



**TORTUM ELMASINDAN (*Malus sylvestris*.) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BAZİ KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Şahin KARABULUT

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU**

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TORTUM ELMASINDAN (*Malus sylvestris.*) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Şahin KARABULUT

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her Hakkı Saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**TORTUM ELMASINDAN (*Malus sylvestris.*) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU danışmanlığında, Şahin KARABULUT tarafından hazırlanan bu çalışma 02.09.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oyçokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.09.2017 tarih ve 37. / ... 79 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TORTUM ELMASINDAN (*Malus sylvestris.*) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Şahin KARABULUT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Polifenol oksidaz enzimi bazı sebze ve meyvelerde enzimatik kararmaya neden olur. Bu çalışmada, PFO enzimi Tortum elmasından (*Malus sylvestris.*) Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu ile ilk kez saflaştırıldı. Enzimin saflığının kontrolü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforeziyle yapıldı. Katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak PFO enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, stabil pH, K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Enzimin iki ayrı substratı için sırasıyla optimum pH'sı 5,0-5,5; optimum sıcaklığı 10°C; optimum iyonik şiddeti 0,05 M; stabil pH'sı 5,5, K_M değeri 6,17-4,16 mM, V_{max} değeri 3,38-7,75 μ mol/dk olarak belirlendi. İnhibitör çalışmalarında askorbik asit, sodyum azit, tiyoüre, GSH ve DTT çalışıldı. Bu inhibitörler için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda IC_{50} değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla bu inhibitörler için K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlendi. K_i sabitleri ve IC_{50} değerlerine göre en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu tespit edildi.

2017, 71 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, afinite kromatografisi, karakterizasyon, inhibisyon, Tortum elması

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM TORTUM APPLE (*Malus sylvestris*.) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATE THE EFFECT OF SOME CHEMICALS ON THE ENZYME ACTIVITY

Şahin KARABULUT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Advisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Polyphenol oxidase enzyme causes the enzymatic browning in some fruits and vegetables. In this study, the PFO enzyme was purified for the first time using the Sepharose 4B-L-tyrosine-p-aminobenzoic acid affinity column from Tortum apple. The purity of the enzyme was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum pH, optimum temperature, optimum ionic strength, stable pH, K_M and V_{max} values of PPO enzyme were determined using catechol and 4-metil catechol substrates. The optimum pH and temperature of PPO were determined as 5,0-5,5, 10°C. Optimum ionic strength of this enzyme was found as 0,05 M for both substrates. K_M constants and V_{max} values of enzyme for the used two substrates were found as 6,17-4,16 mM and 3,38-7,75 $\mu\text{mol/dk}$, respectively. Ascorbic acid, sodium azide, thiourea, GSH and DTT were studied in inhibitor studies. IC_{50} values were determined in five different inhibitor concentrations for these inhibitors. K_i constant and the types of inhibition of these inhibitors were determined by using Lineweaver-Burk graphics. Ascorbic acid was appointed to be the most effective inhibitor according to the K_i constants and values of IC_{50} .

2017, 71 Pages

Keywords: Polyphenol oxidase, affinity chromatography, characterization, inhibition, Tortum apple

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezin deney aşamasından yazım aşamasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU'na,

Aynı zamanda çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkısı olan Sayın Arş. Gör. Mine AKSOY'a, ayrıca Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan aileme ve eşime sonsuz minnet duygularımı sunarım.

Şahin KARABULUT

Ağustos, 2017

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovin serum albumin
C	Katekin
DTT	Ditiyoeritritol
E	Enzim
E.C	Enzim komisyon
E.Ü.	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GSH	Glutatyon
I	İnhibitör
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_M	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
mM	Milimolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PER	Amonyum persülfat
PFO	Polifenol oksidaz
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorür
SDS	Sodyum dodesilsülfat
[S]	Substrat konsantrasyonu
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
V_{max}	Maksimum hız
µL	Mikrolitre

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tortum Elması ve Elmalar Hakkında Genel Bilgi	2
1.2. Esmerleşme Reaksiyonları	4
1.2.1. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları	4
1.2.2. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları.....	5
1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyası.....	8
1.3.1. Adlandırılması	8
1.3.2. Polifenol oksidazın tabiattaki dağılımı.....	8
1.3.3. Polifenol oksidazın biyokimyasal özellikleri	9
1.4. Polifenol Oksidaz Enziminin Substratları	11
1.5. PFO Enziminin Aktivatörleri	16
1.6. PFO Enziminin İnhibisyonu ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi	17
1.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyaller	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temini.....	29
3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	29
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması	30
3.2. Yöntemler.....	34
3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması	34
3.2.2. PFO Enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	34
3.2.2.a. Afinite jelinin hazırlanması	35

3.2.2.b. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi ve L-tirozinin bağlanması	35
3.2.2.c. L-Tirozinle modifiye edilen sepharose-4B'ye p-aminobenzoik asitin bağlanması.....	36
3.2.2.d. Ekstrakt çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzim elüsyonu	37
3.2.3. Protein tayini	38
3.2.3.a. Kalitatif protein tayini	38
3.2.3.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini.....	38
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	39
3.2.5. PFO Enziminin aktivite tayini	40
3.2.6. PFO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar.....	40
3.2.6.a. PFO enzimi aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	41
3.2.6.b. PFO aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi.....	41
3.2.6.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	41
3.2.6.d. Stabil pH'nın belirlenmesi.....	42
3.2.6.e. Katekol ve 4-metil katekol için optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi.....	42
3.2.6.f. Farklı inhibitörler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi	42
3.2.6.g. İnhibitörler için K_i değerlerinin belirlenmesi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. Kantitatif Protein Tayini.....	44
4.2. Tortum Elmasından PFO Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar.....	45
4.3. SDS-PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü	46
4.4. PFO Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları.....	47
4.4.1. Optimum pH değerlerinin belirlenmesine ait bulgular.....	47
4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait bulgular	48
4.4.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	50
4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesine ait bulgular	51
4.5. PFO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Ait Bulgular	53
4.6. PFO'nun İnhibisyon Kinetiği Verileri.....	55

4.6.1. PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bileşikler için IC_{50}	
değerlerinin belirlenmesine ait bulgular	56
4.6.2. PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin K_i	
sabitlerinin belirlenmesine ait bulgular.....	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	72



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteindeki fonksiyonel gruplar ile glukozun oluşturduğu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu.....	5
Şekil 1.2. Heterohalkalı aminlerin esmerleşme reaksiyonları ve ürünleri (R, X, Y harfleri H veya CH ₃ ; Z harfi CH veya N).....	5
Şekil 1.3. Melanin pigmetinin oluşum mekanizması.....	6
Şekil 1.4. Kinonların serbest amino asitlerle polimerizasyonu.....	7
Şekil 1.5. Monofenollerin o-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi).....	10
Şekil 1.6. o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi).....	10
Şekil 1.7. PFO enziminin bakır merkezleri.....	11
Şekil 1.8. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	12
Şekil 1.9. Katekinlerin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.10. Lökoantosiyanidinlerin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.11. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı	14
Şekil 1.12. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.13. Klorogenik asitin kimyasal yapısı	15
Şekil 1.14. Bazı basit fenollerin kimyasal yapıları	16
Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi, L-tirozin ile modifiye edilmesi ve p- aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyon.....	37
Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için (Bradford metodu) kullanılan standart grafik.....	44
Şekil 4.2. Elüe edilen PFO enziminin tüp sayısına göre absorbans-aktivite grafiği.....	45
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	47
Şekil 4.4. Katekol ve 4-metil katekol substratları varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	48
Şekil 4.5. PFO enziminin iki farklı substratı için (katekol ve 4-metil katekol) aktivite-derişim grafiği.....	49
Şekil 4.6. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi için aktivite-sıcaklık grafiği....	51

Şekil 4.7. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enziminin stabil pH belirlemek için yapılan aktivite-zaman grafiği.....	52
Şekil 4.8. Katekol substratı varlığında PFO'nun V-[S] grafiği	53
Şekil 4.9. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.10. 4-metil katekol substratı varlığında PFO'nun V-[S] grafiği.....	54
Şekil 4.11. 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 4.12. PFO enziminin aktivitesi üzerinde askorbik asitin farklı inhibitör konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite - [Askorbik Asit] grafiği	56
Şekil 4.13. PFO enzimi aktivitesi üzerine tiyoüre'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Tiyoüre] grafiği.....	57
Şekil 4.14. PFO enzimi aktivitesi üzerine GSH'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[GSH] grafiği	57
Şekil 4.15. PFO enzimi aktivitesi üzerine DTT'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[DTT] grafiği.....	58
Şekil 4.16. PFO enzimi aktivitesine sodyum azitin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sodyum azit] grafiği	58
Şekil 4.17. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine L-askorbik asitin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 4.18. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine tiyoürenin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 4.19. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine GSH'nin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği	61
Şekil 4.20. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine DTT'nin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 4.21. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azitin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı ..	33
Çizelge 3.2. PFO enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	40
Çizelge 4.1. Tortum elması PFO enzimi için saflaştırma tablosu.....	46
Çizelge 4.2. İki farklı substrat için farklı pH’larda elde edilen aktivite değerleri (Aktivite değerleri birim EÜ/mLdak’dır.)	48
Çizelge 4.3. PFO enziminin iki farklı substratı için farklı konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerleri	49
Çizelge 4.4. PFO enzimi aktivitesinin optimum olduğu sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	50
Çizelge 4.5. PFO enziminin stabil pH’nın belirlenmesine ait aktivite ölçüm sonuçları.....	52
Çizelge 4.6. PFO difenolaz aktivitesiyle ilgili enzim kinetiği değerleri.....	55
Çizelge 4.7. PFO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC50 değerleri	59
Çizelge 4.8. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal bileşiklerin Ki değerleri ve inhibisyon tipleri.....	62

1. GİRİŞ

Birçok sebze ve meyvenin toplanması veya depolanması esnasında bir takım fiziksel işlemler sonucu sebze ve meyvelerde sarıdan kahverengiye kadar değişen renk değişimleri meydana gelmektedir. Esmerleşme veya kararma olarak adlandırılan bu renk değişimleri fenolik bileşiklerin kinonlara yükseltgenmesiyle sonuçlanan reaksiyonlar bütünüdür. Esmerleşme, genellikle fenolik bileşiklerin kinonlara yükseltgenmesi, bu olayı takiben de reaktif ara ürünlerin enzimatik olmayan oksidasyonu sonucunda kolayca ve hızlı bir şekilde polimerleşerek koyu renkli ve sudaki çözünürlüğü az olan melanin pigmentlerine dönüşmesiyle sonlanan bir takım reaksiyonlar zinciridir (Whitaker 1972; Friedman 1997; Laurila *et al.* 1998).

Bu kahverengi pigment oluşumu bir dereceye kadar istenen bir durum iken, çoğu kez bu oksidasyon işlemleri istenilen seviyede durdurulamazlar. Özellikle de besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında besinlerin duyu ve besinsel özelliklerinde değişimlere neden olurlar. Bu durum genelde besinin renk, koku ve besin değerinde istenmeyen değişimler şeklinde ortaya çıkar. Sonuç olarak da besinin, hem besinsel değerinin hem de ekonomik değerinin düşmesine neden olur (Whitaker and Lee 1995).

Enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin antibakteriyal, antikanserojen ve antioksidan özelliklere sahip olmaları son zamanlarda büyük ilgi konusu olmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek amacıyla besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılarından tanımlanması ve bu istenmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konulması, etkilerinin anlaşılması ve çözümler bulunması, hem insan beslenmesi hem de insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en uygun yöntem ise PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesine gerek duyulmaktadır (Baisier and Labuza 1992).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkinin türüne, yetiştirildiği bölgeye ve bitkinin olgunluk derecesine göre değişim gösterir. Esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne göre farklılık gösterir. Esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokulardaki oksijen miktarı ve aktif polifenol oksidaz konsantrasyonudur (Mayer and Harel 1991; Lee 1992; Fraignier *et al.* 1995; Yoruk and Marshall 2003).

Fenolik madde, oksijen ve PFO enzimi faktörlerinden birisinin ortadan kaldırılmasıyla enzimatik kararma azaltılabilmekte veya durdurulabilmektedir.

Enzimatik olmayan esmerleşme olarak bilinen renk değişimleri ise, aminoasitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu olarak da adlandırılan reaksiyonlar sonucu oluşur ve oksijensiz ortamda da yürüyebilir. Koku ve renkte bir iyileşme sağlayan bu reaksiyonlar endüstriyel açıdan önemlidir. Olayın ilk aşamasında amino grubu şekerin indirgen hidroksil grubuna bağlanarak N-glikozitleri oluşturmaktadır. Bunu izleyen karmaşık polikondensasyon olayları sonucunda, esmer renkli "melanoidin" adı verilen bileşikler oluşmaktadır. Enzimatik olmayan renk bozulmaları ısı, ışık, metaller ve oksijen gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir (Bolin and Steele 1987).

1.1. Tortum Elması ve Elmalar Hakkında Genel Bilgi

Tortum elması *Rosacea* familyasının *Malus* cinsine ait *Malus sylvestris* türünün bir kültivarıdır. Tortum elması, Doğu Anadolu Bölgesi'nin Erzurum ili Tortum ilçesi çevresinde yetişmektedir. Tortum elması, Erzurum ilinin endemik türleri arasında yer almaktadır.

Ülkemiz, sahip olduğu iklim ve ekolojik özellikleri açısından bazı tropik meyveler dışında birçok meyvenin yetişmesine elverişlidir. Elmanın ana vatanı, Anadolu'yu da içine alan Güney Kafkasyadır. Elma, ekolojik şartların uygunluğu ve gen merkezi olması nedeniyle yurdumuzun hemen hemen her yerinde yetiştirilebilmekte; en uygun

kültür merkezleri Kuzey Anadolu’da bulunmaktadır. Kuzey Anadolu, Karadeniz’in kıyı bölgeleri ile İç Anadolu ve Doğu Anadolu yaylaları arasındaki geçit bölgeleri de elmanın önemli yetiştirilme alanlarını kapsamaktadır.

Elma güz mevsiminde olgunlaşmakta; hasat edildikten sonra uzun süre saklanılabilmekte ve bu süre zarfında lezzet kazanmaktadır. Ayrıca elmanın çekirdeği olgunlaşma evresine doğru kaybolmaktadır. Tortum elması hakkında literatürde ve yazılı belgelerde henüz ayrıntılı bir bilgi bulunmamasına rağmen günümüzde elma yetiştiriliciliği, kimyasal içerikleri, biyokimyasal özellikleri ve sağlık açısından yararları ile ilgili birçok bilgi bulunmaktadır.

Elma, içerdiği mineral ve vitaminler açısından beslenmede önemli bir yere sahiptir. Taze elmanın %84’ünü su oluşturur. Ayrıca karbohidratlar, malik asit, proteinler, yağlı maddeler, vitaminler, pektinler ve mineral maddeler ihtiva eder. Elmada bulunan A ve C vitaminleri ile potasyum, kalsiyum, magnezyum ve sodyum gibi elementler birleşerek bir takım tuzları oluşturur. Bu tuzların organik kısımları kanda enerji sağlamak için okside oldukları zaman, geride baz teşkil eden bileşenler kalır. Böylece elma, kandaki asit-baz dengesi üzerinde olumlu bir etki yapar.

Elma suyu antioksidan etkisi en fazla olan meyve sularından biri olarak , “Kuercetin” adlı güçlü bir antioksidan içererek sağlıklı beslenmede önemli bir yer tutar. Yapılan araştırmalarda elma suyunun içerdiği antioksidan sayesinde hücrel hasarı önleyici potansiyel bir etkisi olduğu, bu etkinlik sonucunda LDL oksidasyonunu önleyebildiği görülmüştür. Buna bağlı olarak yüksek tansiyon ve ritim bozukluğu olan hastalarda pozitif etki gösterdiği ve kalp krizi riskini %24 oranında düşürdüğü ifade edilmektedir. İngiltere’deki Milli Kanseri ve Tıp Araştırma Merkezi’nin her gün elma yeme alışkanlığı olan 2 bin kişiyi kapsayan ve 77 yıl süren araştırması sonucunda elma yemeyenlerin elma yiyenlere oranla kalp krizi riskinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca British Medical Journal adlı tıp dergisinde yayınlanan araştırma sonuçlarına göre de her gün başta elma olmak üzere meyve veya meyve suyu tüketme alışkanlığı

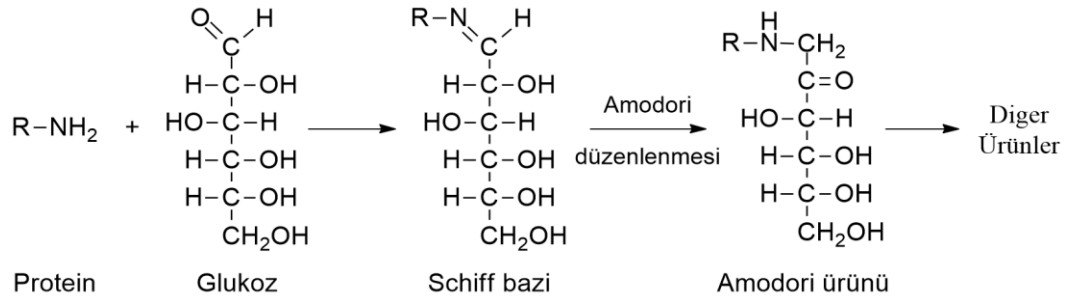
olanlarda inme (felç) riski böyle bir alışkanlığı bulunmayanlara oranla %32 daha az olduğu belirtilmektedir.

1.2. Esmerleşme Reaksiyonları

1.2.1. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları

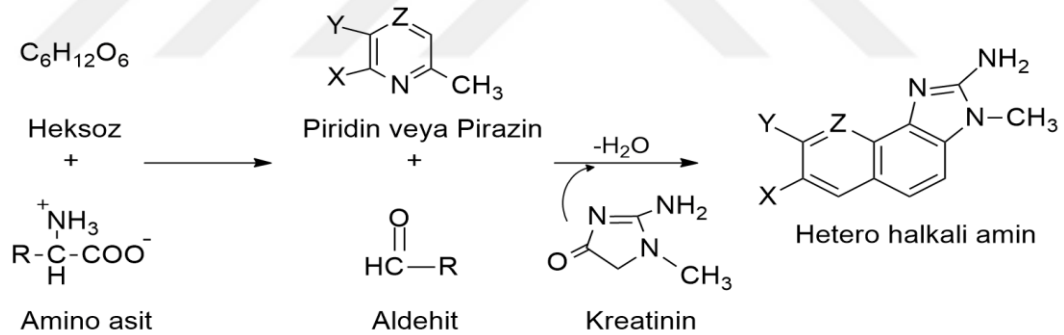
Enzimlerin doğrudan rol almadığı ve enzimatik olmayan esmerleşme olarak tanımlanan reaksiyonlar esmer pigmentin oluşumundan sorumludur (Friedman 1997). Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına göre daha farklı ara ürünler ve farklı mekanizmalarla gerçekleşen reaksiyonlar Maillard reaksiyonları olarak bilinir (Mauron 1981; Lee and Nagy 1988).

Yapısında amin grubu içeren biyomoleküllerin (protein, amino asit ve peptitler) karbohidratlarla olan ve ısı ile katalizlenen reaksiyonlar bu tür reaksiyonlardır (Şekil 1.1). Örneğin, unda bulunan glutein ile glukozun reaksiyonu, laktalbumin ile süt tozunda bulunan laktozun reaksiyonu ve serbest aminoasitlerin kızarmış patatesteki glukoz ile olan reaksiyonları bu reaksiyonlara örnek gösterilebilir. Bunun dışında in vivo protein-karbohidrat etkileşimleri de söz konusudur. Diyabet hastalığında hemoglobin ile glukozun reaksiyonu, katarakt hastalığında göz lensi proteininin glukoz ile reaksiyonu söz konusudur. Bunun yanı sıra, proteinlerin okside olmuş yağ asitleri ile gerçekleştirdiği reaksiyonlar da önemlidir. Kazein adlı protein okside olmuş linoleik asit ile böyle bir etkileşime girebilmektedir (Friedman 1997).



Şekil 1.1. Proteindeki fonksiyonel gruplar ile glukozun oluşturduğu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları dışında ısı ile katalizlenen ve hetero halkalı aminlerin oluşumuyla sonuçlanan bazı reaksiyonlar da vardır (Şekil 1.2). Sadece hayvansal besinlerde bulunan aminoasitler, karbohidratlar ve kreatinin arasındaki etkileşimlerle bu tür reaksiyonlar gerçekleşebilir (Friedman 1996, 1997).

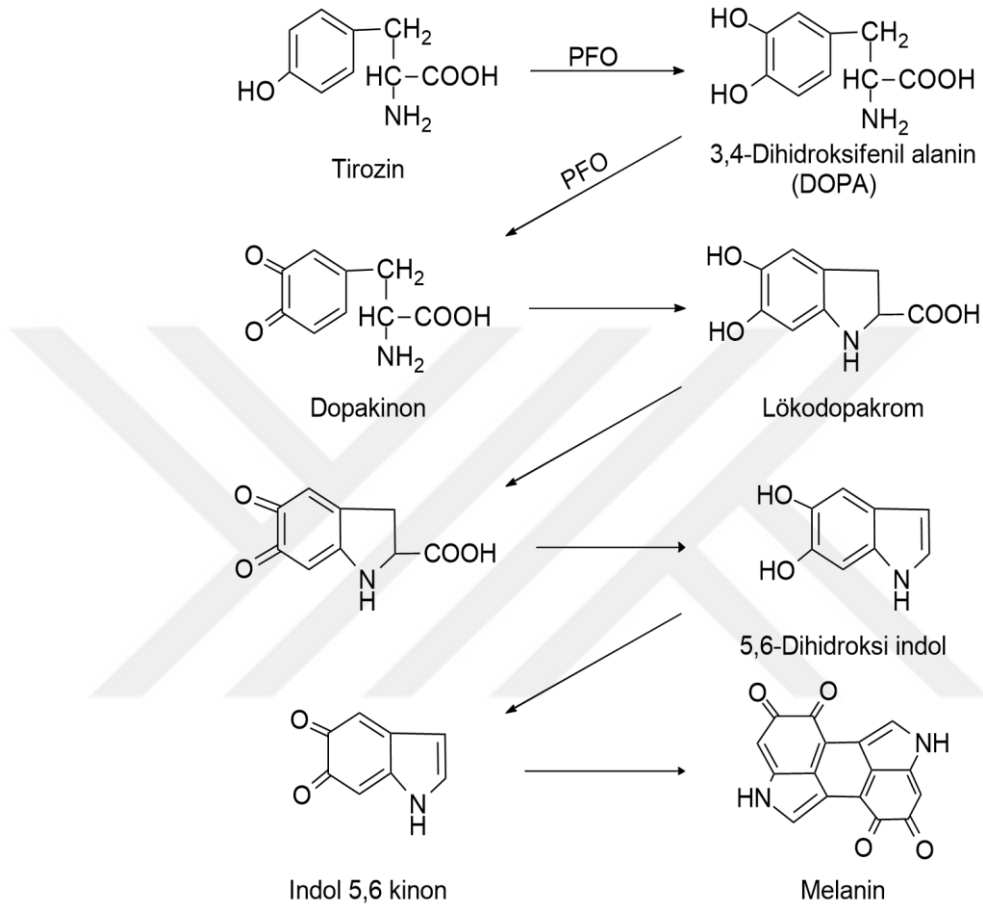


Şekil 1.2. Heterohalkalı aminlerin esmerleşme reaksiyonları ve ürünleri (R, X, Y harfleri H veya CH₃; Z harfi CH veya N)

1.2.2. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları

Esmerleşme reaksiyonlarının en yaygın olanı enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Genellikle fenolik bileşiklerce zengin olan bitkilerde görülür. İki şekilde meydana gelebilir (Friedman 1997). Bunlardan biri, sebze ve meyvelerde bulunan polifenol bileşiklerin kinonları oluşturmak üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan kinonoid bileşikler, daha sonra

enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda kahverengi melanin pigmentlerine polimerleşirler (Şekil 1.3.) (Laurila *et al.* 1998).

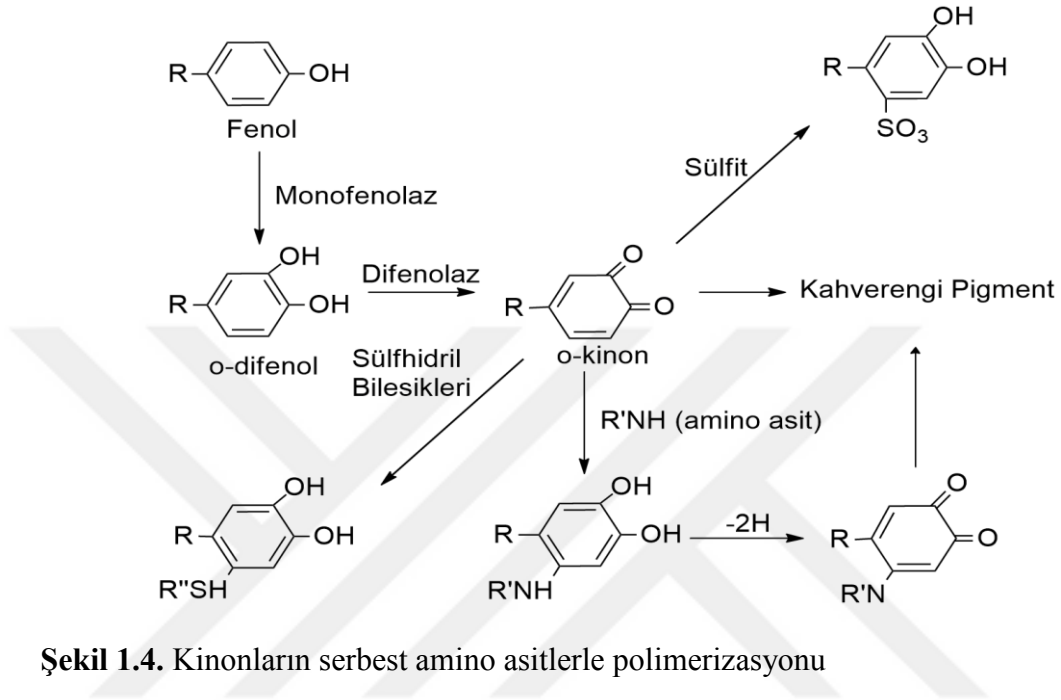


Şekil 1.3. Melanin pigmetinin oluşum mekanizması

Normal şartlar altında enzim hücre içerisinde moleküler oksijenle temas halinde değildir, fakat meyve veya sebze fiziksel işleme tabi tutulduğu zaman, enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında, bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girer ve renkli bileşikler oluşturur (Lee *et al.* 1990; Valero and Garcia- Carmona 1998; Rocha *et al.* 1998; Manzocco *et al.* 1999; Chang *et al.* 2000; Mathewson 2000).

Bir diğer enzimatik esmerleşme reaksiyonu ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest aminoasit ve proteinlerle esmer polimeri oluşturmasıdır (Labuza *et al.* 1992).

Patateste ve kazein içeren besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonu bu türden reaksiyonlardır (Şekil 1.4).



Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının oluşabilmesi için PFO enzimi, PFO'nun etkilediği fenolik substrat ve moleküler oksijenin bir arada bulunması gerekir. Ayrıca, sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında oluşan ve ilk kilit madde olan *o*-kinonlar renksiz bileşiklerdir ve bu kinonlar herhangi bir renk bozulmalarına neden olmaz. Ancak oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve oluşan bu dimerler daha büyük molekülü bileşiklere polimerleşirler. Esmer renkli olan bu polimerler ise besinlerdeki renk bozulmasına sebep olurlar (Mcweeny 1974; O'brein and Morrissey 1989).

1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyası

1.3.1. Adlandırılması

Bakır içeren proteinlerin bir grubu olan polifenol oksidazlar, oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir ve enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (Van Gelder *et al.* 1997; Dincer vd 2002). Moleküler oksijen varlığında iki reaksiyonu katalizler; monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve *o*-fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) dir (Yang *et al.* 2000).

Bitki PFO enzimleri monofenol mono oksijenaz (tirozinaz E.C. 1.14.18.1) ile difenol oksidaz (katekolaz; difenol: O₂ oksidoredüktaz: E.C. 1.10.3.2) olarak adlandırılmıştır (Mayer 1987; Valero *et al.* 1990; Chen *et al.* 1991; Sıddıq *et al.* 1992; Kermasha *et al.* 1993).

Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre de adlandırılmaları 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 oksidazdır (Score *et al.* 1997).

1.3.2. Polifenol oksidazın tabiattaki dağılımı

PFO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Viktoria and Whitaker 1995). PFO enzimi tabiatta yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkilerde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle de mantarlarda, bazı hayvansal organlarda ve kabuklu deniz hayvanlarında bol olarak bulunan bir enzim çeşitidir. Ayrıca bazı toprak türlerinde glukoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO enziminin de varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar *et al.* 1989; Mosko *et al.* 1992; Gulko and Khaziyev 1993).

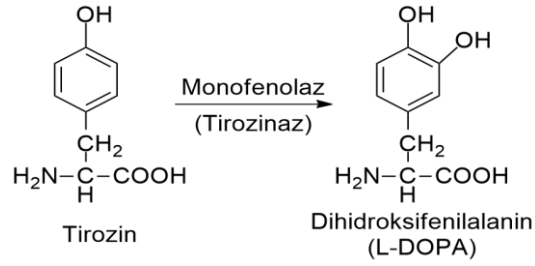
Bitkilerdeki PFO içerikleri bitkinin türüne ve yetiştirilme ortamına ve biçimine göre farklılık göstermektedir. Hatta aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellikler gösterebilmektedir. Enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi, meyve ve sebzelerin olgunluğuna, bitkilerin ise tür ve yaşlarına bağlı olarak değişim göstermektedir (Stephens and Wood 1974; Padron *et al.* 1975; Mayer 1987).

Taze elmada enzimin daha çok kloroplastlarında ve mitokondrilerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Parish 1972). Elmada PFO aktivitesi *o*-dihidroksi fenol bileşeni kararma eğiliminin kültüre bağlı olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür. Herhangi bir elma kültürünün kararma eğilimleri birkaç yıl için kararlılık göstermektedir. Farklı iklim şartları veya farklı coğrafik bölgelerde bu kararlılık çok değişmemektedir (Walker and Wilson 1975).

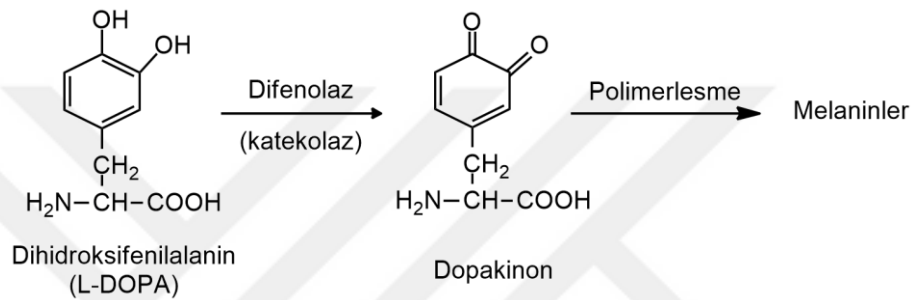
Elmadaki PFO enziminin hem monofenolaz hem de difenolaz aktiviteleri üzerinde çeşitli inhibitörlerin etkisi incelenmiştir (Nicolas *et al.* 1994). Monofenolaz aktivitesi enzim izolasyonu işlemlerine duyarlı olmasından dolayı, ekstraksiyon sırasında çok düşük oranlarda, NMR spektroskopisi ya da HPLC gibi teknikler yardımıyla tespit edilebilmiştir. Ancak son yıllarda geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağlı olduğu görülmüştür. PFO enzimi Triton X-114 ile izole edilip kısmen saflaştırılmış ve kinetik karakterizasyonu sonucunda enzimin tek bir aktif bölgeye sahip olduğu ve katalitik işlemler sırasında iki farklı konformasyonu halinde bulunabileceği ileri sürülmüştür (Walker and Wilson 1975).

1.3.3. Polifenol oksidazın biyokimyasal özellikleri

PFO enzimi iki farklı aktivite göstermektedir ve bunlardan ilki, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur. Enzimin bu aktivitesi, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.5). Bir diğer aktivite ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile oluşan reaksiyondur ve enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.6) (Fenoll *et al.* 2000; Espin and Wichers 2001; Brooks *et al.* 2004).



Şekil 1.5. Monofenollerin o-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)



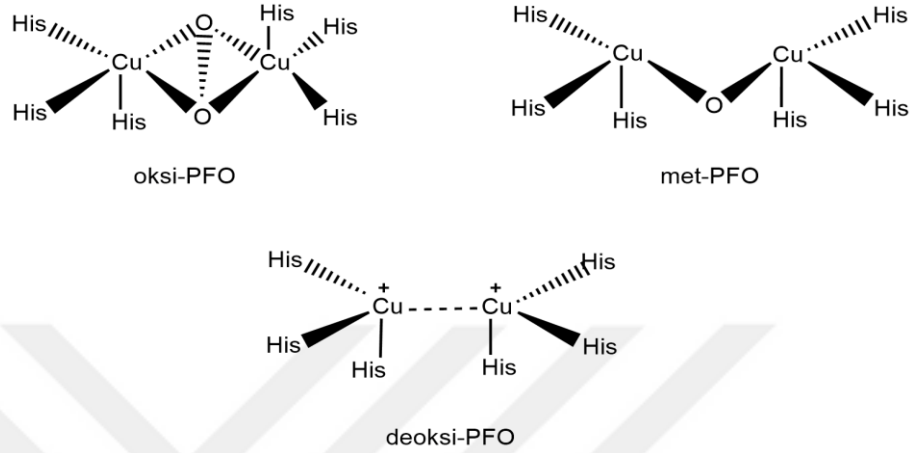
Şekil 1.6. o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)

Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip olduğu ileri sürülmektedir (Pendhark and Nair 1974). Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi birçok PFO enzimi ekstraktları her iki aktiviteye de sahip iken; çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz PFO enzimlerinin mono hidroksi fenollere etki etmediği belirtilmektedir (Mayer 1987).

PFO enzimi ortalama 55-65 kDa molekül ağırlığına sahip olup enzimde iki bağlanma bölgesinin bulunduğu belirlenmiştir. Enzim ekstraktlarında bakırın Cu (I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu (I)'in Cu (II)'ye yavaş bir şekilde okside olduğu gözlemlenmiş; bu değişimin herhangi bir aktivite kaybına neden olmadığı tespit edilmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değil iken Cu (II) ilave edilmesi ile aktivite geri kazanılabilmektedir (Kertesz *et al.* 1972).

PFO'nun fenolik bileşiklere etki mekanizması oldukça karmaşıktır. PFO enzimi proestetik grup olarak bakır iyonu ihtiva eder. Bakırın valens durumu PFO enziminin aktivitesini sağlar (Kolcuoğlu vd 2007). Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu

PFO' ların aktif bölgesinin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir (Şekil 1.7.) (Marusek *et al.* 2006).



Şekil 1.7. PFO enziminin bakır merkezleri

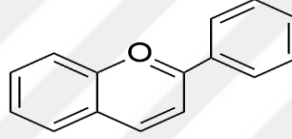
1.4. Polifenol Oksidaz Enziminin Substratları

Sebze ve meyvelerin çok çeşitli fenolik bileşikler içermesine rağmen fenolik bileşiklerden çok azı PFO enzimine substrat olabilmektedir. Fenolik ve polifenolik bileşikler sayısız bitki türünde ikincil metabolitler oldukları için bu bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunma sisteminde rol oynadıkları tahmin edilmektedir. PFO enzimi ile katalizlenmiş polimerleşme reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Polifenolik bileşiklerin ayrıca antitumör, antikanser, antidiyabetik ve antioksidatif özelliklere de sahip oldukları bilinmektedir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, bitkilerin türüne, büyüme ve saklanması sırasında çevresel şartlara ve olgunlaşma derecelerine göre çeşitlilik göstermektedir (Friedman 1997).

PFO enziminin meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle basit fenollerdir.

Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerin yenilenebilir kısımları, kök, gövde ve tohum kısımlarında bulunurlar. Bitkilerin hiçbirinde flavonoidler konsantre olarak belirli bir bölgede bulunmazlar. Bitkinin belirli bölümlerinde eşit olarak dağılım gösterirler. Bitkilerin farklı kısımlarında en azından eser miktarda flavonoid bileşiklerine rastlanmıştır (Swain 1962). Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Frudenberg and Weinges 1962).

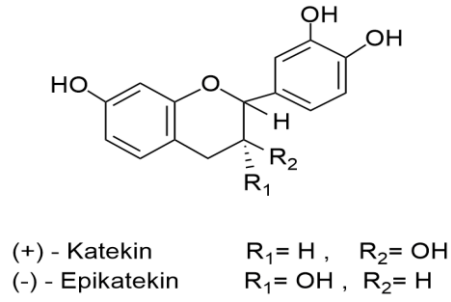


Şekil 1.8. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Bitkilerde doğal olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerden yalnızca katekinler, lökoantosiyanidinler, antosiyaninler, flavonoller ve sinamik asit türevleri besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler (Şakiroğlu 1994).

Katekinler

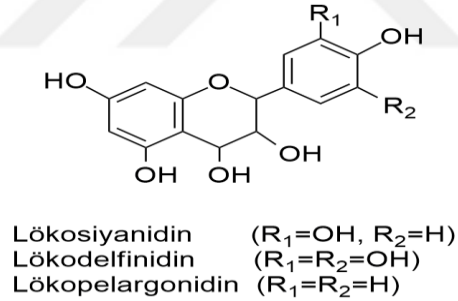
Katekinler, C3 atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olan katekinler (+) - katekin ve onun stereoizomeri olan (-) - epikatekin olarak bulunmuştur. Diğer formları ise katekinlerin sıcak sodyum karbonatla muamelesinden meydana gelir. Katekinlerin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Frudenberg and Weinges 1962).



Şekil 1.9. Katekinlerin kimyasal yapısı

Lökoantosiyandinler

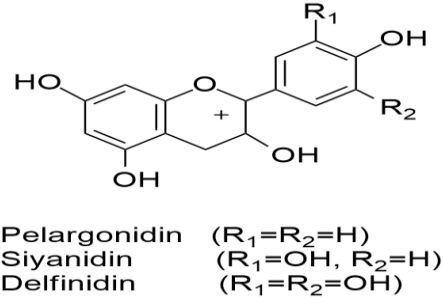
Lökoantosiyandinlerin önemli özelliği asidik ortamda ısıtılmasıyla antosiyanidinlere çevrilebilen bileşikler olmasıdır. Bu bileşiklerin streokimyası, katekinlerin stereokimyası kadar araştırılmamıştır (Şakiroğlu 1994) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Lökoantosiyandinlerin kimyasal yapısı

Antosiyaninler

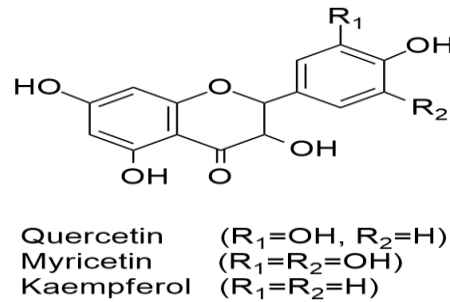
Antosiyaninler renkli bileşiklerdir. Bitki ve meyvelerin hücre öz suyunda glikozidler halinde bulunurlar. Antosiyaninler serbest şeker rezidüleri antosiyanidin olarak bilinirler. Antosiyanidinlerin %20 lik HCl ile 3 dk civarında kaynatılarak hidroliz edilmesinden bir veya daha fazla şeker molekülleriyle elde edilirler (Hayashi 1962) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı

Flavonoller

Flavonoller ve flavononler antoksanin pigmentleri olarak adlandırılırlar. Renkleri açık yeşil olup bazı durumlarda kararima reaksiyonlarına katılırlar (Şekil 1.12.) (Şakiroğlu 1994). Flavonoller genellikle glikozidler halinde bulunurlar. Bu glikozidler de bir ya da daha fazla hidroksil grubu olan glukoz, ramnoz ve nadiren de rafinoz şeker türleri bir araya gelir. Genellikle şeker rezidülerinin substitüsyon reaksiyonlarında flavonol çekirdeğinin hidroksil grupları esterleşme reaksiyonuna uğrar (Gripenberg 1962).

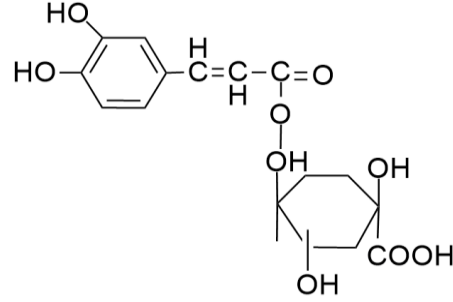


Şekil 1.12. Flavonollerin kimyasal yapısı

Sinamik Asit Türevleri

PFO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden olan klorogenik asittir. Klorogenik asitin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının *p*-kumarik asitin (4-hidroksi sinamik asit) PFO enzimi tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu belirtilmektedir (Sato 1962). Klorogenik asitin izomerleri olan izoklorogenik asit,

neoklorogenik asit, pseudo klorogenik asit de PFO'nun substratları olarak sayılmıştır (Sandeimer 1964). Klorogenik asitin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Şekil 1.13).

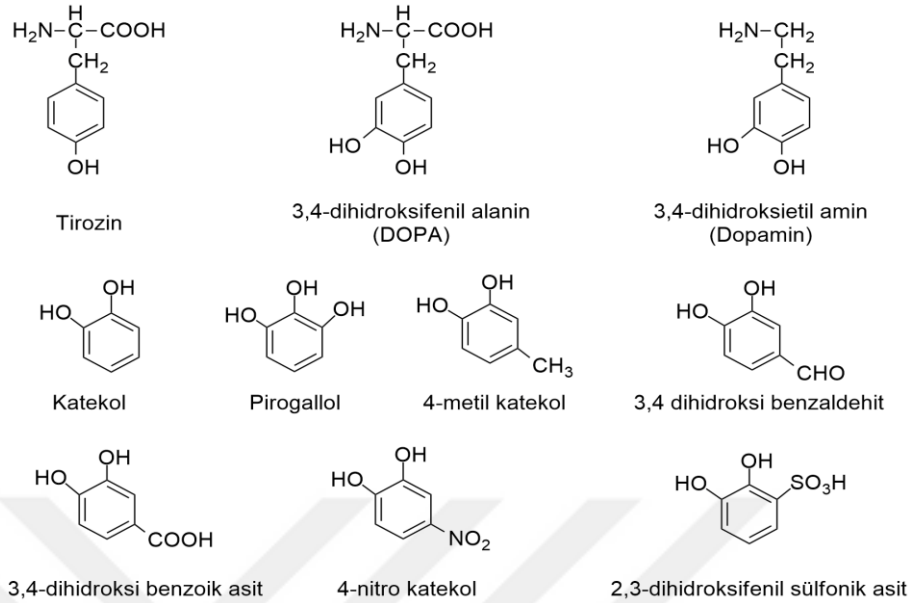


Şekil 1.13. Klorogenik asitin kimyasal yapısı

Basit Fenoller

Tirozin, çoğu gıdalarda bulunan önemli bir amino asittir ve melanin oluşumunda enzimatik oksidasyon için monohidroksifenol klasik bir substrattır. Tirozinin hidroksilasyon ürünü olan dihidroksifenil alanin (DOPA) ve dihidroksifenil etilamin (Dopamin) bitki dokularında bulunur (Şekil 1.14) (Şakiroğlu 1994).

Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PFO enzimi, L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat *p*-kresolu hidroksiller (Stelzig *et al.* 1972). Şeker pancarında ise PFO enzimi, tirozine karşı aktivite göstermezken L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmaktadır. Fakat ilginç olan şudur ki şeker pancarı dokularında kayda değer miktarda L-DOPA bulunmazken, oldukça fazla miktarda tirozin bulunmaktadır (Wilcox *et al.* 1985).



Şekil 1.14. Bazı basit fenollerin kimyasal yapıları

1.5. PFO Enziminin Aktivatörleri

Enzimatik kararmanın önlenmesi ve PFO'nun inhibisyonu üzerine çok fazla çalışma yapılmışken, aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu durum şüphesiz, enzimin aktivasyonunun istenmemesinden kaynaklanmaktadır.

Elma kabuğundan elde edilen mitokondriyal enzim polivinil pirolidin (PVP) ile inaktive edildikten sonra sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlarla tekrar aktive edilmiştir (Coetzer *et al.* 2001). SDS'nin farklı avakado türlerinden hazırlanan ham ve kısmen saflaştırılmış ekstraktlardaki inaktif PFO'yu da aktive ettiği belirtilmektedir (Lerner *et al.* 1972).

Üzümden elde edilen PFO kısa bir süre içerisinde üre ya da asidik pH'ya maruz bırakıldığında 4-10 kat arasında dönüşümlü olarak aktive olmaktadır. Yüksek iyonik şiddetlerde, asitlerle aktivasyon daha yüksektir. Bu durum, kloroplastlarda olduğu gibi kısmen saflaştırılmış enzim ekstraktlarında da görülmektedir. Üre inaktif bakla

PFO'sunu aktive ederken aynı zamanda enzimin monofenoller üzerine olan etkisinde de artmaya neden olur (Lerner *et al.* 1972).

Ortama Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi turp PFO'sunun aktivitesini artırırken; patates PFO'suna da etkisi olmamaktadır (Weaver *et al.* 1968; Ishigoro and Aoyama 1970).

L-DOPA, PFO tarafından katalizlenen adrenalinin oksidatif döngüsünü ve renkli ara bileşiklerin oluşumunu aktive eder. Tatlı patates dokularında substratların indüklediği aktivasyona da rastlanmıştır (Schaller 1972).

1.6. PFO Enziminin İnhibisyonu ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi

Enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin endüstrisinde oldukça önemli bir konu olup araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir (Lee and Park 2005). PFO katalizli esmerleşme, enzim ve fenolik substratın ikisinin ya da enzim ve fenolik substrattan birinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla önlenabilir. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke edilmeleriyle ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumlarının engellenmeleriyle önlenabilir (FDA 1996).

PFO'nun birçok inhibitörü bilinmektedir. Günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır (Ferrer and Walker 1996).

Esmerleşme reaksiyonlarının inhibe ettiği bilinen bazı bileşikler sülfidler, askorbik asit ve türevleri, oksalik asit, sitrik asit ve tiyol bileşikler olarak sıralanabilir (Altunkaya ve Gökmen 2008). PFO aktivite tayininde inhibitör olarak askorbik asit olarak kullanıldığında reaksiyon başlangıcında absorbanstaki değişim belli bir süre izlenememektedir. Bu süre sonunda hemen hemen bütün askorbik asit dehidroaskorbik

asite dönüşmekte ve bu periyoda ulaşıldıktan sonra PFO tarafından üretilen *o*-kinon miktarı artmaktadır (Colak vd 2007).

Sülfidler, PFO'nun inhibisyonunda çok fazla kullanılan inhibitör olmalarına rağmen meyve ve sebzelerin taze olarak pazara sunulması, satılması durumunda kullanımına izin verilmemektedir (FDA 1996). Enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeyi önleyen sülfidler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder ayrıca ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici madde olarak da rol oynar. Sülfid kullanımının avantajlarının yanında dezavantajları da söz konusudur. Besinlerde yıkıcı özelliği, bitki ve meyvelerin doku yumuşamasına neden olduğu ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir (Mcevilly *et al.* 1991).

Bir inhibitör olarak üzerinde en çok çalışılan madde askorbik asittir. Ayrıca sitrik asit, sitrik-askorbik asit ve benzoik-sorbik asit karışımlarının uygulanması da minimum düzeyde işlenmiş patateslerde etkili sonuçlar vermiştir. Karides, elma ve patates için 4-hekzilrezorsinol iyi bir enzimatik esmerleşme inhibitörüdür (Castaner *et al.* 1996).

PFO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sisteinin PFO'yu inhibisyonu, enzimin difenolaz aktivitesi ile oluşan *o*-kinonlarla sisteinin tiyol-konjugatlarını oluşmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Sistein, oluşan *o*-kinonları onunla ilgili fenollere indirgeyerek inhibisyonu sağlamış olur (Marshall 2000).

Doğada yaygın olarak bulunan polifenoller birçok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak da bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kök, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze meyve, sebze ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel PFO inhibitörleri; kuampferol, kuarsetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir (Kubo and Yokokawa 1992; Chen and Kubo 2002). Flavanoidlerin inhibisyon özelliği, aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir.

2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, kumik asit gibi çok sayıda aldehit ve türevlerinin, PFO için inhibitör madde olabilecekleri belirlenmiştir (Kubo and Kinst-Hori 1998; Lee 2002). Aldehit grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple inhibisyon etkisinin, enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı oluşturmamasından ileri geldiği ileri sürülmektedir (Lee 2002).

Ayrıca, çeşitli sentetik PFO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkapt-2-metilpropionil)-Z,-prolin] ve antitiroid ilaç olan metimazol (1-metil-2-merkaptimidazol)'dür (Kahn and Andrawis 1985; Espin and Wichers 2001). Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asitler gibi birçok kimyasalın da inhibitör olarak PFO aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Kubo and Kinst-Hori 1998).

1.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Gelişen teknolojiyle birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. Gıda, sağlık, tekstil gibi alanlarda artan talebi karşılamak amacıyla daha hızlı, az enerji maliyetli, çevreye daha az zarar veren yöntemler tercih edilmektedir. Klasik kimyasal yöntemlerin spesifik olmaması, veriminin düşük olması ve çevreye daha çok zarar vermesi gibi nedenlerden dolayı artık tercih edilmemektedir. Bu yüzden bu klasik yöntemlerin yerini artık enzim katalizli reaksiyonlar almaktadır. Canlı sistemler tarafından metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran biyolojik katalizör olan enzimler, oldukça spesifik reaksiyonları 10^8 - 10^{20} kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünler oluştururlar. Bu şekilde elde edilen ürünler klasik yöntemlere göre daha kısa sürede sentezlenir.

Günümüzde isteğe göre üreticiler raf ömrü uzun ve göze hoş gelen meyvelerin üretimini tercih etmektedirler. Bu özellikleri sağlayan meyvelerin de üretimi genelde gen translasyonu ve hormon takviyesiyle gerçekleştirebilmektedir. Bu tür müdahaleler meyvelerin sağlık açısından sağlayacağı bazı faydalı yanlarını azaltmaktadır. Hâlbuki

meyveler sağlık açısından oldukça önemli besinlerdir ve besinlerin sağlıklı bir şekilde korunması ve raf ömrünün uzatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyeceklerin sentetik yoldan elde edilmiş kimyasallarla ya da farklı yöntemlerle korunması sonucu gıdalarda tat ve besin değeri kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Bu türden oluşumlar da insan sağlığını tehdit ettiğinden bu konulara evre ve sağlık örgütleri tarafından hassasiyet gösterilmekte ve pek çok gelişmiş ülkede enzimlerle elde edilen yeni ürünlerin ya da bilinen ürünlerin yeniden modifiye edilmesi çalışmalarına hız verilmektedir.

Dolayısıyla, PFO'lar veya benzeri reaksiyonları katalizleyen enzimler bu açıdan son yıllarda oldukça ilgi toplamıştır. Endüstriyel açılardan değerlendirildiğinde sadece birkaç oksidoredüktaz, çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak bu türden yeni enzimlerin saflaştırılıp karakterize edilmesi ile bazı yeni ürünlerin enzimatik sentezi mümkün olabilecektir. Bitkilerde bulunan bu tür enzimler, potansiyel kaynaklar olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Erzurum yöresinde yetişen elma PFO'larının varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılıp, endüstriyel uygulamalar için kullanılabilişliği açısından önem arz etmektedir. Bu kaynaklardan PFO'ların saflaştırılması ile çeşitli ve yeni bazı polimerlerin veya diğer kimyasal maddelerin sentezi işlemlerinde kullanılabilişliklerinin araştırılması hız kazanacaktır.

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip meyve olan elmanın PFO enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu ile saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen saf PFO enzimlerinin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla şunlar hedeflenmiştir;

- Afinite jelinin sentezi,
- Erzurum yöresine ait olan Tortum elmasından afinite jeli ile PFO'nun saflaştırılması,

- Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile PFO enziminin yaklaşık moleköl ağırlıklarının tespit edilmesi,
- Çalışılan her bir substrat için optimum pH ve sıcaklığının 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, IC_{50} ve K_i değerlerinin bulunması.

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem beslenme hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir. Buna göre, bu yörede yetişen ve tüketilebilen bu elma türü, tüketilmenin yanında endüstriyel öneme de sahip olabilecektir. Bu kaynaklardan sağlanan özütten PFO enziminin saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bunun sonucunda elde edilen PFO aktivitesinin inhibisyon verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel PFO kaynaklarına adapte edilmesiyle, hem istenmeyen esmerleşmeden kaynaklanan ekonomik kayıplar azaltılmış veya önlenmiş hem de besin değerini kaybetmeksizin ürünlerin raf ömrü uzatılmış olacaktır.

Yapılan bu çalışmayla, yeni enzim kaynakları denenerek endüstrinin ihtiyaç duyduğu yeni ve potansiyel PFO'ların saflaştırılması ve elde edilen bu enzim için optimum çalışma şartlarının belirlenmesi, bu bilgiler dahilinde, çeşitli alanlarda enzimin kullanılması amacıyla, endüstriyel veya farmakolojik öneme sahip yüksek saflıkta bazı organik bileşiklerin sentezi ve bazı polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi, gibi farklı uygulamalar için kaynak teşkil edecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gregory ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çay bitkisi PFO'su 5000 kat saflaştırılmıştır ve saflaştırmanın ara aşamalarında dört tane çözünür özellikte sarı fraksiyon bulunmuştur. Bunların asidik fenolik oksidasyon ürünlerine ek olarak temel enzim proteinleri ve nükleik asitler oldukları ortaya konulmuştur. Kompleks oluşturucu materyallerin ayrılmasından sonra fraksiyonlar mavi ve birbirlerine benzer şekilde meydana gelmiştir. %0,32 bakır içeriği elde edilmiştir. Pirogallol'un spesifik aktivitesi 30°C'de, 373 EÜ/mg olarak belirlenmiş en iyi substratın *o*-dihidrik fenol olduğu belirlenmiştir. Kuinol ve *p*-fenilendiamin yavaş bir şekilde okside olmasına rağmen monohidrik fenoller ve askorbik asit okside olmamıştır. Çay fermantasyon mekanizması ile sonuçlar arasındaki ilişki tartışılmıştır (Gregory *et al.* 1966).

Mahanta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada işlenmiş çay yapraklarında, renk ve aromadan sorumlu olan teaflavin maddesinin oluşumuna neden olan polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri çalışılmıştır. Pigmentlerin teaflavin grupları sıvı kromatografisiyle belirlenmiştir. Bu iki enzimin aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Enzimlerin en yüksek aktivitelerinin çay işlenme aşamalarından kivrırma işlemi esnasında görülmüştür. İşlenmiş siyah çayda enzimatik esmerleşmeye neden olan mekanik zararlardan dolayı enzim aktivitesinde düşüş ve daha sonra artış olduğu gözlemlenmiştir (Mahanta *et al.* 1993).

Halder ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çay yapraklarından polifenol oksidaz enzimi ekstrakte edilmiş sonra saflaştırılıp bazı özellikleri belirlenmiştir. DEAE selüloz kolonu yardımıyla PFO'nun izoezimleri ayrılmış ve iki fraksiyon absorbe edilirken diğeri edilememiştir. Absorbe edilmeyen fraksiyon jel filtrasyon, hidroksiapatit, centricon-30, FPLC gibi farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştırılarak enzimin optimum şartları belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'sının alkali olduğu bulunmuştur. Yüksek oranda saflaştırılmış olan enzim, katekolü okside ederken, monofenolleri, *p*-kinolleri okside edemediğinden dolayı katekol oksidaz olabileceği düşünülmüştür (Halder *et al.* 1998).

Çaşır bitkisiyle yapılan bir çalışmada Erzurum-İspir yöresinden temin edilen çaşır bitkisinin yaprak ve gövdesinden polifenol oksidaz enzimi izole edilmiş, beş ayrı substrat için optimum şartlar belirlenmiş ve K_M ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Çaşır bitkisinden izole edilen PFO enziminin en etkili substratının katekol olduğu belirlenmiştir. İnhibitör çalışmalarında askorbik asit, β -merkapt etanol, sodyum metabisülfid, sodyum dietilditiyokarbomat ve L-sistein klorür kullanılmış, Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri ve inhibisyon türleri tespit edilmiştir. Yaprak için en etkili inhibitörün L-sistein klorür, gövde için sodyum metabisülfid olduğu belirlenmiştir (Erat 1998).

Yapılan başka bir çalışmada ayvadan ekstrakte edilen PFO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılmış ve katekol, pirogallol, L-DOPA, *p*-kresol, resorsinol ve tirozin substratlarıyla çalışılmıştır. Fakat en etkili substratın katekol olduğu saptanmıştır. K_M değerleri katekol için 4,54 mM, pirogallol için 7,35 mM ve L-DOPA için 1,78 mM olarak belirlenmiştir. En iyi substrat olan katekol kullanılarak enzimin optimum pH'sı 8,0 ve optimum sıcaklığı ise 40°C olarak bulunmuştur. Çalışılan inhibitörler içerisinde askorbik asit, potasyum siyanid, L-sistein'in enzim aktivitesi üzerine en etkili inhibitörler olduğu bulunmuştur (Yağar ve Sağıroğlu 2000).

Enginar bitkisinin yaprağından ve gövdesinden yapılan çalışmada, PFO enzimini ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon ile saflaştırılmıştır. 50 mM katekol substratı kullanarak optimum şartlar belirlenmiştir. Çalışmada 6 inhibitör çalışılmış, bitkinin yaprağı ve gövdesi için en iyi inhibitörün sodyum azit ve tiyoüre olduğu belirlenmiştir (Ziyan ve Pekyardımcı 2003).

Aydemir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yer elmasından polifenol oksidaz enzimi izole edilmiştir. Enzim katekol ve L-DOPA'ya karşı aktivite gösterirken, bir monofenol olan L-tirozine karşı aktivite göstermemiştir. Enzimin optimum pH değeri 7,0 ve sıcaklık değeri ise 25°C olarak bulunmuştur. Enzimin nötr pH civarında kararlı olduğu gözlemlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak belirlenen K_M değeri 5,88 mM, V_{max} değeri ise 25,402 EÜ/mg.dk olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmasında ise

potasyum siyanid, β -merkaptetanol ve tiyoürenin en iyi inhibitörler olduğu görülmüştür (Aydemir vd 2003).

Arslan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada duttan izole edilen PFO enzimi amonyum sülfat ve afinite kromatografisi yardımı ile saflaştırılmıştır. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarıyla çalışılmıştır. Bu üç substrat için yapılan çalışmalarda optimum pH ve sıcaklık değerlerinin 4,5-8,0 ve 20-45°C arasında değiştiği saptanmıştır (Arslan vd 2004).

Yapılan başka bir çalışmada, kereviz köklerinden 0,1 M fosfat tamponu kullanarak pH 7'de PFO enzimi izole edilmiştir. Farklı substratlar kullanılarak K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. K_M değerleri 25°C'de sırasıyla, pirogallol için 4,5, katekol için 8,3 ve L-DOPA için 6,2 mM olarak saptanmıştır. Optimum pH ve sıcaklık çalışmaları bu substratlar ile belirlenmiştir. Pirogallol için optimum pH 7,5, katekol ve L-DOPA için 7,0 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklıklar sırasıyla 25°C, 40°C ve 45°C olarak bulunmuştur. Farklı inhibitörlerin etkisi incelenmiş ve en etkili inhibitörün L-sistein olduğu bulunmuştur (Yağar 2004).

Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ısırgan otundan PFO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi yardımıyla saflaştırılmış ve optimum şartları belirlenmiştir. Enzimin altı farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiş ve en etkili substratın L-tirozin olduğu tespit edilmiştir. Optimum pH değeri 4,5, sıcaklık değerleri ise 30°C olarak bulunmuştur. Substrat olarak L-tirozin kullanıldığında K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $7,90 \times 10^{-4}$ mM ve 11290 EÜ/ml olarak belirlenmiştir. İnhibitör çalışmasında L-sistein, klorid, sodyum azit, sodyum siyanit, benzoik asit, salisilik asit, L-askorbik asit, glutatyon, tiyoüre, sodyum dietil, ditiyokarbomat, β -merkaptetanol ve sodyum metabisülfid gibi çeşitli inhibitörler çalışılmış ve ditiyokarbomat en etkili inhibitör olarak bulunmuştur (Gülçin vd 2005).

Yapılan başka bir çalışmada Türkiye'de yetiştirilen emir üzümlerinden PFO enzimi izole edilmiş, optimum şartları (pH, sıcaklık) termal inaktivasyon, kinetik parametreler

incelenmiştir. Bazı inhibitörlerin enzim üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Substrat olarak katekol kullanıldığında, optimum pH 4,2 ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir. K_M değeri $25,1 \pm 2,72 \text{ mmol L}^{-1}$, V_{max} değeri ise $0.925 \pm 0.04 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$ bulunmuştur. İnhibitör çalışmalarında ise en etkili inhibitörlerin sodyum metabisülfid ve askorbik asit olduğu bildirilmiştir (Ünal ve Şener 2006).

Yapılan başka bir çalışmada İspir şeker fasulyesinden izole edilen polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmi saflaştırılmış ve enzimin bazı kimyasal özellikleri incelenmiştir. Enzimin 3 farklı substrat için optimum pH, optimum sıcaklık ve iyonik şiddet, K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak yapılan çalışmada dört farklı inhibitör ile çalışılmış ve glutatyonun en etkili inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Yılmaz 2007).

Sabancılar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Denizli narından PFO enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile 67 kat saflaştırılmıştır. PFO enziminin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,5 ve 40°C olarak saptanmıştır. Enzim için K_M ve V_{max} değerleri ise Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla belirlenmiştir (Sabancılar vd 2007).

Yapılan başka bir çalışmada, anamur muzundan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,0 ve 30°C olarak belirlenmiştir. Termal inaktivasyon sonuçlarına göre, enzimin yarı ömür değerleri 7,3-85,6 dakika arasında saptanmıştır. Enzimin E_a değerinin 155 kJ. mol^{-1} ve Z değerinin ise 14,2°C olduğu tespit edilmiştir. Enzimin K_M değeri 8,5 mM, V_{max} değeri $0,754 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$ 'dir. Çalışılan inhibitör çalışmalarında askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Ünal 2007).

Yapılan başka bir çalışmada, çağla bademinden izole edilen polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. PFO enziminin karakterizasyonunda amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden elde edilen numune kullanılmıştır. Optimum pH ve sıcaklık

değerleri farklı substrat kullanılarak belirlenmiştir. En iyi substrat olan 4-metil katekol için optimum pH değeri 6,5, optimum sıcaklık değeri ise 35°C olarak tespit edilmiştir. K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. İnhibitör çalışmalarında ise en etkili olanların sodyum azit, benzoik asit, sitrik asit, L-askorbik asit ve tiyoüre olduğu bulunmuştur. Metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş; Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} , Pb^{+2} metalleri enzim aktivitesini artırırken Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Sn^{+2} , K^{+1} metalleri enzim aktivitesini azalttığı ileri sürülmüştür (Güngör 2008).

Şakiroğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dereotundan polifenol oksidaz enzimi izole edilerek çeşitli kinetik özelliklerini incelenmiştir. Katekol, klorogenik asit ve dopamin substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak yapılan inhibitör çalışmalarında L-sistein klorür, askorbik asit ve glutatyon ile çalışılmıştır. Çalışılan inhibitörlerden en etkili inhibisyon etkisinin L-sistein klorür olduğu belirlenmiştir (Şakiroğlu vd 2008).

Yapılan başka bir çalışmada, Çukurova bölgesinde yetiştirilen domat çeşidi zeytinden ekstrakte edilen polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırmıştır. Enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Substrat olarak 4-metil katekol kullanılmış ve enzimin K_M ve V_{max} değerlerinin 14,52 ve 1,73 Abs/dk olduğu saptanmıştır. Enzimin optimum pH'sı 4,5, optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur. E_a değeri 121 kJ.mol^{-1} ($r^2=0,9496$), Z değeri ise 18,55°C ($r^2=0,9532$) olarak belirlenmiştir. Çalışılan inhibitörlerden en etkili olanlarının sistein ve sodyum disülfid olduğu tespit edilmiştir (Taş 2009).

Yapılan başka bir çalışmada, Konya-Ereğli yöresinden temin edilen beyaz kirazdan izole edilen polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin optimum şartları belirlenmiş. Saflaştırma işleminden sonra iki farklı aktivite piki elde edilmiş ve ilk aktivite görülen pik izoenzim A, diğeri ise izoenzim B şeklinde adlandırılmıştır. İzoenzim A %48,7 verimle 3,9 kat, izoenzim B ise %54,3 verimle 76,7 kat saflaştırılmıştır. İzoenzim A için optimum pH ve sıcaklık değerler sırasıyla 4,5 ve 20°C,

izoenzim B için ise 4,98 ve 30°C olarak saptanmıştır. İnhibisyon çalışmasında L-sistein ve sodyum disülfid inhibitör olarak kullanılmıştır. Bu iki inhibitörün her iki enzim için inhibisyon etkilerinin farklılık gösterdiği ve B enzimini her iki inhibitörün %100 inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gökkaya 2009).

Yapılan başka bir çalışmada, iki farklı mantardan PFO enzimini izole edilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimler için SDS-PAGE de tek bir bant elde edilmiştir. Mantar türleri için sırasıyla enzimin molekül ağırlığı 36 kDa ve 50 kDa civarında gözlenmiştir. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak, PFO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. *Lactarius salmonicolor* PFO enziminin kullanılan bu substratlar için optimum pH'ları 6,0-7,5 arasında, optimum sıcaklıkları ise 0-25°C arasında bulunmasına rağmen *Agaricus bisporus* PFO enzimi için optimum pH 7,5-8,0 ve sıcaklık ise 20-30°C arasında değiştiği bulunmuştur. LsPFO ve AbPFO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta bu üç substrat için K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile bulunmuş ve LsPFO enzimi için en uygun substratın 4-metil katekol, AbPFO enzimi için ise pirogallol olduğu saptanmıştır. Farklı inhibitörler kullanılarak her iki enzim için çalışmalar yapılmıştır (Dedeoğlu 2009).

Yapılan başka bir çalışmada, polifenol oksidaz enzimi yabani ve yenilebilir olan bir mantardan Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoikasit afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saf enzim elüatında PFO'nın varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant olarak bulunmuştur. Optimum şartlar katekol substratı kullanılarak belirlenmiş ve enzimin optimum pH'sı 7,0, sıcaklığı 20°C olarak saptanmıştır. Katekol substratı kullanılarak yapılan kinetik çalışmalar sonucunda, K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1 mM ve 25000 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir. İnhibisyon çalışmalarında ise askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum azid ve benzoik asitin enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (Öz 2010).

Yapılan başka bir çalışmada Trabzon ili Yomra Elması meyvesinden hazırlanan ekstraktta polifenol oksidazın (PFO) monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri ve çeşitli

biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Monofenolaz aktivitesi 3-(3,4-hidroksifenil) propiyonik asit (MHPPA), L-tirozin monofenolik substratları ve difenolaz aktivitesi de katekol, 4-metil katekol ve L-DOPA substratları varlığında belirlenmiştir. Her bir substrat için PFO'un en iyi çalışacağı pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda Yomra elması PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve difenolaz aktivitesinin en yüksek derecede katekol substratına ilgi duyduğu ve bu substrat ilgisinin sırasıyla 4-metil katekol ve L-DOPA'nın izlediği, monofenolaz aktivitesi için ise sırasıyla MHPPA, L-tirozin şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca askorbik asit, sodyum azit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit gibi genel PFO inhibitörlerinin enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir (Can 2010).

Doğan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, melisa bitkisinden polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleri ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak PFO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Bu substratlar için sırasıyla optimum pH, 6,5, 4,0 ve 8,5'dir. Optimum sıcaklık ise sırasıyla 40°C, 50°C ve 60°C'dir. V_{max}/K_M en iyi substratın pirogallol olduğu tespit edilmiştir. İnhibitör çalışmalarında ise etkili inhibitör glutatyon olarak bulunmuştur (Doğan vd 2013).

Yapılan başka bir çalışmada, yeni bir keçiyoynuzu meyve çeşidinden polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimleri izole edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. PFO enzimi için optimum pH değeri 4,5; optimum sıcaklık değeri ise 30°C olarak tespit edilmiştir. POD enzimi için ise optimum pH değeri 5,0; optimum sıcaklık değeri ise 35°C olarak bulunmuştur. Katekol substratı kullanılarak yapılan kinetik çalışmalarda K_M değeri PFO enzimi için 47,11 mmolL⁻¹, guaiakol substratı varlığında ise POD enzimi için K_M değeri 153,00 mmolL⁻¹ olarak bulunmuştur. Çalışılan inhibitörlerden her iki enzim için 4-heksilresorsinol (4-HR), oksalik asit ve L-sistein güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Zhang and Shao 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temini

Çalışmada kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, indirgenmiş glutatyon (GSH), sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA), katekol, 4-metil katekol, sıvı azot, Sepharose-4B, *p*-amino benzoik asit Sigma Chemical Comp.'den Fluka'dan; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merc AG'den; akriamid, N,N'-metilen bisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat ve β -merkapt etanol Pharmacia'dan temin edildi.

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Laboratuvar çalışmalarında aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	: (1x10), Sigma (ABD)

Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C' ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C' ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan çözeltiler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

1. Ekstraksiyon Tamponu

0,05 M Fosfat Tamponu (pH: 7,3): 0,87 g K_2HPO_4 , 0,5 g polietilen glikol (PEG), 0,198 g askorbik asit ve 0,075 g EDTA 80 mL saf suda çözüldü. % 6 (w/v) olacak şekilde TX-100 ilavesinden sonra 1 M HCl ile pH 7,3' e ayarlandı. Son olarak çözeltinin hacmi saf suyla 100 mL' ye tamamlandı.

2. Diyaliz Çözeltisi Tamponu

5 mM Fosfat Tamponu (pH: 6,3): 0,68 g KH_2PO_4 alınarak 950 mL saf suda çözüldü. İçerisine 100 µl gliserol eklendikten sonra 1 M HCl ile pH 6,3'e ayarlandı. Son olarak çözeltinin hacmi saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

3. Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Tampon Çözeltisi:

0,05 M Asetat Tamponu (pH: 5,5): 0,41 gr NaCH_3COO alınarak 80mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 5,5'e ayarlandı. Son olarak çözeltinin hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Substrat Çözeltileri:

- 1) 100 mM katekol Çözeltisi: 0,55 g katekol bir miktar saf suda çözüldükten sonra çözeltinin hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 2) 100 mM 4-metil katekol Çözeltisi: 0,62 g 4-metil katekol bir miktar saf suda çözüldükten sonra çözeltinin hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

4. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar

- 1) 0,1 M Bikarbonat tamponu (pH:10,0): 8,401 gr NaHCO_3 950 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 2) 0,2 M Bikarbonat tamponu (pH:8,8): 8,401 gr NaHCO_3 450 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH'sı 8,8'e getirildi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 3) 0,01 M Bikarbonat tamponu (pH:6,0): 1,42 gr Na_2HPO_4 950 mL saf suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH'sı 6,0'a getirildi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

5. Afinite Jelinin Dengelenmesinde ve Yıkanmasında Kullanılan Tampon Çözelti

0,05 M Fosfat tamponu (pH: 6): 7,098 g Na_2HPO_4 alınarak 950 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH'sı 6,0'a getirildi ve çözeltinin hacmi saf su ile 1L'ye tamamlandı.

6. Afinite Kolonundan PFO Enziminin Elüsyonu İçin Kullanılan Çözelti

0,1 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl (pH:7) tamponu: 7,098 g Na_2HPO_4 ve 29,25 g NaCl'e alınarak 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH'sı 7'e getirildi ve son hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

7. SDS- PAGE Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- 1) 1 M Tris-HCl tamponu (pH:8,8): 12,114 g Tris alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'sı 8,8'e ayarlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 2) 1 M Tris-HCl tamponu (pH:6,8): 12,114 g Tris alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 3) %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
- 4) %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra çözeltinin hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti kullanılacağı zaman hazırlandı ve hemen kullanıldı.
- 5) %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek elde edilir.
- 6) Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,2 g glisin tartılarak 450 mL saf suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH: 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
- 7) Numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 3 ml, %10'luk SDS'den ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi karıştırılarak son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

- 1) Tespit çözeltisi: 60 mL saf su, 30 ml %96'lık etanol, 10 mL asetik asit karıştırılmasıyla elde edildi.

- 2) Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 80 mL saf su ve 45 mL etanol karışımının pH'sı asetik asitle 6,0'a ayarlandı. 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit ilave edilerek son hacim saf suyla 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 3) Boyama çözeltisi: 100 mg AgNO_3 100 mL saf suda çözülüp üzerine 30 μL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
- 4) Yıkama çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf suda çözülüp üzerine 120 μL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
- 5) Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin, 1,25 mL asetik asit (%5'lik 250 mL asetik asit çözeltisi) saf suyla 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

8. İnhibisyon Çalışmasında Kullanılan Stok İnhibitör Çözeltileri

Enzim inhibisyonu çalışmalarında kullanılan çözeltiler Çizelge 3.1'de gösterildiği miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı. Seyreltme işlemleri saf su ile yapıldı.

Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı

İnhibitör	Miktar (g)	Stok çözelti konsantrasyonu (mM)	İnhibitörün çözündüğü ortam	Çözeltinin hacmi (ml)
Ditiyoeritritol	0,154	100	Su	10
Sodyum azit	0,130	200	Su	10
Glutatyon	0,300	100	Su	10
Askorbik asit	0,180	100	Su	10
Tiyoüre	0,152	200	Su	10

9. Protein Tayini (Bradford Yöntemi) İçin Kullanılan Çözelti

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözülerek içerisine %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Araştırmada kullanılan elmalar (*Malus sylvestris*) Erzurum ilinin Tortum ilçesindeki bahçelerden toplandı. Gerek az miktarda numuneyle çalışılması yönünden gerekse hücre parçalamadaki etkinliği nedeniyle sıvı azotla ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Ham ekstrakt hazırlamak için 10 g meyve ilk önce sıvı azot yardımıyla parçalandı. Sonra 20 mL daha önce hazırlanan homojenat tamponu içinde ultraturakstan geçirildi. Homojenat iki katlı tülbentten süzöldükten sonra süzöntü 13500 rpm, +4°C'de 30 dakika santrifüjlendi ve çökelek kısmı atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı. Ekstrakt afinite kolonuna yüklenmeden önce 100 µl gliserol ihtiva eden 5 mM fosfat tamponu (pH: 6,3) ile diyaliz edildi.

3.2.2. PFO Enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Afinite kromatografisi PFO enziminin saflaştırılmasında kullanılan yaygın metotlardan birisidir. Ayrıca bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi saflaştırılmak istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Afinite kromatografisi ile zor, yorucu ve bazen de imkânsız olan ayırma ve saflaştırma işlemleri kısa zamanda gerçekleştirilebilmekte ayrıca yüksek verimli saflaştırma yapılabilmektedir.

3.2.2.a. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibinin sentezledikleri yönteme göre sentezlenmiştir. Bu yönteme göre afinite jeli, çözünmeyen bir kolon maddesi olan Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı (Arslan vd 2004). Sepharose-4B'nin serbest -OH gruplarının modifikasyonu için genel olarak CNBr kullanıldığından bu çalışmada da, Sepharose-4B CNBr ile aktifleştirildikten sonra, matriksin uzantı kolunu oluşturmak üzere tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. *p*-aminobenzoik asit, PFO'nun spesifik bir inhibitörü olduğu için ligand olarak seçilmiştir. Bu bağlamda, uzantı kolu olan tirozine, diazolanmış *p*-aminobenzoik asitin bağlanması gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen jel, afinite kromatografisi ile elmadan PFO enziminin saflaştırılmasında kolon sabit fazı olarak kullanıldı.

3.2.2.b. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi ve L-tirozinin bağlanması

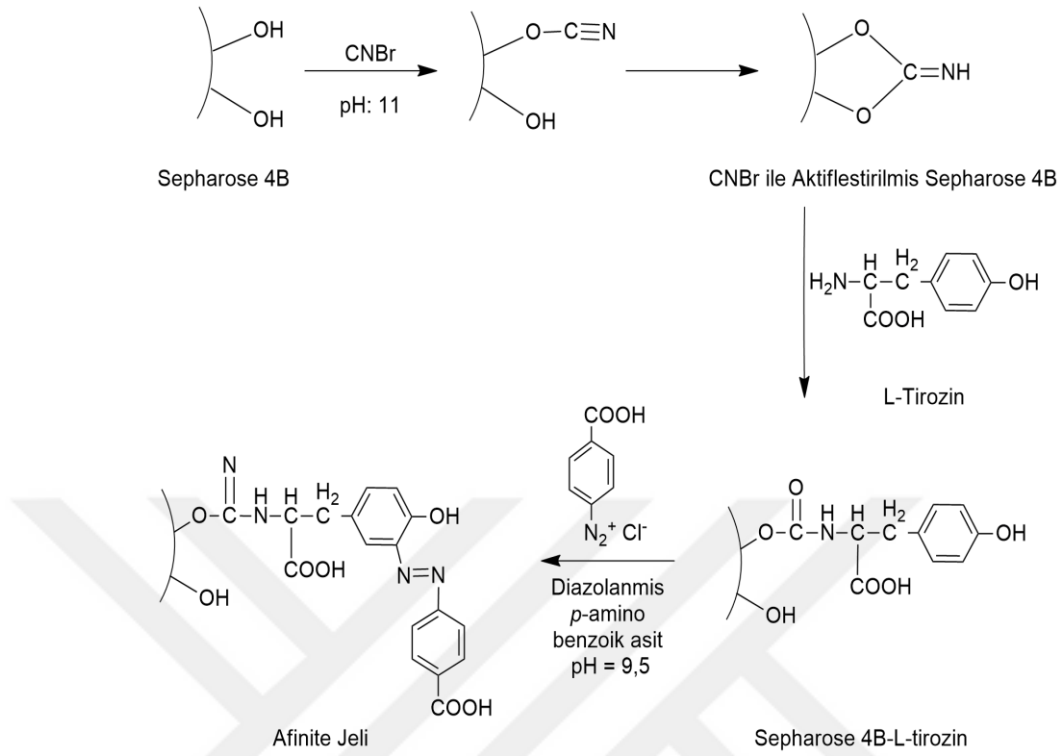
Bir beher içerisinde 10 mL Sepharose-4B saf suyla iyice yıkandı ve çökmesi için bekletildi. Üstte kalan sıvı kısım dekante edildi. Sepharose-4B süspansiyonuna eşit hacimde saf su ilave edildi. Çeker ocak içerisinde karıştırılan bu süspansiyona, 4 g CNBr katı olarak ilave edildi ve pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11.0'e çıkarıldı. CNBr tamamen reaksiyona girene kadar (yaklaşık 30 dakika) pH 11'de tutuldu ve reaksiyon tamamlandığında pH'nın 11'de sabit kaldığı görüldü. Küçük buz parçaları süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine yerleştirilen mavi banttı süzöldü. Mavi bant üzerinde kalan kısım, 250 mL 0.1 M pH'sı 10 olan soğuk bikarbonat tamponuyla yıkanarak süzöldü ve bir beher içerisine alındı. 20 mL'sinde 10 mg L-tirozin içeren 0.1 M bikarbonat tamponu (pH:10) ilavesiyle yavaşça karıştırılan bu süspansiyondan bağlanma verimliliğini belirlemek için belirli sürelerde üst kısımdan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile hacmi 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimine bakıldı. Bir süre sonra absorbansta önemli bir farklılık gözlemlenmediği görülmüştür. Böylece L-tirozinin, CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B matriksine bağlanmış olduğu tespit edildi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyon bir buchner hunisine yerleştirilen

mavi bant üzerine alınarak, süzüntü kısmı 280 nm’de absorbans değeri 0 olana kadar bol saf su ile yıkandı. Böylelikle reaksiyona girmeyen L-tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Mavi bant üzerinde kalan katı kısım, 100 mL 0.2 M bikarbonat tamponuyla yıkanarak aynı tamponun 40 mL’si içine alındı. Böylece sentezlenen sepharose-4B-L-tirozin ligandın bağlanması için hazır hale getirilmiş oldu (Arslan vd 2004).

3.2.2.c. L-Tirozinle modifiye edilen sepharose-4B’ye p-aminobenzoik asitin bağlanması

Buz banyosunda 5 mL saf su içerisinde çözölen 75 mg NaNO₂, 10 mL 1 M soğuk HCl içerisinde çözölen 25 mg *p*-aminobenzoik asit çözöltisi üzerine damla damla ilave edildi. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen reaksiyon sonunda, diazolanmış halde bulunan *p*-aminobenzoik asit, 40 mL sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 4 M NaOH ilavesiyle birlikte pH: 9,5’e çıkarılarak sabit tutuldu ve yaklaşık 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, önce 1 L saf su ile ve ardından 0,01 M 200 mL pH’sı 6,0 olan fosfat tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan vd 2004).

Sepharose-4B’nin CNBr ile aktifleştirilmesi, L-tirozin ile modifiye edilmesi ve *p*-aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyonlar Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi, L-tirozin ile modifiye edilmesi ve p- aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyon

3.2.2.d. Ekstrakt çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzim elüsyonu

Arslan ve çalışma ekibinin sentezledikleri yöntemle hazırlanan afinite jeli 1×10 cm ebatında afinite kolonuna paketlenmiştir. $0,05$ M fosfat tamponu (pH: 6.0) ile kolonun dengelenmesi sağlanmıştır. Diyaliz edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine $0,05$ M fosfat tamponu (pH: 6.0) ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Yıkama tamponunda 2 şer mL toplanan tüplerde 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra $0,05$ M pH: 7.0 olan Na_2HPO_4 / 1 M NaCl tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve elüatlar 3 'er mL halinde tüplerde toplandı. Elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein ve 420 nm'de aktivite tayini yapıldı.

3.2.3. Protein tayini

3.2.3.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu.

3.2.3.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bradford yönteminde boya olarak negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır. Kullanılan boya çözeltisi fosforik asitle hazırlanır ve asidik ortamda pozitif yüklenen protein ile negatif yüklü boya kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin renk şiddeti 595 nm'de ölçülür. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 µg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir, hızlı cereyan eder ve iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanarak ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe 100'er µL alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9'ar mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem sonunda 3 ayrı

ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.4. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

PFO enzimi saflaştırıldıktan sonra sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Elektroforez plakaları önce saf su sonra alkolle iyice yıkandı. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama aparatına konuldu. Öncelikle ayırma jeli hazırlandı ve plakaların arasına üst kısımda 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Jelin donması beklendi ve bu esnada yığma jeli hazırlandı. Yığma jeli de boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika sıcak su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra gerilim 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Jel sabitleştirme çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra redüksiyon çözeltisine alındı. Bunun için çalkalayıcı üzerinde ve 30 dakika boyunca bu çözeltide bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Jel daha sonra boyama işlemi yapılmak üzere gümüş nitrat çözeltisi içerisine konuldu. 20 dakika süren bu işlem sonrasında jel çıkarılarak yıkama 1 ve yıkama 2 çözeltilerine konuldu. Protein bantlarının belirginleşmesine kadar çalkalayıcıda yıkanan jel alınarak fotoğraf çekimi yapıldı (Şekil 4.3).

3.2.5. PFO Enziminin aktivite tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,10 μL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2,990 mL tampon + substrat (0,1 M katekol veya 0,1 M 4-metil katekol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm’de köre karşı üç 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.

Çizelge 3.2. PFO enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
Stok Aktivite Çözeltisi	Hacim	Konsantrasyon	Hacim	Konsantrasyon
Fosfat Tamponu	2400 μL	0,05 M	2370 μL	0,05 M
katekol / 4-metil katekol	600 μL	0,1 M	600 μL	0,1 M
Enzim Numunesi	-----	-----	30 μL	-----

3.2.6. PFO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar

PFO enziminin kinetik özelliklerini incelemek için iki farklı substrat için, optimum pH ve sıcaklık belirlendi. Kullanılan her bir substrat için K_M ve $V_{\max}$ değerleri tayin edildi. Ayrıca farklı inhibitörler için, optimum şartlarda, IC_{50} ve K_i değerleri bulundu.

3.2.6.a. PFO enzimi aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

PFO enzimi aktivitesinin maksimum olduğu optimum pH'yı belirlemek için 0,05 M'lık pH'sı 5,0 ve 5,5 olan asetat tamponu, pH'sı 6,0, 6,5, 7,0 olan 0,05 M olan fosfat tamponu ve pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 olan 0,05 M Tris-HCl tamponu hazırlandı. 100 mM katekol ve 100 mM 4-metil katekol kullanılarak reaksiyon hızları belirlendi. PFO aktiviteleri hesaplanarak PFO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerleri tespit edildi (Çizelge 4.2; Şekil 4.4).

3.2.6.b. PFO aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi

PFO enzimi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek için 100 mM katekol ve 100 mM 4-metil katekol substratları kullanıldı. Katekol substratı için 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,8 M, 1 M asetat tamponlarıyla (pH: 5,5) 4-metil katekol substratı için 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,8 M, 1 M asetat tamponlarıyla (pH: 5) çalışıldı. PFO aktiviteleri hesaplanarak PFO enziminin maksimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet değeri tespit edildi (Çizelge 4.3; Şekil 4.5).

3.2.6.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

PFO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla iki farklı substrat kullanıldı. 100 mM katekol substratı için asetat tamponu (pH:5,5) ve 100 mM 4-metil katekol substratı için asetat tamponu (pH:5) kullanılarak 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C'deki reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak aktiviteler hesaplandı ve optimum sıcaklık değerleri tespit edildi (Çizelge 4.4; Şekil 4.6).

3.2.6.d. Stabil pH'nın belirlenmesi

PFO enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için 0,05 M'lık pH'sı 5,0 ve 5,5 olan asetat tamponu, pH'sı 6,0, 6,5, 7,0 olan 0,05 M olan fosfat tamponu ve pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 olan 0,05 M Tris-HCl tamponu hazırlandı. Hazırlanan bu tampon çözeltilerden 500 μ L alınarak üzerine 500 μ L enzim çözeltisi ilave edilerek ependorf tüplerine konuldu. İlk okuma yapıldıktan sonra +4°C'de korunarak her 12 saatte bir yapıldı. Aktivite ölçümlerinde optimum pH ve iyonik şiddete sahip tamponlar kullanıldı. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi. (Çizelge 4.5; Şekil 4.7).

3.2.6.e. Katekol ve 4-metil katekol için optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi için optimum şartlarda 100 mM katekol ve 100 mM 4- metil katekol substratlarının 9 farklı konsantrasyonda (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM ve 20 mM) enzim aktiviteleri ölçüldü. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. Her bir substrat için $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulundu ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafik denklemlerinden yararlanılarak hesaplandı (Çizelge 4.6).

3.2.6.f. Farklı inhibitörler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

Farklı inhibitörlerin [L-askorbik asit ($C_6H_8O_6$), Ditiyoeritritol ($C_4H_{10}O_2S_2$), Tiyoüre (CH_4N_2S), Glutasyon (γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), Sodyum Azit (NaN_3)] IC_{50} değerlerini belirlemek için, optimum şartlarda katekol substratının 100 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi belirlendi. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteleri hesaplandı ve grafikleri çizildi. Grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7).

3.2.6.g. İnhibitörler için K_i değerlerinin belirlenmesi

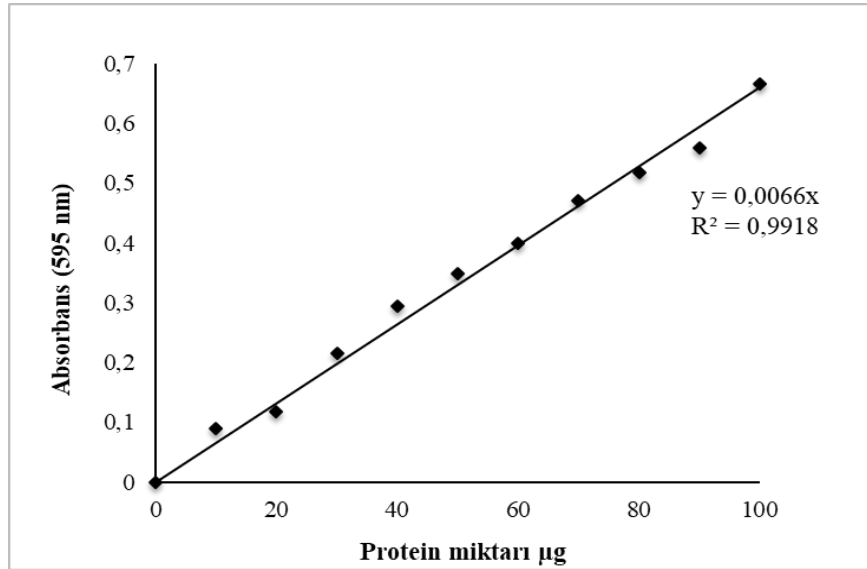
Farklı inhibitörlerin [L-askorbik asit ($C_6H_8O_6$), Ditiyoeritritol ($C_4H_{10}O_2S_2$), Tiyoüre (CH_4N_2S), Glutasyon (γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), Sodyum Azit (NaN_3)] K_i değerlerinin belirlemek için önce inhibitörsüz ortamda ve optimum şartlarda beş farklı substrat konsantrasyonu kullanarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda ve optimum şartlarda aktiviteler 100 mM katekol substratı kullanılarak tespit edildi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri tespit edildi. K_i değerleri yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1 + [I]/K_i)$ formülünden, yarı yarışmalı inhibisyon için eğrinin $1/V$ eksenini kestiği noktayı veren $1/V_{max}(1 + [I]/K_i)$ formülünden yarışmasız inhibisyon için Lineweaver- Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanarak hesaplandı (Çizelge 4.8).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada esmerleşme reaksiyonlarında rol oynayan PFO enziminin Erzurum ili Tortum elmasından (*Malus sylvestris.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışıldı. Enzim afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzimin stabil pH, optimum pH, iyonik şiddet, optimum sıcaklık, iki farklı substrat için K_M ve V_{max} değerleri ve çeşitli inhibitörler için IC_{50} ve K_i değerleri tespit edildi.

4.1. Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırma işlemleri sırasında bütün basamaklar için kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik çizildi. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).

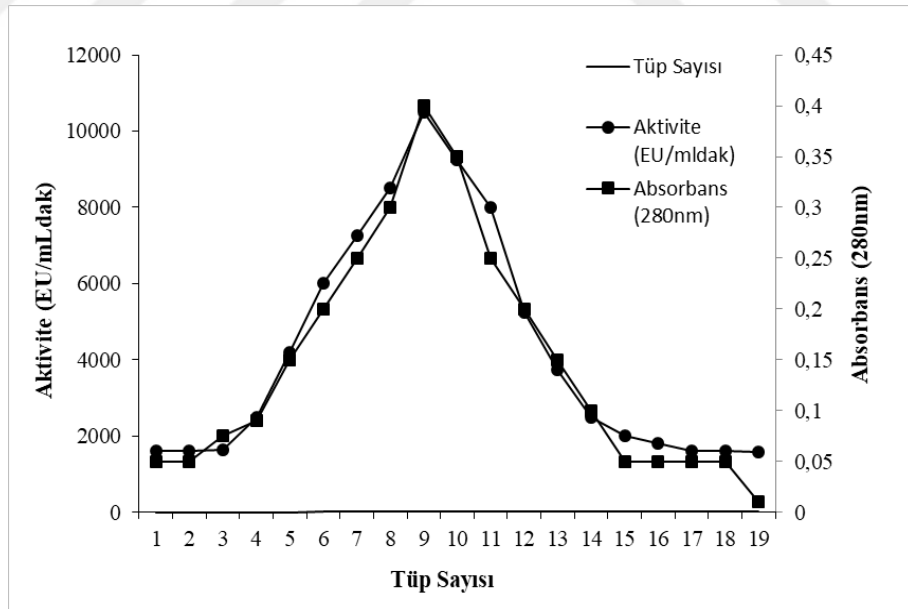


Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için (Bradford metodu) kullanılan standart grafik

4.2. Tortum Elmasından PFO Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar

Bölüm 3.2.2.a'da belirtildiği şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 0,05 M Fosfat tamponu (pH: 6) ile dengelendi. Diyaliz işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Enzim numunesi kolondan geçirildikten sonra kolon yine aynı tampon çözelti ile yıkandı. Yıkama çözeltileri 2'şer mL halinde tüplere toplandı ve yıkama işlemine 280 nm'deki absorbans değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyon 0,05 M Na_2HPO_4 / 1 M NaCl tamponu (pH: 7) ile yapıldı. Elüatlar 2'şer mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen aktivite ve absorbans değerleri tüp numarasına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Elüe edilen PFO enziminin tüp sayısına göre absorbans-aktivite grafiği

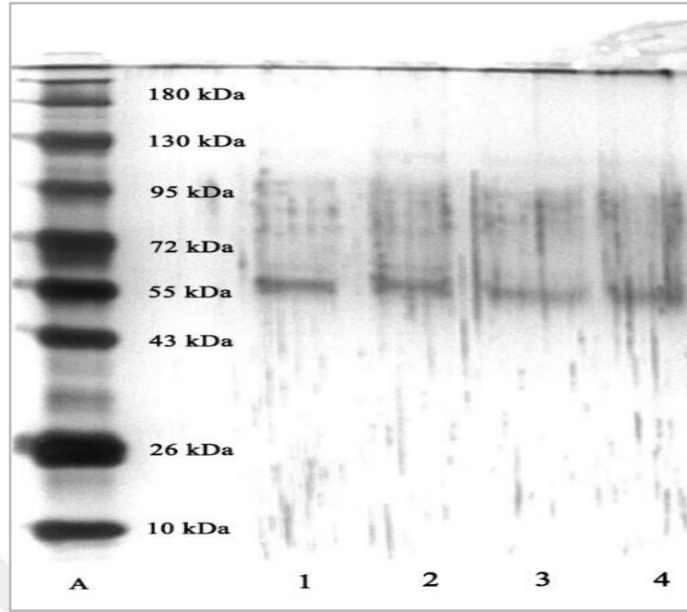
Homojenat ve afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi bazı değerler aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tortum elması PFO enzimi için saflaştırma tablosu

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Aktivite (EÜ)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg prot.)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	20	9400	188000	0,3664	7328	25655	100	1,00
Afinite Kromatografisi	8	3266	26128	0,0046	37	706926	13,89	27,55

4.3. SDS-PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü

Tortum elmasından PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra elde edilen elüatlardaki PFO enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4’te izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı (A: Standart proteinleri 1, 2, 3, 4 ise saflaştırılan PFO enzimi numunelerini ifade etmektedir.)

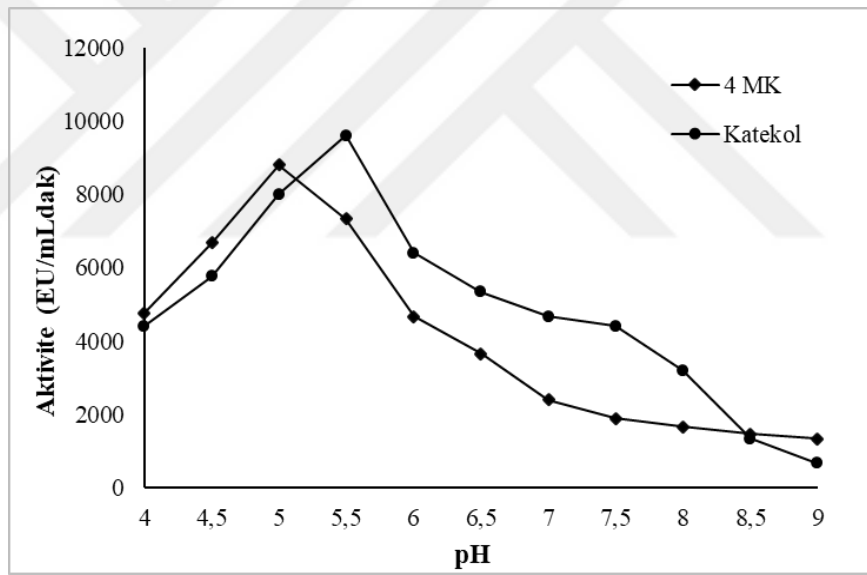
4.4. PFO Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

4.4.1. Optimum pH değerlerinin belirlenmesine ait bulgular

PFO enzimi aktivitesinin maksimum olduğu optimum pH'yı belirlemek için bölüm 3.2.6.a.'da anlatıldığı gibi değişen pH'larda tampon çözeltiler ve 100 mM katekol ve 100 mM 4-metil katekol kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Fenolik özelliğe sahip olan substratların, ortamın pH'sına bağlı olarak enzimin aktif bölgesine karşı davranışı ve enzim-substrat etkileşimi farklılık göstermiştir. İki farklı substrat için değişen pH'ya karşı aktivite değerleri Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. PFO enzimi katekol substratıyla en yüksek aktiviteyi pH 5,5'te gösterirken, 4-metil katekol substratıyla pH 5.0'te gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. İki farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen aktivite değerleri (Aktivite değerleri birim EÜ/mLdak'dır.)

pH \ Substrat	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
katekol	4764	6672	8800	7332	4664	3664	2400	1900	833	1664	1464
4-metil katekol	4400	5764	8000	9600	6400	5332	4664	4400	1300	3200	3200



Şekil 4.4. Katekol ve 4-metil katekol substratları varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

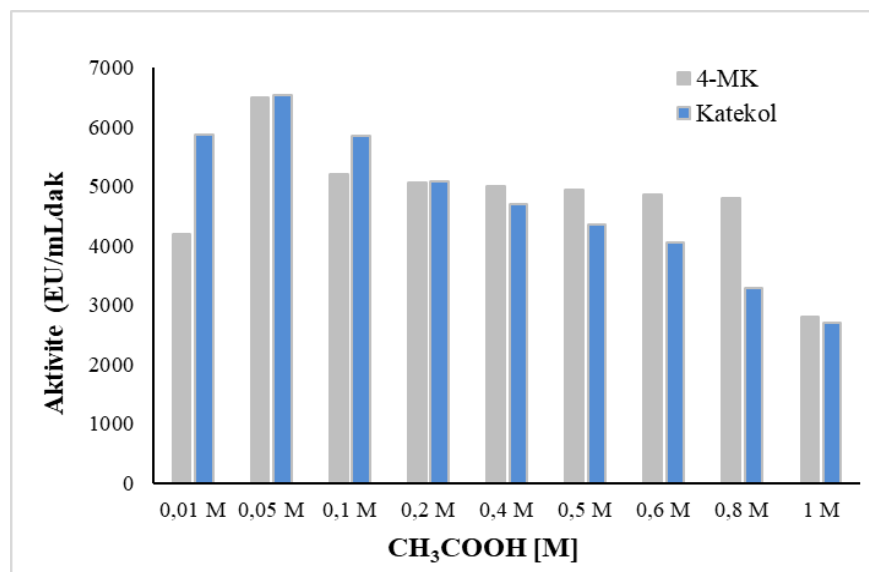
4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait bulgular

PFO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.6.b'de belirtildiği gibi 4-metil katekol için pH: 5'te; katekol için pH: 5,5'te asetat tamponlarıyla değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı ve enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her bir substrat için en

yüksek aktivitenin 0,05 M asetat tamponunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3), Şekil 4.5).

Çizelge 4.3. PFO enziminin iki farklı substratı için farklı konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerleri

Asetat Tamponu Konsantrasyonu (M)	Katekol	4-metil katekol
	Aktivite (EÜ/mLdak)	Aktivite (EÜ/mLdak)
0,01	5877	4200
0,05	6533	6500
0,1	5855	5200
0,2	5088	5066
0,4	4710	5000
0,5	4366	4933
0,6	4055	4866
0,8	3288	4800
1	2700	2799



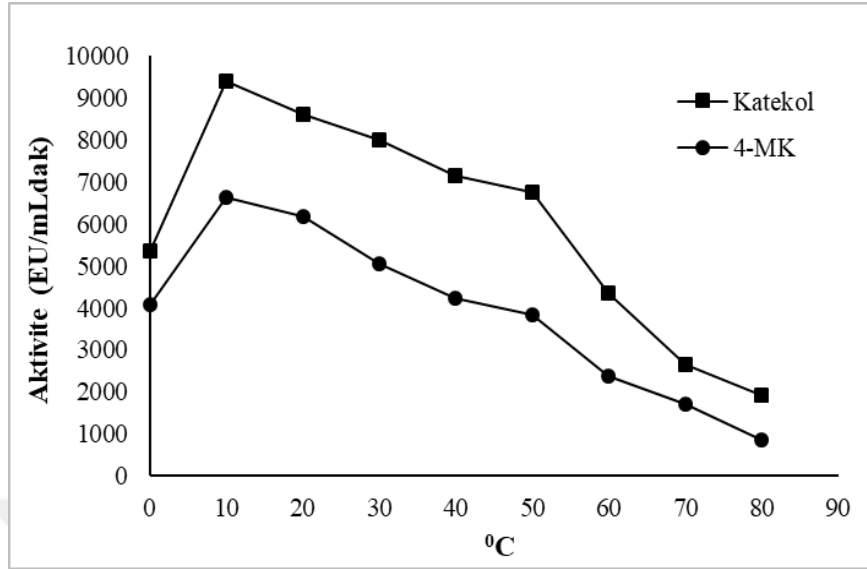
Şekil 4.5. PFO enziminin iki farklı substratı için (katekol ve 4-metil katekol) aktivite-derişim grafiğı

4.4.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

PFO enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için bölüm 3.2.6.c’de belirtildiği gibi 0- 80°C aralığında PFO aktivitesi ölçüldü. Maksimum aktivitenin ölçüldüğü optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Katekol ve 4-metil katekol için maksimum aktivite 10°C civarında iken; 40°C ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesinin giderek azaldığı 70°C’de ise enzim aktivitesini büyük oranda kaybettiği belirlendi (Çizelge 4.4), (Şekil 4.6).

Çizelge 4.4. PFO enzimi aktivitesinin optimum olduğu sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Katekol	4-metil katekol
	Aktivite (EÜ/mL)	Aktivite (EÜ/mL)
0	5352	4080
10	9400	6622
20	8620	6165
30	8000	5040
40	7152	4245
50	6752	3832
60	4352	2364
70	2664	1698
80	1908	864



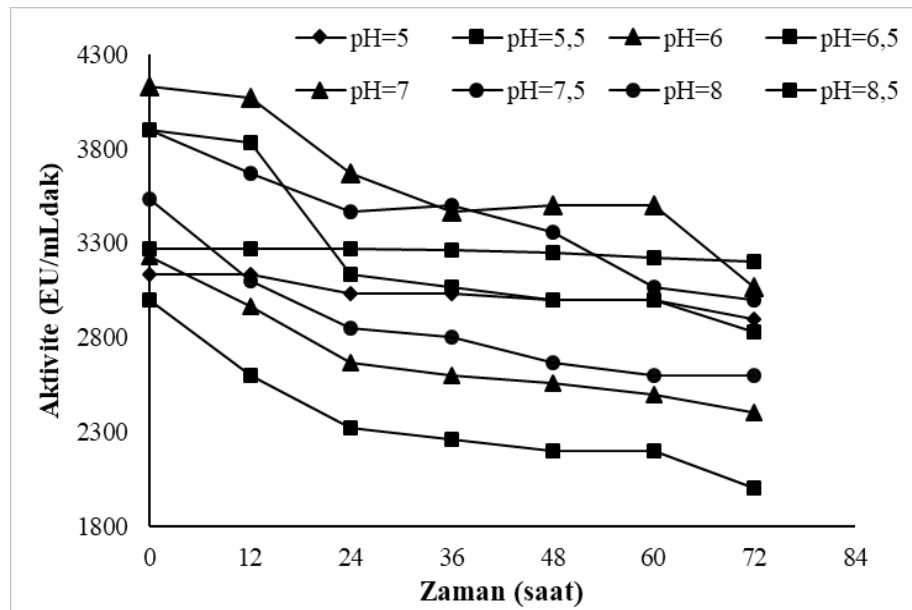
Şekil 4.6. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi için aktivite-sıcaklık grafiği

4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesine ait bulgular

PFO enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için 0,05 M'lik değişik pH değerlerinde tampon çözeltileri bölüm 3.2.6.d'de belirtildiği gibi hazırlandı. 1/1 oranında saf enzim ile tampon karıştırılarak muhafaza edilen PFO enzimi için 12 saatte bir aktivite ölçümü yapıldı. PFO enziminin stabil pH değerin pH: 5,5 asetat tamponunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5), (Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesine ait aktivite ölçüm sonuçları

Tampon Çözeltiler (0,05M)	Zaman (saat)	0	12	24	36	48	60	72
	pH	Aktivite (EÜ/mLdak)						
Asetat Tamponu	5,0	3133	3133	3033	3033	3000	3000	2900
	5,5	3266	3266	3266	3260	3250	3225	3200
Fosfat Tamponu	6,0	4132	4066	3666	3466	3500	3500	3066
	6,5	3900	3832	3132	3066	3000	3000	2832
	7,0	3232	2966	2666	2600	2560	2500	2400
Tris-HCl Tamponu	7,5	3900	3666	3464	3500	3360	3066	3000
	8,0	3532	3100	2850	2800	2666	2600	2600
	8,5	3000	2600	2320	2260	2200	2200	2000

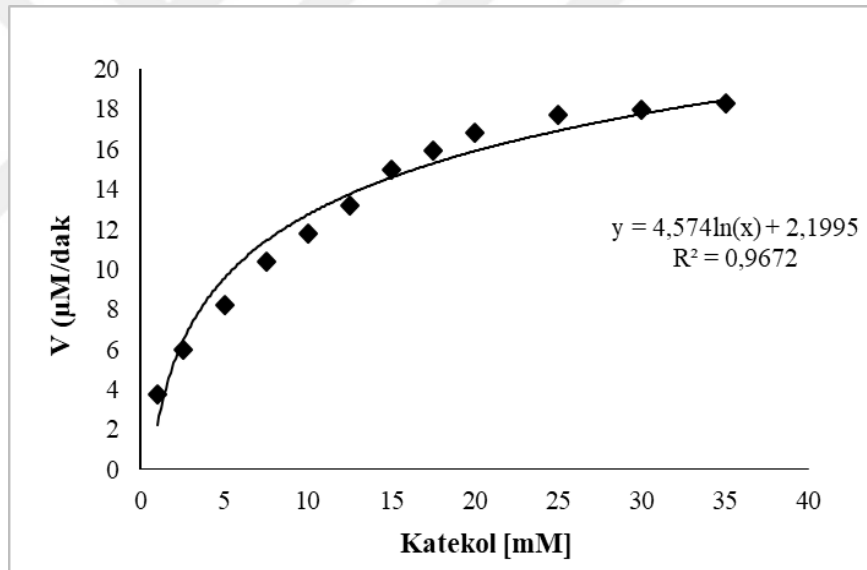


Şekil 4.7. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enziminin stabil pH belirlemek için yapılan aktivite-zaman grafiği

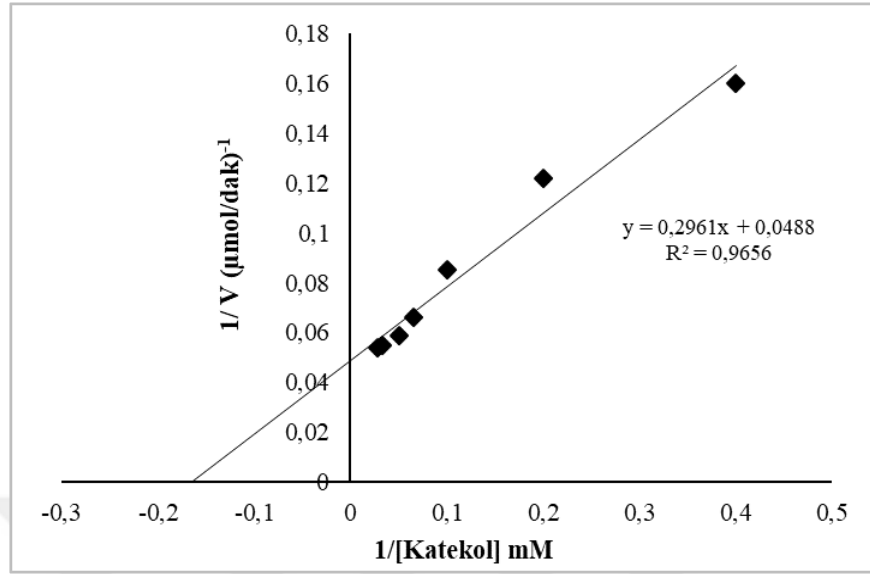
4.5. PFO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Ait Bulgular

K_M ve V_{max} değerlerinin tespiti için bölüm 3.2.6.e’de belirtildiği gibi optimum şartlarda katekol ve 4- metil katekol substratlarının değişen konsantrasyonlarıyla enzim aktivitesi ölçüldü. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı U ($\mu\text{M}/\text{dak}$) olarak hesaplandı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi K_M ve V_{max} değerleri grafik denklemleri yardımıyla bulundu (Çizelge 4.6); (Şekil 4.8-4.11).

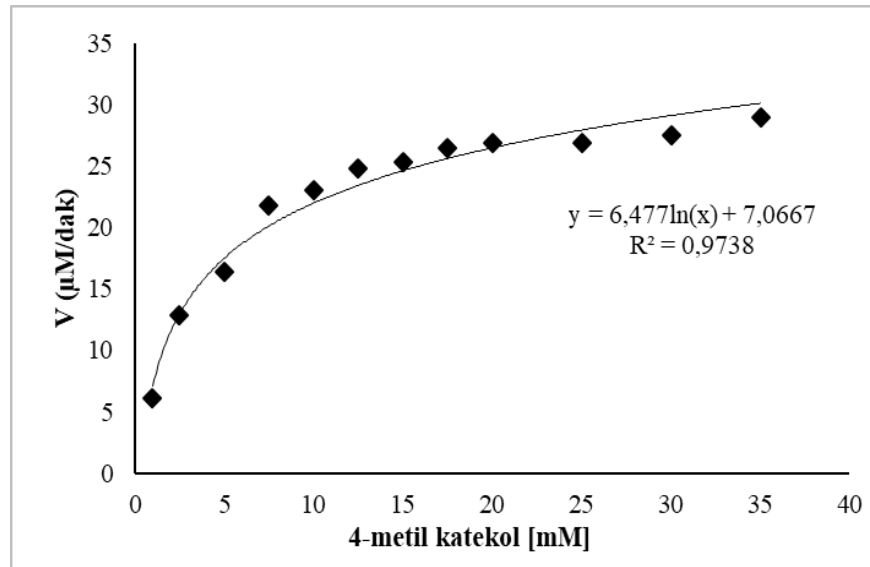


Şekil 4.8. Katekol substratı varlığında PFO’nun V-[S] grafiği

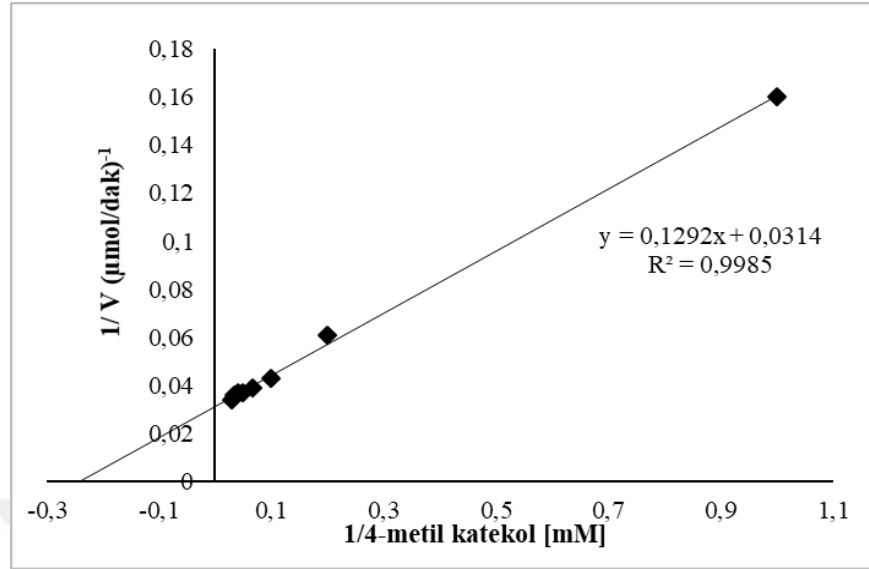


Şekil 4.9. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği

Katekol substratı varlığında PFO enziminin çizilen Lineaweaver-Burk grafiği ile elde edilen doğrunun denkleminde yararlanılarak hesaplanan $V_{\max}$ ve K_M değerleri sırasıyla 20,83 $\mu\text{mol/L}$ dak ve 6,17 mM olarak belirlendi (Çizelge 4.6).



Şekil 4.10. 4-metil katekol substratı varlığında PFO'nun V-[S] grafiği



Şekil 4.11. 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği

4-metil katekol substratı varlığında PFO enziminin çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile elde edilen doğrunun denkleminde yararlanılarak hesaplanan $V_{\max}$ ve K_M değerleri sırasıyla 32,26 $\mu\text{mol/L dak}$ ve 4,16 mM olarak belirlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. PFO difenolaz aktivitesiyle ilgili enzim kinetiği değerleri

Substrat	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/L.dak}$)	K_M (mM)	$V_{\max} / K_M$ (dak^{-1})
4-metil katekol	32,26	4,16	7,75
katekol	20,83	6,17	3,38

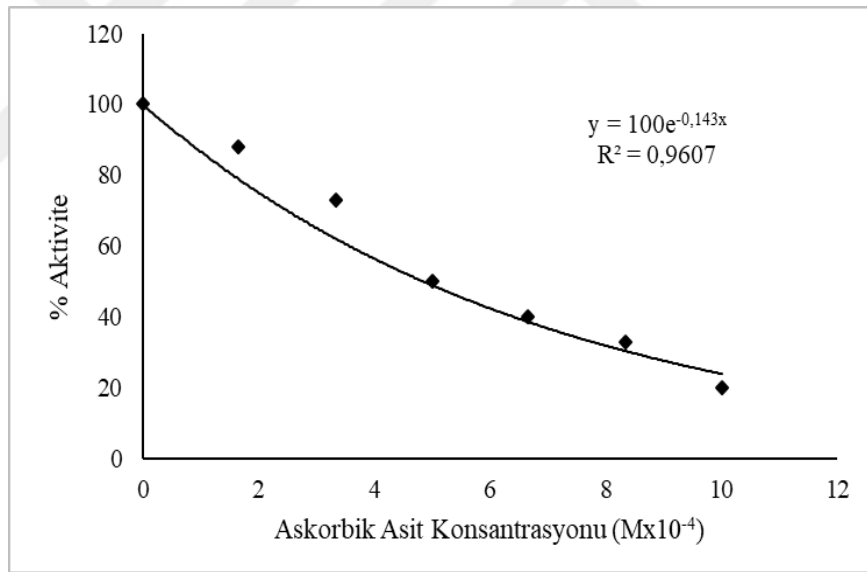
4.6. PFO'nun İnhibisyon Kinetiği Verileri

Çeşitli kaynaklardan izole edilen PFO'ların en önemli özelliklerinden birisi de çeşitli inhibitörlere karşı gösterdiği davranışlardır. Bu amaçla askorbik asit, sodyum azid, tiyoüre, GSH ve DTT'nin enzim aktivitesine karşı gösterdikleri inhibisyonları incelendi. İnhibisyon denemelerinden elde edilen sonuçlar elmadaki PFO aktivitesinin diğer

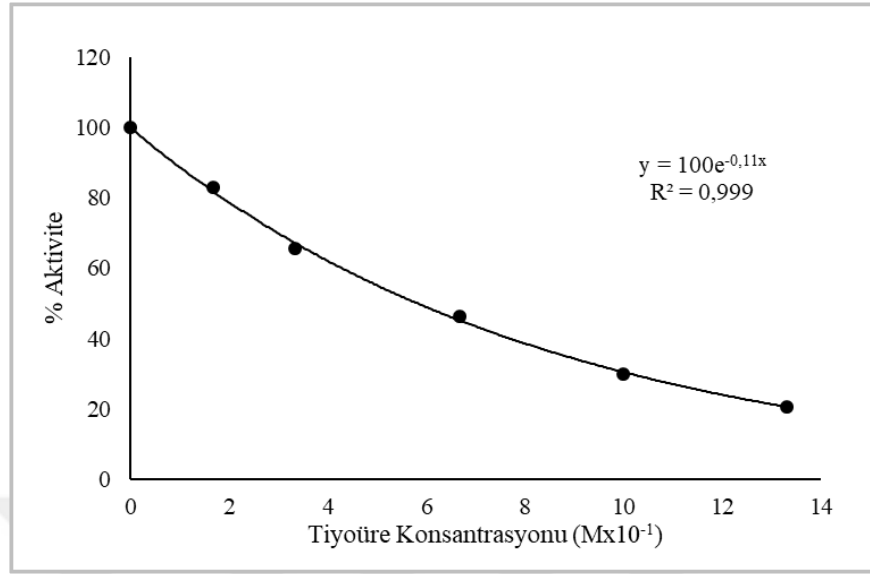
PFO'dan elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu ve denenen inhibitörlere oldukça duyarlı olduğu belirlendi.

4.6.1. PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bileşikler için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait bulgular

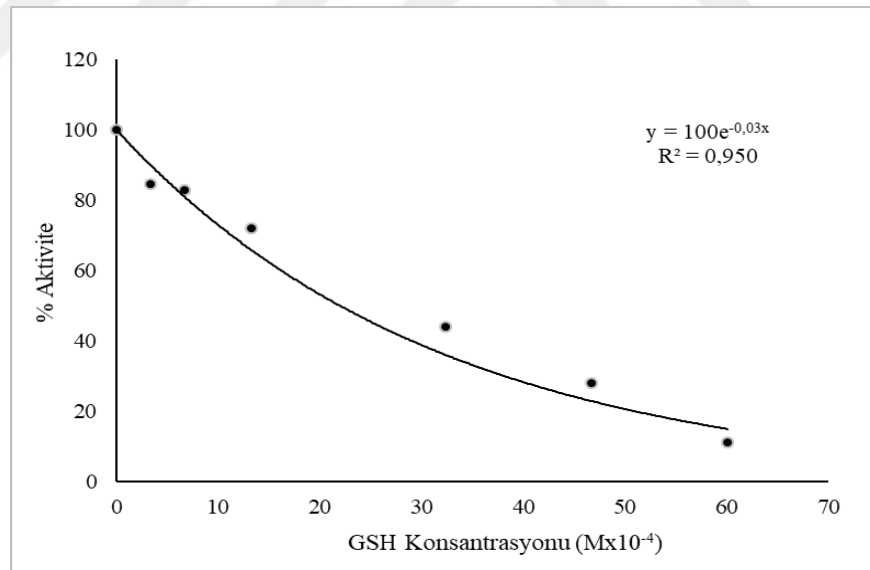
Tortum elmasından afinite kromatografisiyle saflaştırılan PFO enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden askorbik asit, sodyum azit, tiyoüre, GSH ve DTT bileşikleri ile sabit substrat konsantrasyonunda (100 mM) beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC₅₀ değeri bölüm 3.2.6.f'de belirtildiği gibi belirlendi (Şekil 4.12- 4.16).



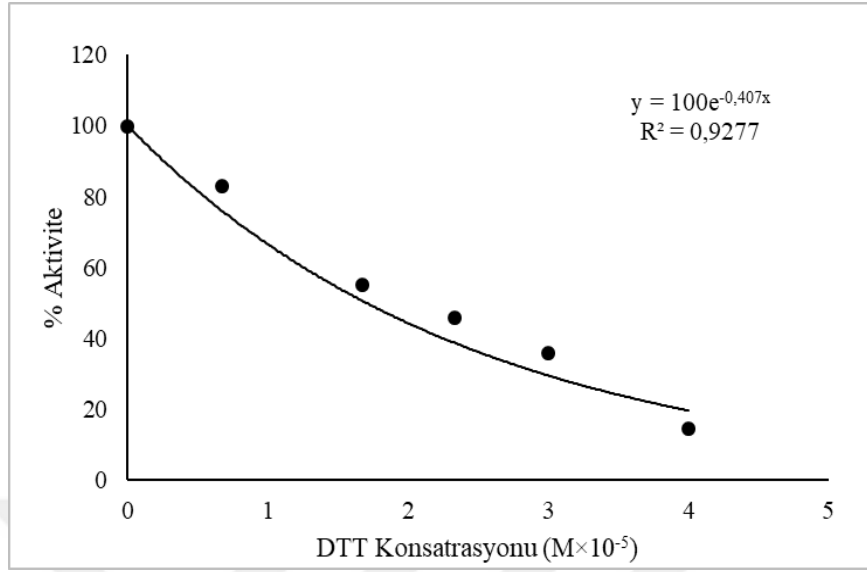
Şekil 4.12. PFO enziminin aktivitesi üzerinde askorbik asitin farklı inhibitör konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite - [Askorbik Asit] grafiği



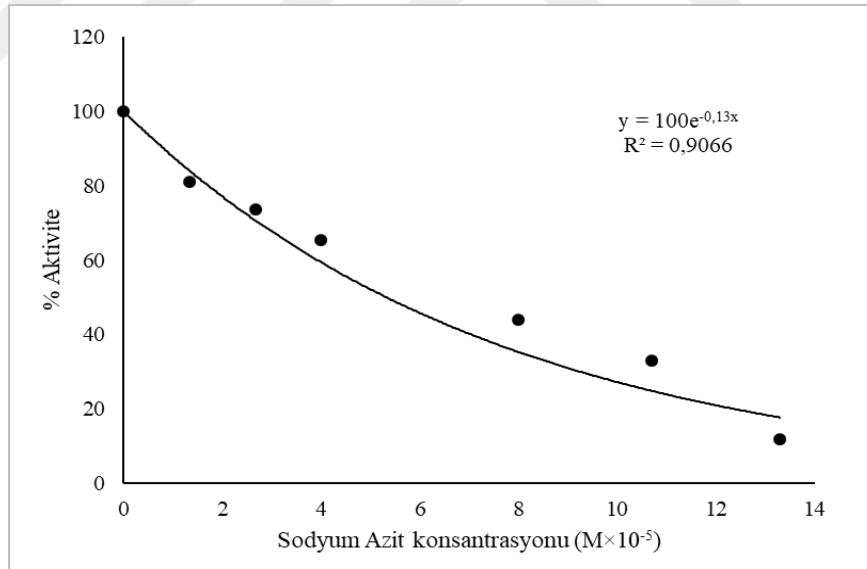
Şekil 4.13. PFO enzimi aktivitesi üzerine tiyoüre'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Tiyoüre] grafiği



Şekil 4.14. PFO enzimi aktivitesi üzerine GSH'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[GSH] grafiği



Şekil 4.15. PFO enzimi aktivitesi üzerine DTT'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[DTT] grafiği



Şekil 4.16. PFO enzimi aktivitesine sodyum azitin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sodyum azit] grafiği

Çizelge 4.7. PFO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC₅₀ değerleri

İnhibitör	IC₅₀ (mM)
Tiyo üre	0,632
Askorbik asit	0,494
Sodyum azit	0,052
GSH	0,023
DTT	0,017

4.6.2. PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin K_i sabitlerinin belirlenmesine ait bulgular

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi.

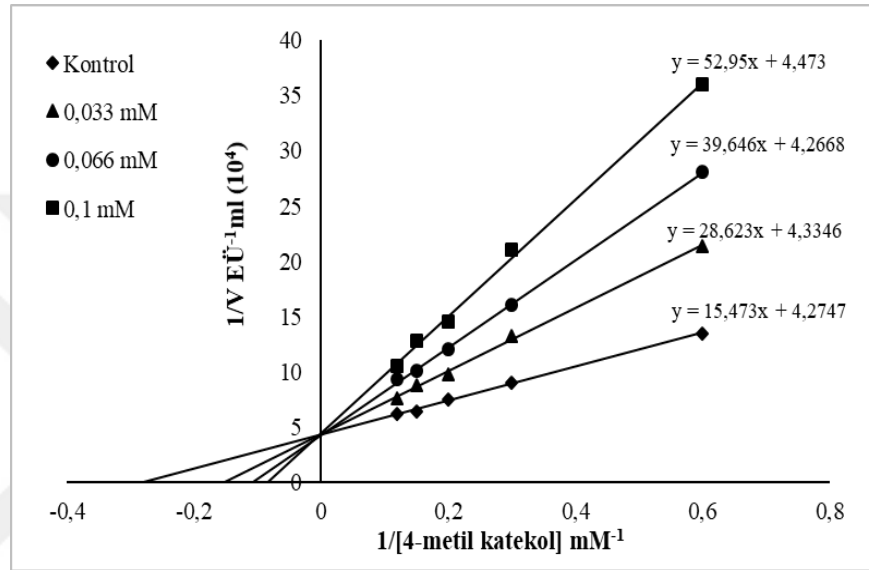
Tortum elması meyvesinden saflaştırılan PFO enzimi için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen çözelti konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra saflaştırılan PFO enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipleri tayin edilerek Şekil 4.17-4.21 aralığında belirtilmiştir (Lineweaver and Burk 1934). PFO enzimi için inhibitör olarak kullanılan tüm maddeler için inhibisyon tipleri (yarışmalı inhibitör, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Yarışmasız ve Yarı Yarışmalı için

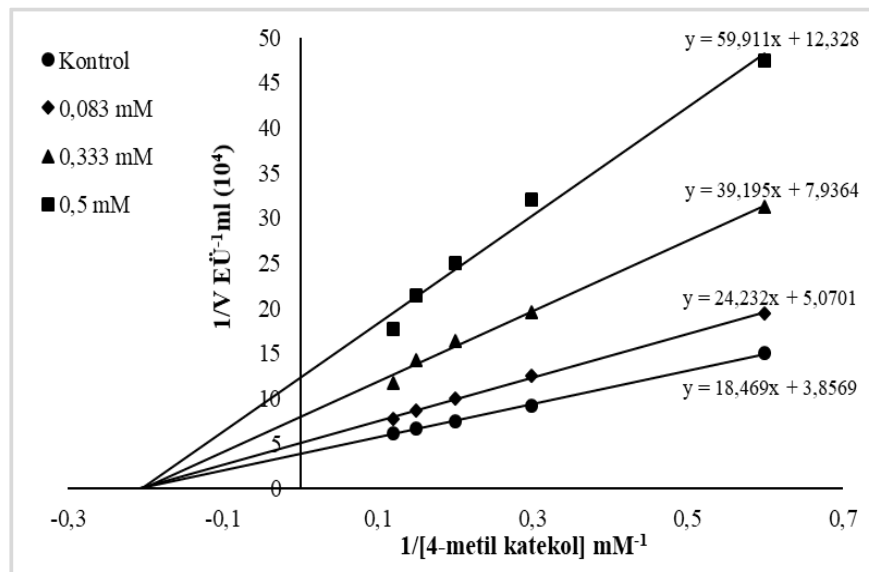
Yarışmalı için:

$$V_{max}^I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

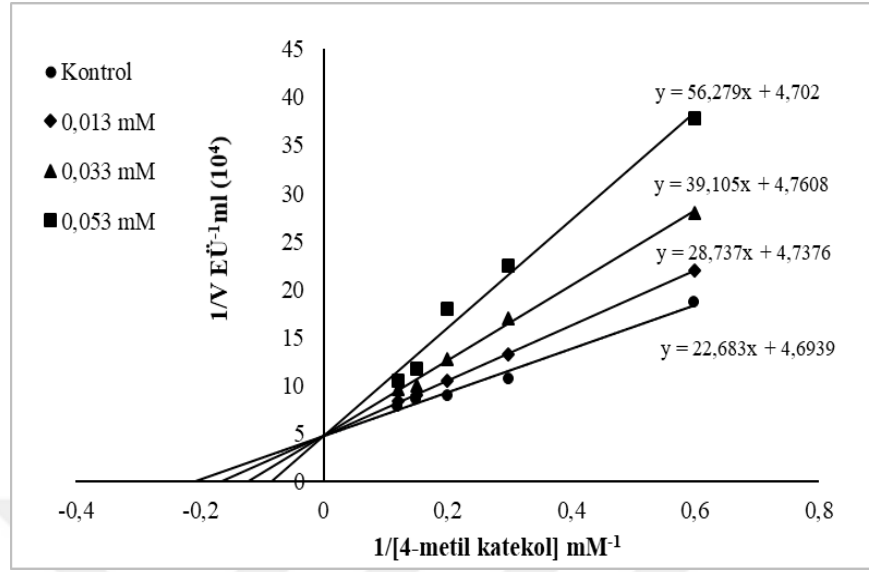
$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$



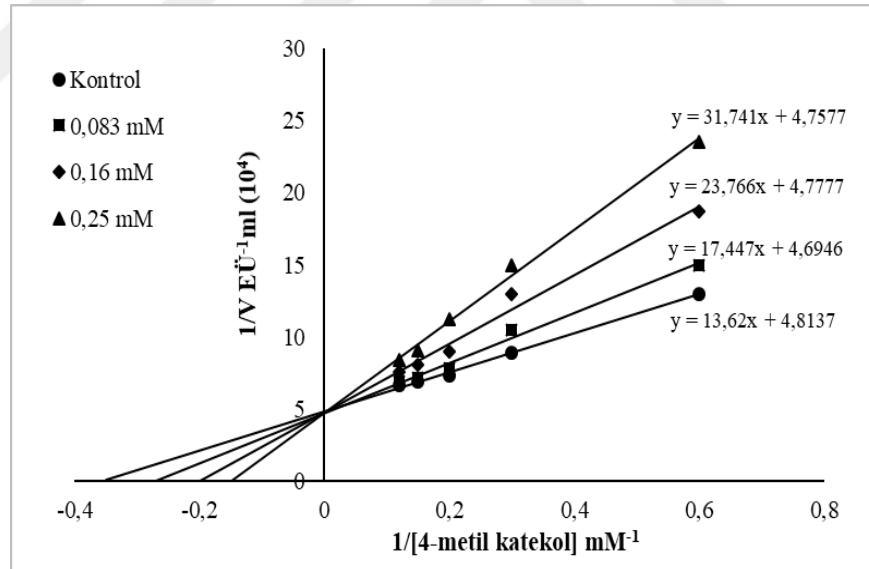
Şekil 4.17. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine L-askorbik asitin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



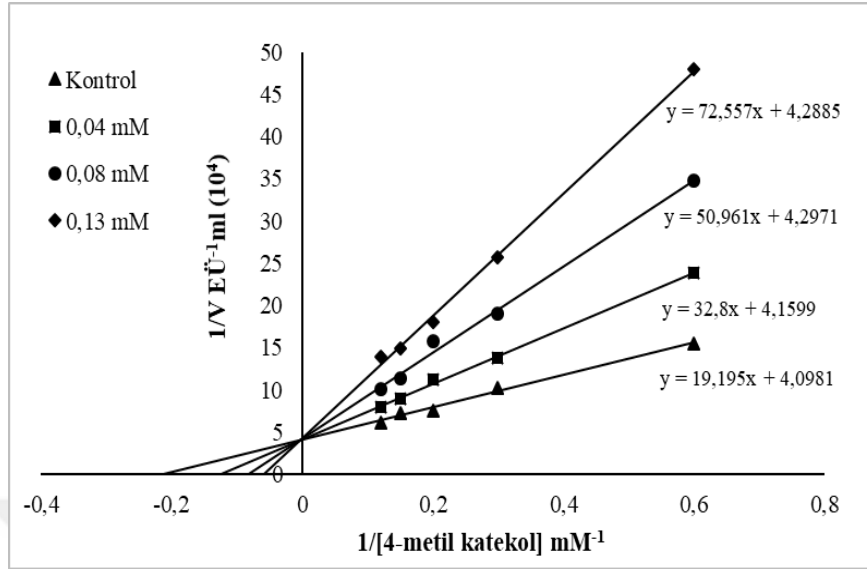
Şekil 4.18. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine tiyöürenin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine GSH'nin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.20. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine DTT'nin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.21. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azitin etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal bileşiklerin K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
Tiyoüre	0,268±0,044	Yarışmasız
Askorbik asit	0,042±0,002	Yarışmalı
Sodyum azit	0,054±0,005	Yarışmalı
GSH	0,045±0,008	Yarışmalı
DDT	0,221±0,041	Yarışmalı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meyve ve sebzelerde toplanma, depolanma ve fiziksel işlemler sonucunda meydana gelen kararma reaksiyonlarından sorumlu olan PFO enzimi, 30 yıla aşkın zamandır birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır (Seo *at al.* 2003). Meyve suyu üretim sektöründe özellikle elma gibi meyvelerde, üretim aşamalarında uygulanan fiziksel işlemler sonucunda meydana gelen kararma reaksiyonları, meyve suyunun rengini, kokusunu etkilemekte ve besinsel değerini azaltmaktadır. Bu tür reaksiyonların kontrol edilebilmesi ancak PFO enziminin meyve suyu ekstraktlarındaki davranışlarının belirlenmesiyle mümkün olabilecektir.

Yapılan bu çalışmada Tortum elmasından hazırlanan homojenattan PFO enzimi Sepharose 4B-L tirozin- *p* amino benzoik asit afinite kolonu kullanılarak tek basamakta saflaştırıldı ve enzimin varlığı elektroforetik olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin kinetik ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada Arslan vd (2004) jel sentezleme yöntemi kullanılarak, Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli sentezlenmiştir. Tampon ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edilen homojenat sentezlenen afinite kolonuna tatbik edildi ve bu sayede Tortum elmasından PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirildi. Homojenattaki enzimin spesifik aktivitesi 25655 EÜ/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 706926 EÜ/mg protein olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, enzim 27,55 kat, %13,89 verimle saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Daha önce aynı afinite jeli sentezlenerek yapılan afinite kromatografisi ile PFO enziminin *Lactarius piperatus* türü mantardan 13,9 kat (Öz 2010), *Agaricus bisporus* türü mantardan 1,93 kat, %39 verimle (Dedeoğlu 2009), dut meyvesinden 74 kat (Arslan vd 2004), *Boletus erythropus* türü mantardan ise 28,5 kat (Özel vd 2010) saflaştırılmıştır.

Afinite kromatografisinden farklı olarak iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi de PFO enziminin çeşitli kaynaklardan saflaştırılmasında kullanılan çok yaygın tekniklerdendir. Taze fasulyenin yeşil kabuğundan iki PFO izoenzimi, Sephadex G-100 kolonu ile 17 kat ve 9,4 kat (Guo *et al.* 2009), aynı fasulyenin tanelerinden yine iki PFO izoenzimi, DEAE-selüloz kolonu ile 6,6 kat ve 3,8 kat (Guo *et al.* 2009), çay bitkisinden DEAE-selüloz kolonu ile 3,32 kat, %5,11 verimle (Yabancı 2008), çadır bitkisinin yaprak ve gövdesinden iyon değişim kromatografisi ile 2.7 kat ve 2,2 kat, %148 ve %129 verimle saflaştırılmıştır (Erat 1998).

Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma işleminden sonra, elde edilen enzim numunesi elektroforetik olarak analiz edilmiştir. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi PFO enziminin saflığını kontrol etmek için yapılmış ve tek bant elde edilmiştir. Elde edilen bantlar yaklaşık 60 kDa'ya tekabül etmektedir (Şekil 4.3).

Polifenol oksidaz enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sı katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak belirlenmiştir. Optimum pH değerleri katekol substratı ile pH 5,0 iken 4-metil katekol ile pH 5,5 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2), (Şekil 4.4).

Optimum iyonik şiddet çalışmasında; 0,01-1 M arasında belirli konsantrasyonlarda bir seri Asetat tamponu hazırlandı. Katekol ve 4-metil katekol substratları için belirlenen optimum pH'larda aktivite ölçümü yapıldı. Her iki substrat da 0,05 M tampon konsantrasyonunda yüksek aktivite göstermiştir. Farklı konsantrasyonlardaki aktivite farklıları çok az olduğundan iyonik şiddetin enzim aktivitesini etkileyen ciddi bir faktör olmadığını söylemek mümkündür (Çizelge 4.3), (Şekil 4.5).

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı vardır. Çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklarda enzimin üç boyutlu yapısı bozunur ve enzim aktivitesi kaybolur. Çalışmamızda Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için katekol ve 4-metil katekol substratlarıyla 0-80°C aralığında enzim aktivitesi ölçüldü. Enzimim maksimum aktivite değeri 10°C

maksimum iken 40°C ve üzeri sıcaklıklarda aktivitenin giderek azaldığı ve 70°C’de de enzimin aktivitesini büyük oranda kaybettiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4). (Şekil 4.6).

Enzim aktivitesinin stabilitesi üzerine pH’nın etkisinin incelenmesi amacıyla belirli pH’larda 0,05 M’lık tampon çözeltilerine (Asetat tamponu pH: 5,0 / 5,5; Fosfat tamponu pH: 6,0 / 6,5 / 7,0; Tris-HCl tamponu 7,5 / 8,0 / 8,5) enzim ve glikol eklenerek 4°C’de muhafaza edildi. Belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlarda PFO enziminin stabil pH’sı 5,5 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5), (Şekil 4.7).

Enzim kinetiğinde K_M değeri, enzimin aktif bölgesinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonunu ve enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesi şeklinde iki farklı anlamı vardır. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi için 5 farklı konsantrasyonda katekol ve 4-metil katekol substratları ile enzim aktivite değerleri ölçüldü. $1/V-1/[S]$ değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek grafik yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6). (Şekil 4.8-4.11). Katekol için K_M sabiti 6,17 mM, V_{max} değeri ise 20,83 $\mu\text{mol/L}$. olarak hesaplandı. 4-metil katekol için ise K_M sabiti 4,16 mM, V_{max} değeri ise 32,26 $\mu\text{mol/L}$. olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre PFO enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan 4-metil katekol substratına ilgisinin daha fazla olduğu görüldü. Çünkü düşük K_M yüksek ilgiyi; yüksek K_M düşük ilgiyi ifade eder.

Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC_{50} değerlerini belirlemek için % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.12.-4.16). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7). Kimyasal bileşiklerin IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında DTT < GSH < sodyum azit < askorbik asit < tiyoüre şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7).

Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesinde Lineweaver-Burk grafiklerinden

faydalanıldı. Sonuçların daha hassas bulunabilmesi amacıyla her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.17-4.21).

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisinin fazla olduğu düşünüldüğünde bu tür inhibitörlerin enzimi çok daha fazla inhibe edeceği açıktır. Tortum elmasından saflaştırılan PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren tiyoüre, askorbik asit, sodyum azit, GSH ve DTT kimyasal bileşiklerin (K_i)_{ort} sabitleri hesaplandı. En düşük K_i değerleri sırasıyla askorbik asit (0,042), glutatyon (0,045), sodyum azit (0,054), ditiyoeritritol (0,221) ve tiyoüre (0,268) olarak bulunmuştur. Bu etki sırası IC_{50} değerleri ile çoğunlukla uyuşmaktadır. Görüldüğü gibi enzim için askorbik asit oldukça küçük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi göstermektedir. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Sonuç olarak;

- Tortum elmasından (*Malus sylvestris*.) PFO enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak ilk kez saflaştırıldı.
- Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş olup yaklaşık molekül ağırlığı 60 kDa'ya takabül etmektedir.
- Tortum elmasından saflaştırılan PFO enziminde monofelaz aktivitesi görülmemiştir. Enzimin sadece difenolaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Enzimle ilgili yapılan kinetik çalışmalarda optimum pH değeri katekol substratı ile pH:5,0, 4-metil katekol ile pH:5,5 olarak bulunmuştur. Optim iyonik şiddet 0,05 M ve optimum sıcaklık değeri 10 °C olarak tespit edilmiştir.
- Optimum şartlarda yapılan enzim kinetiği çalışmalarına göre en iyi substratının 4-metil katekol olduğu tespit edilmiştir.
- Bazı kimyasalların (askorbik asit, tiyoüre, GSH, DTT ve sodyum azit) enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. En etkili inhibitörün askorbik asit olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Altunkaya, A. ve Gökmen, V., 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry*, 107, 1173- 1179.
- 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.
- Aydemir, T., Kavrayan, D. ve Çınar, S., 2003. Isolation and Characterisation of Polyphenoloxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 21, 115-125, Konya.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-255.
- Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. ve O'Conner, K. E., "Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, (2004), 486-492.
- Castaner, M., Gil, M. I., Artes, F. ve Tomas-Barberan, F. A.. "Inhibition of browning of harvested head lettuce", *Journal of Food Science*, 61, (1996), 314-316.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N. ve Barrett, D. M., 2000. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 147.
- Chen, J.C., Wei, C., Rolle, R., S., et al., 1991, Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases., *J. Agr. Food Chem.*, 39, 1396-1401.
- Chen, Q. X. ve Kubo, I. "Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (2002), 4108-4112.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J. and Tumer, N., 2001. Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenoloxidase. *J.Agric. Food Chem*, 49, 652- 657.
- Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A. ve Dincer, B.. "Comparative Characterization of Diphenolases from Two Mulberry Fruits (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.)", *Asian Journal of Chemistry*, 19, (2007), 2961-2972.
- Dedeoğlu, N., 2009. Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dincer, B., Colak, A., Aydın, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae), *Food Chemistry*, 77, 1-7.
- Doğan S., Ayyıldız Y., Doğan M., Alan Ü., Diken M.E. (2013): Characterisation of polyphenol oxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm). *Czech J. Food Sci.*, 31: 156-165.

- Erat, M., 1998. Çadır bitkisinden izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A., ve Wichers, H. J.,. "Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalys"t. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49,(2001), 1187- 1193.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office of Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenoll, L. G., Rodriguez-Lopez, J. N., Varon, Garcia-Ruiz, P. A., Garcia- Canovas, F. ve Tudela, J.. "Action mechanism of tyrosinase on *meta*- and *para*-hydroxylated monophenols". Biological Chemistry. 381, (2000) 313- 320.
- Ferrar, P. H. ve Walker, J. R. L.. "Inhibition of diphenol oxidases: A comperative study", Journal of Food Biochemistry, 20,(1996) 15-30.
- Fraignier, M. P., Marques, L., Fleuriert, A. ve Macheix, J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruit of (Prunus), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2375- 2380.
- Friedman, M. "Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, (1997), 1523-1540.
- Frudenberg, K. and Weinges, K., 1962. Catechins and flavonoid compounds in the chemist of flavonoid campounds. Pergamon Press, 197.
- Gökkaya, Ö., 2009. Beyaz Kiraz Meyvesi (Starks Gold) Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Gregory, R. P. F. and Bendall, D. S., 1966. The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis* L). Biochemichal Journal, 101: 569-581.
- Gul'ko, A. Y. and Khaziyevev, F. K., "Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity", Eurasian Soil Science, 25 (4), (1993), 101-113.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. and Xue, S., 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Food Chemistry, 117, 143-151.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Oktay, M., 2005. Purification and Characterization of Polyphenol oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20(3), 297-302.
- Güngör, K., 2008. Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi). Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Halder, J., Tamuli, P. and Bhaduri, A.N., 1998. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*), Nutritional Biochemistry. 9: 75-80.
- Hayashi, K., 1962. The anthocyanins in the chemistry of flavonoid compounds.
- Ishiguro, R. and Aoyama, Y., 1970. Studies on the relationship between L-ascorbicacit and o-diphenol oxidase activity in Radist (*Raphenus sarivus* L). Eiyo To
- Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metche, M. and Rovel, B., 1993, Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activitiy., Phytochemistry , 34 , 2, 349-353

- Keskin, H., Erkmen, G., 1987. Besin Kimyası. T.C..İstanbul Üniversitesi Sıra no: 3450, Mühendislik Fakültesi No:72. Güryay Matbaacılık Tic. Lmt. Sti., İstanbul, 270-274.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), Food Chemistry, 101, 778-785.
- Kubo, I. ve Yokokawa, Y.. "Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from *Buddleria coriacea*", Phytochemistry, 31, (1992), 1075-1077.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I. "Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, (1999), 4121-4125.
- Labuza, T. P., Lillemo, J. H. and Taoukis, P. S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes, Fruit Processing, 2, 9-13.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
- Laurila, E., Kervinen R. and Ahvenainen, R., 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. Postharvest News and Information , 9(4), 53-66.
- Lee, H. S.. "Tyrosinase inhibitors from *Pulsatilla cernua* root-derived materials", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, (2002), 1400-1403.
- Lee, H. S. ve Nagy, S., 1988. Quality changes and nonenzymic browning. intermediates in grapefruit juice during storage, Journal of Food Science, 53, 168- 172.
- Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W. ve Brown, S. K., 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 99.
- Lee, S. E., Kim, M. K., Lee, S. G., Ahn, Y. J. ve Lee, H. S., 2000. Inhibitory effects of Linnamomen cassia bark-derived materials on mushroom tyrosinase, Food Science and Biotechnology, 9, 330-333.
- Lerner, H.R., Mayer. A.H. and Harel. E., 1972. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. Phytochemistry, 11, 2415.
- Mahanta, P.K., Boruah, S.K., Baruah, H.K. and Kalita, N.J., 1993. Changes of Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities and Pigment Composition of Some Manufactured Black Teas (*Camellia sinensis* L). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41: 272-276.
- Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C. "Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods". 2000.
- Mauron, J., 1981. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint, Program The Food and Nutrition Science, 5, 5-35.
- Mayer, A.M., 1987. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. Phytochemistry, 26, 11-20.
- Mayer, A.M. ve Harel, E., 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: Food Enzymology. Fox PF, Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, 373- 398.
- Mcweeny, D.J., "The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites", *J. Sci. Food Agric.* 25, (1974), 735.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, S., 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. Food Technology, 45, 80-86.

- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A. ve Klenitskaya, I. A., 1992. Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus, *Eurasian Soil Science*, 5, 60.
- Öz, F., 2010. *Lactarius Piperatus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. and 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.
- Padron, M. P., Lorano, J. A. ve Gonsales, A. G., 1975. Properties of o-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*, *Phytochemistry*, 14, 1959.
- Parish, R. W., "The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (*Beta vulgaris* L.)", *Z. Pflanzenphysiol.*, 66, (1972), 176.
- Pendharkar, M. B. and Nair. P. M., "Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation", *Phytochemistry*, 13, (1964), 1373.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A. ve Bollog, J. M. 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 223.
- Sabancılar, İ., Emre, Ö., Baycan, Y.S., Demir, H. ve Erge, H., 2007. Denizli Narından Afinit Kromatografisi Yardımı ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi ABD, VAN. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edb. Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, Van
- Sandheimer. E., 1964. Chlorogenic acids and related depsides. *Bot. Rev.* , 30, 667.
- 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.
- Schaller, K., "Zur Bestimmung der Polyphenoloxidaseaktivitat in Kartoffelknollen", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 150,(1972), 211.
- Segel, I.H and Woodin, T.S., 1968. Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine- S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys., Acta* 167(1), 78-88.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. and Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.
- Şiddiq, M., Sinha, N.K., and Cash, J.N., 1992. Caracterization of polyphenol oxidase from stanley plumps. *J. Food Sci.*, 57 (5), 1177-1179.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. and Riberio, S., 1972. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel. *Phytochemistry* , 11, 575.
- Stephens, G. J. And Wood, R. K. S., "Release of enzymes from cell walls by an endopeptidase-trans-eliminase", *Nature*, 251, (1974), 358.
- Swain. T., 1962, economic importance of flavonoid compounds, In 'The chemistry of flovonoid compounds' ., Pergamon Press, 513.
- Şakiroğlu, H., 1994. Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Şakiroğlu, H., Öztürk, A.E., Pepe, A.E. and Erat, M., 2008. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from dill (*Anethum Graveolens*). *J.O. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23 (3), 380-385.
- Taş, C., 2009. Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri
- Ünal, M.Ü. and Şener, A., 2006. Determination of Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2374-2379.
- Ünal, M.Ü., 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913.
- Valero, E., Varon, R. and Garcia-Carmona, F., 1990, Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols., *J. Agr. Food Chem.*, 38, 1097-1100
- Walker, J. R. L., 1975. Enzymic browning in food a review., *Technol. Deg.*, 4(3), 89.
- Wang, H. and Helliwell, K., 2000. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, 337-344.
- Weaver, M.L., Bron. R. C., and Steen. H. A., 1968. The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes. *Am. Potato J.*, 45, 132.
- Whitaker, J. R., 1972. Polyphenol Oxidase of In : Principles of enzymology for the food sciences (Fennema, O.R., Ed). Marcel Dekker, pp. 571-582, New York.
- Whitaker, J. R. ve Lee, C. Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, C. Y. Lee ve J. R. Whitaker, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, DC, 2-7.
- Wilcox, D.E., Porras, A. G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., and Solomon, E.I., "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase", *J. Am.Chem. Soc.*, 107, (1985), 4015-4027.
- Yağar, H. and Sağiroğlu A., 2000. Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince, Trakya University, Department of Chemistry, 22030 Edirne-TURKEY.
- Yağar, H., 2004. Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, (4) 34: 378-397.
- Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., and Hayashi, N., "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel", *J. Agric. Food Chem.*, 49, (2001), 1446-1449.
- Yoruk, R. ve Marshall, R., M., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review, *Journal Food Biochemistry*, 27, 361- 422.
- Yılmaz, E., 2007. İspir şeker fasulyesinden elde edilen polifenoloksidaz enziminin bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Zhang X. and Shao X., 2015. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in brown-ing of loquat fruit. *Czech J. Food Sci.*, 33: 109-117.
- Ziyan, E. and Pekyardımcı, Ş., 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27:217-225.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 2008 yılında girdiği Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisansa başladı ve halen devam etmektedir.

