TC

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

IĞDIR ELMASINDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN : Fikret TÜRKAN

DANIŞMAN : Doç. Dr. Halit DEMİR

VAN-2009

TC

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

IĞDIR ELMASINDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Fikret TÜRKAN

VAN-2009

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç Dr. Halit DEMİR danışmanlığında Fikret TÜRKAN tarafından hazırlanan ‘‘**Iğdır Elmasından Polifenol Oksidaz Enziminin saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi**’’ isimli bu çalışma 22/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Halit DEMİR **imza:**

Üye: Doç. Dr. İsmet BERBER **imza:**

Üye: Yrd. Doç. Dr. İ. Hakkı YÖRÜK **imza:**

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun …/…/2009 Gün ve ……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

IĞDIR ELMASINDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

TÜRKAN, Fikret

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Halit DEMİR

Ocak 2009, 63 sayfa

Bu çalışmada Iğdır Elması'ndan polifenol oksidaz enzimi (E.C. 1.14.18.1;PPO) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış ve polifenol oksidaz enziminin çeşitli özellikleri incelenmiştir. Bu çalışma için Iğdır yöresinden elma temin edilmiştir. Iğdır elmasından polifenol oksidaz enzimi saflaştırmak için pH'sı 7.3 olan fosfat tamponu kullanılarak, gerekli santrifüj ve diğer işlemler yapılarak kolona uygulanacak homojenat hazırlanmıştır. Bu homojenat aktifleşmiş Sepharose 4-B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonuna uygulanmıştır. Kolondan alınan fraksiyonlardan aktivite gösterenler, kantitatif protein tayinleri için Coomassie Blue yöntemiyle ve 595 nm'de yapılmıştır. Bunun yanı sıra enzimin optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, iyonik şiddet etkisi ve bazı kimyasalların inhibisyon etkisi incelenmiştir. Enzimin optimum pH'sı 6.0 , optimum sıcaklığı 50 ^{0}C olarak bulundu. Ayrıca iyonik şiddetin etkisi üzerine yapılan çalışmada ise en yüksek aktivite 0.16 M $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunda görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, Iğdır Elması, İnhibisyon, Polifenol oksidaz, Saflaştırma.

ABSTRACT

THE INVESTIGATIONS OF SOME CHARACTERISTICS AND THE PRUFOCOLION OF POLIPHENOL OXIDASE ENZYME FROM IĞDIR APPLE

TÜRKAN, Fikret
Msc Thesis, Chemistry Department
Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Halit DEMİR
January 2009, 63 pages

In this study, polyphenol oxidase (E.C. 1.14.18.1; PPO) enzyme obtained from Igdır Apple's was purified with affinity chromatography and various properties of poliphenol oxidase enzym were stated. The apple was provided from Igdır province. To purify polyphenol oxidase enzyme obtained from apple, phosphate buffer at 7.3 pH was used, necessary santrifuging and other processes were carried out and the homogenate will be applied to the column was prepared. The homogenate was applied to activated Sepharose 4B-Tyrosine-p-amnobenzoic asid affinity column. Activity showing fractions obtained from column, for quantitative protein analyse was performed at 595 nm with Coomassie Blue method. In addition, optimum pH of enzyme, optimum temperature, ionic strength effect and inhibition kinetics of some chemicals on enzyme were investigated. Optimum pH of enzyme and optimum temperature was found as 6 and 50^{o}C respectively. Furthermore, the work carried out on the ionic strength the highest activity was seen in concentration of 0.16 M$(NH_4)_2SO_4$.

Key words: Affinity Chromatography, Igdır Apple, Inhibition, Polyphenol oxidase, Purification.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Iğdır Elması'ndan afinite kromatografisi ile saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin çeşitli özellikleri incelenmiştir.

Tüketicilerin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir. Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişmeleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine "esmerleşme" denir. Birçok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişmeleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Enzimatik esmerleşme denilen bu reaksiyon, hem polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi, hem de fenolik madde konsantrasyonu ile ilgilidir. PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler, ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir.

PPO enziminin neden olduğu bu esmerleşme reaksiyonlarının önlenebilmesi için bu enzimin inhibe edilmesi gerekmektedir, PPO enziminin özellikleri izole edildiği kaynağa göre değişmektedir. Bu nedenle uygun inhibisyon yöntemlerinin bulunabilmesi için öncelikle meyve ve sebzelerde bulunan PPO enziminin kinetik özelliklerinin, aktivatör ve inhibitörlerinin, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin, sıcaklığa dayanıklılığının iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bazı sebze ve meyvelerde meydana gelen istenmeyen kararmaların önlenmesini desteklemek için yaptığımız çalışma önem arz etmektedir.

Çalışmamızda saflaştırma işleminin basamakları materyal ve yöntem kısmında açıklanmış, saflaştırma sonrasında yapılan işlemlerle elde edilen veriler, bulgular ışığında sonuçlar değerlendirilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu konuyu yüksek lisans tezi olarak öneren, çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm önemli deneyim ve bilgilerinden faydalandığım hocam Sayın Doç. Dr. Halit DEMİR'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her türlü konuda desteğini gördüğüm değerli dostum Faik GENÇDAL'a, laboratuar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Y.Servet BAYCAN, İlhan SABANCILAR ve Özgür EMRE arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü konuda yanımda olan aileme ve benim için çok değerli olan Çiğdem ÇAM'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i

ABSTRACT ii

ÖNSÖZ iii

İÇİNDEKİLER iv

ŞEKİLLER DİZİNİ v

ÇİZELGELER DİZİNİ vi

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii

1.GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ 1

1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi 1

1.2. Enzim İnhibisyonu 5

1.2.1. Yarışmal (competive) inhibisyon 5

1.2.2. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon 6

1.2.3. Basit yarışmasız (simple noncompetitive) inhibisyon 7

1.2.4. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon 7

1.3. Enzim Aktiflik Birimleri 10

1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi (E.C.1.14.18.1; PPO) 10

1.4.1. Adlandırılması 15

1.4.2.Doğada bulunuşu 15

1.4.3.Molekül yapısı 16

1.4.4.Katalizlediği reaksiyonlar 17

1.4.4.1.Hidroksilasyon reaksiyonu 17

1.4.4.2.Oksidasyon reaksiyonu 17

1.4.5.Bakırın reaksiyondaki rolü 18

1.4.6. Substratları.....20
1.4.6.1.Katekinler.....21
1.4.6.2.Lökoantosiyanidinler.....22
1.4.6.3.Antosiyanidinler.....22
1.4.6.4.Flavonoller.....23
1.4.7.Aktivatörleri.....24
1.4.8.İnhibitörleri.....25
1.4.9.Doğa ve gıda işletmeciliğindekirolü ve önemi.....26
1.5.Enzimatik Kararma.....27
1.5.1. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları.....28
1.5.2. PPO enziminin inhibitörleriyle enzimatik kararmanın önlenmesi.....28
1.5.3.Enzimi birinci derecede etkileyen inhibitörler.....28
1.5.4.Reaksiyon ürünleri veya substralar ile reaksiyona giren bileşikler.....29
1.6. Iğdır Elması Hakkında Genel Bilgi.....30
1.7 Araştırmanın Amacı.....31
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....33
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....33
2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....33
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....33
2.3.1.Ekstraksiyon tamponu.....34
2.3.2.Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar.....34
2.3.3.Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar.....34
2.3.4.Afinite kromatoğrafisinde jele bağlanmış PPO enziminin elusyonu için kullanılan çözelti.....34
2.3.5.Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler.....34
2.3.6.İnhibisyon etkisi incelecek ilaç ve kimyasal çözeltilerinin hazırlanması..35

2.4.Kullanılan Yöntemler 35
2.4.1.Ham ekstraktın hazırlanması 35
2.4.2.PPO enziminin afinite kromatoğrafisi ile saflaştırılması 36
2.4.2.1Afinite jelinin hazırlanması.....36
2.4.2.2. Enzim çözeltisinin afnite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu 37
2.4.2.3. Saflaştırılan enzim çözeltisinin diyalizi 37
2.4.3. Protein tayini.....37
2.4.3.1. Kalitatif protein tayini.....37
2.4.3.2. Coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein tayini.....38
2.4.4. PPO Enziminin aktivite tayini 38
2.4.5. PPO Enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar.....39
2.4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....39
2.4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....39
2.4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi.....39
2.4.5.4. Enzim Aktivitesi üzerine bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon etkisi 40
3. BULGULAR.....41
3.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik.....41
3.2. PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması 41
3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 43
3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi 44
3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi 45
3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların İnhibisyon Etkisi 45
4. TARTIŞMA ve SONUÇ 49
KAYNAKLAR.....54
ÖZGEÇMİŞ.....63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Michaelis-Menten grafiği 3
Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği 4
Şekil 1.3. Enzimin liganda bağlanmasının şematik gösterilişi 9
Şekil 1.4.O-kinon oluşum mekanizması 19
Şekil 1.5.Melanin pigmentinin oluşum mekanizması 20
Şekil 3.1. Coomassie Blue Yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik ...41
Şekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayin grafiği 42
Şekil 3.3.Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği 44
Şekil 3.4.Enzimaktivitesinin pH'ya bağlı grafiği 45
Şekil 3.5.Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlı grafiği 45
Şekil 3.6. 2- merkaptoetanol için % aktivite-[I] grafiği 46
Şekil 3.7.Bakır sülfat için % aktivite -[I] grafiği 46
Şekil 3.8. Sitrik asit için % aktivite -[I] grafiği 47
Şekil 3.9. Sodyum bifosfat için % aktivite -[I] grafiği 47
Şekil 3.10. . Tirozin için % aktivite -[I] grafiği 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Farklı kaynaklardan izole edilen PPO enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma yöntemleri 16
Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimininin substratları.....24
Çizelge 3.1. Iğdır elmasından saflaştırılan Polifenol Oksidaz enziminin saflaştırma sonuçları 43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
ºC	Santigrad derece sıcaklığı
dk	Dakika
g	Gram
h	Saat
L	Litre
mL	Mililitre
ml	Mikrolitre
mg	Mikrogram
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
Rpm	Devir/Dakika
kDa	Kilo Dalton

Kısaltmalar

PPO	Polifenol Oksidaz Enzimi
E.C.	Enzim kodu
Tris	Tri hidroksimetil aminometan
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
I	İnhibitör
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör komplek

1. GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERi

1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden % 100'lük bir ürün verimi alınmasını sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; 2005).

Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} ye kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^{2} -10^{4} kadar artırabilmektedir.

Enzimler, oldukça spesifik maddelerdir. Birbirine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir.

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997; 2005).

Bazı enzimler katalizleme reaksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken bazıları da protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. "kofaktör" adı verilen bu gruplar bir metal iyonu olabildiği gibi "koenzim" adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Koenzimle birlikte enzim molekülüne "haloenzim", kofaktörsüz olan protein kısmına ise "apoenzim" denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar (Ziyan, 1998).

Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir ve turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim karbonik anhidraz enzimidir.

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25 ^{o}C' de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

Tüm canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonların hepsi, uzak veya yakın enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenirler ve hücre canlılığını yitirdikten sonra bile bir süre etkisini sürdürürler. Enzimlerin katalitik etkileri hücreye bağlı değildir.

Enzimler de protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Onlar gibi makromoleküller olması itibarıyla sellofan ve kolodyum zarlarından geçemezler ve bu özelliklerden dolayı ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ayrıca ortamın alkali veya asit oluşuna karşıda oldukça hassastırlar. Enzimlerin hızları ortalama olarak 30-50 ^{o}C arasında artar. Fakat bu sıcaklıkların üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona uğrarlar (Champe ve Harvey, 1997).

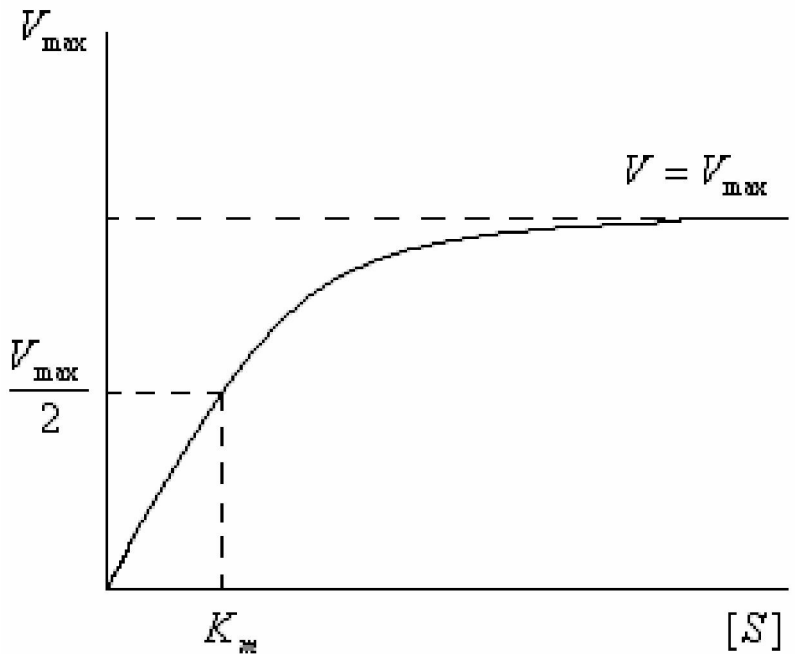
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir "Enzim-Substrat kompleksi" oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

$$\text{Enzim} + \text{Substrat} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{ES} \xrightarrow{k_3} \text{Ürün} + \text{Enzim}$$

Burada ES kompleksi, E ve S' dan k_1 hızı ile oluşur; ES' nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşınca "Kararlı Durum İlkesi"ne göre ES' nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta

hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.1.). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



Şekil 1.1. Michaelis-Menten grafiği.

$$V = \frac{V_m . [S]}{K_m + [S]}$$ (Michaelis-Menten Bağıntısı)

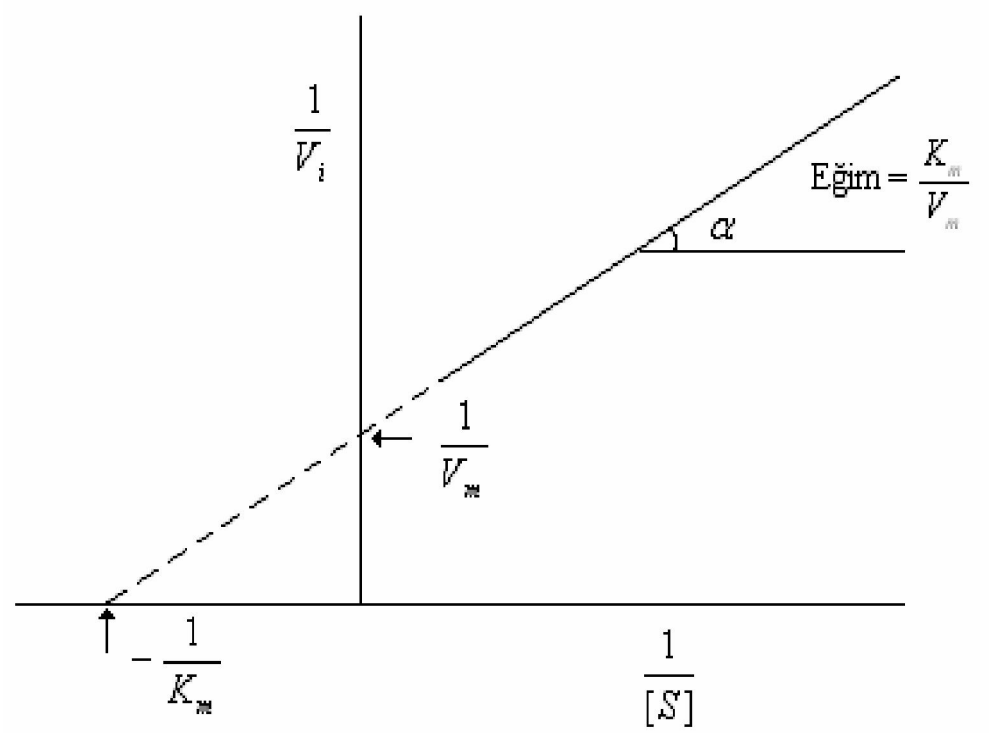
Vmax: hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yansına (Vmax/2) karşılık gelen substrat derişimi Km (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. Vmax ve Km bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ([S] << Km) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlannda herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede [S] >> Km 'dir. V = Vmax olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemidir (Lineweaver ve Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{[S]}$$ (Lineweaver-Burk denklemi)

Bu denkleme göre ordinatta 1/Vmax, apsiste 1/[S] değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise Km /Vmax' tır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği

Enzimli reaksiyonların hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla:

1) Substrat konsantrasyonu

2) Enzim konsantrasyonu

3) pH

4) Sıcaklık

5) İyonik şiddet

6) Kofaktör konsantrasyonu (varsa)

7) İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu

Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedir.

1.2. Enzim İnhibisyonu

Enzim aktivitesinin inhibisyonu, canlı hücrenin kullandığı en önemli düzenleyici yollardan biridir. Aynı zamanda ilaçların en önemli etki mekanizması ve enzimolojistlerin en etkin teşhis yöntemlerinden birisidir.

İnhibisyon çalışmaları; enzimin seçimliliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi vermektedir. Enzimlerin inhibisyon mekanizmaları için 4 yol önerilmiştir:

1) Yarışmalı (Competitive) inhibisyon

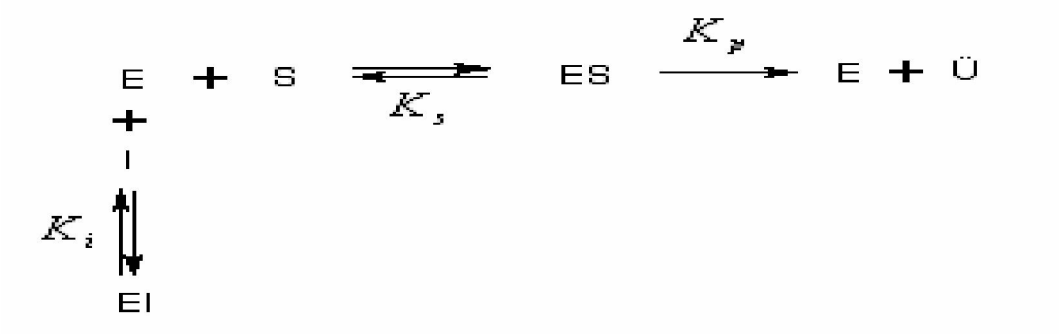
2) Yarı yarışmalı (Uncompetitive) inhibisyon

3) Basit yanşmasız (Simple nonconıpetitivc) inhibisyon

4) Karışık yanşmasız (Mixed noncornpetitîve) inhibisyon (Robyt ve White, 1990)

1.2.1. Yarışmalı (competitive) inhibisyon

Yarışmalı inhibitör (I), molekül yapısı bakımından substrata (S) benzer ve substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını engelleyecek tarzda, sağlanarak enzimin aktivitesini azaltır (Ziyan, 1998). Reaksiyon mekanizması:

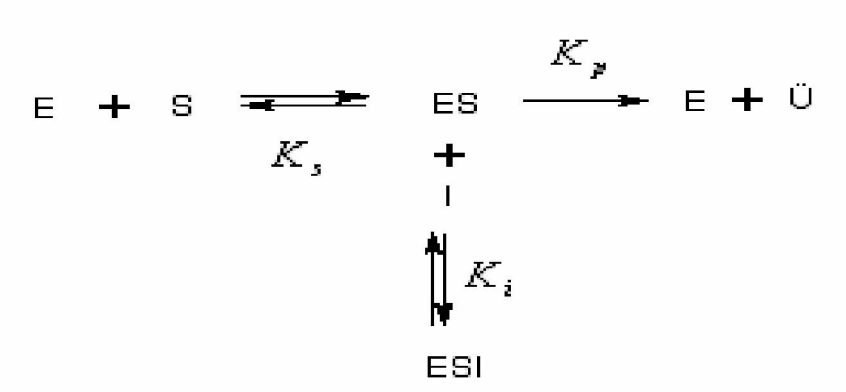


Hız Denklemi : $$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

1.2.2. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon

Tek substratlı sistemlerde inhibitör, serbest enzime bağlanamadığından bu tür inhibisyona çok az rastlanmaktadır. Bu tür inhibisyonda inhibitör, enzimle birleşip EI kompleksi vermediği için enzim önce substratla ES kompleksi verir, daha sonra bu kompleks inhibitörle etkileşir (Ziyan, 1998).

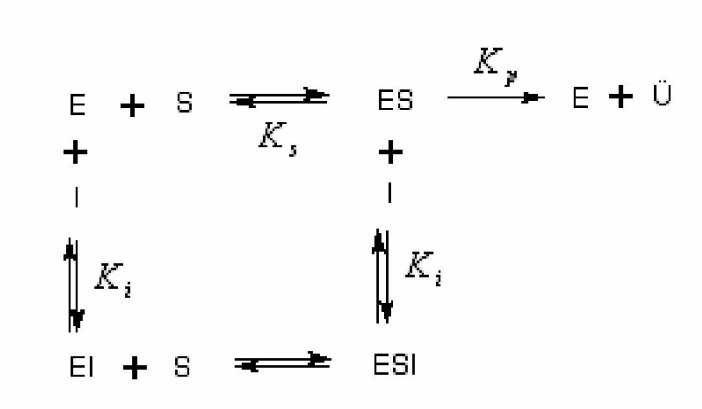
Mekanizması:



Hız Denklemi : $$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

1.2.3. Basit yarışmasız (simple noncompetitive) inhibisyon

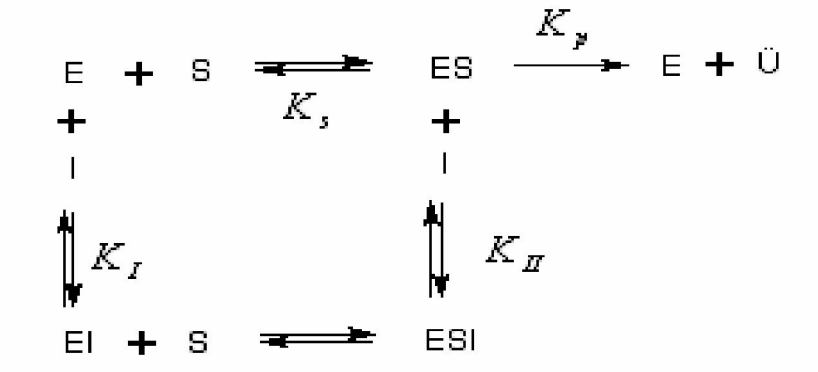
Bu tür inlıibisyonda substrat ve inhibitör gelişigüzel bir tarzda birbirinden bağımsız ve tersinir olarak farklı merkezlere bağlanırlar. Sonuçta ES ve EI komplekslerini oluşturabilirler. Ayrıca ES, I ile ve EI, S ile birleşerek ESI üçlü kompleksini meydana getirirler, oluşan ESI üçlü kompleksi katalitik olarak inaktiftir (Ziyan, 1998). Mekanizması:



Hız Denklemi : $$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

1.2.4. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon

E, S ve I' nın bağlanma denge sabitlerinin farklılaştığı özel bir noncompetitive inhibisyon türüdür. En basit şekline ait reaksiyon mekanizması aşağıda verilmiştir (Ziyan, 1998).



Hız Denklemi : $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}}\right)$

Birçok multienzim sistemi reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler denir. Bu olaya ise feed-back inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere "modülatör" denir.

Enzimlerin aktivitelerini inhibitörlerin tersine pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Aktivatörler genellikle küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküller şeklindedir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür, birinci grupta sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler, ikinci gurupta ise serbest enzimlerle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara, 1997).

Daha öncede belirttiğimiz gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanabilir. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000'in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlem u özelliklerini şöyle sıralayabiliriz:

a) Molekül büyüklüğü leri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin (diyaliz ve ultrafilitrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu, jel filtrasyon kromatografisi).

b) Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (izoelektrik çökelme, nötral tuzlarla çöktürme, çözücülerle fraksiyonlama, sıcaklığın etkisi).

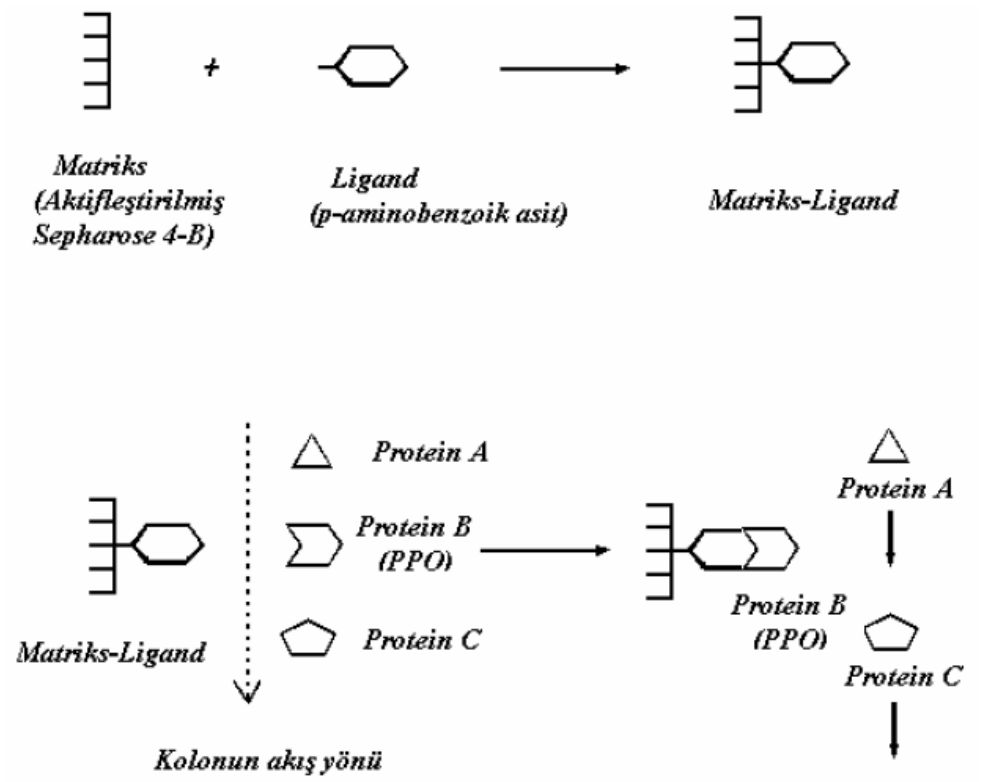
c) Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (elektroforez, iyon değişim kromatografisi).

d) Seçimli adsorbsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması.

e) Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi).

Enzimlerin, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatoğrafisi yöntemidir ve bizde çalışmamızda bu yönteme göre polifenol oksidaz enzimini saflaştırıp karakterizasyon ve kinetik incelenmesini yaptık. Bu yöntemde ligand enzime son derece spesifik olduğundan hızlı bir şekilde enzim bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortama tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzimimiz kolonda yalnız kalır.

Afinite kromatoğrafisininin, mekanizmasının açık şekli aşağıdaki gibidir:



Şekil.1.3. Enzimin liganda bağlanmasının şematik gösterilişi.

Liganda bağlanan enzim veya protein, hareketsiz hale getirilmiş ligandtan genel olarak yüksek konsantrasyondaki bir tuz çözeltisi ile veya ligandın çözünebilir bir şeklinin kullanılması ile elüte edilebilir. Afinite kromatoğrafisi yöntemleri ile son derece başarılı şekilde saflaştırmalar yapılmıştır. Saflaştırılan proteinlerin kirlilikleri poliakrilamid jel elektroforezi ile ortaya çıkarılır (Alırız, 2000; Aldemir, 2002). 1894 yıllarında Chittenden'nin enzimler için ileri sürdüğü üç kavram, enzimoloji tarihi için bir dönüm

noktasıdır. Bu kavramlar, halen günümüzdeki enzimlerle ilgili bilgilerle çelişmemektedir (Gözükara, 1997).

1) Enzimler proteinlerden oluşmuşlardır.

2) Katalitik aktivite, enzim proteinin özel yapısına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

3) Enzimler pasif katalizörler olmayıp substratları ile ara kompleks bileşikler oluşturarak çalışan aktif bileşiklerdir.

1.3. Enzim Aktiflik Birimleri

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda bulundukları için miktar ölçümleri yerine aktivite ölçümleri yapılmaktadır.

Enzim Aktivitesi: optimum koşullarda, birim zamanda substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzim Ünitesi (IU): 25 ºC'de, bir dakikada, optimum koşullarda 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

Katal: 1 saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokan enzim miktarıdır. Uluslararası enzim komisyonu tarafından belirlenen yeni bir birim olan katal çok büyük bir miktarı gösterir.

Spesifik Aktivite: 1 miligram protein başına düşen enzim aktivitesine denir. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Turnover sayısı: Birim zamanda bir mol enzimi ürüne dönüştüren substratın mol sayısıdır.

1.4 Polifenol Oksidaz Enzimi (E.C. 1.14.18.1; PPO)

Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir (EC 1.14.18.1). Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi), diğeri ise o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi). Kresolaz ve katekolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler oluşturur (Whitaker, 1972, Friedman,1997). Son yıllarda enzim isimlerindeki karışıklığını gidermek amacıyla

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

Üzümdeki enzim aktivitesi, pulp veya özsuya nazaran kabukta daha fazla bulunmuştur ve olgunlaşma esnasında aktivite azalması kabukta daha belirgin olmuştur (Parish, 1972). Bazı araştırmacılar kabukta daha yüksek aktivite bulurken (Voigtve ark., 1996), bazıları çekirdek bölgesinde daha fazla aktivite olduğunu belirlemiştir (Bleslermann, 1956). Elmadaki polifenol oksidaz aktivitesinin büyük oranda elmanın cinsine bağlı olduğu bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Walker, 1964; Vamos-Vigyazo, 1981). Amasya ve Golden türü elmalar üzerinde yapılan bir çalışmada, Amasya türünün Golden'e göre daha fazla PPO enzim aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Keleş, 1986). Çay bitkisinin (özellikle filizlerinin) polifenoller ve PPO enzimi bakımından oldukça zengin olduğu ve PPO enziminin çayın fermentasyonunda anahtar enzim olduğu bildirilmiştir (Mayer ve Harel, 1991).

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir (Erzengin, 2002). Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişmeleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine "esmerleşme" denir. Birçok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişmeleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Enzimatik esmerleşme denilen bu reaksiyon, hem polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi, hem de fenolik madde konsantrasyonu ile ilgilidir (Coseteng ve Lee, 1987). PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler, ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir. PPO enziminin neden olduğu bu esmerleşme

reaksiyonlarının önlenebilmesi için bu enzimin inhibe edilmesi gerekmektedir (Ponting, 1960; Golan-Goldhirsh ve Whitaker 1984; Pekyardımcı ve Balaban, 1992). PPO enziminin özellikleri izole edildiği kaynağa göre değişmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Bu nedenle uygun inhibisyon yöntemlerinin bulunabilmesi için öncelikle meyve ve sebzelerde bulunan PPO enziminin kinetik özelliklerinin, aktivatör ve inhibitörlerinin, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin, sıcaklığa dayanıklılığının iyi bilinmesi gerekmektedir. PPO enziminin özeliklerini belirleyebilmek amacı ile birçok kaynaktan enzim izolasyonu yapılmıştır.

Yapılan çalışmalardan PPO ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Şöyleki; elma (Oktay ve ark., 1995; Walker ve ark. 1964), kiraz (Benjamin ve Montgomery, 1973), şeftali (Wong ve ark., 1971; Flurkey ve Jen, 1980; Luh ve ark. ,1972), üzüm (Cash ve ark., 1976; Valero ve ark., 1988), kuşburnu (Şakiroğlu ve ark., 1996) gibi meyveler, patates (Patil ve ark., 1965), mantar (Golan-Goldhirsh ve ark., 1984), patlıcan (Knapp,1965) gibi sebzelerdir.

Polifenol oksidazlar, bitkilerde, kabuklu deniz hayvanlarında, mikroorganizmalarda özellikle de funguslarda yaygın olarak bulunmaktadırlar (Vamos-Vigyazo, 1981). PPO enziminin bitki hücrelerinde bulunduğu yerler farklılık göstermekle birlikte genellikle bitki hücrelerinin plastitlerinde bulunmaktadır. Dolayısıyla, vakuollerde bulunan fenolik substratlarından ayrı bölgelerdedir (Vaughn ve ark., 1988). Üzümdeki enzim aktivitesi, pulp veya özsuya nazaran kabukta daha fazla bulunmuştur ve olgunlaşma esnasında aktivite azalması kabukta daha belirgin olmuştur (Parish, 1972). Bazı araştırmacılar kabukta daha yüksek aktivite bulurken (Voigt ve ark., 1996), bazıları çekirdek bölgesinde daha fazla aktivite olduğunu belirlemiştir (Bleslermann, 1956). Elmadaki polifenol oksidaz aktivitesinin büyük oranda elmanın cinsine bağlı olduğu bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Walker, 1964; Vamos-Vigyazo,1981). Amasya ve Golden türü elmalar üzerinde yapılan bir çalışmada, Amasya türünün Golden'e göre daha fazla PPO enzim aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Keleş, 1986). Çay bitkisinin (özellikle filizlerinin) polifenoller ve PPO enzimi bakımından oldukça zengin olduğu ve PPO enziminin çayın fermentasyonunda anahtar enzim olduğu bildirilmiştir (Mayer ve Harel, 1991). Elma kabuğundan hazırlanan mitokondrial PPO enziminin; polivinilpirolidon (PVP) ile inaktive edildikten

sonra, sodyumdodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlarla reaktive olduğu bulunmuştur (Halim ve Montgomery, 1978). Aynı zamanda sodyum dodesilsülfatın, kısmen saflaştırılmış PPO enzimini aktive ettiği bulunmuştur (Kohn, 1977). PPO enzim aktivitesinde süreli asidik pH veya üreyle muamele edildiğinde 4-10 kat artış gözlenmiştir. Ortama Cu^{+2} iyonlarının katılması patatesteki PPO enzimine etki etmezken, turptaki enzimin aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Isbiguro ve Aynama, 1970; Weaver ve Sten, 1968). Bu enzimde aktivatörlerin rolü enzim için gerekli konformasyonun oluşumunu kolaylaştırmak şeklindedir (Mathen ve Parpia, 1971; Şakiroğlu 1994)

Corsini ve arkadaşları patatesten (*Solanum tuberosum*) saflaştırarak elde ettikleri PPO enziminin aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmalarda enzim aktivitesinin patatesin yumru, kök ve çiçeklerinde oldukça yüksek olmasına rağmen yaprak ve saplarında daha düşük seviyelerde olduğunu tespit etmişlerdir. PPO enzimi tarafından meydana gelen enzimatik esmerleşmenin özellikle patatesin yumrularında daha fazla olduğu bildirilmiştir (Corsini ve ark., 1992). Bununla birlikte, Thygesen ve arkadaşları patatesten saflaştırılarak elde ettikleri PPO enzimi ile yaptıkları çalışmalarda doku hasarını takiben patatesin yumrularında PPO enziminin aktivitesinin yüksek düzeylere ulaştığını saptamışlar ve bu enzimin bitki savunma sisteminde rol oynayabileceğini bildirilmişlerdir (Thygesen ve ark., 1994).

Cano ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise tropik bitkilerden biri olan papaya meyvelerinde de PPO enziminin varlığı bildirilmiştir (Cano ve ark., 1995). Bu meyvelerden kısmen izole edilen PPO enziminin türlere göre değişimi incelenmiş ve toplam PPO enzim aktivitesinin dişi meyvelerde diğerlerine göre çok daha yüksek olduğunu belirtilmiştir. Bu meyvelerden elde edilen enzimlerin elektroforetik özellikleri incelendiğinde, hermafrodit meyvelerde 6 izoenzimin varlığı gözlenmesine rağmen dişi meyvelerde dört izoenzimin varlığını gösteren bandlar belirlenmiştir (Cano ve ark., 1996).

Mayer ve arkadaşları çay bitkisinden saflaştırdıkları PPO enziminin, çayın fermantasyonunda ve çay bileşenlerinden olan flavonolleri oksidasyonunda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Mayer ve ark., 1991).

Fujita ve Tono patlıcandaki polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürme ve Sephadeks G-100 gibi kromatografik yöntemlerle saflaştırmışlar ve enzimin substratı olan klorogenik asitle hızlı bir şekilde oksitlendiğini bulmuşlardır. Klorogenik asit kullanılarak enzimin Km değeri 0.50 mM olarak belirlenmiştir. Optimum pH'sı 4,0, enzimin kararlı olduğu pH aralığı ise 5,0 ile 8,0 arasında bulunmuştur. Ayrıca termal kararlılık deneyleri de yapılmış ve enzimin 75 ºC'de 30 dakikada, 80 ºC'de ise 5 dakikada aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Fujita ve Tono, 1988). Valero ve arkadaşları PPO enzimini üzümden izole ederek karakterizasyonunu yapmışlar ve saflaştırılan enzimin hem kresolaz hem de katekolaz aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH aralığının 3.5-4.5 arası olduğu ve termal kararlılığının yüksek olduğu bulunmuştur (Valero ve ark., 1988).

Simpson, polifenol oksidaz enzimini beyaz karides (*Panaeus setiferus)* ve pembe karides'den (*P.duorarum*) izole ederek saflaştırmıştır. Her iki kaynaktaki enzim de poliakrilamid jel elektroforezinde tek bir protein bandı olarak gözlenmiştir. Beyaz karidesdeki polifenol oksidaz enziminin molekül kütlesi 30.000 Da, pembe karidesdeki enziminin molekül kütlesi ise 40.000 Da olarak bulunmuştur. Her iki kaynaktaki polifenol oksidaz enziminin p-amino benzoik asit tarafından inhibe olduğu gözlenmiştir. Pembe karidesdeki polifenol oksidaz enziminin aktivitesinin beyaz karidese göre 1.8 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca pembe karidesdeki esmerleşmenin doğal substratlarından olan tirosin ve fenilalanin miktarının beyaz karidese göre çok daha fazla olduğu belirtilmiştir (Simpson, 1988).

Satjawatcharaphong ve arkadaşları kırmızı elmadaki (*Malus domestica*) polifenol oksidaz enzimini saflaştırmışlar ve poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) katekol substratı kullanarak 2 aktif izoenzim bandı belirlemişlerdir. Ham enzim ekstraktının optimum pH'sı 6,2, optimum sıcaklığı ise 30 ºC olarak bulunmuştur. Km ve Vmax değerleri sırasıyla; $2.2x10^{-1}$mM ve $4.8x10^{-1}$ΔA390 µmolmin-1 olarak hesaplanmıştır (Satjawatcharaphong ve ark., 1983).

Arslan ve arkadaşları Malatya kayısısından amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleriyle polifenol oksidaz enzimini izole etmişler ve katekol, L-DOPA ve gallik asit substratları ile yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Arslan ve ark., 1998). Malatya kayısısındaki polifenol oksidaz enzimi için en iyi substratın katekol

olduğu bulunmuş ve bu substratlarla optimum pH 8.5 olarak hesaplanmıştır. Termal kararlılık deneyleri sonucu 40 ºC de 40 dakika sonunda enzim aktivitesinde bir azalma gözlenmiş 80 ºC da 16 dakikalık bir uygulama sonucu aktivitenin %50 düştüğü belirtilmiştir (Arslan ve ark., 1998).

Kimberly ve arkadaşları polifenol oksidaz enzimini Batı Avrupada yetişen Ravat ve Niagara üzümlerinden izole ederek karakterize etmişlerdir. Her iki enzim için de optimum sıcaklık ve optimum pH aralıkları sırasıyla 25 ºC ve 5,5 olarak belirlenmiştir. Termal kararlılık deneylerinde de Niagara PPO enziminin, Ravat enzimine göre daha kararlı olduğu görülmüştür. Her iki enzim için de en fazla inhibisyona yol açan inhibitörlerin L-sistein ve sodyumdietilditiyokarbamat olduğu bildirilmiştir (Kimberly *ve ark.,* 1981).

1.4.1. Adlandırılması

Polifenol oksidaz enzimi, reaksiyonda kullanılan substrata göre isimlendirilir. Bu isimlerden bazıları krezolaz, katekol oksidaz, katekolaz, tirozinaz, polifenol oksidaz, difenol oksidaz, dopo oksidaz ve o-oksidoredüktazdır. 1981 yılından itibaren bunların tümü "Fenolazlar" veya "Polifenol oksidazlar" adı altında toplanmıştır. Bu enzimler oksidoredüktazlar grubuna girer ve (E.C. 1.14.18.1; PPO) olarak gösterilir.

1.4.2. Doğada bulunuşu

PPO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972)

Polifenol oksidaz bitkilerde kararmaya sebep olan oksidoredüktaz sınıfından bir enzimdir (Vamos-Vigyazo, 1981). Birçok meyve ve sebzede bulunmasının yanı sıra ıstakoz, karides, yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarında (Simpson ve ark., 1988) ve bazı mikroorganizmalarda da bulunmaktadır (Pomerantz, 1963).

Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin miktarı ve dağılımı, bitkinin cinsine, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır (Joslyn ve Ponting, 1951).

PPO enziminin, meyve ve sebzelerin değişik kısımlarındaki dağılımı oldukça farklıdır, örneğin üzümün kabuğunda bulunan enzimin, etli kısmına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Meyve ve sebzelerin olgunlaşması süresince, içerdikleri PPO enziminin aktivitesi değişmektedir. Ham meyvelerde, PPO aktivitesi ve dolayısıyla renklenme daha fazladır. Zeytinin olgunlaşması sırasında o-difenol konsantrasyonunun arttığı, enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Vamos-Vigyazo, 1981; Mathew ve Parpia, 1971).

1.4.3. Molekül yapısı

Polifenol oksidaz, birden fazla alt birimden oluşan oligomerik yapıda bir enzimdir. PPO'nun içerdiği alt birimlerin sayısı enzimin izole edildiği kaynağa ve substrata bağlı olarak değişmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Amasya elmasından elde edilen PPO enzimi için katekol ve L-dopa substratları kullanılarak 3 izoenzim tespit edilmiştir (Oktay ve ark., 1995)..

Çizelge 1.1. Farklı kaynaklardan izole edilen PPO enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma yöntemleri

Enzim Kaynağı	Alt Birimlerin Sayısı	Ayırma Yöntemi
Elma (Amasya)	3	PAGE
Mango	2	PAGE
Kivi	8	PAGE
Şeftali	4	Tampon ekstraktı, aseton çöktürmesi, DEAE-Selüloz
Üzüm (Kloroplast)	3	PAGE
Patlıcan	2	AS çöktürme. DEAE-Selüloz[a]
Kayısı	2	Tampon ekstraktı (pH: 5 ve pH:7 sırasıyla)

a : Kromatografik basamak

AS : Amonyum Sülfat

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1.4.4. Katalizlediği reaksiyonlar

Polifenol oksidaz, yapısında bakır bulunduran, meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikleri, moleküler oksijenin de bulunması halinde, yükseltgeyen bir enzimdir, PPO enzimi, moleküler oksijen ile 2 tür reaksiyonu katalizler;

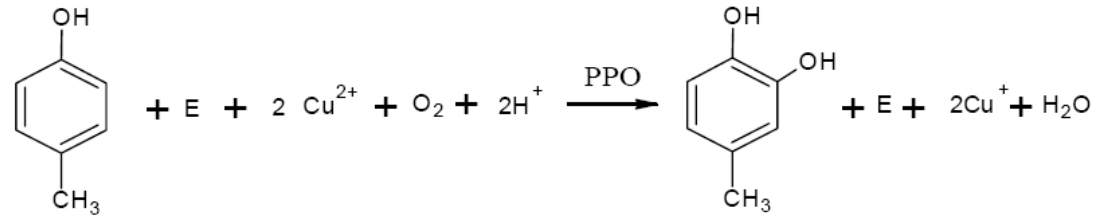
1.4.4.1. Hidroksilasyon reaksiyonu:

Monofenollerin hidroksilasyonu ile O-dihid-roksifenoller yükseltgenmesi (Krezolaz aktivitesi)

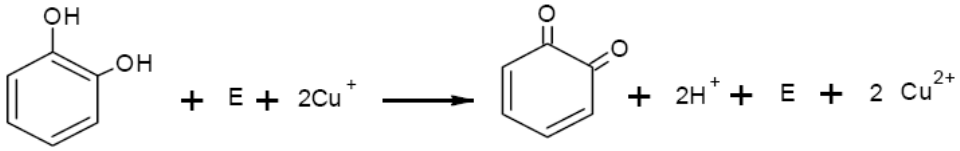
1.4.4.2 .Oksidasyon reaksiyonu:

O-dihidroksifenollerin o-kinonlara yükseltgenmesi (Katekolaz aktivitesi) (Valero ve ark., 1988).

Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantardan elde edilen PPO enzimi her 2 aktiviteyi de göstermektedir. Ancak çay yaprağı, tütün yaprağı, mango, muz, armut gibi bitkilerden elde edilen PPO enziminin monofenollerle reaksiyon göstermediği belirtilmiştir (Zemel, 1989).



p - Krezol **4 - Metil Katekol**



Katekol **o - Benzokinon**

Meyvelerde bulunan fenolik substratların çoğu dihidroksifenoller olduğundan kararma reaksiyonlarının çoğu PPO enziminin katekolaz aktivitesi sonucu meydana gelmektedir.

PPO enziminin katalizlediği reaksiyonun aydınlatılması için uzun yıllar çalışılmıştır. Ancak günümüzde, bu reaksiyonun PPO enziminin aktif merkezinde bulunan bakırın redoks reaksiyonları sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir (Zemel, 1989).

1.4.5. Bakırın reaksiyondaki rolü

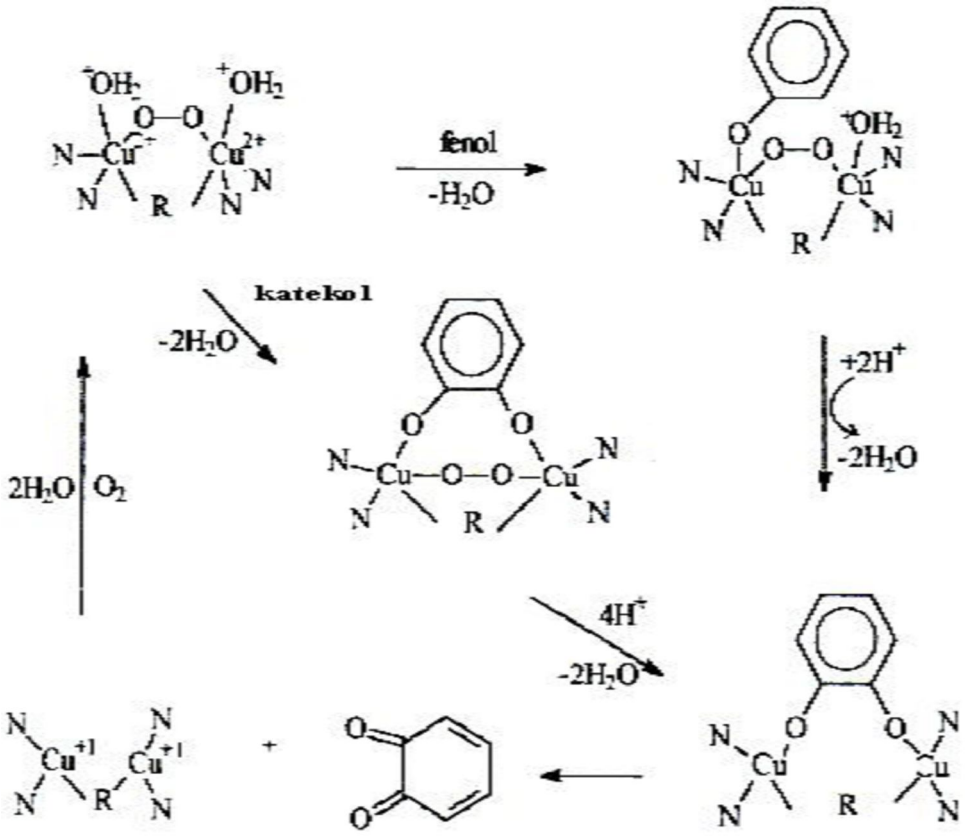
Çeşitli kaynaklardan izole edilen PPO enziminin içerdiği bakır miktarı da farklıdır. Muz, patates ve tütünden elde edilen PPO enziminin bakır konsantrasyonları sırasıyla % 0,3, % 0,2 ve % 0,32'dir (Vamos-Vigyazo 1981).

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

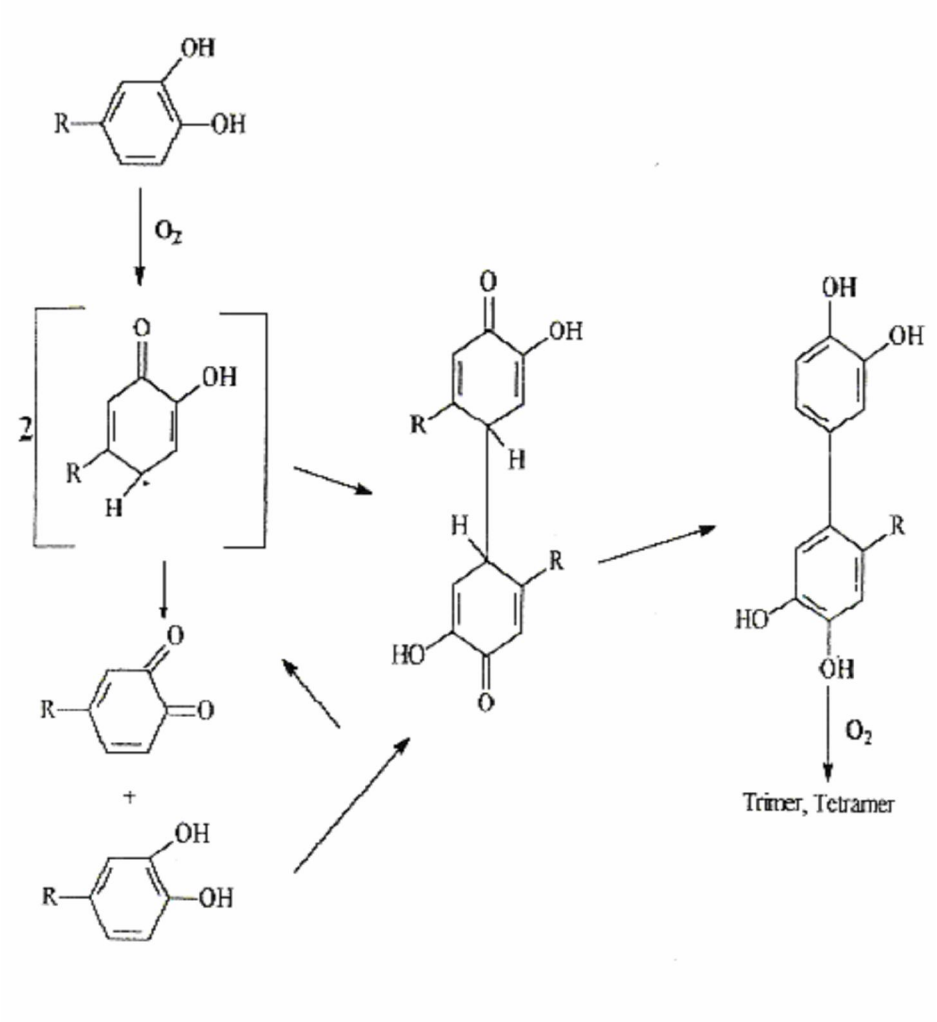
$$\underset{\text{aktif}}{\text{Enzim-2 Cu}^{+} + O_2} \rightarrow \text{Enzim - 2 Cu}^{+}\text{- } O_2$$

$$\text{Enzim- 2 Cu}^{+}\text{- } O_2 + \text{Monofenol} + 2\ H^{+} \rightarrow \underset{\text{inaktif}}{\text{Enzim - 2 Cu}^{+2}} + \text{o-difenol} + H_2O$$

$$\text{Enzim- 2 Cu}^{+2} + \text{o-difenol} \rightarrow \underset{\text{aktif}}{\text{Enzim -2 Cu}^{+}} + \text{o-kinon} + 2\ H^{+}$$



Şekil 1.4. O-kinon oluşum mekanizması



Şekil 1.5 Melanin pigmentinin oluşum mekanizması

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

1.4.6. Substratları

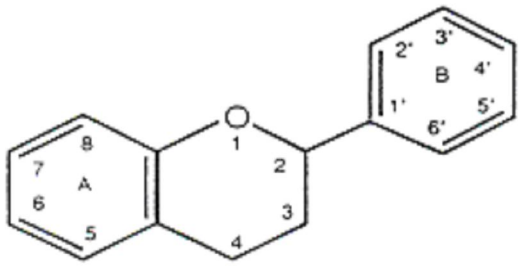
Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerinin geniş bir karışımını içerirler. Ancak bunların çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olarak uygundur (Herrmann, 1976).

Meyve ve sebzeler, yapısında çeşitli fenolik bileşikler bulundurmaktadır. Bu substratlara başta katekol, 4-metil katekol, pirogalol, dopa olmak üzere gallik asit, tirozin, kafeik asit ve sinnamik asit esterleri örnek verilebilir.

Sinnamik asit türevlerinden klorojenik asit ve kafeik asit (3,4-dihidroksi sinnamik asit) PPO enziminin yaygın olarak kullanılan substratlarıdır. Katekol (o-dihidroksi fenol); enzimatik oksidasyon çalışmalarında model substrat olarak kullanılmaktadır. Dopa ve tirozin hemen hemen bütün bitki dokusunda bulunan aminoasitlerdir ve PPO'nun substratlarıdır (Mathew ve Parpia, 1971).

Meyve ve sebzelerin çoğunda fenol konsantrasyonunun dış tabakalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Örneğin elma ve armudun kabuk kısmının fenol içeriği etli kısmına göre daha fazladır.

Bir kaynaktan elde edilen PPO enzimi için en iyi substratın yine aynı kaynakta bulunan substrat olduğu görülmüştür (Vamos-Vigyazo, 1981).

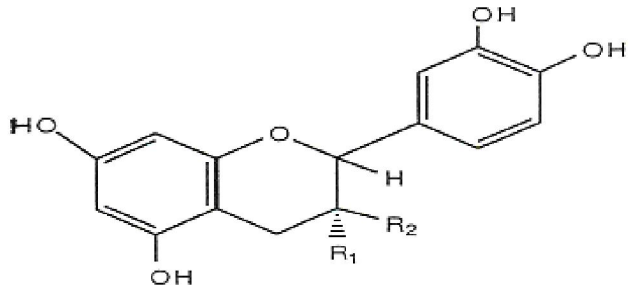


Flavonoid omurgası

Flavonoid omurgasına sahip fenolik bileşikleri 4 grupta toplamak mümkündür:

1.4.6.1. Katekinler

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

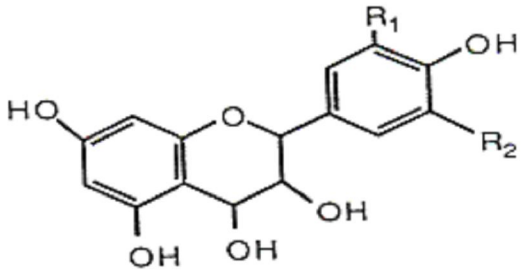


(+) - Katekin (R1=H, R2=OH)

(-) - Epikatekin (R1=OH, R2=H)

1.4.6.2. Lökoantosiyanidinler

Lökoantosiyanidinlerin ilk göze çarpan özelliği asidik ortamda ısıtılarak antosiyanidinlere dönüşebilmeleridir. Lökoantosiyanidinlerden (5,7,3',4'-tetrahidroksi-3.4-dial) (IV) Lökosiyanid (5,7,3',4',5' -pentahidroksi-34 dial) (V) ve Lökopelargonidini (5,7,4' trihidroksiflavon-3,4-dial) (VI) izole edebilmişlerdir (Ganguly ve Seshada 1958).



(IV) Lökosiyanidin (R1=OH, R2=H)

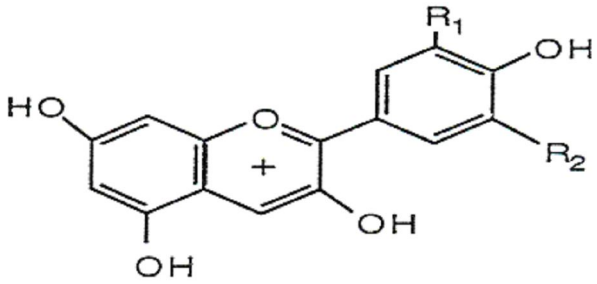
(V) Lökodelfinidin (R1=R2=OH)

VI) Lökopelargonidin (R1=R2=H)

1.4.6.3. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, antosiyaninlerden oluşmaktadır. Antosiyaninlerin aglikon kısmını oluşturan fenolik bileşiklerde -OH grubu sayısı arttıkça renkte mavilik, -OCH3

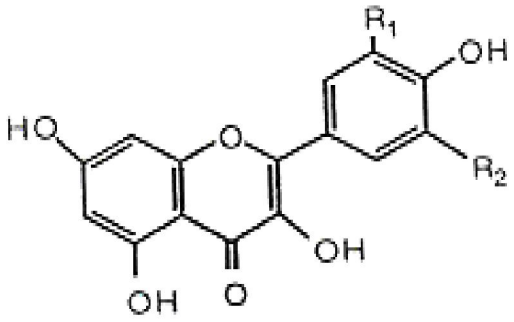
grubu sayısı arttıkça renkte kırmızılık artmaktadır. Üzümlerde ve doğal olarak şaraplarda en yaygın olarak bulunan antosiyanidinlerdir (Acar, 1998).



Pelargonidin (R1=R2=H)
Siyanidin (R1=OH, R2=H)
Delfinidin (R1=R2=OH)

1.4.6.4. Flavonoller

Siyah ve beyaz üzüm kabukları üzerinde yapılan çalışmalar siyah üzümlerin hepsinde , kemferol, quersetin ve mirisetin, beyaz üzümlerde ise yalnız kemferol ve quersetin pigmentlerinin bulunduğunu göstermektedir (Austin, 1968; Canbaş, 1985; Acar, 1998).



(X) Quercetin (R1= OH, R2=OH)
(XI) Myricetin (R1= R2=OH)
(XII) Kaempferol (R1=R2=H)

Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimininin substratları.

Enzim Kaynağı	Substratları
Armut	Katekol Klorojenik asit Kafeik asit 4- metil katekol
Elma (Amasya)	Klorojenik asit Katekol Kafeik asit L-Dopa 3.4- Dihidroksi benzoik asit p- Krezol
Erik	Klorojenik asit Kafeik asit Katekol
Mandalina	Pirogalol
Patlıcan	Klorojenik asit

1.4.7. Aktivatörleri

Aktivatörlerin, enzimin içerdiği monomerlerin Cu^{++} iyonu içeren oligomer oluşturacak şekilde etki gösterdiği ve enzimin aktivite göstermesi için gerekli polimerizasyonu sağladığı düşünülmektedir.

Örneğin yapılan bir çalışmada ortama Cu^{++} iyonları ilavesi ile kırmızı turptaki enzim aktivitesinin arttığı, ama bunun patatesteki enzimi etkilemediği görülmüştür (Vamos-Vigyazo, 1981). d'Anjou armudundan elde edilen PPO aktivitesine dimetil sülfoksilin (DMSO) etkisi incelenmiş ve armuttaki PPO'nun aktivitesini önemli derecede arttırdığı görülmüştür (Wissemann ve Montgomery, 1985).

Suni gübrelerde bulunan eser elementler, olgunlaşmayı hızlandıran maddeler ve iyonlaştırıcı maddelerin enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Üzümden elde edilen PPO enziminin asidik pH 'ta veya üre ile kısa muamelesinden sonra aktivitesinin 4-10 kat arttığı görülmüştür (Vamos-Vigyazo, 1981).

Aynı zamanda manganez, bakır gibi elementlerin elma, patates, yulaf ve domateste PPO aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir (Mathew ve Parpia, 1971).

1.4.8. İnhibitörleri

Polifenol oksidaz kofaktör olarak bakır taşıyan bir metaloprotein olduğu için, siyanür, karbonmonoksit, sodyumdietilditiyokarbonat (DIECA), merkaptobenztiozal, dimerkaptoproponat, azid veya potasyum metilksantat gibi metal şelat ajanları tarafından inhibe edilir (Wildanger ve Herrmann, 1973). Bunların bazıları kinon formları ile de reaksiyona girerler. Benzoik asit, sinnamik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, m-kumarik asit, o-kumarik asit gibi bazı sinnamik asitler, borat, filari, azid inorganik iyonlar, askorbik asit, sülfid, 2,3-naftalendiol, tioglikolat, potasyum metabisülfid, potasyum siyanür, sodyum ve klorür, 2-metroputoetanol, 2- merkaptobenztiazol, sistein, glutatyon, benzen, sülfürik asit, dietilditiokarbonat kullanılan inhibitörlerdir (Stelzig ve ark., 1972).

Bu reaktiflerden bazıları, oluşan kinonlarla da reaksiyona girerler. Muz PPO'su üzerine DIECA' nın etkisiz olduğu bulunmuştur. Bu durum saflaştırılmış enzimde bakırın bulunmayışı ile ilişkilendirilir (Galeazzi ve Sgarbieri, 1978). Askorbik asit de enzimin prostetik grubunu şelatlayarak enzime direkt olarak etki edebilir. Meyve ve sebzelerde meydana gelen enzimatik kararmaya sadece enzim inaktive edilerek değil reaksiyon için gerekli olan 2 substrattan birisi uzaklaştırılarak da engel olunabilir.

Fenollerle enzimin reaksiyonunu engelleyecek en etkili metotlar fenollerle kompleks yapan ajanların (polivinil pirolidon, polietilen glikol ve anyon değiştirici reçineler) kullanılmasıdır (Wissemann ve Montgomery, 1985).

Barllett armudu soyulduktan sonra dokuda bulunan polifenolleri oksijenden uzak tutmak için % l'lik NaCl ile etkileştirilmiş ve kararma reaksiyonlarına engel olunmuştur. Ayrıca doğranmış armut, askorbik asitle etkileştirilerek meyvenin kararması büyük ölçüde engellenmiştir (Tate ve ark., 1964).

Kivi meyvesi çok fazla askorbik asit içerdiği için (-100 mg/100 g meyve) enzimatik kararmaya karşı daha az hassastır (Park ve Luh, 1985).

Mango'dan elde edilen PPO için inhibitör olarak sodyum metabisülfitin en etkili, askorbik asidin en az etkili olduğu görülmüştür (Park ve ark., 1980).

PPO enzimlerinin inaktivasyonunda SO_2 (kükürtdioksit) kullanımı etkili olmaktadır. SO_2 ortamda bulunan oksijeni harcayarak ve oluşan yükseltgenmiş polifenollerle veya kinonlarla reaksiyon vererek enzimin aktiflik göstermesine engel olmaktadır.

Askorbik asit, oluşan o-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir, sonuçta kendisi yükseltgenir. Askorbik asidin tamamı yükseltgendikten sonra kararma reaksiyonu devam eder. Bu nedenle kullanılan askorbik asidin miktarı önemlidir (Zemel, 1989).

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

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

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

1.4.9. Doğa ve gıda işletmeciliğindeki rolü ve önemi

Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelen zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. Bu durum, şüphesiz, oldukça istenmeyen bir işlemdir ve engellenmelidir.

Gıda teknolojistleri PPO enzimiyle ilgili olan enzimatik kararma olayı üzerinde yoğunlaşmışlardır. Enzimatik kararma PPO etkisinin dolaylı bir sonucudur.

Bazı un ürünlerinde bulunan yüksek PPO aktivitesi ekmek veya makarna ürünlerinde kararmayı meydana getirir. Enzimatik olarak kinonların kazein gibi proteinlerle reaksiyonu makarna ürünlerinin sindirimini ve lisin içeriğini azaltır (Szabo, 1999). Bu besinlerin besleyici değerini etkileyebilir. Enzimatik renk değişimi, pancar ve şeker kamışının işlenmesi esnasında yalnız son ürünün rengine etki edebileceğinden değil aynı zamanda oluşan polimerlerin şekerin kristalizasyonunu zorlaştıracağından ve verimi düşüreceğinden dolayı da istenmeyen bir durumdur (Gross ve Coombs, 1975).

Enzimin, bitkilerin mikrobik veya viral enfeksiyonlara ve değişik iklim şartlarına karşı direnç göstermelerinde çok önemli rolünün olduğu düşünülmektedir (Mathew ve Parpia, 1971).

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizi enzimatik kararma reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir. Ancakbazı besin teknolojisi dallarında PPO enziminin sebep olduğu enzimatik kararma istenmektedir. Örneğin siyah çay, siyah üzüm ve kuru erik üretiminde PPO enziminin bu reaksiyonu önemlidir (Vamos-Vigyazo, 1981; Mathew ve Parpia, 1971).

PPO enzimi, fermantasyonla elde edilen içeceklerin tat ve lezzetini de etkileyebilir. Örneğin fermente edilmiş elma ve armut suyu üretiminde, meyvelerde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler okside olarak çökelirler. Ancak bunlar süzülerek uzaklaştırılabilirler.

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik kararmalar; bunların depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında kesilme, zedelenme, dondurulmuş meyvenin çözülmesi durumlarında hava oksijeninin etkisiyle meydana gelir (Vamos-Vigyazo, 1981). İstenmeyen bu tür kararma reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır.

1.5. Enzimatik Kararma

Enzimatik esmerleşme, esas olarak oksijenin varlığında fenollerle polifenol oksidazlar arasındaki ilişkiden kaynaklanmaktadır (Nicolas *ve ark.,* 1994). Bu reaksiyonlarda oluşan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve herhangi bir renk bozulmasına neden olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimer oluşmakta ve bunlar daha büyük moleküllü bileşiklere polimerize olmaktadır. Renk bozulmalarının esas nedeni esmer renkli olan bu polimerlerdir. Reaksiyon sonunda oluşan renk tonu ve yoğunluğu, çevresel faktörlerin ve ortamdaki fenollerin türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir.

1.5.1 Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, özellikle ısı etkisiyle artan bir esmerleşmeye uğradıkları gözlenmektedir. Kurutulmuş ürünlerde renk esmerleşmesi daha çok enzimatik olmayan bir yolla meydana gelmektedir. Esmerleşme olayı, üretim sırasında uygulanan ısıl işlem sonucu oluştuğu gibi depolama sırasında da yavaş bir hızda devam etmektedir. Buna göre bu tip esmerleşme reaksiyonları ısı ile şiddetlenen ve düşük sıcaklıklarda zamana bağlı olarak sürekli artan bir olaydır (Wetherilt *ve ark.,* 1992).

Enzimatik olmayan esmerleşme diye bilinen renk değişmeleri, amino asitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi reaksiyonun sonucudur ve oksijensiz ortamda da yürüyebilir. Koku ve renkte bir iyileştirme sağlayan bu reaksiyonlar lezzet endüstrisinde oldukça önemlidir. Olayın ilk aşamasında, amino grubu, şekerin indirgen hidroksil grubuna bağlanarak N-glikozitleri oluşturmaktadır. Bunu izleyerek gelişen 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 (Cemeroğlu ve Acar, 1986; Bolin ve Steele, 1987).

1.5.2. PPO enziminin inhibitörleriyle enzimatik kararmanın önlenmesi

PPO enziminin inhibisyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi genelde aynı başlık altında incelenir. Ancak kararmanın önlenmesi, yalnızca enzimin inaktivasyonu ile değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli olan iki substrattan (0_2 ve fenolik substrat) birinin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilebilir. Gıda teknolojisinde kararma inhibitörleri kullanılacaksa bu inhibitörün toksik olmaması, tadı ve görünüşü bozmaması gerekmektedir. Enzimatik inhibitörler aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır (Walker, 1975).

1.5.3. Enzimi birinci derecede etkileyen inhibitörler

PPO enzimi, kofaktör olarak Cu içeren bir metalloprotein olduğu için, siyanür, karbonmonoksit, sodyumdietilditiyokarbamat (DIECA), merkaptotiyazol,

dimerkaptopropanol, azid ve potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir (Roberts, 1962; Mathen ve Parpia, 1971; Wildanger, 1973**;** Sapers, 1990; Şakiroğlu, 1994)**.**

Florür ve azotür gibi inorganik iyonlar asidik ortamda enzimi genellikle inhibe etmektedir. Bakla PPO enzimi üzerinde florür yarışmasız inhibisyon etkisi gösterirken azotür karışık tip inhibisyon göstermektedir. Borat gibi bazı inorganik iyonlar substratla kompleks yaparak inhibisyon etkilerini gösterirler. Substrat olarak L-Dopa veya Ladrenalin kullanıldığında boratın inhibisyonu yarışmalı inhibisyondur (Yosunobu, 1957; Weser, 1968; Şakiroğlu, 1994).

Benzoik asit ve sinamik asidin bazı türevleri; tatlı kiraz, elma, armut, kayısı ve patateslerden elde edilen enzimler üzerinde yarışmalı inhibisyon etkisi göstermiştir (Soler-Mahnez ve Lozona, 1965; Pifferi ve Cultrera, 1974; Walker ve Wilson, 1975; Walker,1976; Şakiroğlu, 1994).

Polivinilpirolidon (PVP) gibi çözünebilen polimerler, PPO enzimine yarışmalı bir inhibitör olarak etki eder (Jones ve Waoltorton, 1965; Pierpoint, 1966; Walker, 1975; Şakiroğlu, 1994). Bu etki anyonik deterjanlarla kaldırılabilir.

1.5.4. Reaksiyon ürünleri veya substratlar ile reaksiyona giren bileşikler

1) O-dihidroksifenollerden oluşan kinonlar üzerine indirgeyici reaktif olarak etki eden bileşikler inhibisyon esnasında tükenirler. Ve bunlar yüksek konsantrasyonlarda kullanılmadıkça renk değişimine karşı geçici bir koruma sağlarlar. Bu özelliği gösteren bazı maddeler, askorbik asit, $S0_2$, potasyum metabisulfat, 2-merkaptoetanol, 2-merkaptobenzotiyazol ve tiyoglikolattır (Şakiroğlu, 1994).

Askorbik asit, enzimatik kararma inhibitörü olarak en çok kullanılanlardan biridir. Çünkü askorbik asit gıda ürünlerinin biyolojik değerini artırmaktadır. Antosiyaninlere karşı koruyucu görev yapar ve aynı zamanda kırmızı meyvelerin renklerini korumasına da yardımcı olur. Askorbik asitin etkisi enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ve kinonları indirgeme şeklindedir. Ayrıca Cu'ı şelatlama reaktifi olarak da görev yapar. Bunların yanında enzim tarafından direkt oksitlenerek yarışmalı bir inhibitör olarak da kullanılır. Kinetik çalışmalar üstün bir inhibitör olduğunu göstermiştir. Bazı fenollerde gözlendiği gibi (rezorsinol gibi), PPO enziminin yarışmalı

inhibisyonu askorbik asitle artırılabilir (Taufel ve Voigt, 1964; Singh ve Ahlawati, 1974; Şakiroğlu, 1994).

Askorbik asit yanında $S0_2$ ya da sülfit çok sık olarak sebze ve meyvelerdeki enzimatik kararmayı önlemek için kullanılır. Bu bileşikler, PPO-polifenol sistemi zerine kompleks bir etkiye de sahiptirler. Sülfit, kinonları renksiz bileşiklere çevirerek dönüşümsüz bir inhibisyonla kararmayı önler. Aynı zamanda bu inhibitör mono ve dihidroksi fenollere karşı enzimin aktivitesini azaltır (Markakis, 1966; Şakiroğlu, 1994). Kinonlar ile kararlı renksiz bileşik oluşturan maddeler: Bunlar tükenmediği müddetçe devamlı koruma sağlarlar. Sistein, glutatyon, benzensülfonik asit, DIECA ve tilksantat bu şekilde etki gösterir.

1.6. Iğdır Elması Hakkında Genel Bilgi:

Dünyada 6500'ün üzerinde elma çeşidi olmakla birlikte Türkiye'de bu sayı 460'ı bulmaktadır. Bunlar arasında ticari anlamda yetiştiriciliği yapılanların sayısı çok azdır. Bugünkü modern elma yetiştiriciliğinde melezleme ıslahı yoluyla kalite ve verim yönünden oldukça iyi çeşitler elde edilmiştir. Iğdır yöresinde daha çok Starking delicious ve Golden delicious elma çeşitleri yetiştirilmektedir.

1.6.1. Starking Delicious:

Ağacı çok verimli kuvvetli,yarı dik ve dik gelişir. Meyvesi iri koyu kırmızı renkte, ortalama 200 gram ağırlığında çiçek tarafında beş çıkıntısı olup uzunca şekilli çok iyi kalitelidir.

1.6.2. Golden Delicious:

Orta irilikte geniş ve bir miktar uzun bir forma sahip ve çekici görünümlüdür. Kabuğu sarı renkte bazen kırmızı renklede süslenmiş olup ara sıra paslanma izleri gösterebilir. Ortalama ağırlığı 135 gramdır.

1.5. Araştırmanın Amacı

Polifenol oksidaz (PPO: E.C.1.10.3.2) bitkilerde özellikle sebze ve meyvelerde bol bulunan ve bakır ihtiva eden bir enzimdir. Sebze ve meyvelerde çoğu enzimatik kararmalar, doğal fenolik bileşiklerin enzimatik oksidasyonuyla meydana gelir. Sebze ve meyvelerdeki enzimatik kararmalar tüketici ve üreticiler için ekonomik anlamda önemli bir problemdir.

Enzimatik kararmalar birçok sebze ve meyvelerde meydana getirdiği etkilerden dolayı polifenol oksidaz önemli bir enzimdir. PPO enzimi ile ilgili son zamanlarda birçok sebze ve meyvelerdeki enzimatik kararmaları önlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Elma (Oktay ve ark., 1992; Murata ve ark., 1995), muz (Kahn,1985; Yang ve ark., 2000), şeftali (Flurkey ve Jen, 1980), üzüm (Wissemann ve Lee, 1981; Lamikanra ve ark., 1992), kivi (Park ve Luh, 1985), armut (Wissemann ve Montgomery, 1973), ahududu (Gonzales ve ark., 1999), çilek (Ebeling ve Montgomery, 1990), erik (Siddiq ve ark., 1992), turp (Arslan ve ark., 1997), ıspanak (Golbeck ve Cammarata, 1981), bakla (Flurkey, 1989; Hutcheson ve Buchanan, 1980), tarla fasulyesi (Paul ve Gowda, 2000) yabani patates (Kowalski ve ark., 1992), ferula sp (Erat ve ark., 2006), Anamur muzunda (Ünal, 2005), Ankara armudunda (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004), *Cynara scolymus L* 'dan (Aydemir, 2004), Van elmasında (Demir ve ark., 2006) ve yer elması (Zawitowski ve ark., 1988) olmak üzere pek çok bitki dokusunda çalışılmıştır. Enzim, moleküler oksijen içeren iki farklı reaksiyon katalizlemektedir. Birincisi monofenolleri o-difenollere dönüştüren hidroksilasyon, ikincisi o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (Vamos-Vigyazo, 1981). Oksidasyon, yiyeceklerin güvenliğini, rengini, lezzetini ve yapısını etkilediği için gıdaların bozulmasında en önemli etkendir (Kinsella ve ark., 1993).

Zararlı olan bu kararmaların çeşitli taze sebze ve meyvelerde depolama esnasında PPO tarafından katalizlendiği bilinmektedir. Kararma, kahverengi veya siyaha yakın, PPO tarafından fenolik oksidasyonu ortaya çıkardığı ilgili literatürlerde bahsedilmiştir. Gelecekte PPO bitkilerin ve meyvelerin çevresel yaklaşımlar ve daha çok endüstriye sahip olabileceği çalışmalar önem kazanacaktır.

Enzim saflaştırma yöntemlerinden en güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandları esasına dayanarak proteinlerin ayrılması yöntemi olan afinite kromatografisidir. Bu çalışmada da saflaştırma tekniği olarak afinite kromatografisi

kullanılmıştır. Bu araştırmada Iğdır Elmasından saflaştırılan PP0 enziminin bazı özellikleri incelenmişltir. Enzim üzerine sıcaklık etkisi, iyonik şiddet etkisi, pH etkisi ve bazı kimyasalların inhibisyon etkisine bakılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, paminobenzoik asit, L-tirozin, standart serum albumin, TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den; sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum sitrat, sodyum sülfat, bakır sülfat, glukoz, sitrik asit, EDTA, trihidrosimetil aminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum azid, hidroklorik asit, sodyum nitrit, sodyum dihidrojen fosfat, Potasyum bifosfat, sodyum bikarbonat, polietilenglikol (PEG), coomassie brillant blue, Glisin, katekol, 2-merkaptaetanol, Merck A.G'den; askorbik asit (vitamin C) eczaneden sağlandı.

2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

1- Peristaltik pompa: Ismatec, MCP-Standart / Easy-load
2- Klinik santrifuj: Hettich EBA 3-S
3- Soğutmalı santrifuj: Hereaeus Sepatech
4- pH metre: CG 840 Schott
5- Manyetik karıştırıcı: IKA Combimag RCO.
6- Hassas terazi: Gee Avery
7- Karıştırıcı(vorteks): Vortex- Genine
8- Kromatografi kolonu: Sigma chemical
9- Otomatik pipetler: Volac R 880/D
10- Spektrofotometre: LKB-Biochrom, Ultrosec-II Model 4050
11- Kronometre:Larus JAPAN
12- Afinite kolonu: Sigma 1.3 x 18 cm

2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

2.3.1. Ekstraksiyon tamponu: % 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit içeren 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.3); 8.7 gr (0.05 mol) K_2 HPO_4, 0.5 gr polietilen glikol (PEG) 80 mL saf suda çözüldü, l M HCI ile pH 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi ve son hacim destile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

2.3.2. Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar: 0.1 M $NaHCO_3$ Tamponu (pH 10.0); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHC0_3$ 950 mL destile suda çözülerek, l N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile l L'ye tamamlandı.

0.2 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 8.8); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHC0_3$ 450 mL destile suda tamamlandı.

0.01 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.0); l .42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 950 mL destile suda çözülerek, l N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile l L'ye tamamlandı.

2.3.3. Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar: 0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. 0.05 M fosfat tamponu (pH 6.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HP0_4 450 mL destile su İçinde çözülerek pH'sı 6.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2.3.4. Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elusyonu için kullanılan çözelti:

0.05 M Na_2PO_4 l M NaCl fosfat tamponu (pH 8.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 8.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'te tamamlandı.

2.3.5. Optimium pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler: pH 4-4.5 aralığında 0.1 M sitrat / 0.2 M K_2HPO_4 tamponu**;** Bu

tampon için 2.94 gr sodyum sitrat (0.01 mol), 3,48 gr (0.02 mol) K_2HPO_4 80 mL saf suda çözülerek l M NaOH veya l M HC1 yardımıyla istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile hacim 100 mL' ye tamamlandı.

pH 5-7 aralığında 0.2 M fosfat tamponu; Bu tampon çözelti için 3.48 gr K_2PO_4 80 mL saf sudaçözüldü, 1 M HCI ile çözelti istenen pH' ya ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

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

2.3.6.İnhibisyon etkisi incelenecek kimyasal çözeltilerinin hazırlanması:

İnhibisyon etkisi incelenecek kimyasalların çözeltilerinin hazırlanmasında her bir madde için molekül ağırlıkları göz önüne alınarak yapılan hesaplamalarda 0.4 mM konsantrasyonlarda çözelti hazırlamak için gerekli madde miktarı tespit edildi. Tespit edilen bu miktarlar tartılarak hacimleri saf su ile 1000 ml ’ ye tamamlandı. Böylece 0.4 mM’lık inhibitör çözeltileri hazırlanmış oldu ve konsantrasyonlar değiştirilerek değişik inhibitör konsantrasyonlarında inhibisyon kinetikleri incelendi.

2.4. Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Araştırmada kullanılan Iğdır Elması (*Malus domestica*) Iğdır yöresinden temin edildi. Meyve, çalışmada kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-70 °C) muhafaza edildi. Ham ekstraktın hazırlanması amacıyla, 50 g meyve 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ihtiva eden) 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.30) içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü 20000xg ve +5 °C' de l saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı (Yerlitürk, 2003).

2.4.2. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

2.4.2.1. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin serbest –OH gruplarının modifikasyonunda yaygın olarak CNBr yönteminden yararlanılmıştır (Pathak ve ark., 1992). Aynı metot üretici firma tarafından önceden aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilmiş olan Sepharose- 4B'ye L-tirozin bağlandı. Reaktif türevde tirozine diazolanmış p-aminobenzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Burada, tirozin afinite jelinin uzantı spesifik olarak bağlayan kısmını (ligandını) oluşturmaktadır, p-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı, kolonu, p-aminobenzoik asit ise enzimipesifik olarak bağlayan kısmını (ligandını) oluşturmaktadır, p-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı;

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

10 ml' lik yatak hacmi için 2.86 g kuru aktifleşmiş CNBr Sepharose 4-B jeli tartıldı.Tartılan aktifleşmiş sepharose 4-B bir miktar destile su ile iyice yıkanarak safsızlıklar uzaklaştırıldı. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 $NaHCO_3$ tampon çözeltisi ile (pH 10.0) yıkandı. 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edildi ve 90 dakika karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 420 nM'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0.2 M $NaHCO_3$ tamponu ile (pH 8.80) tekrarlandı. Tirozinle modifiye Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Yerlitürk, 2003).

• p-aminobenzoik asidin bağlanması(Ligandın bağlanması)

25 mg p-aminobenzoik asit, 0°C civarında 10 mL l M HC1 içerisinde çözüldü. 75 mg $NaNO_2$ ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla akıtıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazonlanmış bulunan p-aminobenzoik asit, 40 mL sepharose-4B-Ltirozin süspansiyonunna ilave edildi. pH 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve ardından 200 mL 0.01 M Na_2HPO_4 (pH 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Yerlitürk, 2003).

2.4.2.2. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat (pH 5.00) ile dengelendi. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M fosfat tamponu (pH 6.00) ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0.05 M Na_2HPO_4 /1M NaCl tamponu (pH 8.00) ile enzim elüsyonu ve 3'er mL fraksiyonlar halinde gerçekleştirildi. Toplanan tüplerde 420nM'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Elüatlarda Bradford metoduyla kantitatif, 420 nm'de kalitatif protein ve 420 nM'de enzim aktivite tayini yapıldı (Yerlitürk, 2003).

2.4.2.3. Saflaştırılan enzim çözeltisinin diyalizi

Saflaştırılan enzim çözeltilerinden yüksek oranda protein ihtiva edenler diyaliz torbasına konuldu. İlk önce destile suya karşı her 3 saate bir suyu değiştirerek toplam 24 saat, sonra fosfat tampon çözeltisine karşı 4 saat kadar diyalize bırakıldı. Diyaliz işlemi mağnetik karıştırıcı üzerinde ve buzdolabında (+4 ^{0}C) gerçekleştirildi (Cuatrecases, 1970). Böylece enzim çalışmalar için hazır hale getirilmiş oldu.

2.4.3. Protein tayini

2.4.3.1. Kalitatif protein tayini

Çalışmamızda yapılan kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen eluatlar eşit hacimde alınıp, bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntemle yapılan kalitatif protein tayinin temel prensibi proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip olan amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 595 nmde UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Jaenicke, 1984). Fraksiyonların, absorbanslan (kuvartz küvetlerde) spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak alındı.

2.4.3.2. Coomassie Blue yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde ettiğimiz fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu metot o-fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmaları ve oluşan bu kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermeleri esasına dayanır. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı olmaktadır (ortalama 2 dak.). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Protein tayin işlemleri şu şekilde gerçekleştirildi; 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 90 µl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0.1 ml'ye tamamlandı. Her bir tüpe 5 ml Coomassie blue reaktifi eklendi ve vortex mikser ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra, 595 nM'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart bir grafik elde edildi. Enzim çözeltisindeki protein miktarları bu grafik yardımıyla hesaplandı (Şekil 3.1.).

2.4.4. PPO enziminin aktivite tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spetrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümünde, 0.2 mL enzim çözeltisi alınıp önceden hazırlanmış olan 2.8 mL tampon + 0.2 mL substrat (0.1 M katekol) çözeltisine hızlı bir şekilde eklendikten sonra 585 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu, l Enzim ünitesi (U) reaksiyonun oluştuğu küvette l dakikada meydana gelen 0.001'lik artış olarak

tanımlandı. Aktivite birimi olarak "l mL enzim çözeltisi başına l dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişme" kullanıldı.

2.4.5. PPO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar

PPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için optimum pH, iyonik şiddet ve sıcaklık değerleri belirlendi. Kullanılan her bir substrat için Km ve Vmax değerleri saptandı.

2.4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek için değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) substrat olarak katekol kullanılarak reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlendi. Her ölçüm üç kez tekrarlanarak çıkan değerlerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum pH değeri tespit edildi.

2.4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerini belirlemek için değişik sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C' de) substrat olarak katekol kullanılarak reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlendi. Her ölçüm üç kez tekrarlanarak çıkan değerlerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum sıcaklık değeri tespit edildi.

2.4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek için sabit sıcaklıkta (37^oC de) ve sabit pH' da (7,4); 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.10 M 0.12 M, 0.14 M, 0.16 M, 0.18 M 0.20 M, konsantrasyonlarda amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

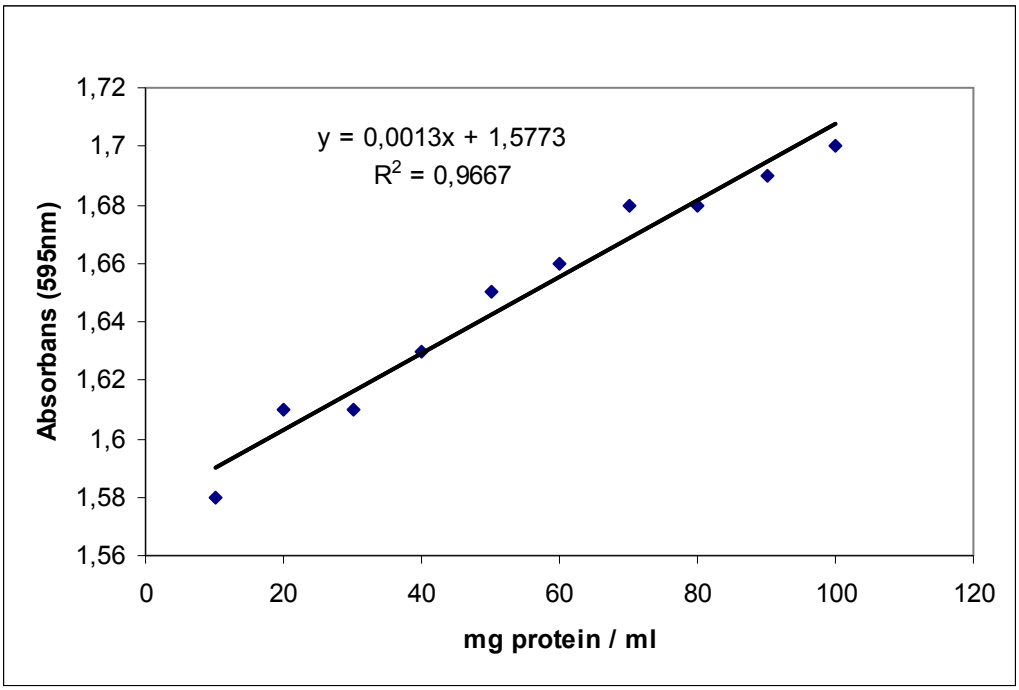
2.4.5.4. Enzim üzerine bazı kimyasalların inhibisyon etkisi

Bu çalışmada inhibitor olarak bakır sülfat, 2-merkaptoetanol, tirozin, sitrik asit ve sodyum bisülfat kimyasalları kullanıldı. Sabit ilaç konsantrasyonunda beş farklı hacimde enzime katılan ilaçların aktivite üzerine etkileri saptandı (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6ml). Madde katılmadan önceki aktivite % 100 olarak kabul edildi (Çifçi ve ark., 2000).

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayini için Coomassie Blue yöntemi kullanıldı. Coomassie Blue yönteminde tayin yapabilmek için önce bir standart grafik hazırlandı. Grafik çizimi bilgisayarda Mikrosoft Excel paket programına göre hazırlandı. Ekstrakttaki ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları bu grafik yardımı ile hesaplandı. Standart grafiğin çiziminde kullanılan çözeltilerin, değişik µgprotein/ml konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorbans değerleri Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



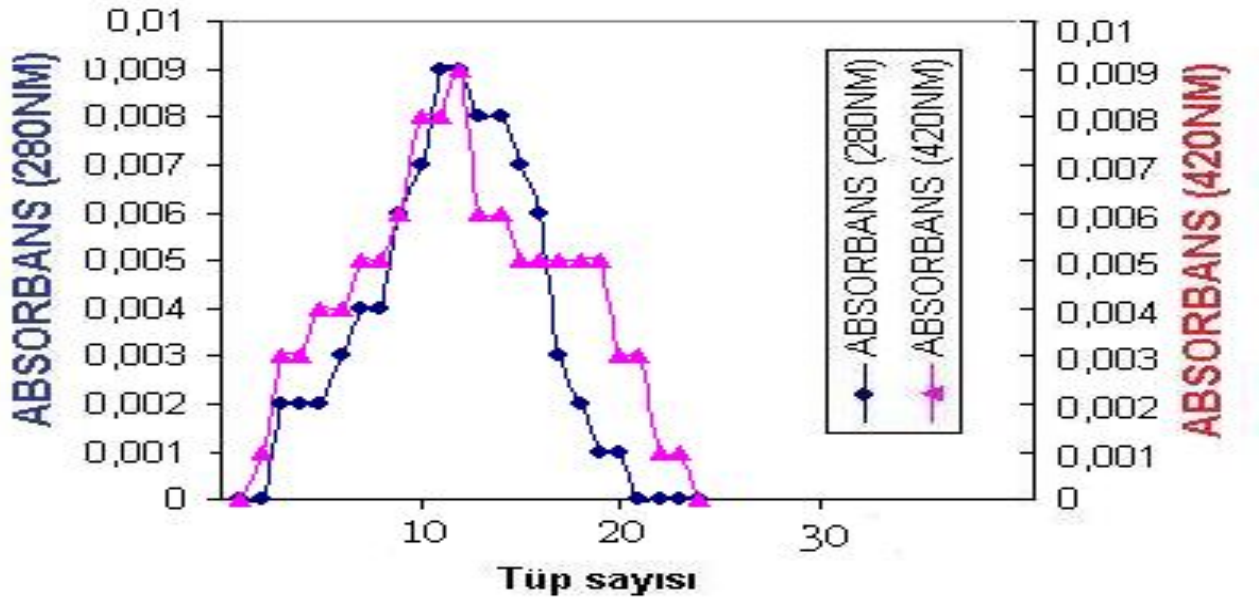
Şekil 3.1. Commassie Blue Yöntemiyle protein tayini için hazırlanan standart grafik

3.2. PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Enzimin saflaştırılması işleminde, homojenat kolona hazırlanan afinite kolonu önce 0.05 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Santrifüj

edilerek hazırlanan enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon 0.05 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile yıkandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon, 0.05 M Na_2HPO_4 / 1 M NaCl tamponu (pH 8.00) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan eluatlar 3'er mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 595 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu, kör olarak kullanılarak her bir tüpte 595 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de de aktivite tayini yapıldı (Şekil 3.2.). Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen eluat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Çizelge3.1.'da verildi.



Sekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayin grafiği

Homojenat için yapılan protein tayininde ml'deki protein miktarı 138.2 mg olarak bulundu. Enzim ünitesi 334 EÜ/ml olarak hesaplandı. Homojenat için spesifik aktivite

$$\frac{EÜ\ /\ ml}{mgprotein\ /\ ml} = \frac{334}{138.2} = 2.41$$

olarak bulundu.

Saflaştırma sonucu elde edilen enzim çözeltisinin, Coomassie blue yöntemi ile protein miktarına ve polifenol oksidaz aktivitesine bakıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi için ml'deki enzim ünitesi 589 EÜ ml'deki protein miktarı da 2.21 mg olarak bulundu.Enzim çözeltisi için spesifik aktivite:

$$\frac{EÜ / ml}{mgprotein / ml} = \frac{589}{2.21} = 266.52$$

olarak bulundu.

Saflaştırma oranını bulmak için saflaştırma sonucundaki spesifik aktivite değeri, başlangıçtaki spesifik aktivite değerine bölünür. Buna göre;

$$Saflaştırmaoranı = \frac{266.52}{2.41} = 110.58$$

kat olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerlere göre homojenatın doğrudan affinite kolonuna uygulanması sonucunda, homojenattan enzim 110.58 kat saflaştırılmış oldu.

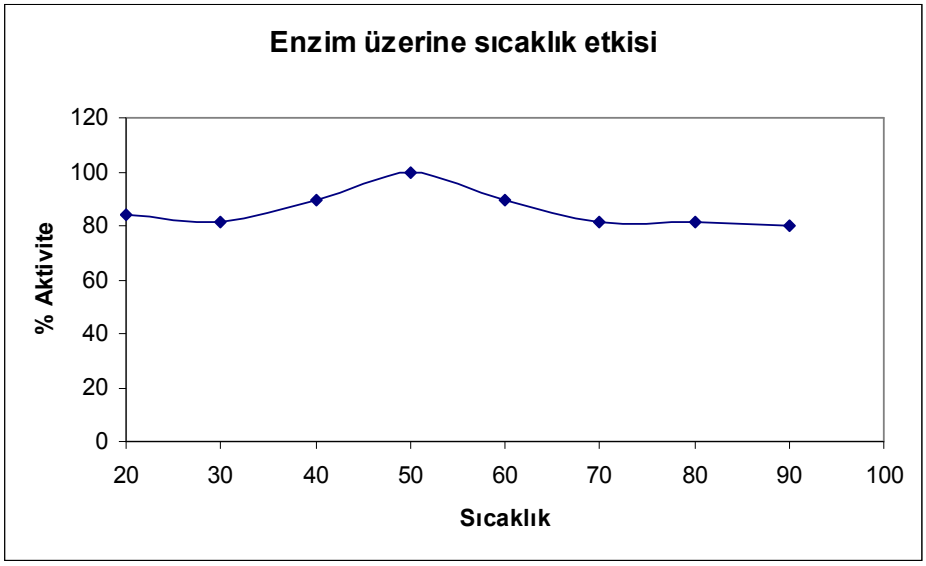
Çizelge3.1. Iğdır elmasından saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	*Hacim*	*Enzim Aktivitesi (EÜ/ml)*	*Top. Enzim Ünitesi (EÜ)*	*Toplam Protein (mg/ml)*	*Spesifik Aktivite (EÜ/mg.pro)*	*Saflaştırma Katsayısı*
Homojenat	50	334	16700	138.2	2.42	-
Afinite Kolunu	45	589	26505	2.21	266.52	110.580

3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın, enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları üzerine etkileri bilinmektedir. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları genellikle optimum sıcaklığa kadar doğru orantılı bir şekilde artar. İlk başta sıcaklığın artması ile birlikte ortamın kinetik enerjisi de artar ve buna paralel olarak hızda artar. Belli bir sıcaklıktan

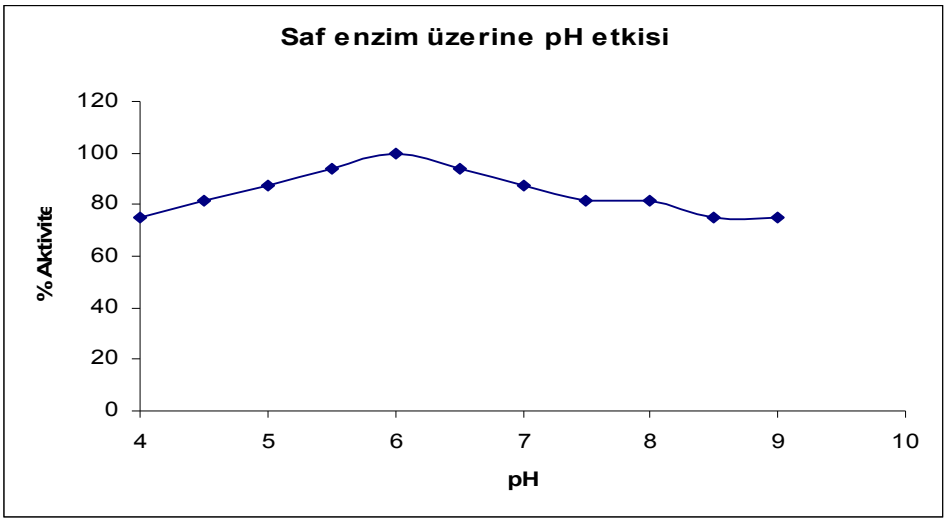
sonra enzimlerin fonksiyon gören üç boyutlu yapılarında bozulmaların meydana gelmesiyle aktivitelerinde de bir azalma meydana gelir. PPO enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacı ile değişik sıcaklık değerlerinde (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C) katekol substratı kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3.Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği

3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

PPO enziminin aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) katekol substratı kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.4'de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar şekil 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.4.Enzimaktivitesinin pH'ya bağlı grafiği

3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi

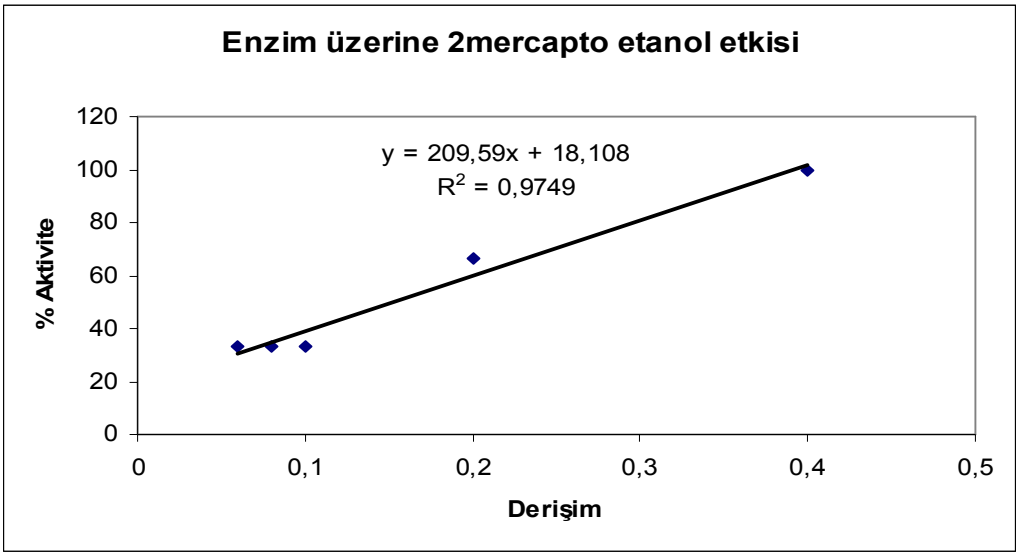
Enzimin iyonik şiddete karşı gösterdiği davranışlar şekil 3.5.'da gösterilmiştir. Buna göre en yüksek aktivite 0.16 Molar $(NH_4)_2SO$ konsantrasyonunda göstermektedir. Her protein farklı iyonik şiddetli ortamda çökelme gösterdiğinden bu yolla proteinler birbirinden ayrılmaktadır. Proteinler salting-out sırasında konformasyonlarını korurlar ve uygun ortamlarda tekrar çözelti fazına alınabilirler. İşte enzimler en uygun tuz konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterirler.



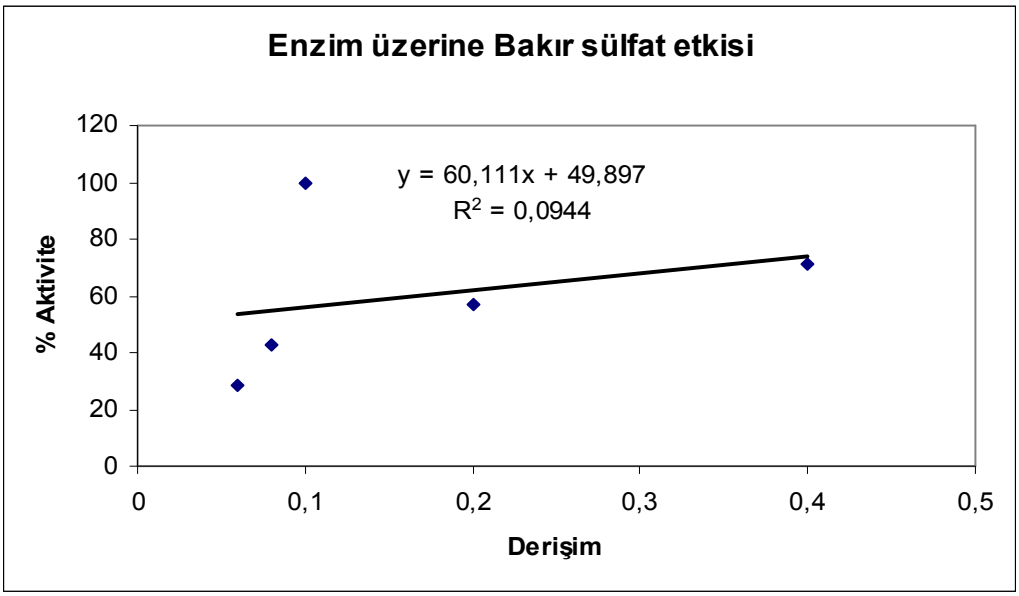
. Şekil 3.5. Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlılığını gösteren grafik.

3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların İnhibisyon Etkisi

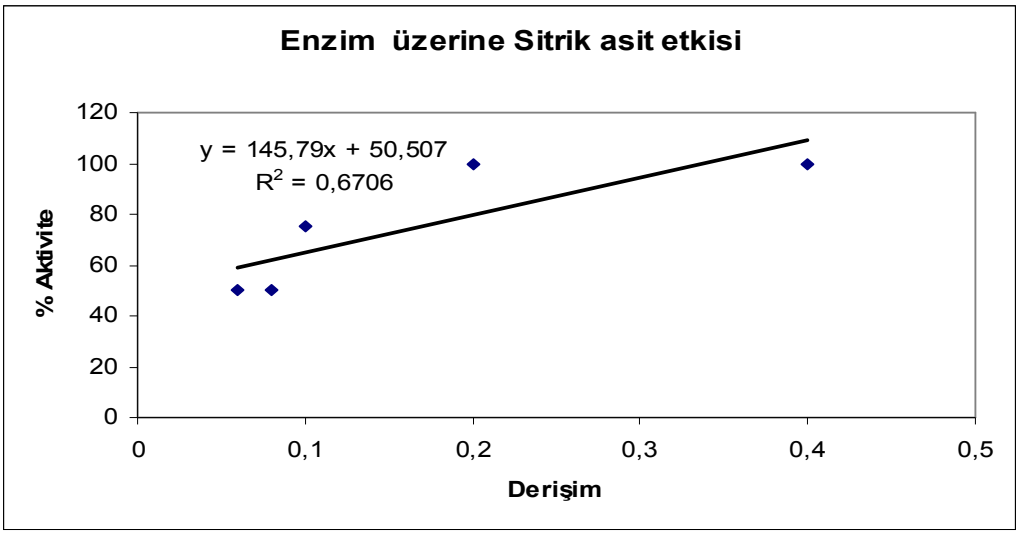
Her kimyasal madde için ilave edilen madde miktarıyla % aktivite grafikleri çizildi. Ki değerleri Lineweaver-Burk denkleminden saptandı. Bütün kinetik incelemeler 25 ^{o}C'de ve optimal pH'da yapıldı (fosfat tamponu, pH 8.5).



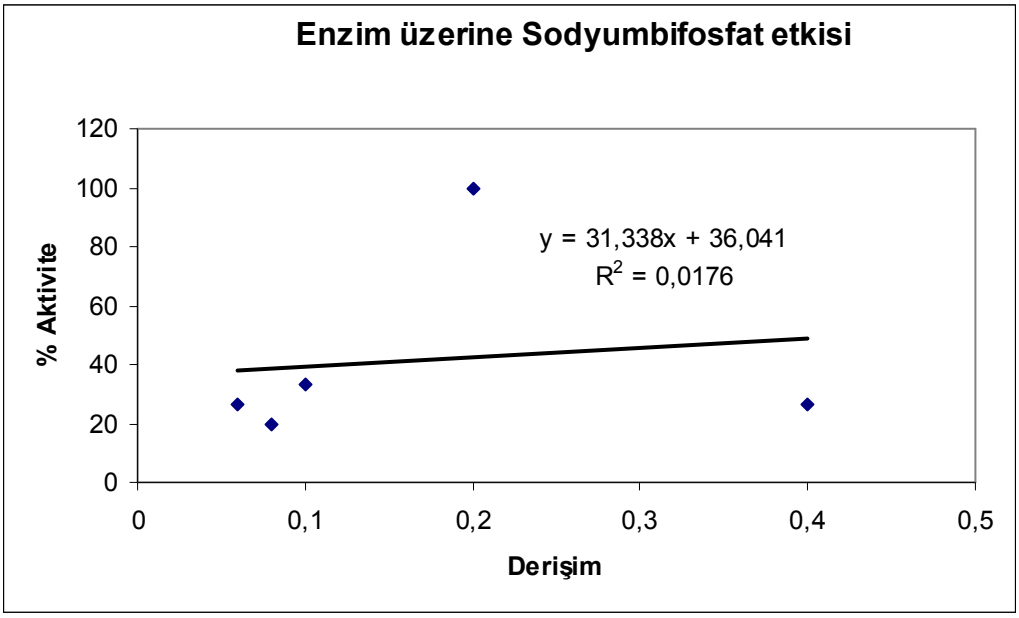
Şekil 3.6. 2- merkaptoetanol için % aktivite-[I] grafiği



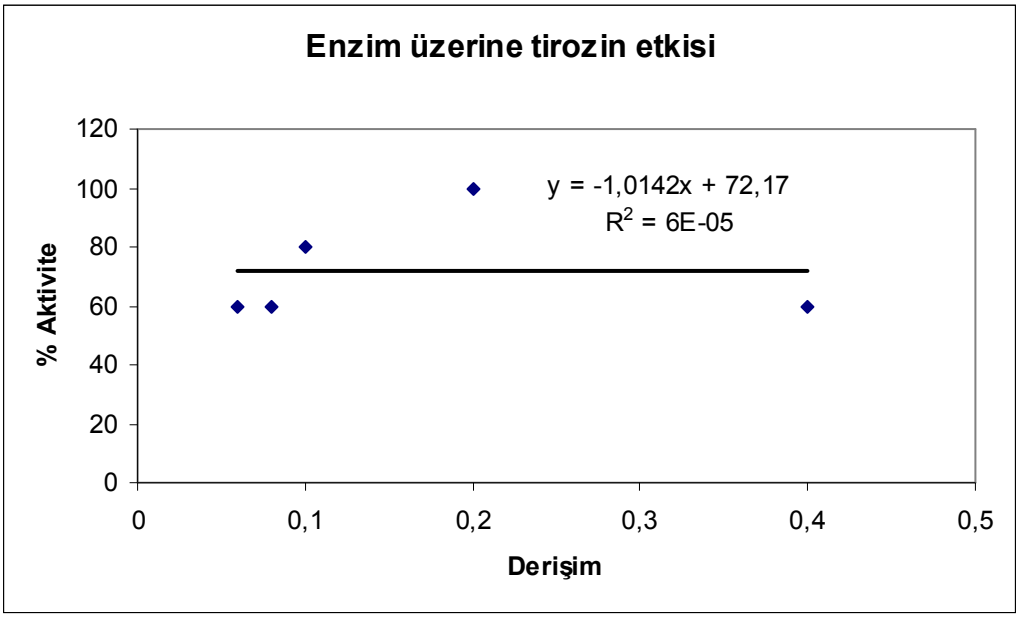
Şekil 3.7. Bakır sülfat için % aktivite -[I] grafiği



Şekil 3.8. Sitrik asit için % aktivite -[I] grafiği



Şekil 3.9. Sodyum bifosfat için % aktivite -[I] grafiği



Şekil 3.10. Tirozin için % aktivite -[I] grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Iğdır Elması'ndan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin özellikleri ve enzim üzerinde bazı kimyasalların inhibisyon etkisi incelenmiştir. Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelen zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. PPO enzimi katalizi enzimatik kararma reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir.

Yaptığımız bu çalışmada polifenol oksidaz enzimi saflaştırılarak çeşitli özellikleri incelenmiş ve bazı kimyasalların inhibisyonuna bakılmıştır. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak alınacak tedbirler sayesinde hem meyvenin doğal rengi hem de içeriğinin korunması hedeflenecektir.

PPO aktivitesi, substratın kaybolma ya da ürünün oluşma hızını ölçmekle belirlenebilir. Ürünün oluşma hızı, kinonlarda oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluklarının spektrofotometrik metotla ölçülmesiyle tayin edilmektedir. Bu metot uzun zaman aralıklarında kullanılabildiği için rutin analizlerde ve polorografik metota nispeten daha fazla kullanılmaktadır. Ayrıca bu metodun diğer metotlar kadar hassas ve güvenilir olduğu bilinmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Bu nedenle bu çalışmada spektrofotometrik metot ve 420 dalga boyu kullanılmıştır (Park ve Luh, 1985; Rivas ve Whitaker, 1973; Ebeling ve Montgomery, 1990). Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin "matriks" adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand), spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede zor ve bazı hallerde imkansız olan birçok ayırma tekniklerine oranla kısa zamanda saflaştırma gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimle binlerce saflaştırılan bileşikler elde edilmektedir (Cuatrecases, 1970). Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit kimyasal yapısındaki afinite jeli kullanılarak, Iğdır elmasından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması laboratuarımızda gerçekleştirilmiştir. Söz konusu olan bu enzimin kolondan elüsyonu için en uygun elüsyon çözeltisinin 1M NaCl içeren 0.05 M tamponu (pH=8) olduğu tespit edilmiştir.

Afinite kolonunda aktifleşmiş Sepharose-4B matrisi üzerine hazırlanmış afinite jeli kullanıldı. Sepharose-4B'nin seçilmesinin başlıca sebebi, çok iyi akış özelliğine

sahip olması ve ayrıca serbest –OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir sürede aktifleşebilmesidir. Aktif haldeki Sepharose-4B'ye tirozin kovalent olarak takılmış daha sonra p-aminobenzoik asit tirozine kenetlendirilmiştir. p-aminobenzoik asit, enzimin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinde enzimi bağlayıcı rolü üstlenmektedir. Tirozin ise, afinite jelinin uzantı kolunu oluşturarak enzimin daha iyi tutunmasını sağlamaktadır. Çünkü polifenol oksidaz enziminin aktif bölgesindeki globuler protein yapısının 12-15 AO derinliğinde olduğu x-ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Küfrevioğlu, 1985). Protein miktarlarının belirlenmesinde Coomassie Blue yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre stabil olarak kalması, hassasiyet sınırının çok iyi olması ve enzim çözeltilerinin μg seviyesinde bulundurmasıdır (Bradford, 1976). Ayrıca bu metodun diğer önemli bir yanı ise, az reaktif gerektirmesi her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya gereksinim duyulmamasıdır.

Ligand olarak polifenol oksidaz enzimini daha fazla tutma kapasitesine sahip polifenol oksidaz inhibitörlerinden biri olan p-aminobenzoik asit kullanılmıştır. Bu inhibitör literatürde en iyi ligand olarak gözükmektedir ve bu ligand'ın afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enzimin saflaştırılması çalışmalarında kısıtlı sayıdadır. Yapılan bazı çalışmalarda PPO enzimin saflaştırılması çalışmalarında ligand olarak tropole, metinazol, L-mimozin, 2- merkaptobenzimidazol, 2-merkaptobenzotiyazol gibi maddelerde kulanılmıştır (Yerlitürk, 2003).

Afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması esnasında elüatların protein muhtevaları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, protein yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Jacnicke, 1984).

Meyve dokularındaki PPO ekstraksiyonu için çeşitli tamponlar kullanılmakta ve pH değeri enzim kaynağına göre değişmektedir. pH genellikle az bazik ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tampon pH'sı elde edilen enzimi etkileyebilir. Literatürlerde de belirtildiği gibi çalışmamız için 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.3) kullanılmıştır.

Enzimin kolana adsorpsiyonu literatürde en yüksek saflaştırma derecesi pH=6'da elde edildiği için çalışmamızda adsorpsiyon işlemi pH=6'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda elusyon çözeltisi olarak 1M NaCl içeren 0.05M tamponu (pH=8)

kullanılmıştır. Bunun en önemli nedenleri yüksek saflıkta enzim elde edilmesinin yanında NaCl' nin enzime zarar vermemesi ve diyalizle kolayca uzaklaştırılmasıdır.

Saflaştırma katsayısı ferula sp' de polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmasında yapılan çalışmada jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 43.33 kat PPO saflaştırılmıştır (Erat ve ark., 2006). Ankara armudu üzerinde yapılan bir çalışmada ise PPO enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır ve bu çalışma sonucunda saflaştırma katsayısı 13.30 kat olarak bulunmuştur (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004). Yine yapılan başka bir çalışmada ise elmada PPO saflaştırılmış ve saflaştırma katsayısı 25 kat PPO saflaştırılmıştır (Jharna ve ark., 1997). Van bölgesinde yetişen elma (*golden delicious*) üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise polifenol oksidaz enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmış ve bu yapılan çalışmada saflaştırma katsayısı 4.0 kat olarak saptanmıştır (Demir ve ark., 2006). Sodyum fosfat tamponu (pH=6) tamponu ile dengelenmiş kolondan PPO için 110 kat saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Bu değer afinite kromatografisi yardımı ile yapılmış olup bulunan saflaştırma katsayısı değeri literatür değerlerine yakın bulunmuştur(Çimen, 2007) Iğdır elmasından yapılan bu çalışmada bulduğumuz saflaştırma katsayısının yüksek olmasının muhtemelen sebebi, birincisi afinite kromatografisi kullanılarak PPO saflaştırmak ki literatürde kısıtlı sayıdadır, ikincisi Iğdır elmasının türü olan (*starking*) cinsinin yüksek miktarda PPO içermesidir.

Literatür çalışmalarında PPO için elde edilen optimum sıcaklık değerleri patates için 22^{o}C' de katakol substratı için maksimum aktivite bulunmuştur (Schaller, 1972). Yapılan bir çalışmada ferula sp' de polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmış ve enzimin kinetik özelikleri incelenmiş ve enzimin optimum pH'ı katekol substratı için 7 olarak saptanmıştır aynı çalışmada optimum sıcaklık ise 12^{o}C olarak bulunmuştur (Erat ve ark., 2006). Yapılan başka bir çalışmada ise Anamur muzunda optimum sıcaklık 30^{o}C olarak saptanmıştır (Ünal, 2005), aynı çalışmada optimum pH ise 7 olarak bulunmuştur. Ankara armudu üzerinde yapılan bir çalışmada katekol substratı kulanılarak optimum pH 7.0 olarak bulunmuştur aynı çalışmada optimum sıcaklık ise 20^{o}C olarak saptanmıştır (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004). *Cynara scolymus L* 'dan polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmış ve optimum pH 5.0-7.0 olarak bulunmuş ve sonuçlar çok yönlü olarak tartışılmış ve adı geçen aynı çalışmada optimum sıcaklık ise 25^{o}C olarak saptanmıştır (Aydemir, 2004).

Değişik çalışmalarda elde edilen PPO enzimlerinin optimum pH'ları sırasıyla; yeşil zeytin için 4-5, patates için 5, muz ve *Dioscorea bulbifera* için optimum pH 7.0 olarak bulunmuştur (Palmer, 1963; Anosike ve Ojimelukwe, 1982; Ben-Shalom ve ark., 1997; Balasingam ve Ferdinand, 1997). Hindistanda yapılan bir çalışmada elmada polifenol enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyonu incelenmiştir elma üzerinde yapılan bu çalışmada optimum pH 6-7 arasında bulunmuş yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılmıştır (Jharna ve ark., 1997). Van yöresinde yetişen elma üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise polifenol oksidaz enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. yapılan bu çalışmada optimum pH 4.0 olarak bulunmuş aynı çalışmada ayrıca optimum sıcaklık ise 50^{o}C olarak saptanmıştır (Demir ve ark., 2006). Iğdır elmasından saflaştırılan polifenol oksidaz enzimin optimum pH 6.0 olarak tespit edildi diğer yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında literatür çalışmaları ile uyum içersinde olduğu görülmektedir (Jharna ve ark., 1997; Aydemir, 2004; Ziyan ve Pekyardımcı, 2004; Ünal, 2005; Erat ve ark., 2006). Sıcaklık ile optimum çalışmasında ise Iğdır elmasından elde edilen enzimin optimum sıcaklığı 30^{o}C olarak saptandı bulunan bu değer Anamur muzundan elde edilen PPO enzimin optimum sıcaklığına benzer bir değerde bulunmuştur (Ünal, 2005). Ama literatür çalışmalarında optimum sıcaklık meyve, sebze ve polifenol oksidaz kaynaklarına göre türden türe farklılık arz etmektedir (Jharna ve ark., 1997; Aydemir, 2004; Ziyan ve Pekyardımcı, 2004; Demir ve ark., 2006; Erat ve ark., 2006).

İyonik şiddetin polifenol oksidaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılmasında en yüksek aktiviteyi 0.16 M $(NH_4)_2SO_4$ derişimlerde gösterdiği saptandı. $(NH_4)_2SO_4$ amonyum sülfatın suda çok iyi çözünmesi ve çok yüksek iyonik şiddet özelliği göstermesinden dolayı iyonik şiddet çalışmalarında bu çözelti kullanıldı yapılan bu araştırma literatür çalışmaları ile uyum içersinde olduğu söylenebilir.

İnhibisyon ile ilgili çalışmalarda çok sayıda inhibitörler kulanılmıştır yapılan bir çalışmada askorbik asit, sistein, potasyum metabisülfit, sinamik asit, resorsinol ve EDTA ile polifenol oksidaz üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmış ve bu maddelerin iyi birer PPO inhibitörleri oldukları saptanmıştır (Jharna ve ark., 1997). Yapılan başka bir çalışmada ise PPO enzimi üzerinde sodyum metabisülfit, sodyum azid, okzalik asit, askorbik asit, sodyum dietil dikarbomat, tiyoüre ve beta-merkapto etanollün inhibisyon etkileri araştırılmış, sodyum azid, glutatyon, sodyum metabisülfit, sodyum dietil

dikarbomat, okzalik asit ve tiyoüre nin yarışmasız inhibisyon; beta-merkapto etanol ve askorbik asidin yarışmalı inhibisyon oldukları bulunmuştur (Aydemir, 2004). Ankara armudu üzerinde yapılan bir araştırmada ise askorbik asit, sistein, sodyum azid, sodyum dietil dikarbomat, tiyoüre ve beta-merkapto etanollün inhibisyon etkileri incelenmiş ve askorbik asit, sistein ve sodyum dietil dikarbomattın en etkili inhibitör oldukları saptanmıştır aynı çalışmada askorbik asit, sistein, sodyum azid, sodyum dietil dikarbomattın yarışmalı, beta-merkapto etanollün ise yarışmasız inhibisyon oldukları bulunmuştur (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004). Yapılan bir çalışmada ferula sp' de polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmış ve enzimin kinetik özelikleri incelenmiş ve çeşitli kimyasalların inhibisyon etkileri araştırılmıştır ve sodyum dietil dikarbomat, sodyum metabisülfit, betamerkapto etanol, askorbik asid ve L-sistein klorürün içersinde sodyum dietil dikarbomat ve sodyum metabisülfittin en etkili inhibitör oldukları saptanmıştır adı geçen çalışmada askorbik asidin yarışmasız, diğer kimyasalların yarışmalı oldukları tesbit edilmiştir (Erat ve ark., 2006). Patatez üzerinde yapılan bir araştırmada glisin ve glukoz inhibitör olarak seçilmiş ve bu iki maddenin çok güçlü birer inhibitör oldukları bulunmuştur (Lee ve Park, 2005). Yapılan bir çalışmada Van elmasından PPO enziminin saflaştırılmasında Potasyum siyanür, benzoik asit, mangan klorür, sodyum klorür, sodyum nitrit, sitrik asit ve bakır sülfat gibi inhibitörler kullanılmış ve en güçlü inhbitörler bakır sülfat, benzoik asit ve sodyum klorür olarak saptanmıştır (Demir ve ark., 2006). Iğdır elmasından saflaştırılan PPO enzimi üzerinde 2mercaptoetanol, Bakır sülfat, sitrik asit, Sodyum bifosfat ve tirozin gibi inhibitörler kullanılmıştır ve bu maddeler birer iyi inhibitör oldukları çalışmada bulunmuştur.

Iğdır elmasından saflaştırılan PPO enzimin yüksek miktarda saflaştırılması ve bu saflaştırmanın literatüre katkı yapacağı kanısındayız ve bu çalışmanın bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

Aldemir, S., 2002. ***Koyun Karaciğerinden Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin (E.C.1.1.1.49) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*** (yüksek lisans tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

Alırız, S., 2000. ***İnci Kefalinden (Chalcalburnus tarichi, Pallas 1811) Asetilkolin esteraz Enziminin (E.C.3.1.1.7) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması*** (yüksek lisans tezi).Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

Anosike E. O., Ojimelukwe P. C., 1982. Partial purification and characterizatin of polyphenol oxidase from cocoyam, *X anthosoma sagitifolium*, ***J. Exp. Bot.,*** **33:**487.

Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I., 1997. Polyphenol oxidase from *Allium sp*. ***J. Agric. Food Chem.,*** **45:**2861.

Aydemir, T., 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). ***Food Chemistry,*** **87:**59–67.

Balasingam, K., Ferdinand W., 1997. "The purification and properties of a ribonucle enzyme, o-diphenol oxidase, from patotoes", ***Biochem J.,*** **15:**118.

Beena, P., Gowda, L. R., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from the seeds of field bean, ***J. Agric. Food. Chem.,*** **48:**3839.

Benjamin, N. D. and Montgometry, M. W. 1973. Polyphenol Oxidaze of Royal Ann Cherries: Purification and Characterization. **J. Food Sci, 38**, 799.

Ben-Shalom, N., Kahn V., Harl E., Mayer A. W., 1997. "Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification **",** ***Phytochem.*****, 16:**1153.

Bingöl, G., 1983. ***Biyokimya.*** Güven Matbaası. Ankara. 169-174.

Bleslermann, W. 1956. Oxydation in obst. and obstsuffen. ***Mit Geb. Lebensmit Chmters., Hyg,*** 47-86.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding**.** ***Anal. Biochem*****.,** **72**(7):248.

Bolin, H.R. and Steele, R. J. 1987. Nonenzymatic Browning in Dried Apples During Storage. ***Journal of Food Science, 52***(69); 1654-1657.

Cano, M. P., Ancos, B. and Lobo, G. 1995. Peroxidase and polyphenol oxidase activities from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits. ***J. Agric Food Chem.***, 44, 3057-3079.

Cano, M.P., Lobo, M.G., Ancos, B., Galeazzi, M.A.M., 1996. Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits. ***J. Agric Food Chem***., 44, 3075- 3079.

Cash, J. N., Sistrunk, W. A. and Stutte, C.A. 1976. Characteristics of Concord Grape Polyphenol Oxidase Involved in Juice Color Loss. **J. Food Sci., 41**, 1398.

Champe, P. C., Harvey, R. A.,1997. ***Biyokimya.*** İkinci baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.İstanbul. 442.

Cemeroğlu, B. and Acar, J. 1986. ***Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No: 6***, 512s., Ankara.

Chevalier, T., Rigal, D., Mbe´guie´-A-Mbe´guie´, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., Fils- Lycaon, B. R., 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. ***Plant Physiology,*** **119:**1261-1269.

Corsini, D. L., Pavek, J. J. and Deab, B. 1992. ***Difference in free and protein-bound tyrosine among potate genotypes and their relationship to internal balackspot resistance, Am. Pot. J. 69***, 423-434.

Coseteng, M.Y., Lee, C.Y. 1987. Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relayion to Degree of Browning. **Journal of Food Science, 52** (4); 985-989.

Cuatrecases, P., 1970. Protein purification by affinity chromotography. ***The Your ofBiochem.,*** **245**(11):3059-3065.

Çifçi, M., Kührevioğlu, İ., Gündoğdu M., Özmen, İ., 2000. Effects of some antibioties on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erytrocytes. ***Pharma Research,*** **41:**111-112.

Çimen, Ç., 2007. ***Iğdır Kayısısından (Şalak) Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerinde Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Kinetiğinin Araştırılması*** (yüksek lisans tezi). Yüzüncü Yıl Ünüversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O., 2005. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). ***J. Agric. Food Chem.,*** **53**(3)**:**776-785.

Demir, H., Yörük, İ. H., Savran, A., Ekici, K., 2006. Prufication and properties of polyphenol oxidase from Van Apple (*Golden Delicious*). ***Asian. J. Chem.***, **18**:475-480.

Ebeling. P. W., Montgomery, M. W., 1990. Strawberry polyphenoloxidase. purification and characterization, ***J. Food Sci.,*** **55:**1315.

Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O. K., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp.* ***Food Chemistry,*** **95:**503–508.

Euclides, J.L., Souza, L.J., Valdir, A. N., 1990. Heat inactivation and kinetics of polyphenol oxidase from palmito ***J. Sci. Food Agric.,*** **52:**249.

Flurkey, W. H., Jen, J. J., 1980. Purification of peach polyphenoloxidase in the presence of added protease inhibitors, ***J. Food Biochem.,*** **4**(8):29.

Flurkey, W. H., 1989. Polypeptide compasition and amino terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase, ***Plant Physiol.,*** **91:**481

. Friedman, M. 1997. Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. J. Agric. ***Food Chem., 45***; 1523-1540.

Fujita, S. and Tono, T. 1988. Purification and some properties of polyphenoloxidase in Eggplant (Solanum melongena). J. Sci. ***Food Agric., 115***-123.

Galeazzi, M. A., Sgarbieri, V. C., 1978. ***"Banana Polyphenoloxidase. Varieta Differences and Partial Characterization in Sth Int. Congr", Food Sci. Technol***, Kyoto, Japan, 237.

Golan-Goldhirsh, A. and Whitaker, J. R. 1984. Effect of Ascorbic Acid, Sodium Bisulfite, and Thiol Compounds on Mushroom Polyphenol Oxidase***. J. Agric. Food Chem., 32***, 1003.

Golbeck, J. H., Cammarata, K. V., 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme, ***Plant Physiol.,*** **67:**877.

Gonzales, E. M., De Ancos, B., Cano, M. P., 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, ***J. Agric Food Chem.,*** **47:**4068.

Gözükara, E., 1997. Enzimler. ***Biyokimya.*** Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara.

Gross. D., Coombs. J., 1975. ***Enzymatic colour of formation in beet and cane juices Paper presented at the 15th General Assembly of C. I. T. S.,*** Vienna.

Halim, D. H. and Montgomery, M. W. 1978. Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (Pyruse communis, L.***). J.Food Sci., 43***, 603-606.

Herrmann, K., 1976. Über verfarbungen deş Gemüses durch phenolische inhaltsstoffe, Disch. Lebensm, ***Rdsch.,*** **72:**90.

Hutcheson, S. W., Buchanan, B. B., 1980. Polyphenol oxidation by Vida faba chloroplası membranes, ***Plant Physiol.,*** **66:**1150.

Isbiguro, R. S. R. and Anyama, Y. 1970. Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in radish. ***Etyo To Shukoryo***, 23, 13.

İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma ve Uygulama Merkezi Web Sitesi, 2007.

http://kaum.inonu.edu.tr

Jacnicke, I., 1984. Protein bestimmung cinfuhrung in the praxis des. ***Biochemilcers,*** Köln. 27.

Jharna, R. D., Santhoor, G. B., Lalitha, R. G., 1997. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian Pineapple fruit. ***J. Agric. Food Chemistry,*** **45:**2031-2035.

Jones, J. D., Halme, A. C. and Waoltorton, L.S.C. 1965. Use of polyvinyl pyrrolidinone in the isolaton of enzymes from chloplast. ***Phytochemistry, 4***, 659. bitör of phenolase. ***Phytochemistry, 3***,447.

Joslyn, Ma., Ponting, J.D. 1951. Enzymecatalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. Adv. ***Food Res.,*** **1:**3.

Kahn, V., 1985. Effect of protein, protein hydrolizates and aminoacids on odihydroxyphenolase activity polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. ***J. Food Sci.,*** **50:**111.

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997. ***Biyokimya***, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum. Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. ***Biyokimya***, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum.

Keleş, F. 1986. ***Amasya ve golden elmalarının polifenol oksidazları üzerine araştırmalar I. Genel Özellikler.*** Doğa, D2, 10(2); 224-234.

Kimberly, W., Wissemann, C. and Lee, Y. 1981. Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara grapes***. J. Sci. Food. Agric***., 506.

Kinsella. J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J., 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. ***Food Technol.,*** **47:**85.

Knapp, F. W. 1965. Some Characteristics of Eggplant and Avocado Polyphenoloxidase. ***J.Food Sci***., 30, 930.

Kohn, V. 1977. Latency properties polyhenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. ***J. Sci.Food Agr***., 28, 233.

Kovvalski, S. P., Eanette, N. T., Hirzei, A. T., Steffens, J. C., 1992. Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of Solanum berthaultü. ***Plant Physiol.,*** **100:**677.

Laemmli, D.K., 1970. ***Cleavage of Structural Proteins During in Asembly of the Head f Bacteriophage T4-*** Nature. London. 227-244.

Lamikanra, O., Sharon, D. K., Mitve, M., l992. Muscadine grape polyphenoloxidase: partial purification by high pressure liquid chromatography and some properties. ***J. Food Sci.,*** **57:**686.

Laurila, E., Kervinen R., Ahvenainen, R., 1988. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. ***Postharvest News and Information***, **9**(4):53.

Lee, M-K., Park, I., 2005. Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard Reaction products. ***Food Chemistry***, **91:**57-61.

Lehninger, A. L., 1982. ***Principles of Biochemistry***. Worth publisher, Acedemic Press, New York. 587-665.

Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant. ***J. Am. Chem. Soc.,*** **56:**658.

Luh, B.S. and Phithakpol, B. 1972. Characteristics of Polyphenoloxidase Related to Browning in Cling Peaches. ***J. Food Sci***., 37, 264.

Markakis, P. and Embs, R. J. 1966. Effect of sulfite and ascorbic acid on mushroom phenol oxidase***. J.Food Sci***., 31, 807.

Mathew, A.G., Parpia, H.A.B. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. adv. ***Food Rcs***., **19:**75.

Mayer, A. M. and Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In Food Enzymology (Vol 1) ed. ***Fox PF, Elsevier Science Publishers Ltd,*** pp 373-398, London, UK.

Meweeny, D.J., 1974. The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites. ***J.Sct. Food Agric.*** **25:**735.

Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo, L., 1976. A method for determining polphenol oxidase activitiy in fruits and vegetables applying a natural substrate. ***Acta Aliment. Acad Sci. Hung.,*** **5:**69.

Murata. M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S., Kaneko, K., 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. ***J, Agric. Food Chem.,*** **43:**1115-1121.

Nagai, T., Suzuki, N., 2001. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese Cabbage, ***J. Agric. Food Chem.,*** **49:**3922.

Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amilot, M. J. and Aubert, S.Y. 1994. Enzymatic Browning Reaction in Apple and Apple Products. ***Criticaal Reviews in Food Science and Nutrion***, 34(2); 109-157.

O'brein, J., Morrisey, P. A., 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Mailard browning reaction in food. ***CRC Crit Rev. Food Science and Nuttrition***, **28**(3):211.

Oktay, M., Küfrevioğlu, L, Kocaçalışkan, I., Şakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. ***J. Food Sci.***, **60:**494-496.

Oktay, M., Küfrevioğlu, 1., Sakiroğlu, H., 1992. Polyphenoloxidase from Amasya apple, ***Biochem.,*** **56:**1705-1710.

Palmer. J. K., 1963. Banana polyphenoxidase. prepartion and properties. ***Phys. Plants,*** **38:**508.

Parish, W. 1972. The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (Beta vulgaris L.). ***Z, Pflanzenphysiol***, 66,176.

Park E.Y., Luh, B. S., 1985. Polyphenol oxidase of kiwifruit. ***J. Food Sci.***, **50:**678-684.

Park, Y., Şato, H.H., Almeida, D., Moretti, R. H., 1980. Polyphenol oxidase of mango, ***J.Food Sci.,*** **45:**1619.

Pathak, S. U., Karyekar, Ghole, V. S., Hedge, M. V., 1992, Effect of activation methods affinity chromatography of potato polyphenol oxidase. ***Phytochemistry,*** **31**(5):1481.

Patil, S. S. and Zucker, M. 1965. Potato Phenolases. ***J. Biol. Chem,*** 240, 3938.

Paul, B., Gowda, L. R., 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). ***J. Agric. Food Chem.,*** **48:**3839.

Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları. ***Gıda,*** **17**(3):181.

Pekyardımcı, Ş. and Balaban, M. O. 1992. High pressure CO2 treatment on polyphenol oxidase activity. **Turkish Journal of Chemistry, 16**(2); 153-163.

Pierpoint, W. S. 1966. Enzymic oxidation of chilorogenic acids and some reactions of the quinnone procuced. ***Biochem,*** 98, 567.

Pomerantz, S.H. 1963. Separation, purification and properties of two tyrosinases from Harmster Mclanoma. ***J. Biol. Chem.***, **238:**2351.

Rivas, N. J., Whitaker J. R., 1973. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. ***Plant physiol.,*** **52:**501.

Roberts, E. A. H. 1962. Economic importance of flavonoid substances; tea ***Fermentation in the chemistry of flavonoid compounds***. Pergamon Press, 465.

Robyt, I. F., Whıte, B., 1990. ***Biochcmical Techniques:*** Theory and Practice. Waveland Press, Inc. Illinois.

Ponting, J. D. 1960. ***The control of enzymatic browning of fruits, food enzymes***. H.W., Schultz, ed., Avi Publ. Co., Inc, Westport, c.t.

Sapers, G. M., Garzarella, L. and Pilizota, V. 1990. Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. ***J.Food Sci***., 55, (4); 1049-1053.

Satjawatcharaphong, C., Rymal, K. S., Dozier, J. R. and Smith, R. C. 1983. ***Polyphenol Oxidase System in Red Delicious Apples. J.Food Sci***., 48.

Schaller, K., 1972. Zur bestimmung der polyphenoloksidase aktivat in Kartoffelknollen. ***Z.Lebensm Unters. Forsh.,*** **150:**211.

Siddiq, M., Sinha, N. K., Cash, J. N., 1992. Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. ***J. Food Sci.,*** **57:**1177.

Simpson, B. K., Marshall, M.R., Otwell, S. W., 1988. Polyphenol oxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties. ***J. Food Biochem***., **12:**205-217.

Singh, K. and Ahlawati, T. R. 1974. Effect of ascorbic acid on tyrosinase of dwarf Mexican wheats***. Food Sci Technol. Abstr., 6***(10); 136.

Singleton, V. L. 1987. Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: ***Observations and Practical Implications. Am. J. End. Vitic., 38***(1); 69.

Stelzig, D. A., Akhtar, S. and Riberio, S., 1972. Catechol oxidase of red delicious apple peel. ***Phytochemistry***, **11:**535

Szabo, M. T., 1999. Effect of polyphenols on digestion of proteins. ***Proc. 19th Hung Annit. Meet. Biochem.***, 223.

Şakiroğlu, H. 1994. ***Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi.*** (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi.

Tate, J.N., Luh, B.S., York. G. K., 1964. Polyphenol oxidase in Bartlett Pears. ***J. Food Sci.***, **29:**829.

Taufel, K. and Voigt, J. 1964. ***Zur Inhibierenden Wirkung von Ascorbins Auere Gegenüber der Polhenol Oxidase des Apfels.*** Z.Lebensm. Unters.For., 126,19.

Tekman, Ş., Öner, N., 1986. ***Genel Kimya***, I. Cilt, Fatih yayınevi matbaası, İstanbul. 335-367.

Thygesen P. W., Dry, I. B. and Robinson, S. P. 1994. Polyphenol oxidase in potato tubers. ***The Molecular and Cellular Biology of the Potato, Ed 2. CAB International,*** 151-159, Wallingford, UK,.

Unal, M. U., 2005. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii). ***Food Chemistry*** (in press).

Valero, E., Varon, R., Garcia-Carmona, F., 1988. Characterization of polyphenol oxidase from Airen Grapes. ***J. Food Sci.***, **53**(5):1482.

Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. ***CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, **15:**49.

Vaughn, K. C., Lax, A. R. and Duke, S. O. 1988. ***Polyphenol oxidase:the chloroplast oxidase with no established function.*** Physiol Plant, 72; 659-665.

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.

Voigt, J. and Noske, R. 1996. Zur Bestimmung der Polyphenoloxidase Aktivitat II. Orientierende Versuch zur Anvendburkeid der Metode mit Besthorns Reagens in Apfeln. ***Z.Lebensm Unters, For***., 130, 9.

Walker, J. R. L. 1975. ***Studies on the enzymic browning of apples II. Properties of apple polyphenol oxidase***. Aust. J. Biol. Sci., 17, 360.

Weaver, M. L., Brown, R. C, and Steen, H. A. 1968. ***The association of gopper with tyrosinase activity and internal discoloration in Russel Burbank Potatoes***., Am.Potato J., 45, 132.

Weber, D. J., Stahmann. M. A., 1964. Ceratocystis infection in sweet potato; its effect on proteins, isozyemes and acquired immunty. ***J. Science***, **146:**929.

Weser, U. 1968. Hemmeng der o- Diphenol Oxydase Aktivitat Durch Borat und Germanat, Hoppe-Seyler's. ***Z.Physiol. Chem***., 349,982.

Wetherilt, H., Pala, M. and Başoğlu, N. 1992. ***Relationship Between Sulphur Dioxide Level and Inhibition of Browning inApricots Dried to Different Moisture Levels***. Developments in Food Science-Food Science and Human Nutrition, (Ed.:G. Charalambous), Elsevier, London, Amsterdam.

Whitaker. J. R., 1972. ***Principles of Enzymolgy for the Food Sciences, Marcel Dekker.*** New York, Chapters, 22-24.

Wildanger, W., Herrmann, K., 1973. Die phenolicshen inhaltsstofee des obstes. H. Die flovonole des obstes. ***Z. Lebensm. Unters. Forsch***., **151:**103.

Wisseman, K. W., Montgornery, M. W., 1973. Purification of d'Anjou pear polyphenoloxidase. ***Plant Physiol.,*** **52:**501.

Wissemann, K. W., Lee, C. Y., 1981. Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Nigara grapes. ***J. Food Biochem.,*** **46:**506.

Wissemann, K. W., Montgomery, M. W., 1985, Purification of d'Anjou Pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. ***Plant Physiol.,*** **78:**256.

Wong, T. C., Luh, B. S. and Whitaker, J. R. 1971. Isolation and Characterization of **Polyphhenol oxidase Clingstone Peach. Plant Physiol**, 48, 19.

Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (Musa sapientum L.) pulp. ***J. Agric Food Chem.,*** **48:**2732.

Yerlitürk, F.Ü., 2003. ***Peyrus Elaegrifolia Meyvesinden Polifenol Oksidaz Enziminin Afinite Kromatogtrafisi ile Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenemesi*** (yüksek lisans tezi). Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

Yosunobu, K.T. and Norris, E. R. 1957. Mechanism of borate inhibition of diphenol oxidation by tyrosinase. J***. Biol. Chem***., 227, 473.

Zawistowski, J., Biliaders, C. G., Murray, E. D., 1988. Purification and characterization of Jerusalem artichoke (*Helliantus tuberosus L.*) polyphenol oxidase. ***J. Food Biochem.,*****1:**12.

Zawistowski, J., Biliaders, C. G., Murray, E. D., 1988. Isolation and some properties of an acidic fraction of polphenol oxidase fom Jerusalem artichoke (*Helliantus tuberosus L.*) ***J. Food Biochem.,*** **43:**23.

Zemel, G. P., 1989. ***Low pH Inactivalion of Polyphenoloxidase.*** (Master Thesis)***,*** Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

Ziyan, E., 1998. ***Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (Pyrus Communis)'ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenemesi*** (yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Anakara.

Ziyan, E., Pekyardımcı., 2004. Purification and characterization of pear (***Pyrus Communis***) polyphenol oxidase. ***Turk. J. Chem.*****, 28:**547-557.

ÖZGEÇMİŞ

1981 Yılında Iğdır'ın Tuzluca ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tuzluca ilçesinde tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'ne kayıt yaptırdı. 2004 yılında lisan proğramını tamamladı. 2007 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2004 yılından itibaren üniversiteye hazırlık dersanelerinde Kimya Öğretmeni olarak çalışmaktadır.