmiştir. Enzimin saflığını ve molekül ağırlığını SDS-PAGE elektroforezlerinde tek bir bant halinde ortaya koymuştur.Ayrıca bazı metal iyonlarının PPO aktivitesini farklı şekillerde etkilediğini tespit etmiştir (Öz, 2010).

Ülkemizde yapılan diğer biryüksek lisans tezinde, Iğdır Elması'ndan polifenol oksidaz enzimini afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılıp polifenol oksidaz enziminin çeşitli özellikleri incelemiştir. Bu çalışma için elmayıIğdır yöresinden temin etmiştir. Iğdır elmasından polifenol oksidaz enzimi Sepharose 4-B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonuna uygulamıştır.Kantitatif protein tayinleri için Coomassie Blue yöntemi yapılmıştır. Bunun yanı sıra enzimin optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, iyonik şiddet etkisi ve bazı kimyasalların inhibisyon etkisini incelemiştir (Türkan, 2009)

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, p-aminobenzoik asit, L-tirozin, standart serum albümin, N,N,N,N' tetrametiletilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den; trikloro asetik asit (TCA), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum karbonat, sodyum sitrat, trihidroksimetil aminometan (Tris), siyanojen bromür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, metil alkol, hidroklorik asit, sodyum bikarbonat, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), katekol, gallik asit, pirogallol, glutatyon, β -merkaptotanol, sülfosalisilik asit, etilen glikol, Merck A.G'den; akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, SDS, bromfenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250 alındı.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

1)Ekstraksiyon tamponu

% 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit içeren 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.3); 8.7 gr (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 gr polietilen glikol (PEG), 0.176 gr (0.001 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi ve son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2)Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeğin çözeltiye alındığı ve diyalizin yapıldığı tampon

5 mM fosfat tamponu (pH 6.3); 0.87 gr (0.005 mol) K_2HPO_4 950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.3'e kadar titre edildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

3)Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar

0.1 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 10.0); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 8.8); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 450 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.0); 1.42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4) Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar

0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

5) Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti

0.05 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl fosfat tamponu (pH 7.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 8.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

6) Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler

pH 4-4.5 aralığında 0.1 M sitrat/0.2 M K_2HPO_4 tamponu; Bu tampon için 2.94 gr sodyum sitrat (0.01 mol), 3.48 gr (0.02 mol) K_2HPO_4 80 ml saf suda çözülerek 1 M NaOH veya 1 M HCl yardımıyla istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 5-7 aralığında 0.2 M fosfat tamponu; Bu tampon çözelti için 3.48 gr K_2HPO_4 80 ml saf suda çözüldü, 1 M HCl ile çözelti istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 7.5-9 aralığında 0.2 M Tris tamponu; Bu tampon çözelti için 12.114 gr (0.1 mol) Tris 400 ml saf suda çözülerek, bu çözeltilerden 40'er mL alındı, 0.1 M HCl ile çözelti istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 50'şer mL'ye tamamlandı ve böylece değişik pH'lı seri Tris tamponları hazırlandı.

7) Substrat çözeltileri

Her bir substrat çözeltisi 10 mL, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 gr (1×10^{-3} mol) katekol, 0.170 gr (1×10^{-3} mol) gallik asit ve 0.126 gr (1×10^{-3} mol) pirogallol alınarak her biri ayrı ayrı son hacim 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.

8)Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL)

25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözöldü.

9)Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti

100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanolde çözöldü. Bu çözeltiye 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

10)Stok inhibitör

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltileri Çizelge 3.1.'de belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı.

Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı

İnhibitör	Miktar (gr)	Mol sayısı(mol)	Stok çözeltinin konsantrasyonu(M)	İnhibitörün çözöndüğü ortam
Benzoik asit	0,024424	0,0002	0,02	1M Tris tamponu pH:8,5
m-amino benzoik asit	0,0342	0,00025	0,01	Saf su
p-amino benzoik asit	0,013714	0,0001	0,01	Saf su + seyreltik HCl
Askorbik asit	0,017612	0,0001	0,01	Saf su
Sodyum azid	0,0325gr	0,0005	0,05	Saf su

11)SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL

% 10'luk SDS 4.0 mL

Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Destile su	0.5 mL

12)SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu

Tris-HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

alınarak destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır.

13) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 3.2.'de verilmektedir.

14)SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi

0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözöldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

15)SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi

% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

Çözeltilerin Hazırlanması	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis</u> Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)</u> Tris-HCl 11.82 gr alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u> Tris-HCl 3.94 gr alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 gr alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> 1 gr Amonyum persülfat alındı ve saf su 10 ml ye tamamlandı.	750 µL	400 µL

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Çalışmalarımızda kullanılan patates Nevşehir ilinden temin edildi. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g meyve 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.30) içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzüldü. Süzüntü 20000xg'de +5°C'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

3.2.2. Amonyum sülfatla çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme işlemleri % 0-80 arasında doygunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formülle tespit edildi.

$$gr_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1.77 \times V_x(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : süpernatant hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Çöktürme işleminde kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı yukarıdaki formüle göre tespit edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş ve azar azar katıldı, her ilave sonrasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra % 80 doygunluğa getirilen suspansiyon 20000xg'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Tüm ekstrakt bu şekilde santrifüj edildikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı kısımlar atıldı. Oluşan çökelek ise, 5 mM fosfat tamponunun (pH 6.30) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

3.2.3. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) yerleştirildi. Enzimin içinde bulunduğu tampona (5 mM fosfat tamponu, pH 6.30) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi.

3.2.4. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

PPO enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan biriside afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede saflaştırma; çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemlerine gerek olmadan kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir (Erzengin, 2002).

3.2.4.1. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin serbest -OH guruplarının modifikasyonunda yaygın olarak CNBr yönteminden yararlanılmıştır (Pathak, 1992). Aynı metot tarafımızdan kullanılarak, Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildikten sonra, tirozinle kovalent modifiye edildi. Reaktif türevde tirozine diazolanmış p-amino benzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Burada, tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, p-aminobenzoik asit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. p-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı;

- **Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin bağlanması**

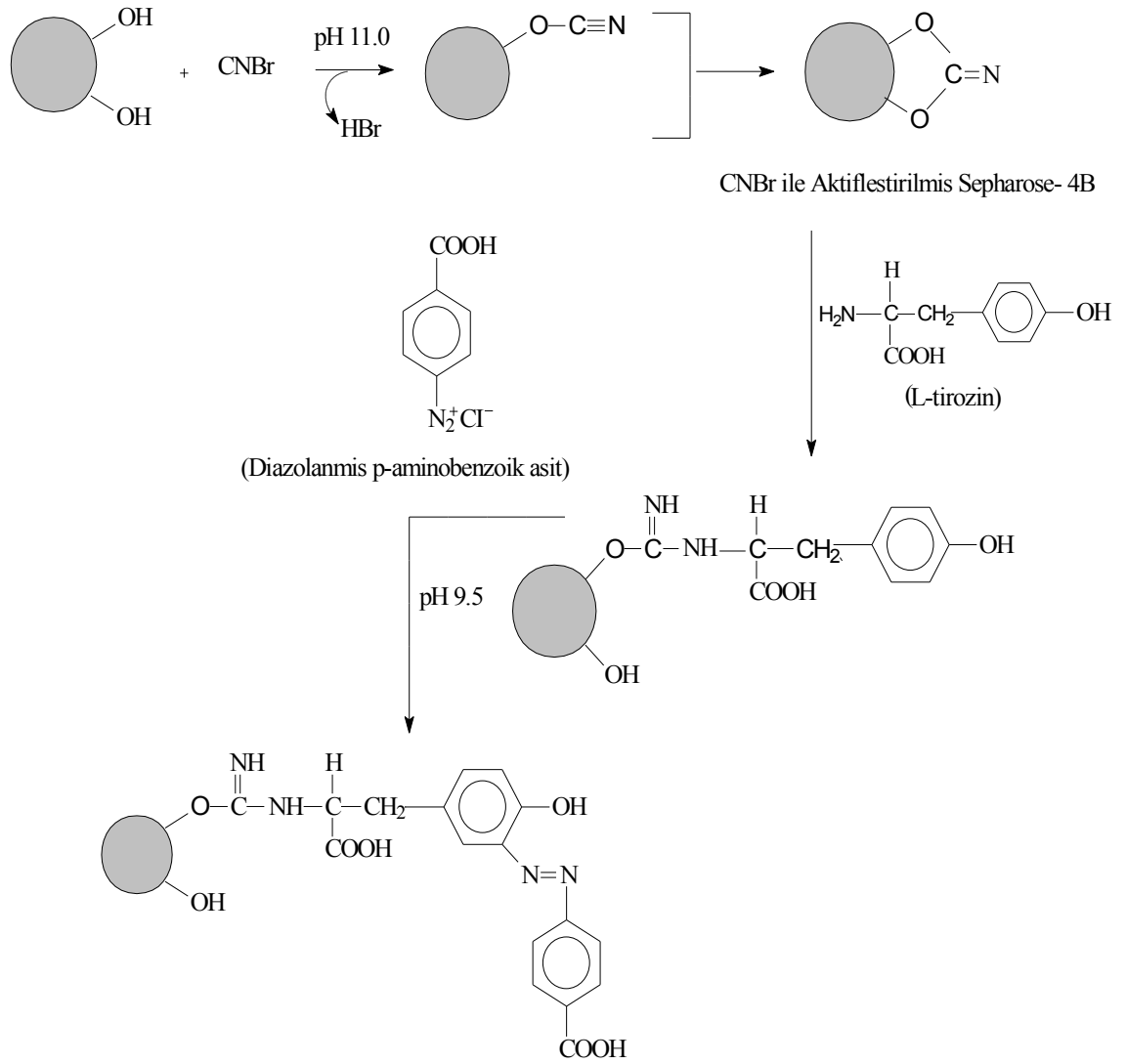
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g toz haline getirilmiş CNBr'ün hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine nakledildi.

Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi ile (pH 10.0) ile yıkandı. 20 mL'inde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek, yavaşça karıştırılan süspansiyondan, bağlanma verimliliğini belirleme amacıyla, her 15 dakikada içinde jel bulunmayan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimi izlendi. 90. dakikadan sonra absorbansda önemli bir farklanma olmadığı için, bağlanma reaksiyonu 90 dakika olarak belirlendi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH 8.80) tekrarlandı. Tirozinle modifiye Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

- **p-aminobenzoik asidin bağlanması**

25 mg p-aminobenzoik asit, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan p-aminobenzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-L- tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi.

Reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmektedir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları

3.2.4.2. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00) ile, üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun pH değerleri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00) ile yıkandı ve 3'er mL halinde tüplere alındı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu.

Toplanan tüplerde 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Daha sonra 0.05 M Na₂HPO₄/1 M NaCl tamponu (pH 7.00) ile enzim elüsyonu yapıldı ve 3'er mL halinde tüplerde fraksiyonlandı. Elüatlarda bradford metoduyla kantitatif, 280 nm'de kalitatif protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı.

3.2.5.SDS-PAGE elektroforezi

NPPO enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1984), tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kışaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Çizelge 3.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Lizozim (14.3 kDa),

β -laktoglobulin (18.4kDA), tripsinojen (24 kDA), pepsin (34.7 kDA), ovalbumin (45 kDA) ve sığır serum albumin (66 kDA) içeren standart protein çözeltisi, içerisinde her birinden 20 μ g protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 μ L olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulurken enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel kesililip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 9). Tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi de Leamelli tarafından belirtilen yöntemle yürütme ve numune tamponuna SDS katılmadan ve numuneler ısıtılmadan gerçekleştirildi.

3.2.6. Protein tayini

3.2.6.1. Kalitatif protein tayini

Çalışmamızda yapılan kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen eluatlar eşit hacimde alınıp, bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodla yapılan kalitatif protein tayininin temel prensibi, proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip olan amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'de UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Jaenicke, 1984). Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorpsanları spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak alındı.

3.2.6.2. Bradford yöntemiyle kantitatifprotein tayini

Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri, bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorpsan göstermesi esasına dayanır (Bradford, 1976).

Bu yöntemin, diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 5 mM fosfat tamponu (pH 6.30) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1 mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL’lik 5 mM fosfat tamponu (pH 6.30) olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 4.2.).

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0.1’er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5’er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.2.7. PPO enziminin aktivite tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.2 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2.8 mL tampon + substrat (0.1 M katekol, 0.1 M 4-metil katekol veya 0.1 M pirogallol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm’de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (U) reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0.001’lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak “1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişme” kullanıldı.

3.2.8. PPO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar

PPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için üç farklı substrat için, optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak her bir substratın değişik pH’lardaki aktivasyon enerjileri bulundu. Enzimin sıcaklığa bağımlı denatürasyon ve renatürasyon özellikleri araştırıldı. Kullanılan her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri tayin edildi. Ayrıca farklı inhibitörlerin, optimum şartlarda, IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri saptandı.

3.2.8.1. Optimum pH ve sıcaklık çalışması

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) üç farklı substrat (katekol, gallik asit ve pirogallol) kullanarak 5,10,20,30,40,50,60 ve 70 °C'deki reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlendi. Her ölçüm iki kez tekrarlanıp çıkan değerlerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum pH ve sıcaklık değerleri tek bir çalışma ile tespit edildi. Elde edilen sonuçlar grafik (Şekil 11-16) ve (Çizelge4.2.) halinde verildi.

3.2.8.2. Farklı substratlar için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol, gallik asit ve pirogallol substratlarının 6 farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

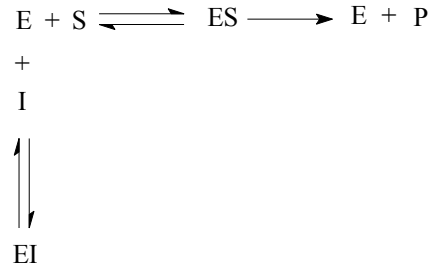
$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 4.3.) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 17-19). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 4.3.' de verildi.

3.2.8.3.Farklı inhibitörler için IC_{50} değerlerinin bulunması

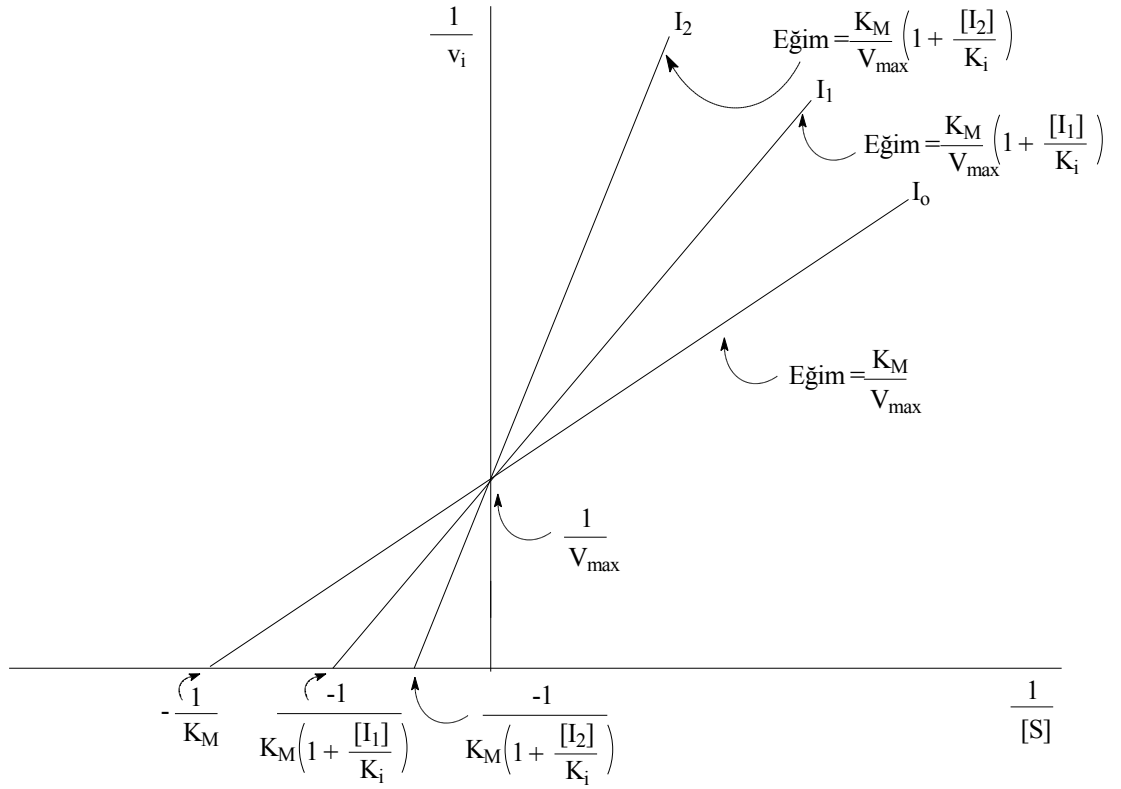
Farklı inhibitörlerin IC_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanlar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.4.). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 20-25). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.4.'te verildi.

3.2.8.4.Farklı inhibitörler için K_i değerlerinin bulunması

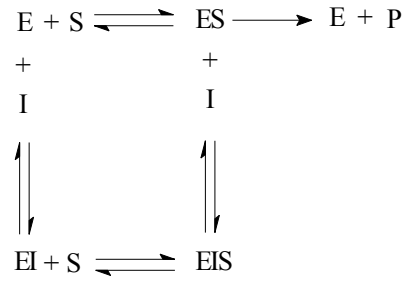
Farklı inhibitörler için K_i değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonu kullanarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda optimum şartlarda aktiviteler katekol substratı kullanılarak tespit edildi (Çizelge 4.4) $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.20-4.25). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri tespit edildi (Çizelge 4.4). K_i değerleri yarışmalı (kompetatif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarı yarışmalı (unkompetatif) inhibisyon için eğrinin $1/V$ eksenini kestiği noktayı veren $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetatif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak hesaplandı. Denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.



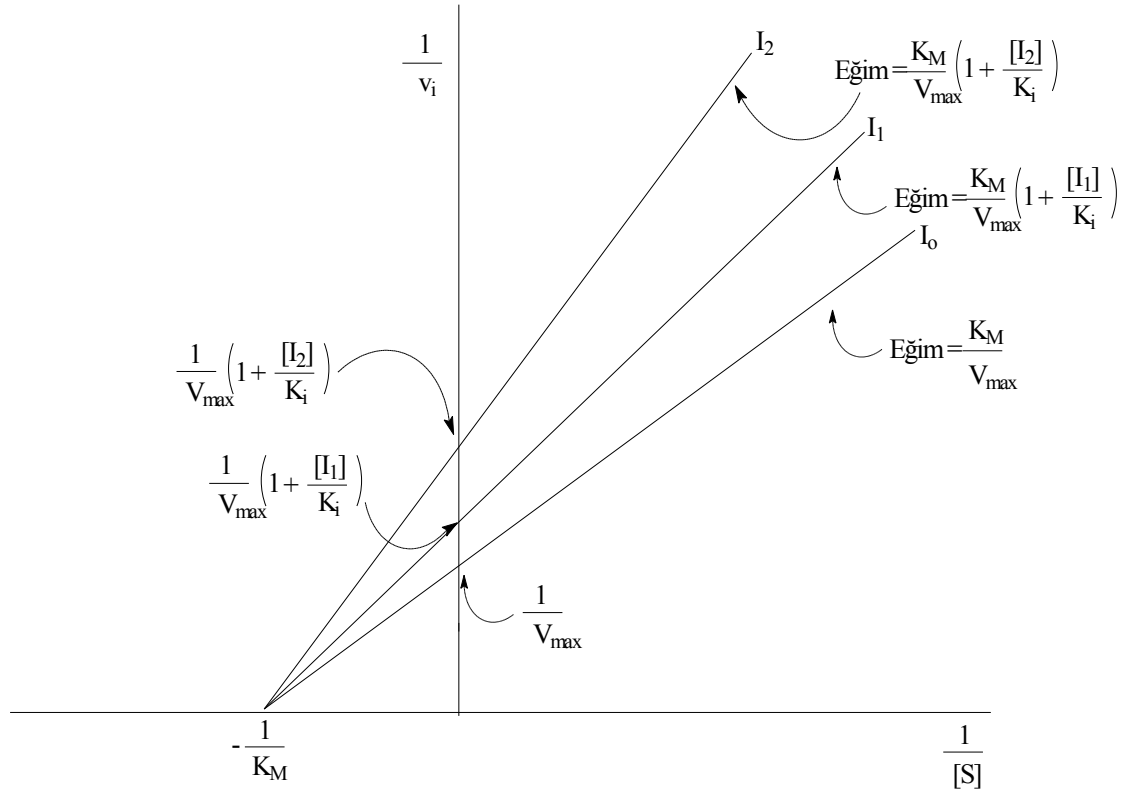
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



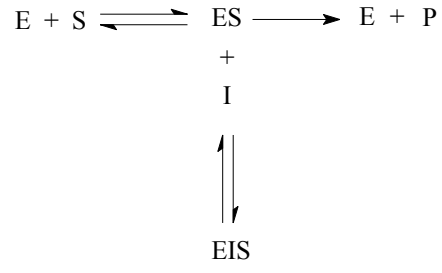
Şekil 3.2. Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği



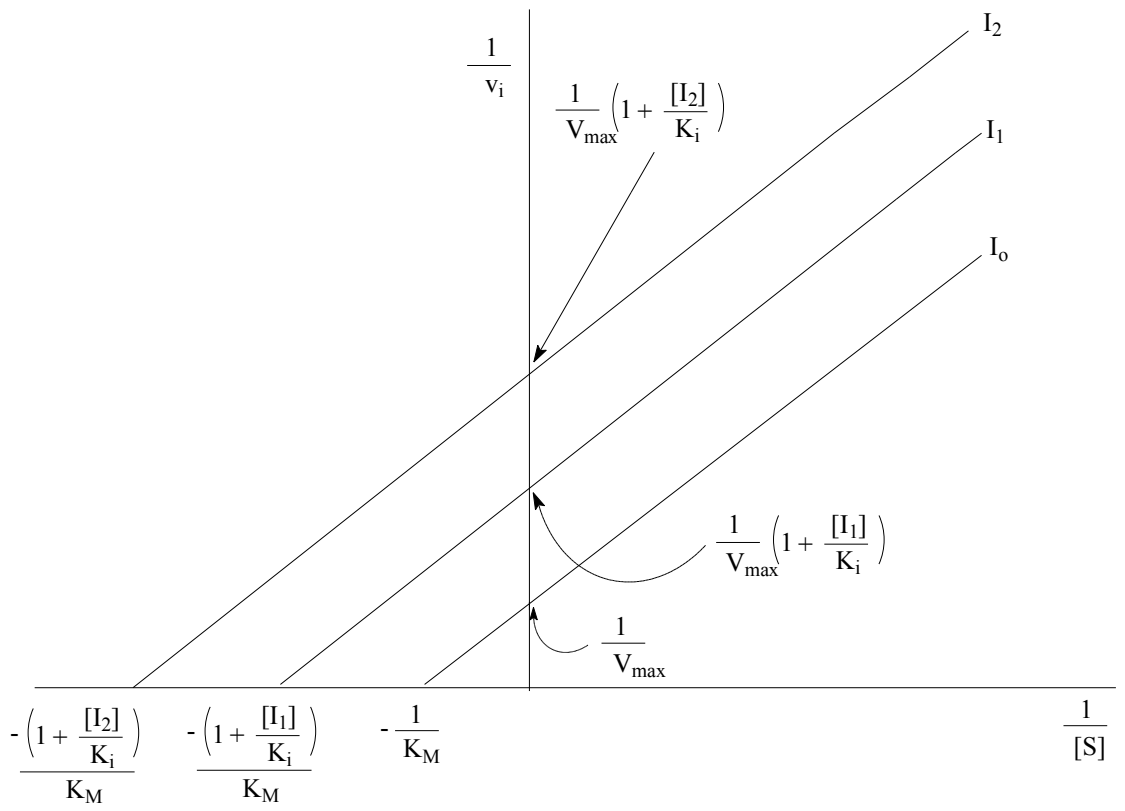
$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$



Şekil3.3. Nonkompetetif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği



$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

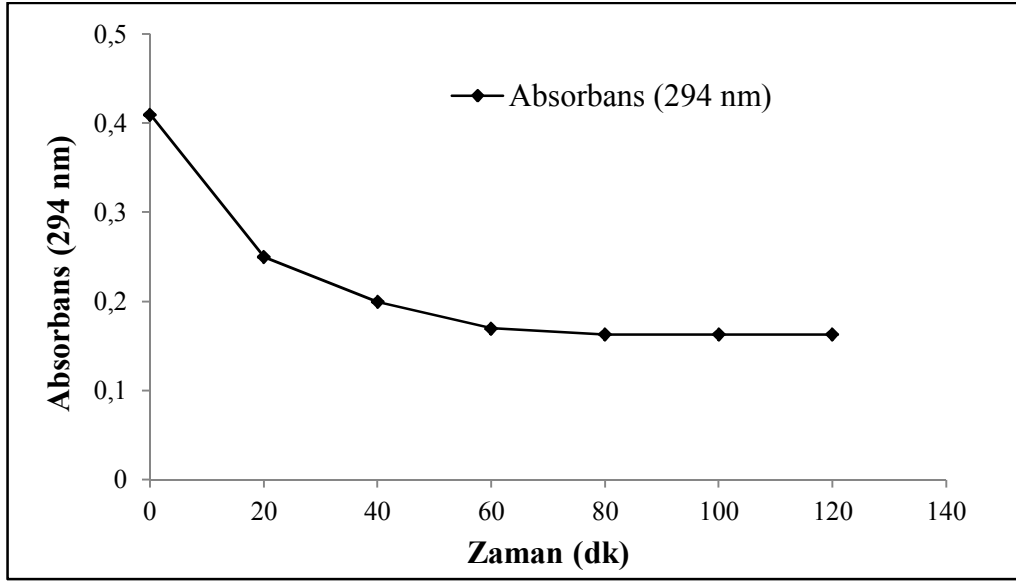


Şekil 3.4. Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği

4. BULGULAR

4.1.L-tirozinin Sepharose-4B'ye Bağlanma Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

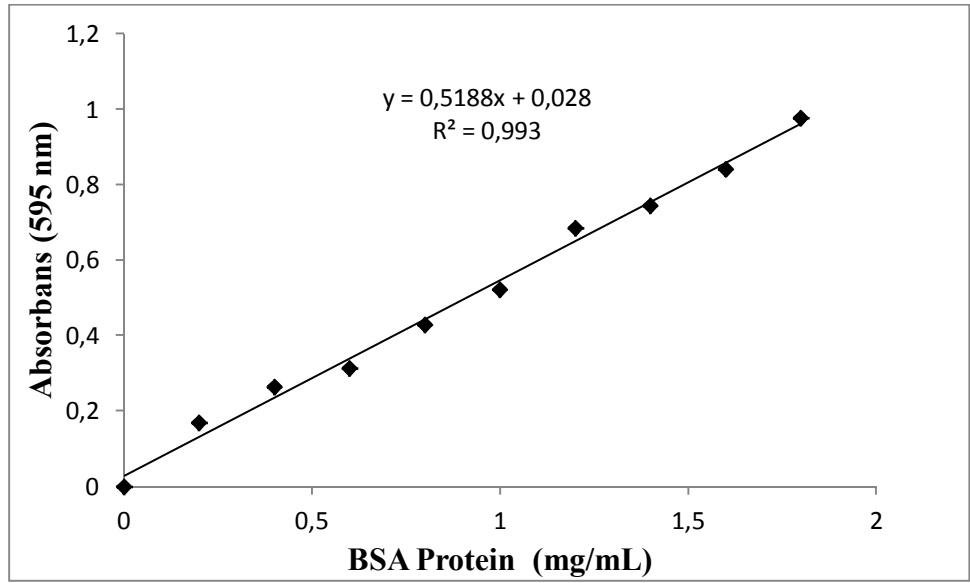
Bölüm 3.2.4.1'de belirtilen prosedürle aktifleştirilen Sepharose-4-B'ye L-tirozinin bağlanma zamanını belirlemek amacı ile belirli sürelerde tepkime kabından alınan örnekler, 294 nm'de absorbansları okunarak grafiğe geçirildi. Şekil 7 'de görüldüğü gibi 90. dakikadan sonra bağlanan L-tirozin miktarında önemli bir değişme olmadığı için, bu süre bağlanma zamanı olarak alındı.



Şekil 4.1. L-tirozinin aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanma süresi grafiği

4.2. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 3.2.6.2'de açıklandığı gibi hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonunda ki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 7'de gösterilmiştir.



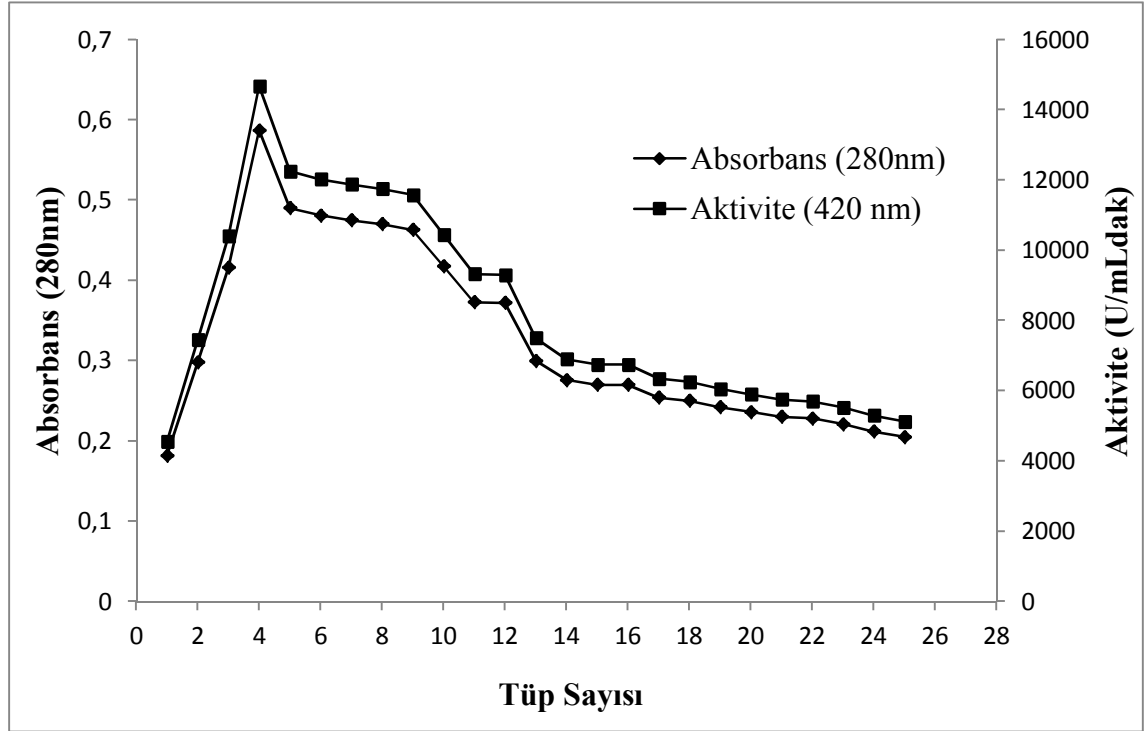
Şekil 4.2. Bradford yöntemine göre standart protein grafiği

4.3. NPPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

4.3.1. NPPO enziminin 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş kolondan saflaştırılması

Bölüm 3.2.4.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Diyaliz işleminden sonra elde edilen Nevşehir patatesi polifenol oksidaz enziminin çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile yıkandı. Alttan gelen yıkama çözeltisi 3’er mL halinde tüplere fraksiyonlandı. Yıkama işlemine 280 nm’deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 420 nm’de de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafiği çizildi (Şekil 4.2.). Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon 0.05 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponu (pH 7.00) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 3’er mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 420 nm’de de aktivite tayini yapıldı (Şekil 4.3.). Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi.

Kolona tatbik edilen numune vebirleştirilen elüat çözeltileri için bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Çizelge4.1.'de verildi.



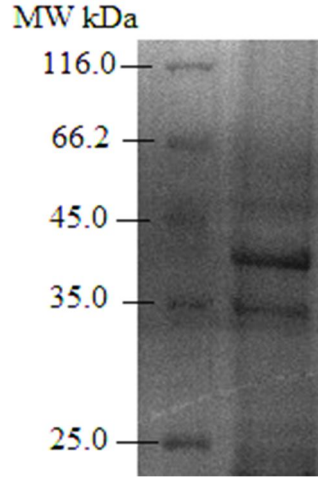
Şekil 4.3.Afinite kolonun Na₂HPO₄ tamponu (pH:5.00) ile yıkanması işleminden sonraNPPO enziminin 0,05 M (pH:7.00) Na₂HPO₄/1M tamponu ile elüsyonu absorbans-aktivite grafiğı

Çizelge 4.1. Nevşehir patatesi saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	107	1300	139100	0,517	55,319	2514,50677	-	-
Amonyum Sülfat	15	13450	201750	0,2477	3,7155	54299,55591	145,03	21,594
Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino Benzoik Asit Afinite Kromatografisi	2	10550	21100	0,0803	0,1606	131382,3163	15,16	52,25

4.3.2. NPPO enziminin SDS-PAGE elektroforezi

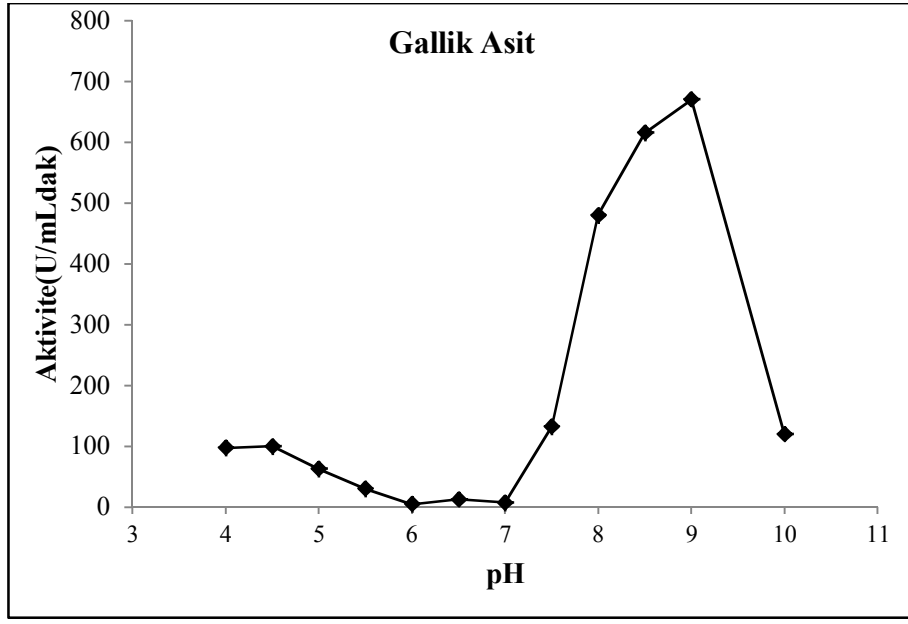
Afinite kolonundan saflaştırılan NPPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS-PAGE jel elektroforezine Nevşehir patatesinden saflaştırılan PPO enzim numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin fotoğrafları çekildi (şekil 4.4.).



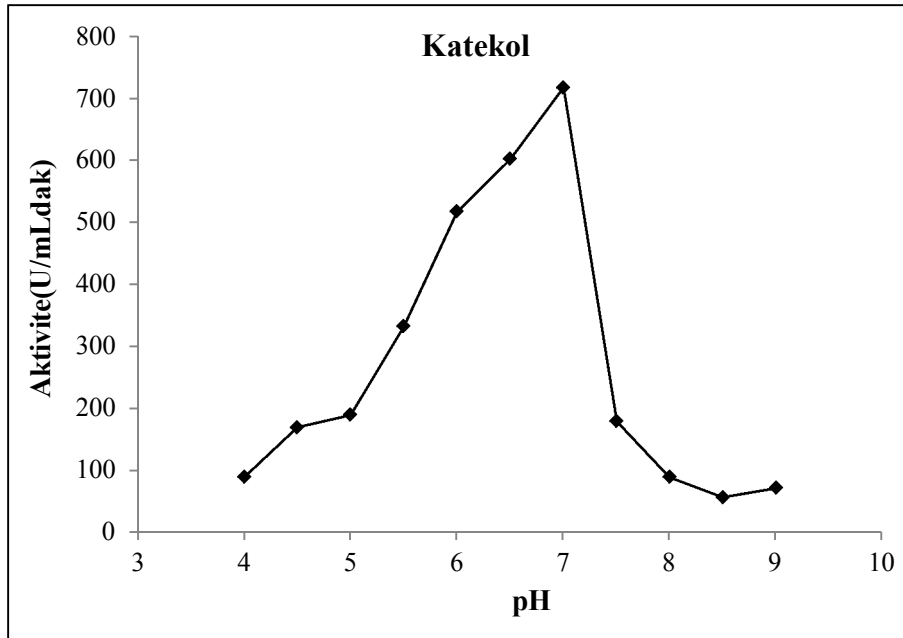
şekil 4.4. Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli ile saflaştırılan NPPO enziminin SDS-PAGE elektroforezi

4.4. NPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini

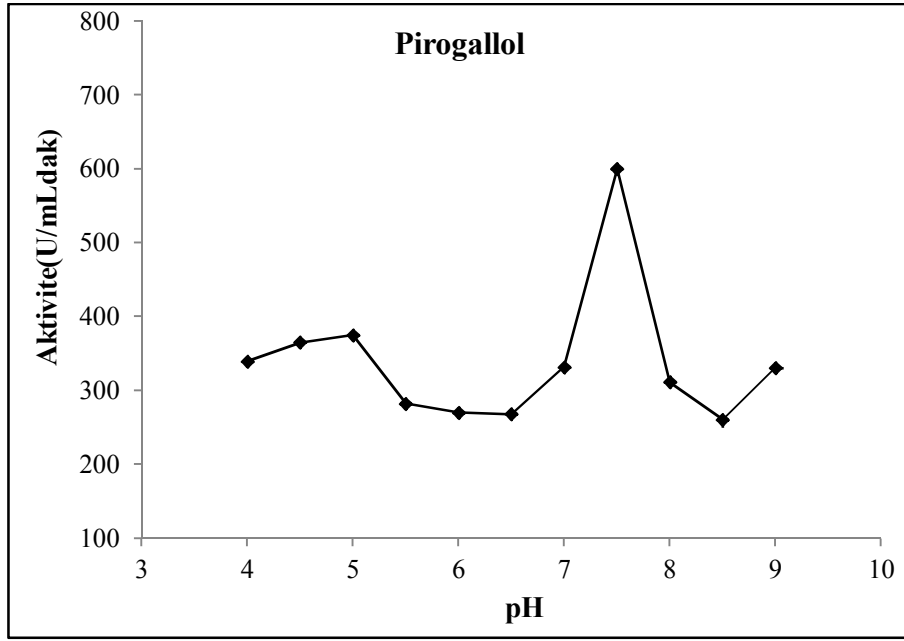
NPPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değeri belirlenmek amacı ile değişik pH değeri (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) farklı substratlar (katekol, gallik asit, pirogallol) kullanılarak 20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C’deki reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar (izelge 4.2.) ve (şekil 4.5.-4.10.) verildi.



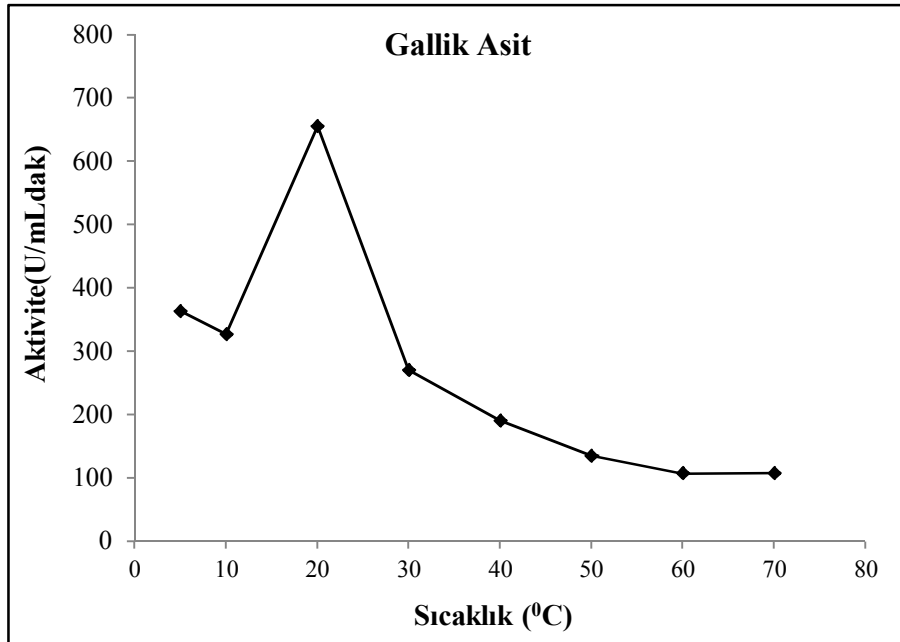
Şekil 4.5. NPPO enziminin gallik asit substratı için pH-aktivite grafiği



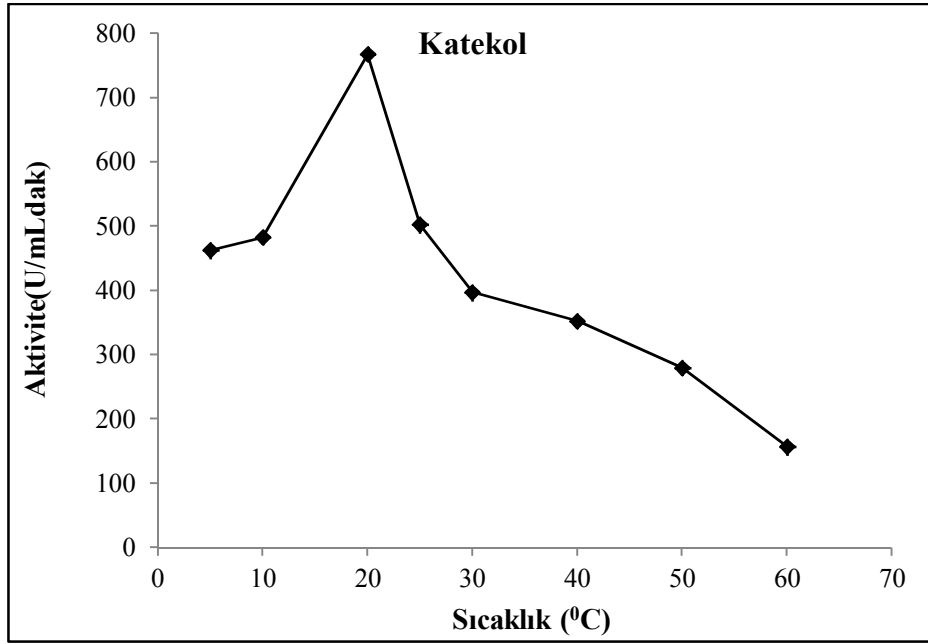
Şekil 4.6. NPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği



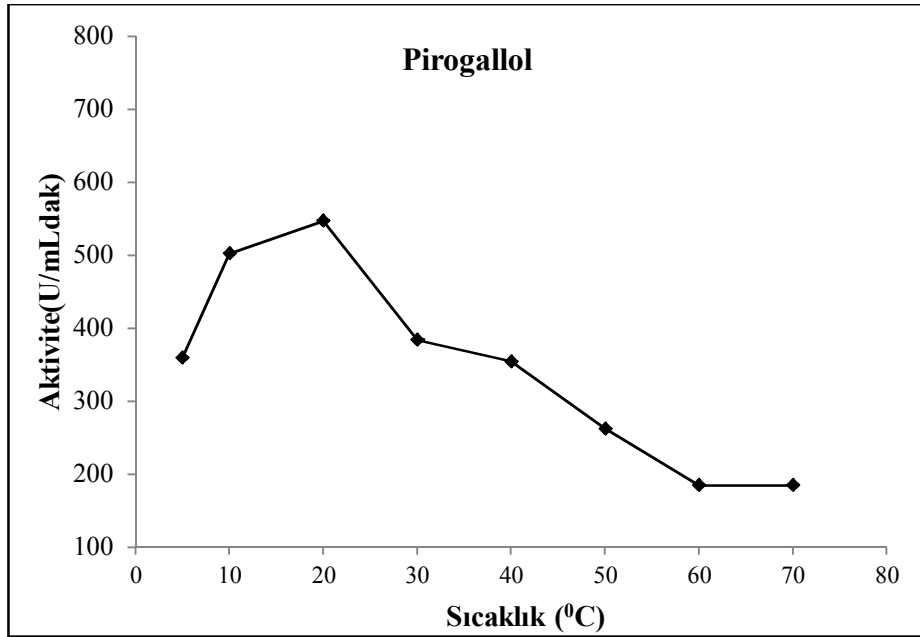
Şekil 4.7. NPPPO enziminin pirogallol substratı için pH-aktivite grafiği



Şekil 4.8. NPPPO enziminin gallik asit substratı için sıcaklık-aktivite grafiği



Şekil 4.9. NPPO enziminin katekol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği



Şekil 4.10. NPPO enziminin pirogallol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

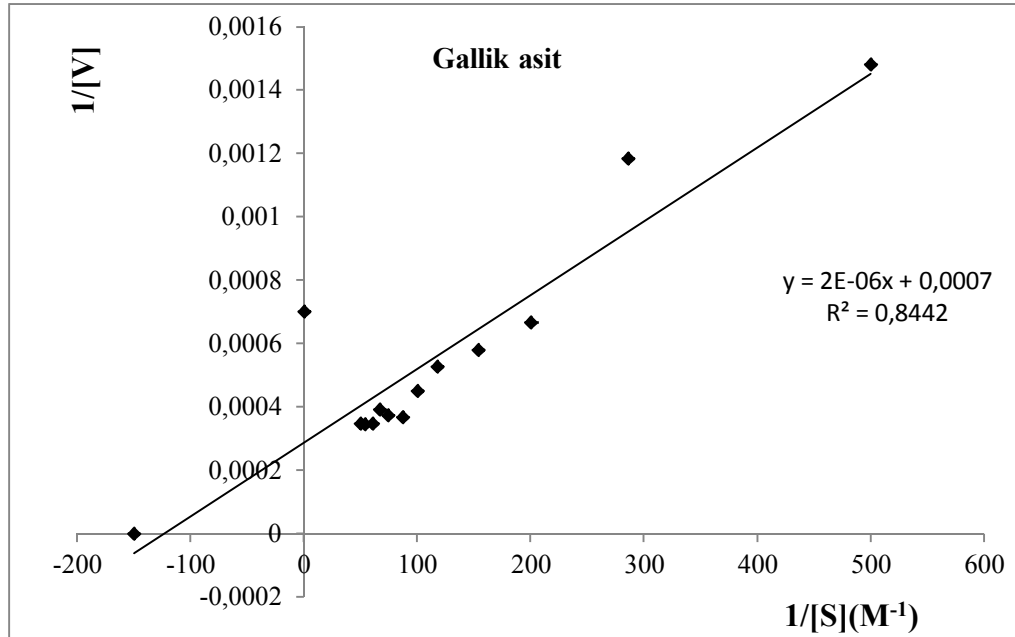
Çizelge 4.2.NPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve sıcaklık değerleri

Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)
Gallik asit	9,0	20
Katekol	7,0	20
Pirogallol	7,5	20

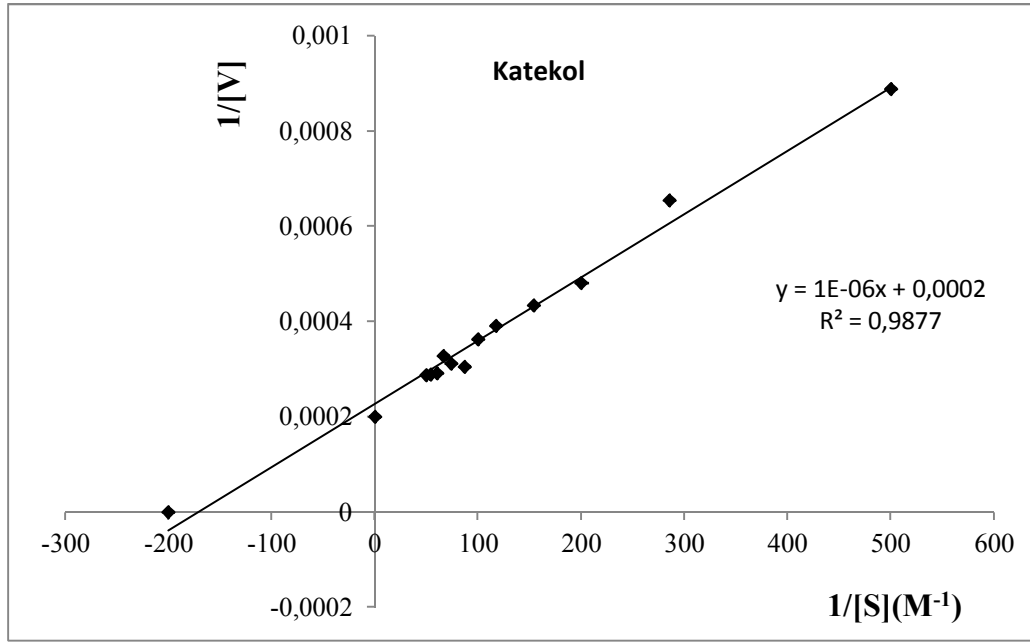
4.5.NPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol, gallikasit ve pirogallol substratlarının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.

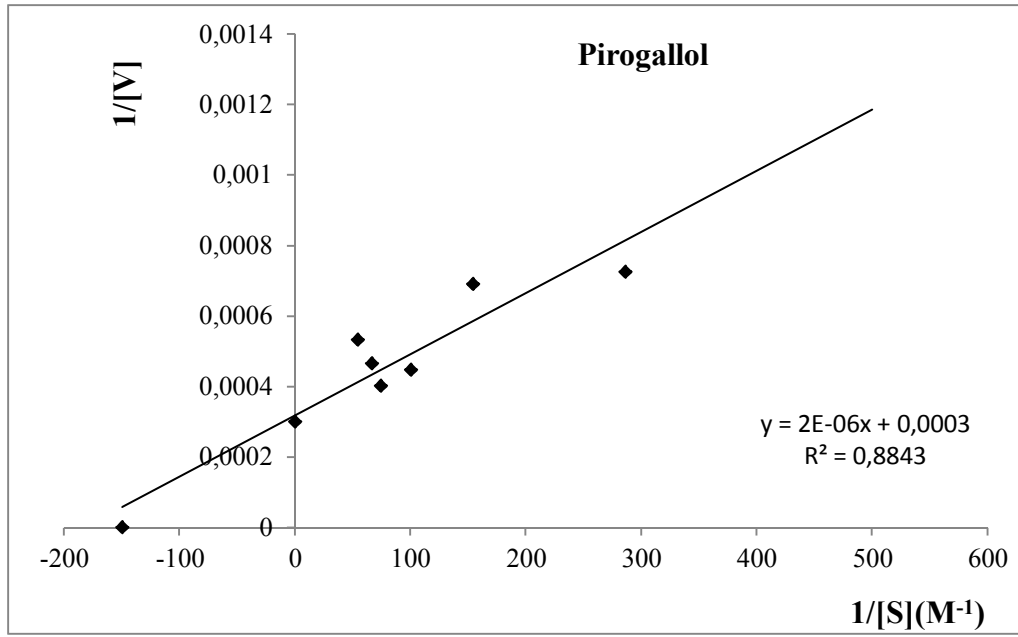
$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 4.3.) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 17-19). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 4.3.’de verildi.



Şekil 4.11. NPPO enzimi için gallik asit substratı Linewear-Burk grafiği



Şekil 4.12. NPPO enzimi için katekol substratı Linewear-Burk grafiği



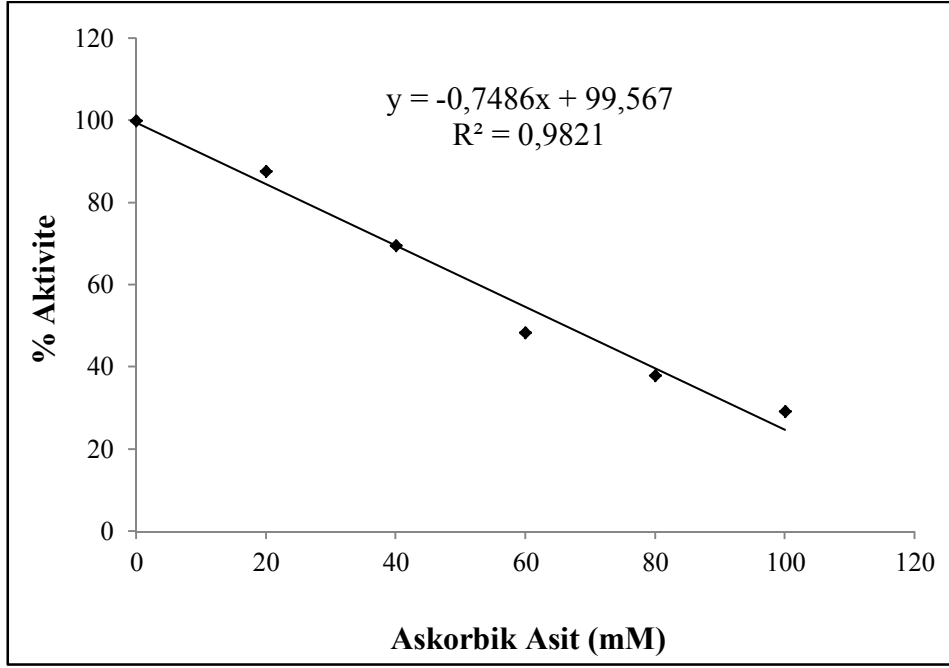
Şekil 4.13. NPPO enzimi için pirogallol Linewear-Burk grafiği

Çizelge 4.3.. NPPO enziminin için üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri

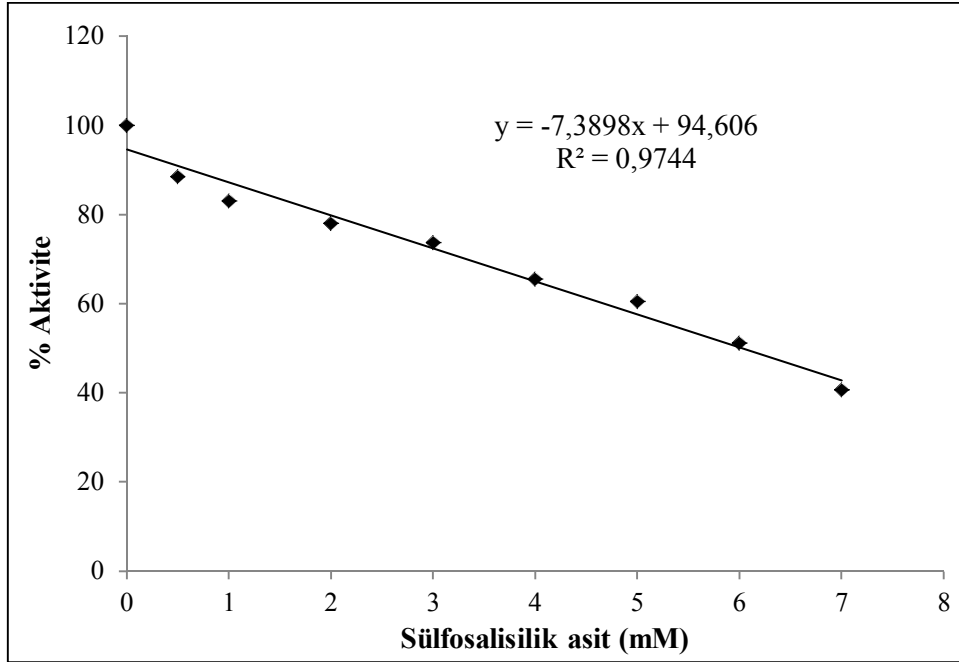
Substrat	$K_M(mM)$	$V_{max}(U/mLdak)$	V_{max}/ K_M
Gallik asit	6,6	1428	216,3
Katekol	5	5000	1000
Pirogallol	6,67	3333	499,7

4.6.NPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için IC_{50} Değerlerinin Bulunması

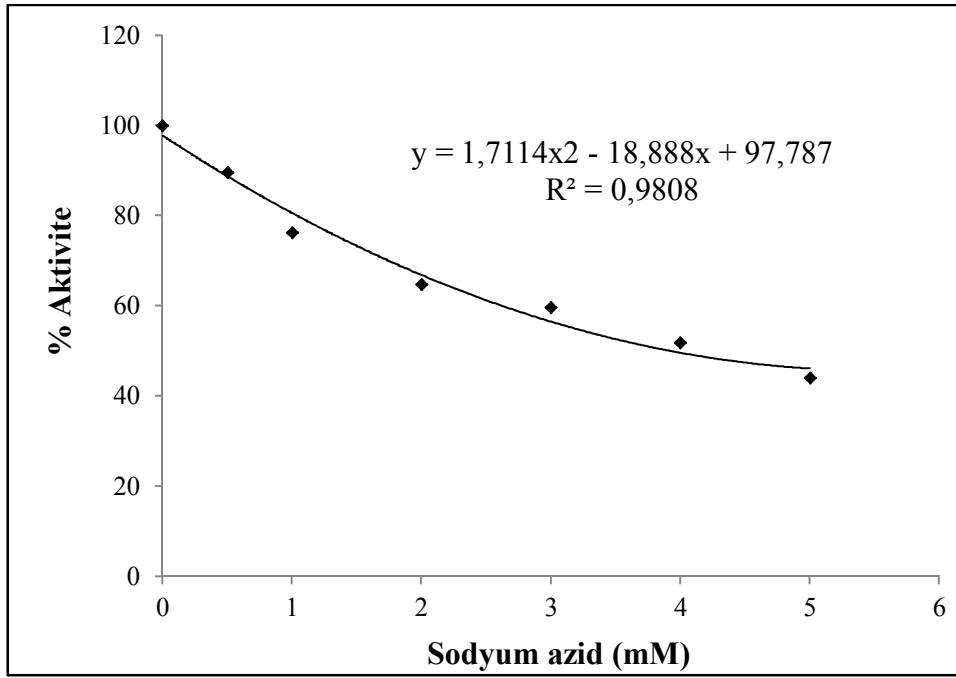
Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin IC_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0.1 M katekol hazırlandı. İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 1mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 40 μ L enzim alınıp daha önceden hazırlanmış olan tampon + substrat + inhibitör çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu.Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.4). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 20-25). (I=küvetteki 1 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur).



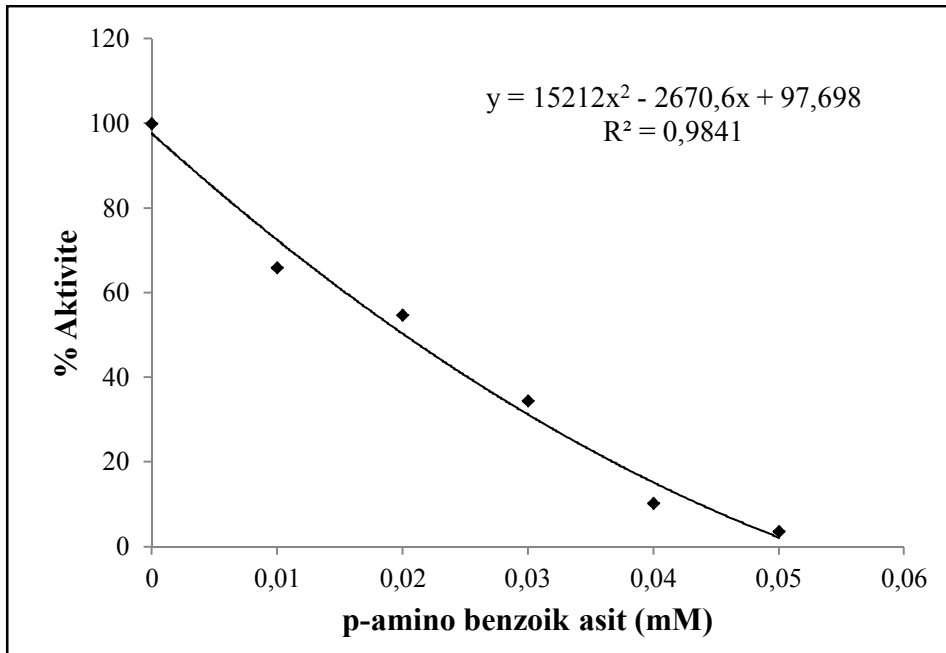
Şekil 4.14. NPPO enzimi üzerine askorbik asit için inhibisyon etkisi



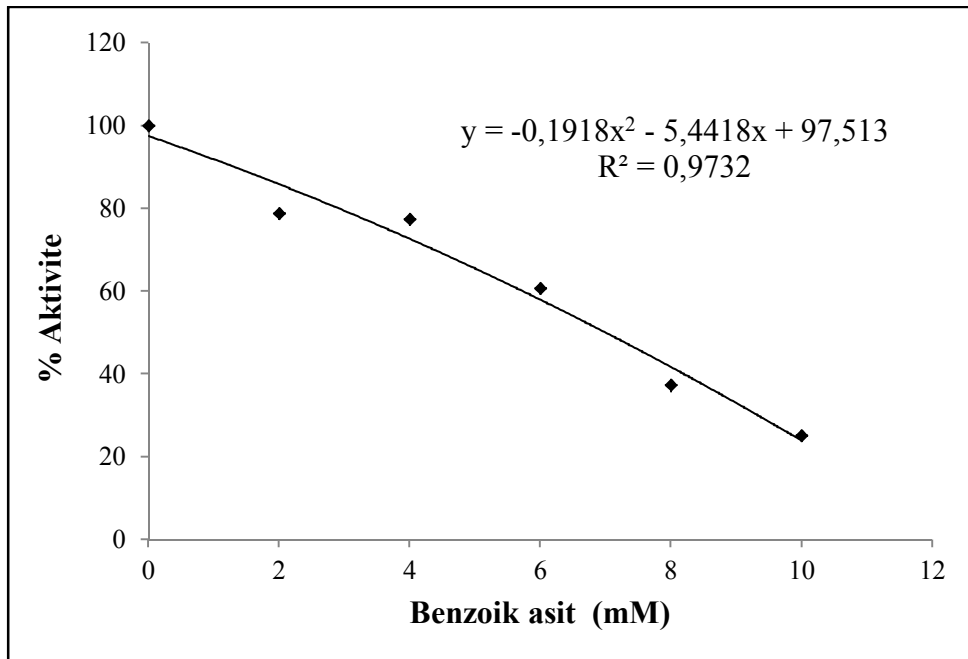
Şekil 4.15. NPPO enzimi üzerine sülfosalisilik asit inhibisyon etkisi



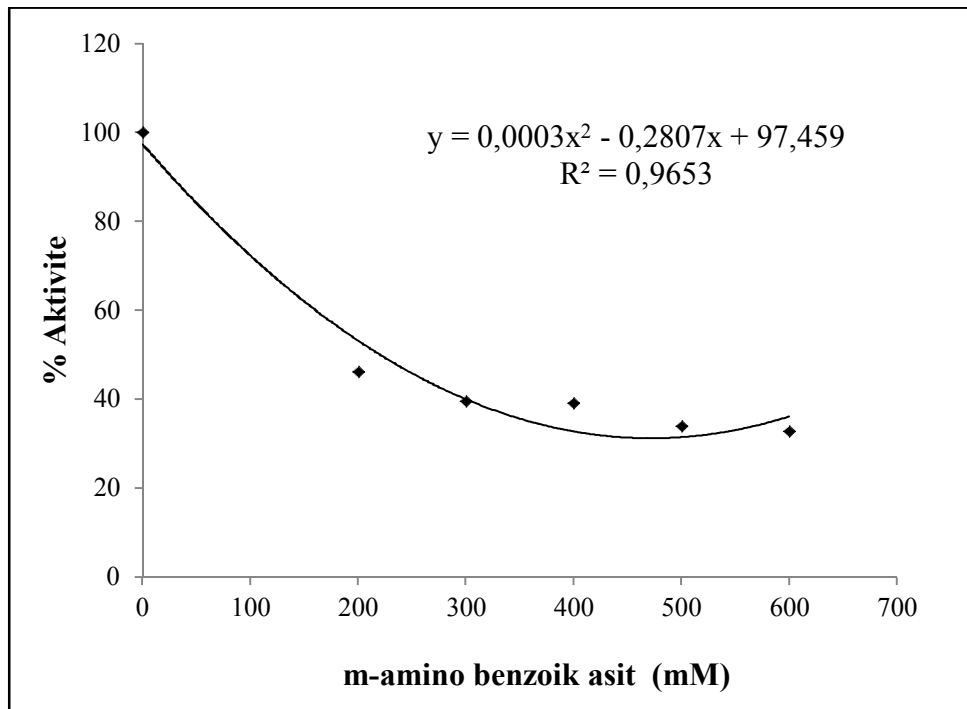
Şekil 4.16. NPPO enzimi üzerine sodyum azid inhibisyon etkisi



Şekil 4.17. NPPO enzimi üzerine p-amino benzoik asit inhibisyon etkisi



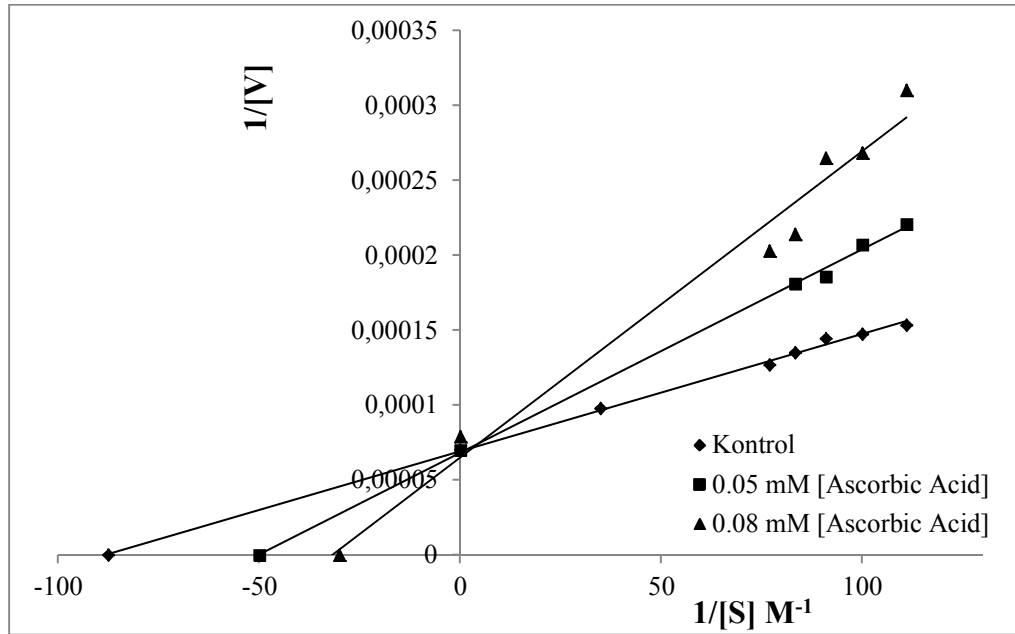
Şekil 4.18. NPPO enzimi üzerine benzoik asit inhibisyon etkisi



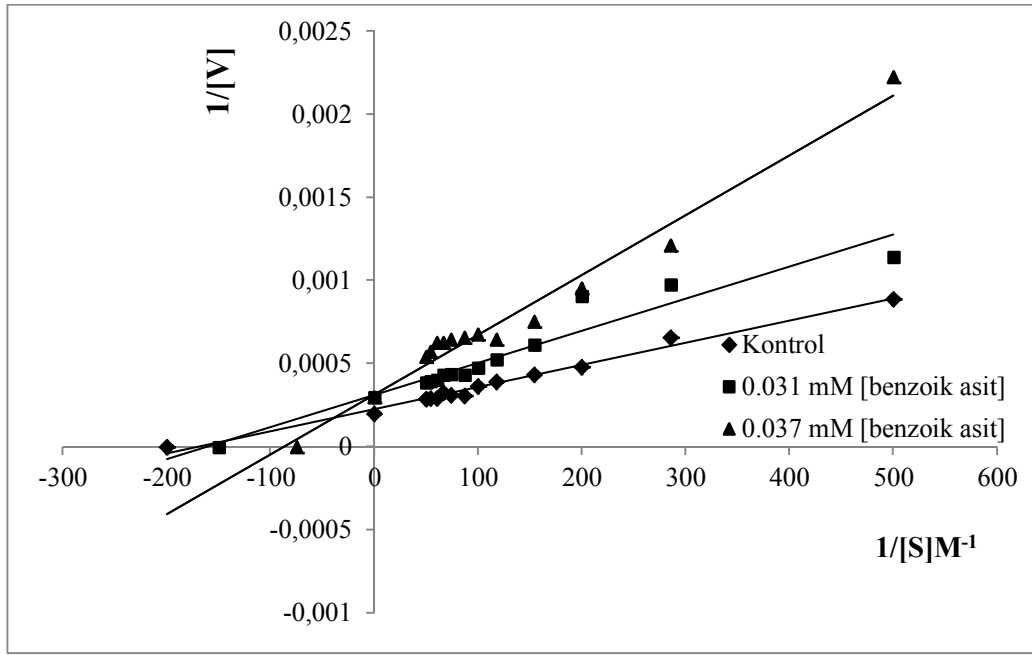
Şekil 4.19. NPPO enzimi üzerine m-aminobenzoik asit inhibisyon etkisi

4.7.NPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için K_i Değerlerinin ve İnhibisyon Türünün Bulunması

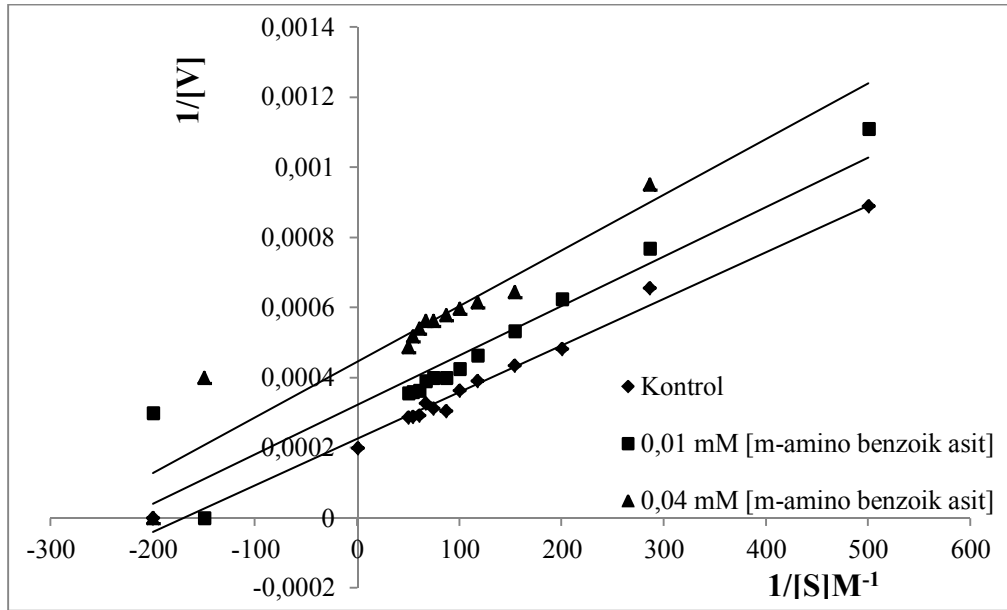
Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda, optimum şartlarda, on iki farklı katekol substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için oniki değişik inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, katekol substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi (Çizelge 4.4.). $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.20–4.25). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri bölüm 3.2.8.5’de anlatıldığı gibi bulundu.



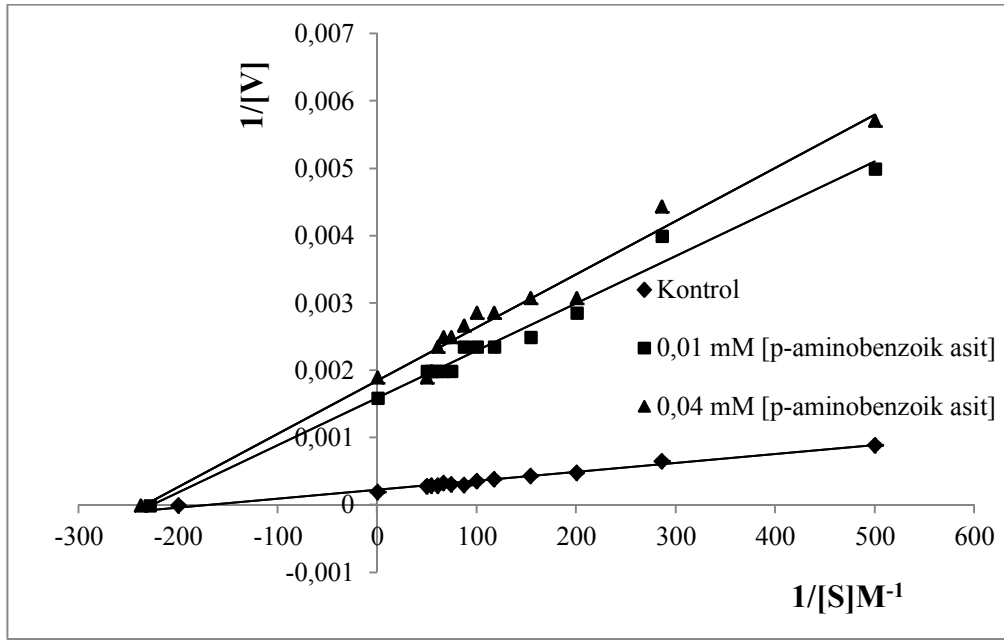
Şekil 4.20.NPPO enzimi üzerine askorbik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,05 \text{ mM}$ ve $[I_2]=0,08 \text{ mM}$



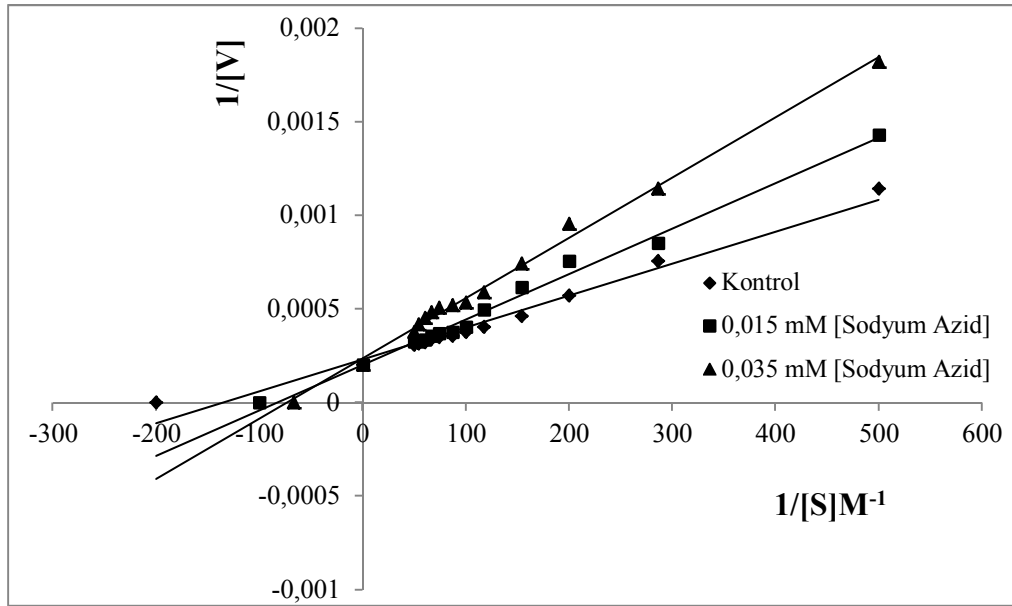
Şekil 4.21. NPPO enzimi üzerine benzoik asit 'in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,05$ mM ve $[I_2]=0,08$ mM



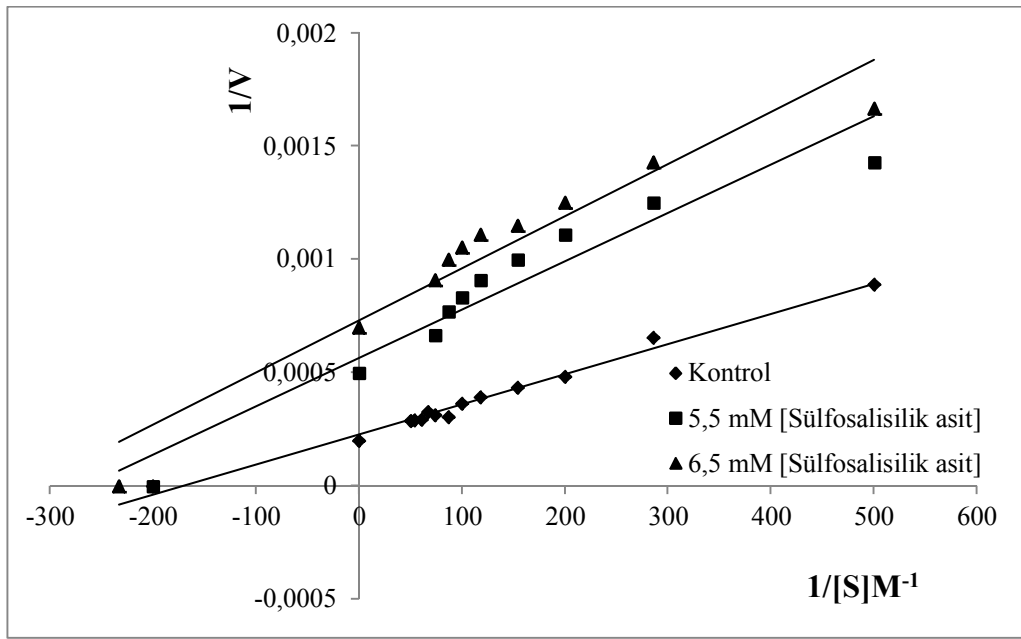
Şekil 4.22. NPPO enzimi üzerine m-aminobenzoik asit 'in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,01$ mM ve $[I_2]=0,04$ mM



Şekil 4.23.NPPO enzimi üzerine p-aminobenzoik asit ‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,01$ mM ve $[I_2]=0,04$ mM



Şekil 4.24. NPPO enzimi üzerine sodyum azid‘in inhibisyon etkisi $[I_1]=0,015$ mM ve $[I_2]=0,035$ mM



Şekil 4.25.NPPO enzimi üzerine sülfosalisilik asit'in inhibisyon etkisi $[I_1]=5,5$ mM ve $[I_2]=6,5$ mM

Çizelge 4.4. NPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i ve % aktivite grafiklerinden bulunan IC_{50} değerleri ve inhibisyon türleri

İnhibitörler	IC_{50} (mM)	K_i (μ M)	İnhibisyon Türü
Askorbik asit	0,0661	0,0064	Kompetitif
Benzoik asit	6,803	0,033	Kompetitif
Sodyum azid	3,928	0,024	Kompetitif
m-aminobenzoik asit	22,08	30	Unkompetitif
Sülfosalisilik asit	6,036	313,3	Unkompetitif
p-aminobenzoik asit	0,020	3,067	nonkompetitif

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan afinite jeli, Arslan ve ekibinin (2004) sentezlediği jel referans alınarak yapıldı. Bu yöntemle göre CNBr ile aktiveleştirilmiş Sepharose-4B matrisi, uzantı kolunu oluşturmak üzere tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. Ligand olarak polifenol oksidaz (PPO) enziminin spesifik bir inhibitörü olan p-aminobenzoik asit seçildi. Bu şekilde elde edilen jel, afinite kromatografisi ile Nevşehir patatesi (*Solanum Tuberosum* L.)'den PPO'nun saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı. Kolondan PPO enzimi saflaştırılarak kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

Afinite kolonunda, aktiveleşmiş Sepharose-4B matrisi üzerine hazırlanmış afinite jeli kullanıldı. Sepharose-4B'nin seçilmesinin başlıca sebebi, çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir sürede aktiveleşebilmesidir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktiveleştirme işlemi sadece beş dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.

Sepharose-4B'nin CNBr ile aktiveleştirilmesiyle hazırlanan afinite jelinin divinil sülfon (DVS) ile hazırlanan afinite jellerine göre daha yüksek PPO adsorpsiyonu sağladığı literatürden anlaşılmaktadır (Pathak, 1992). Bu durum afinite jelleri üzerindeki yük farkıyla açıklanabilir. CNBr ile aktiveleştirilen afinite jelinin adsorpsiyon koşullarında (pH 5.0) pozitif yüke sahip olması PPO'nun jele daha kuvvetli bağlanmasını sağlayacaktır. Bu şekilde yıkama esnasında kolona bağlı PPO enziminin uzaklaşması önlenmiştir.

Birçok biyolojik molekülde olduğu gibi PPO'nun aktif bölgesi de üç boyutlu yapısının derinliklerindedir. Polifenol oksidaz enziminin aktif bölgesindeki globuler protein yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğu x-ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Küfrevioğlu, 1985). Bu nedenle uzantı kolu kullanılmadan sentezlenen afinite jellerinde enzimle matrisin sterik etkileşmesi sonucu bağlanma verimi düşmekte bu da kolon kapasitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Jakoby ve Wilchek, 1974). Bu sorunu elimine etmek için değişik moleküller uzantı kolu olarak kullanılmaktadır. Uzantı kolu uzunluğu kritik bir değer olup kısa kaldığında bağlanma verimi düşmekte gereğinden uzun olduğu durumlarda ise hidrofilik ve hidrofobik etkileşmelerle istenmeyen bazı bileşiklerinde adsorpsiyonuna neden olmaktadır. L-tirozin, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için Arslan (1994) tarafından hazırlanan afinite jeline uzantı kolu olarak

kullanılmış ve son derece yüksek bir verim elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, afinite jelinin sentezinde uzantı kolu olarak L-tirozin tercih edilmiştir. Aktifleştirilen Sepharose-4-B'ye L-tirozinin bağlanma zamanını belirlemek amacı ile belirli sürelerde tepkime kabından alınan örneklerin 294 nm'de ki absorbans değişimlerine göre bakıldığında 90. dakikadan sonra bağlanan L-tirozin miktarında önemli bir değişme olmadığı için, bu süre bağlanma zamanı olarak kabul edilmiştir (Arslan 1994).

Protein miktarlarının belirlenmesinde Coomassie Blue yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin olmaması, protein boyakompleksinin çözeltilerde uzun süre stabil olarak kalması, hassasiyet sınırının çokiye olması ve enzim çözeltilerinin µg seviyesinde bulundurmasıdır (Bradford, 1976). Ayrıca bu metodun başka önemli bir yanı ise, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya gereksinim duyulmamasıdır.

Literatürde, PPO enziminin saflaştırılması için hazırlanan afinite jellerinde ligand olarak tropolen, metimazol, L-mimozin, 2-merkaptobenzimidazol, 2-merkaptobenzotiyazol, p-aminobenzoik asit ve p-aminobenzoik asit türevleri kullanılmıştır (Flurkey, 1988; Pathak ve Vikram, 1994). Fakat bunların içinde p-aminobenzoik asit PPO enzimini daha fazla tutma kapasitesine sahip olduğundan dolayı daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda ligand olarak PPO enziminin inhibitörlerinden biri olan p-aminobenzoik asit kullanılmıştır.

Enzim kaynağı olarak kullanılan Nevşehir Patatesi (*Solanum Tuberosum* L.) nişastalı yumruları için yetiştirilen ve özellikle karbonhidrat kaynakları arasında ilk sırada yer alan en önemli bitkisel besinlerden birisidir. Anayurdu Güney Amerika'daki And Dağları olup 16. Yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir. 18. yüzyıldan itibaren birçok ülkede ana besin kaynağı olarak ekmeğin yerini almıştır. Bol miktarda nişastanın yanı sıra kalsiyum ve C vitamini içeren patates, insan besini olduğu gibi hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Patatesin ülkemizde yaygın olarak ekimin yapıldığı yerler İç Anadolu (Nevşehir ve çevresi), Erzurum, Bolu sayılabilir. (Gözen, vd., 1995; Destafano-Beltran, vd., 1990 ; Corsin vd., 1992) Afinite kromatografisi ile kolondan NPPO enzimi % 15,16 verim, 52,25 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda, PPO'nun dut meyvelerinden 74 kat, *Boletus erythropus* mantarından ise 28,5 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. (Arslan vd., 2004; Özel vd., 2010).

Yine bir afinite jeli olan fenil sepharose kullanılarak yapılan afinite kromatografisinde, Barbados kirazından PPO, 60 kat saflaştırılmıştır (Kumar vd., 2008). Afinite kromatografisinin yanında, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel flitasyon kromatografisi, PPO'nun çeşitli organizmalardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Taze fasulyenin yeşil kabuğundan iki PPO izoenzimi,

Sephadex G-100 kolonu ile 17 kat ve 9,4 kat (Gua vd., 2009), aynıfasulyenin tanelerinden yine iki PPO izoenzimi, DEAEseluloz kolonu ile 6,6 kat ve 3,8 kat (Gua vd., 2009).

Afinite kromatografisinin yanında, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel flitasyon kromatografisi, PPO'nun çeşitli organizmalardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir.

Meyve dokularından PPO ekstraksiyonu için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir. Araştırmamızda birçok literatürde belirtildiği gibi 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.30) kullanıldı (Beena ve Gowda, 2000; Doğan vd., 2002).

PPO'nun pH'ya bağımlılığı, 4,0-9,0 pH değerleri arasında incelendiğinde, enzimin asidik ve bazik pH değerlerinde düşük aktivite gösterdiği, nötral pH değerlerinde ise enzimin yüksek aktiviteye sahip olduğu, pH 7,0'de ise enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği ve bu noktada pik oluşturduğu gözlenmiştir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde meyve ve sebzeleinin pH'sının bu aralıkların dışında tutularak PPO enziminin kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceğini diyebiliriz. Örnek olarak, farklı kaynaklardan elde edilen PPO ekstraktlarının pH 4.0'ın altında inaktif olduğu bildirilmektedir. Çok yüksek pH'lar da PPO'nun hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesi aşağıdaki olasılıkların birine veya bunların kombinasyonuna bağlanabilir; alkali şartlarda enzimin konformasyonel değişime uğrayabilir, enzim, Maillard reaksiyonu ile o-kinonlarla reaksiyona girebilir, o-kinonlar baz tarafından katalizlenen ikincil reaksiyonlara girebilir.

NPPO enzimi için optimum pH ları katekol, gallik asit ve pirogallol olarak üç substrata karşı belirlenmiş olup sırasıyla 7,0 9,0 ve 7,5 olarak bulunmuştur. Optimum pH ve

sıcaklık çalışmalarına göre; NPPO enziminin asidik ve bazik pH değerlerinde düşük aktivite gösterdiği, nötral pH değerlerinde ise enzimin yüksek aktiviteye sahip olduğu, pH 7,0'de ise enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği ve bu noktada pik oluşturduğu gözlenmiştir. NPPO enzimi için en yüksek aktivite katekol substratı kullanılarak pH 7,0'de 20°C'de elde edilmiştir.

Litaretür deki yapılan sonuçlara göre PPO için optimum pH, Dutta 5,0 (Arslan vd., 2004), ahududu 8,0 (Gonzales vd., 1999), Anamur muzunda 7,0 (Ünal, 2007), olarak belirlemiştirler. İsviçre pazısı yapraklarında 7,5 (Gao vd., 2009), *B. erythropus*'tan saflaştırılan PPO için de, optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenmiştir (Özel vd., 2010). Bu sonuçlara göre, pH optimumu açısından NPPO enzimi ile uygunluk gösterdiği görülmektedir.

NPPO'sunun aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 5-70 °C aralığında incelenmiştir. NPPO enziminin optimum sıcaklığı katekol, gallik asit ve pirogallol substratlarının optimum pH'larında hepsinde 20, bulunmuştur. Sıcaklığın 40 °C ve üzerine çıktığında NPPO enzimi aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.8.- 4.10.) (Çizelge 4.2.).

NPPO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta katekol, gallik asit ve pirogallol için $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. (Şekil 4.11- 4.13). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden hesaplanarak bulundu (Çizelge 4.3.).

10 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda, hızının değişmediği saptanmıştır. Enzimin, difenolik substratı katekol varlığındaki kinetik verisi olan Michaelis-Menten sabiti (K_M) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri, çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 4.11- 4.13.), en iyi sonuç katekol substratına göre 5 mM ve 5000 U/mL'de olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). PPO aktivitesi için K_M değerleri, *B. erythropus* mantarında 2,8 mM, Amasya elmasında 3,1 mM (Dogan ve Dogan, 2004), Barbados kirazında 5,2 mM (Kumar vd., 2008), Portabella mantarında 2,1 mM (Xiaodong ve Flurkey, 1997), ve çakşır otu saplarında 6,78 mM (Erat vd., 2006), olduğu bildirilmiştir. Yapılan ve farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin katekol substratı için 0.011 mM'dan 84.2 mM'a kadar değişen K_M değerleri bildirilmektedir.

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin farklı substratları için farklı V_{max} değerleri bildirilmektedir. Çin lahanası, malatya kayısı, hurma ağacı, yali armudu ve fasulyeden izole edilen PPO enzimleri için katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 67.6, 833, 91, 766 ve 3846 U/mL olarak bulunmuştur. *L. piperatus* PPO'sunun 25000 U/mL olarak bulunmuştur (Öz, 2010; Nagai, ve Suzuki, 2001; Euclides, 1990; Lee, 1991; Zhou, ve Feng, 1991; GonGonzales, vd., 1998). Bu verilerden bizim bulduğumuz V_{max} değerimiz 5000 U/mL'dir. Literatürde ki veriler arasında tespit edilmiştir. Araştırmamızda elde edilen PPO enzimi üzerine benzoik asit, p-aminobenzoik asit, m-aminobenzoik asit sulfosalisilik asit, sodyum azid ve askorbik asit inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir. İnhibisyon etkisi, K_i ve IC_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre K_i sabitleridir. Çünkü materyal ve yöntemlerde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda oniki farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir.

Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için IC_{50} değerlerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

Farklı inhibitörlerin IC_{50} değerlerini bulmak için optimum şartlarda katekol substratını 10mM sabit konsantrasyonda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14- 4.19 ve Çizelge 4.4'te verildi. NPPO enzimi için askorbik asit en güçlü inhibitör olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Askorbik asitin 0,064 mM konsantrasyonunda, enzimin inhibe olduğu görülmüştür. Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Özel vd., 2010; Colak vd., 2005; Guo, 2009). Askorbik asit, ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden, enzim aktivitesini azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Bu şekilde gıdalarda ki besin değeri enzimatik kararmaya sebebiyet verilmeden muhafaza edilebilir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- PPO enziminin saflaştırılması için Sepharose 4B- L- tirozin- p-aminobenzoik asit kimyasal yapısına sahip afinite jeli sentezlenmiştir.
- Bu afinite jeli kullanılarak Nevşehir patatesi(*Solanum Tuberosum* L.)’den PPO enzimi saflaştırılmıştır.
- Afinite kromatografisi ile saflaştırılan NPPO enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 40 ve 35 kD molekül ağırlıklı 2 alt birimden oluştuğu bulunmuştur.
- Saflaştırılan enzimin optimum pH ve sıcaklıkları katekol, gallik asit ve pirogallol substratları kullanılarak bulunmuştur.
- Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu NPPO enziminin en yüksek aktiviteyi katekol substratı üzerinde gösterdiği tespit edilmiştir.
- Genel olarak saflaştırılan PPO enzimi pH 4 ile 9 arasında ve nötral pH’larda yüksek aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH’sının bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceği söylenebilir.
- NPPO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta katekol, gallik asit ve pirogallol substratları kullanılarak aktiviteleri belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.
- Saflaştırılan enzim üzerinde en kuvvetli inhibitörlerin askorbik asit ve sodyum azid, en zayıf inhibitörün ise sülfosalisilik asit olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Arslan, O., 1994. Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Arslan, O., Temur, A., ve Tozlu, İ., 1998. "Polifenol Oxidase From Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.)", J. Agric. And Food Chemistry, 45, 2861.
- Arslan, O., Erzen, M., Sinan, S. ve Ozensoy, O., 2004. Purification of Mulberry (*Morus alba* L.) Polyphenol Oxidase by Affinity Chromatography and Investigation of Its Kinetic and Electrophoretic Properties, Food Chemistry, 88, 479-484.
- Aka, J-P., Courtois, F., Louarme, L., Nicolas, J., ve Billaud, C., 2013. Modelling the interactions between free phenols, l-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment, Food Chemistry, 138, 2-3, 15, 1289-1297.
- Abukharma, B. A. ve Woolhouse. H. W., 1966. "The preparation and properties of o-diphenol: oxygen oxidoreductase from potato tubers", New Phytol., 65, 477.
- Arnaud, Y., 1965. "Etude par ultracentrifugation analytique d'un systeme enzymatique monomere-polymere (polyphenoloxydase)", J. Polym .Sci. Part C , 167, 4103.
- Bendall, D. S. ve Gregory, R. P. F., 1966 . "Purification of phenol oxidases", in Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds, Pridham. J. B. Ed., Pergamon Press, Oxford, 7.
- Beena, P., ve Gowda, L.R., 2000. "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean", J. Agric. Food.Chem., 48, 3839.
- Bingöl, G., Biyokimya, 1983. Güven Matbaası. Ankara. 169-174.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. Biotechnology Advances 18, 355-383.
- Bibhuti B. M., Satyendra, G., ve Arun, S., 2012. Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). Food Chemistry 134, 1855-1861.
- Brooks, D. W. ve Dawson, Ch. R., 1966. Aspects of tyrosinase chemistry, in The Biochemistry of Copper. Peicash. J., Aisen. P., and Blumberg. W. E. Eds., Academic Press, New York, 343.
- Bradford, M. M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem., 72, 248.

- Corsini, D.C., Pavek, J.J., Dean, B., (1992). Differences in Free and Protein-Bound Tyrosine Among Potato Genotypes and Their Relationship to Internal Blackspot Resistance, *American Potato Journal*, 69; 423-434.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation, *Food Chemistry*, 90, 801-807.
- Cabezas-Serrano, A.B., Amodio, M.L., ve Colelli, G., 2013, Effect of solution pH of cysteine based pre-treatments to prevent browning of fresh-cut artichokes, *Postharvest Biology and Technology*, 75, 17–23.
- Cuatracasas, P., 1970. “Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059.
- Destafano-Beltran, L., Nagpala, D.G., Çetiner, M.S., DODDS, J.H., Jaynes, J.M., (1990). Enhancing Bacterial and Fungal Disease Resistance in Plants. Application to Potato, the Molecular and Cellular Biology of Potato, Redwood Press Ltd., Melksham, United Kingdom, Ed: Vayda M.E., Park, W.D., 205-221.
- Doğan, M., Arslan, O., ve doğan, S., 2002. “Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars”, *International journal of Food Science and Technology*, 37, 415.
- Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), *Food Chemistry*, 88, 69-77.
- Erzengin M, 2002. Farklı Kaynaklardan Afinite Kromatografisi İle Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi BAÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Eskin, N. A. M. Biochemistry of foods. Academic Press, 1990. New York.
- Euclides, J.L., Souza, L.J., ve Valdir, A.N., 1990. “Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenol Oxidase from Palmito”, *J. Sci. Food Agric.* 52, 249.
- Espin, J.C., Garcia, P. G., Varon, J.R., ve Canovas, F.G., 1988. “Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidases”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968.
- Esterbauer, H., Schwarzl, E., ve Hayn, M., 1977. “A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid”, *Anal. Biochem.*, 77, 486.
- Erat, M., Sakiroglu, H. ve Kufrevioglu, O. I., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp., *Food Chemistry*, 95, 503-508.
- Flurkey, W. H. ve Jen, J. J., J. 1980. *Food Biochem.*, 4, 29.

- Flurkey, H. W., 1988. "Janis I., Affinity Chromatography of Mushroom Tyrosinase", *Phytochemistry*, 27(6), 1593.
- Galeazzi, M. A. ve Sgarbieri, V. C., 1978. "Banana polyphenoloxidase. Varietal differences and partial characterization in Sth Int. Congr", *Food Sci. Technol.*, Kyoto, Japan, 237.
- Garrett, B. C., 1976. "Reinvestigation of phenol oxidase activity by improved analytical techniques", *Diss. Abstr.*, 36(7), 3340-B.
- Gross. D. ve Coombs. J., 1975. Enzymatic colour formation in beet and cane juices. Paper presented at the 15th General Assembly of C. I. T. S., Vienna.
- Gul'ko, A. Y. ve Khaziyev, F. K., 1993. "Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity", *Eurasian Soil Science*, 25 (4), 101.
- Gutteridge, S. ve Robb, D. A., 1973. *Biochem. Soc. Trans.* , 1, 519.
- GonGonzales, E.M., Ancos, B., and Cano M.P, 1998. "Partial Characterization of Peroksaidaz and Polyphenol Oxidase in Blacberry Fruits " , *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5459.
- Gonzales, E. M., Ancos, B. ve Cano, M. P., 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4068.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. ve Xue, S., 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from gren bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 117, 143-151.
- Gözen, A., Abak K., Kasnakoğlu, H., Çetiner, S. ve Güzel, A., (1995). Türkiye'de Bitki Biyoteknolojisi Öncelikleri, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, ISBN 975-95878-3-1, 51.
- Harel, E., Mayer. A. M., ve Shain. Y., 1964. "Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition", *Physiol Plant.*, 17, 921.
- Harel, E., Mayer, M., ve Shain, Y., 1996. "Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples", *J. Sci. Food Agric.* , 17, 389.
- Herrmann, K., 1973. "Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydantein", *Fete. Scifen. Anstrichm.*, 75, 499.
- Herrmann, K., 1976. Über verfärbungen des Gemüses durch phenolische inhaltsstoffe, *Disch. Lebensm, Rdsch.*, 72:90.
- Huque, R., Wills, R.B.H., Pristijono, P., ve Golding, J.B., 2013. Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning *Postharvest Biology and Technology*, 78, 16–23.

- Heimann, W. ve Andler, St., 1962. "Zur Aktivitätsbestimmung der Polyphenoloxidase. III. Eine polarometrische Methode zur Bestimmung der Phenolaseaktivität", Z. Lebensm. Unters. Forsch., 117, 203.
- Hong, K., Xu, H., Wang, J., Zhang, L., Hu, H., Jia, Z., Gu, H., He, Q., ve Gong, D., 2013. Quality changes and internal browning developments of summer pineapple fruit during storage at different temperatures, Scientia Horticulturae Volume 151, 68-74.
- Ishiguro, R., ve Aoyama, Y., 1970. Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in Radish (*Raphanus sativus* L.) Eiyō To Shokuryō. 23, 13.
- Jaenicke, L., 1984. Protein Bestimmung, Einführung in the Praxis des Biochemikers, Köln, p27.
- Jones, J. D., Hulme, A. C., ve Woollorton, L. S. C., 1965. "Use of poly(vinyl) pyrrolidinone in the isolation of enzymes from chloroplasts", Phytochemistry., 4, 659.
- Joslyn, Ma., ve Ponting, J.D., 1951. Enzyme catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. Adv. Food Res., 1:3
- Jakoby, B. ve Wilchek, M., 1974. "Coupling reaction of Ligands and general methodology of affinity chromatography" in Methods in Enzymology, Academic Press, New York.
- Jen, J. J., and Kahler K. R., "Characterization of polyphenoloxidase in peaches grown in the Southcast", Hort Science, 9, 590.
- Kahn, V., 1977. "Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning", J. Food Agric., 28, 233.
- Kahn, V., 1985. Effect of protein, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. J. Food Sci., 50:111.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997. Biyokimya, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. Biyokimya, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum.
- Kwanele, M.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra), Food Chemistry 92, 311-323.
- Kumar, V. B. A., Mohan, T. C. K. ve Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase of Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) Food Chemistry, 110, 328-333.

- Laurila, E., Kervinen R., ve Ahvenainen, R., 1998. "The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits", *Postharvest News and Information*, 9(4), 53.
- Lavollay, J., Legrand. G. Lehongre G., ve Neumann, J. 1963. "Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase", in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. E. Ed. Pergamon Press., Oxford, 33.
- Lehninger, A. L., *Principles of Biochemistry*. 1982. Worth publisher, Academic Press, New York. 587-665.
- Loomis, W. D., 1968. "Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes", *Methods Enzymol.* , 13, 555.
- Liu, F. X ., Fu, S. F., Bi, X. J., Chen, F., Liao, X. J., Hu, X. S., Wu, J. H., 2013. Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in China, *Food Chemistry*, 138, 1, 1, 396–405.
- Laemelli, D. K., 1984. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄", *Nature*, London, 227.
- Lerner, H.R., Mayer. A.H., ve Harel. E., 1972. "Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase", *Phytochemistry*, 11, 2415.
- Lee, P.M., Lee K.H., ve Karim, M.I.A., 1991. "Biochemical Studies of Cocoa Bean Polyphenol Oxidase", *J. Sci. Food Agric.* 55, 251.
- Lerman, L.S., 1953. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, 32.
- Matheis, G. and Belitz, H. D. 1977. "Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1,14,18,1 monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163, 191.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., ve Poggi V. 2013. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers *Phytochemistry*. 63, 745–752.
- Mathew, A.G., Parpia, H.A.B. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *adv. Food Res.*, 19:75.
- Mathewson, P.R., *Enzymes*, 2000. Eagen Press Handbook Series, 37.
- Mazzocco, F. ve Pifferi, P. G., 1976. "An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn's hydrazone" *Anal. Biochem.* , 72, 643.
- Mayer, A. M., Harel, E., ve Ben-Shaul, R., 1966. "Assay of catechol oxidase-a critical comparison of methods", *Phytochemistry*, 5, 783.

- Mayer, A. M., 1987. "Polyphenol oxidases in plants-Recent progress", *Phytochemistry*, 26, 11.
- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, ve N. A., Klenitskaya, I. A., 1992."Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus", *Eurasian Science*, 5, 60.
- Murr, D. P. ve Morris, L. L.,1974."Effect of succinic acid-2,2-dimethyl-hydrazide on mushroom o-diphenol oxidase", *J. Chem. Sci. Hort. Sci.*, 99, 3.
- Mondy, N. L ve Koch. R. L.,1978. "Effect of potato virus X on enzymatic darkening and lipid content of potatoes", *J. Food Sci.*, 43, 703.
- Mihalyi, K. ve Vamos-Vigyazo, L. 1976. "A method for determining polyphenol oxidase activity in fruits and vegetables applying a natural substrate", *Acta Aliment. Acad. Sci.Hung.*, 5, 69.
- Molchanova, Z. Ya., 1966. "The role of oxidases in the resistance of grapevines to unfavorable conditions of Wintering", *Vinodel. Vinograd.*, 26(1), 21.
- Menon, I. A. ve Haberman, H. F., 1975. *Acta Dermat.*, 55, 343.
- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amilot, M. J. Ve Aubert, S.Y.1994. Enzymatic Browning Reaction in Apple and Apple Products. *CriticalReviews in Food Science and Nutrition*, 34(2); 109-157.
- Nagai, T., ve Suzuki, N., 2001."Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage", *J.Agric. Food Chem.*,49, 3922.
- O'Neill, S. P., Greaves, D. J. ve Ferguson, J. J., 1973. *J. Macromol. Sci. Chem.*, A7, 1159.
- Önez. Z., 2006.Üzümden(*Vitis vinifera* L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, AU.Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü, Ankara.
- Öz, F., 2010. *Lactarius Piperatus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. ve Yildirim, M., 2010. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents, *Food Chemistry*, 119, 1044-1049.
- Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S., ve Hegde, M. V., 1992. "Effect of Activation Methods on Affinity Chromatography of Potato Polyphenol Oxidase", *Phytochemistry*, 31(5), pp. 1481.
- Pomerantz, S.H. 1963. Separation, purification and properties of two tyrosinases from Hamster Mclanoma. *J. Biol. Chem.*,238:2351.

- Palmer, J. K., 1963. "Banana polyphenoxidase. Preparation and properties", *Plants Phys.*, 38, 508.
- Pifferi, P. G., Baldassari, L., ve Cultrera, R., 1974. "Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits", *J. Sci. Food Agric.*, 25, 263.
- Pruidse, G. N. ve Grigorashvili, G. Z., 1977. "Extraction and some properties of the o-diphenoloxidase and peroxidase inhibitor from the tea plant", *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 13, 104.
- Pallidina, T. A. ve Pervova, Yu. A., 1966. "Effect of germination stimulators on potato shoots and tubers", *Fiziol. Rast.*, 13, 238.
- Pendharkar, M. B. ve Nair, P. M., 1964. "Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation", *Phytochemistry*, 13, 1373.
- Palmer, J. K. ve Roberts, J. B., 1967. "Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzthiazole", *Science*, 157, 200.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. "Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları", *Gıda*, 17(3), 181.
- Ragazzi, E. ve Veronese, G., 1967. "Ricerche sulle fenolossidasi esul contenuto in o-difenolli delle olive", *Ann. Chim.*, 57, 1476.
- Rivas, N. J. ve Whitaker, J. R., 1973. "Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears", *Plant physiol.*, 52, 501.
- Ros, J. R., Rodriguez-Lopez, J. N. ve Garcia-Canovas, F., 1993. Effect of ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase, *Biochemical Journal*, 295, 309-312.
- Schaller, K., 1972. "Zur Bestimmung der Polyphenoloxidaseaktivitat in Kartoffelknollen", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 150, 211.
- Sato, M., 1962. "The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid", *Phytochemistry*, 8, 353.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A., ve Bollog, J. M., 1989. "Immobilization of enzymes on clays and soils", *Soil Biol. Biochem.*, 21 (2), 223.
- Sondheimer, E., 1964. "Chlorogenic acids and related depsides", *Bot. Rev.*, 30, 667.
- Stelzig, D. A., Akhtar, S. ve Riberio, S., 1972. "Catechol oxidase of Red Delicious apple peel", *Phytochemistry*, 11, 535.
- Solomon, E. I., ve Lowery, M.D., 1996. "Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry", *Science*, 259, 1575.

- Smith, L. L. ve Kruger. R. C., 1962. "Separation and purification of the phenolases of the common mushroom", J. Biol. Chem., 237, 1121.
- Suniti U. Pathak ve Vikram S. Ghole., 1994. "Affinit Purification and properties of polyphenoloxidase from Solanum Tuberosum", Phytochemistry, 36(5), 1165.
- Simpson, B. K., Marshall, M.R., Otwell, S. W., 1988. Polyphenol oxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties. J. Food Biochem.,12:205-217.
- Singleton, V. L. 1987. Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. Am. J. End.Vitic., 38(1); 69.
- Şakiroğlu, H., 1994. Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, ATA., Fen Bilimleri Ens., Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Tolbert, N. E., 1973. "Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts", Plant Phatol. , 51, 234.
- Türkan, F. 2009. Iğdır Elmasından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, YYÜ.Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Van.
- Ünal, M. Ü., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii), Food Chemistry, 100, 909-913.
- Vamos-Vigvazo, L. ve Gejzago. L. 1978. "Substrate specificity of the enzymatic browning of apples", Acta Aliment. Acad. Sci. Hung., 7, 79.
- Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and Vegetables. CRC Critical Rewievs in Food Science and Nutrition, 14; 49-129.
- Vaughan, P. F. T. ve Butt., V. S., 1970. "The action of o-dihydric phenols in the hydroxylation of p-coumaric acid by a phenolase from leaves of spinach beet (Beta vulgaris L.)", Biochem. J., 119, 89.
- White, J.S., ve White, D.C., Source Book of Enzymes, 1997. CRC Press LLC, Florida,33431.
- Whitaker. J. R., Principles of Enzymology for the Food Sciences, 1972. Marcel Dekker. New York, Chapters 22 and 24.
- Wildanger, W. ve Herrmann, K.,1973. "Die phenolicshen Inhaltsstoffe des Obstes. H. Die Flavonole des Obstes", Z. Lebensm. Unters. Forsch., 151, 103.
- Weaver, M.L., Bron. R. C., ve Steen. H. A.,1968. "The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes.", Am. Potato J ., 45, 132.

- Walker, J. R. L., 1975. "Enzymatic browning in food. A review", *Enzyme Technol. Dig.*, 4(3), 89.
- Weser, U., 1968. "Hemmung der o-Diphenol-Oxydase-Aktivitat durch Borat und Germanat", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 982.
- Walker, J. R. I., 1976. "The control of enzymatic browning in fruit juices by cinnamic acid", *J. Food Technol.*, 11, 341.
- Wisseman, K. W. ve Lee, C. Y., 1980. *J. Chromatogr.*, 192, 232.
- Wisseman, K. W. ve Montgomery, M. W., 1985. *Plant Physiol.*, 78, 256.
- Weber, D.J. ve Stahmann. M. A., 1964. "Ceratomyces infection in sweet potato; its effect on proteins, isozymes and acquired immunity", *Science.*, 146, 929.
- Xiaodong, Z. ve Flurkey, W. H., 1997. Phenoloxidas in Portabella Mushrooms, *Journal of Food Science*, 62, 97-100.
- Yavru, İ. 1997. Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşmaya bağlı olarak bazı organik madde miktarları ile polifenol oksidazaktivitesindeki değişimlerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Trabzon.
- Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., ve Hayashi, N., 2001. "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1446.
- Yonekura, M., Shimoda, T., ve Funatsu, 1981. *M., Agric. Biol. Chem.*, 45, 101.
- Zaini, N.A.M., Osman, A., AbdulHamid, A., Ebrahimpour, A., ve Saari, N. 2013. Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]. *Food Chemistry*, 136, 407-414.
- Zemel, G. P., 1989. Low pH Inactivation of Polyphenoloxidase. (Master Thesis), Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- Zhao-Jian, G., Jian-Bing, L., ve Xing-Guo, X., 2011. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from leaves of *Cleome gynandra* L. *Food Chemistry* 129, 1012-1018.
- Zhou, H., ve Feng, X., 1991. "Polyphenol Oxidase From Yali Pear", *J. Sci. Food Agric.* 57, 307.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kabil Özcan TOZAK

Doğum Yılı : 1988

Eğitim Bilgileri (Kurum ve Yıl)

Lisans : Kafkas Üniversitesi

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi

İletişim Bilgileri

Adres : Aksaray Üniversitesi

Telefon : 0553 326 72 67

E-posta : kabilozcantozak@hotmail.com