TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

IĞDIR KAYISISINDAN (*Şalak)* SAFLAŞTIRILAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇ VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Çilem ÇİMEN
DANIŞMAN : Doç. Dr. Halit DEMİR

VAN-2007

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

IĞDIR KAYISISINDAN (*Şalak)* SAFLAŞTIRILAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇ VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Çilem ÇİMEN

VAN-2007

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Halit DEMİR danışmanlığında Çilem ÇİMEN tarafından hazırlanan "**Iğdır Kayısısından *(Şalak)* Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerinde Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Kinetiğinin Araştırılması"** isimli bu çalışma 06/02/2007tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İsmail ÇELİK İmza:

Üye : Doç. Dr. Halit DEMİR İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. İ. Hakkı YÖRÜK İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13/02/2007 gün ve 2007/4-XII sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

IĞDIR KAYISISINDAN *(Şalak)* SAFLAŞTIRILAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇ VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÇİMEN, Çilem
Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Halit DEMİR
Şubat 2007, 63 sayfa

Bu çalışmada Iğdır Kayısısı'ndan polifenol oksidaz enzimi (E.C. 1.14.18.1; PPO) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış ve polifenol oksidaz enzimi üzerine bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon kinetiği incelenmiştir. Bu çalışma için Iğdır yöresinden "şalak" türü kayısı temin edilmiştir. Iğdır kayısısından polifenol oksidaz enzimini saflaştırmak için pH'sı 7.3 olan fosfat tamponu kullanılarak, gerekli santrifüj ve diğer işlemler yapılarak kolona uygulanacak homojenat hazırlandı. Bu homojenat aktifleşmiş Sepharose 4-B-L-tirozin-p-amnobenzoik asit afinite kolonuna uygulandı. Kolondan alınan fraksiyonlardan aktivite gösterenler, kantitatif protein tayinleri için Coomassie blue yöntemiyle ve 595 nm'de yapıldı. Bunun yanı sıra enzimin optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, iyonik şiddet etkisi ve bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon kinetiği incelendi. Enzimin optimum pH'sı 6, optimum sıcaklığı 30 ^{o}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 Kayısısı, İnhibisyon, Polifenol oksidaz, Saflaştırma

ABSTRACT

INVESTIGATIONS OF THE INHIBITION KINETICTS OF SOME DRUGS AND CHEMICALS ON ENZYME OF POLYPHENOL OXIDASE PURIFED FROM IGDIR APRICOT'S *(Salak)*

ÇİMEN, Çilem

Msc Thesis, Chemistry Department

Supervisor: Assocate. Prof. Dr. Halit DEMİR

February 2007, 63 pages

In this study, polyphenol oxidase (E.C. 1.14.18.1; PPO) enzyme obtained from Igdır Apricot's was purified with affinity chromatography and the inhibition kineticts of some drugs and chemicals have been investigated on purified polyphenol oxidase. The apricot cultivar " Salak " was provided from Igdır province. To purify polyphenol oxidase enzyme obtained from apricot, 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 drugs and chemicals on enzyme were investigated. Optimum pH of enzyme and optimum temperature was found as 6 and 30 ^{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 Apricot, Inhibition, Polyphenol oxidase, Purification

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Iğdır Kayısısı'ndan afinite kromatografisi ile saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin kinetik özellikleri incelenmiş ve enzim üzerine bazı ilaç ve kimyasallar uygulanarak inhibisyon etkilerine bakılmıştır.

Bazı sebze ve meyvelerde meydana gelen istenmeyen kararmaların önlenmesi itibarıyla yaptığımız çalışma önem arzetmektedir.

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

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında göstermiş olduğu yakın ilgi ve yardımlarından dolayı danışmanım Doç. Dr. Halit DEMİR'e, Kimya Bölümü laboratuarlarından ve her türlü kimyasal madde imkanından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanı sayın Prof. Dr. Hasan CEYLAN'a, Çalışmalarım sırasında bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. İsmail ÇELİK, Doç. Dr. Vedat TÜRKOĞLU, Yrd. Doç. Dr .İbrahim YÖRÜK'e, tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Çiğdem ÖTER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün öğrenim hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, gerek maddi ve gerekse manevi desteklerini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Çilem ÇİMEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	1
1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	1
1.2. Polifenol Oksidaz Enzimi	9
1.2.1. Adlandırılması	9
1.2.2. Doğada bulunuşu	9
1.2.3. Molekül yapısı	9
1.2.4. Katalizlediği reaksiyonlar	10
1.2.5. Substratları	11
1.2.6. Aktivatörleri	12
1.2.7. İnhibitörleri	13
1.2.8. Doğa ve gıda işletmeciliğindeki rolü ve önemi	14
1.3. Enzimatik Kararma	15
1.4. Iğdır Kayısısı Hakkında Kısa Bilgi	16
1.4.1. Şalak (Aprikoz)	16
1.4.2. Şekerpare	16
1.5. Araştırmanın Amacı	17
2. MATERYAL ve YÖNTEM	18
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	18
2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	18
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	18

2.4. Kullanılan Yöntemler 21
2.4.1 Ham ekstraktın hazırlanması 21
2.4.2. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması 21
2.4.2.1. Afinite jelinin hazırlanması 21
2.4.2.2. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu 22
2.4.2.3. Saflaştırılan enzim çözeltisinin diyalizi 23
2.4.3. Protein tayini 23
2.4.3.1. Kalitatif protein tayini 23
2.4.3.2. Coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein tayini 23
2.4.4. PPO Enziminin aktivite tayini 24
2.4.5. PPO Enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar 24
2.4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 24
2.4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 25
2.4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi 25
2.4.5.4. Enzim Aktivitesi üzerine bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon etkisi 25
2.5. Iğdır Kayısısı'ndan Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enziminin SDS Poliaakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü 25
3. BULGULAR 28
3.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik 28
3.2. PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması 28
3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 31
3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi 32
3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi 33
3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Etkisi 33
4. TARTIŞMA ve SONUÇ 51
KAYNAKLAR 57
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 8

Şekil 3.1. Coomassie Blue Yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik 28

Şekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayin grafiği 29

Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile Iğdır Kayısısı'ndan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin SDS-PAGE bantı 31

Şekil 3.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği 32

Şekil 3.5. Enzim aktivitesinin pH'ya bağlılığını gösteren grafik 32

Şekil 3.6. Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlılığını gösteren grafik 33

Şekil 3.7. Amoksilin için % Aktivite-[I] grafiği 34

Şekil 3.8. Asetil Salisilik Asit için % Aktivite-[I] grafiği 34

Şekil 3.9. Parasetamol için % Aktivite-[I] grafiği 34

Şekil 3.10. Sodyum Sülfat için % Aktivite-[I] grafiği 35

Şekil 3.11. Bakır Sülfat için % Aktivite-[I] grafiği 35

Şekil 3.12. Glukoz için % Aktivite-[I] grafiği 35

Şekil 3.13. Sodyum Nitrit için % Aktivite-[I] grafiği 36

Şekil 3.14. Sodyum Klorür için % Aktivite-[I] grafiği 36

Şekil 3.15. Glisin için % Aktivite-[I] grafiği 36

Şekil 3.16. Sodyum Azid için % Aktivite-[I] grafiği 37

Şekil 3.17. Askorbik Asit için % Aktivite-[I] grafiği 37

Şekil 3.18. 2-merkaptoetanol için % Aktivite-[I] grafiği 37

Şekil 3.19. Tirozin için % Aktivite-[I] grafiği 38

Şekil 3.20. Sitrik Asit için % Aktivite-[I] grafiği 38

Şekil 3.21. EDTA için % Aktivite-[I] grafiği 38

Şekil 3.22. p-aminobenzoik Asit için % Aktivite-[I] grafiği 39

Şekil 3.23. Amoksilin için Lineweaver-Burk eğrisi 39

Şekil 3.24. Asetil Salisilik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi 39

Şekil 3.25. Parasetamol için Lineweaver-Burk eğrisi 40
Şekil 3.26. Sodyum Sülfat için Lineweaver-Burk eğrisi 40
Şekil 3.27. Bakır Sülfat için Lineweaver-Burk eğrisi 40
Şekil 3.28. Glukoz için Lineweaver-Burk eğrisi 41
Şekil 3.29. Sodyum Nitrit için Lineweaver-Burk eğrisi 41
Şekil 3.30. Sodyum Klorür için Lineweaver-Burk eğrisi 41
Şekil 3.31. Glisin için Lineweaver-Burk eğrisi 42
Şekil 3.32. Sodyum Azid için Lineweaver-Burk eğrisi 42
Şekil 3.33. Askorbik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi 42
Şekil 3.34. 2-merkaptoetanol için Lineweaver-Burk eğrisi 43
Şekil 3.35. Tirozin için Lineweaver-Burk eğrisi 43
Şekil 3.36. Sitrik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi 43
Şekil 3.37. EDTA için Lineweaver-Burk eğrisi 44
Şekil 3.38. p-aminobenzoik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi 44
Şekil 3.39. Amoksilin için inhibisyon grafiği 44
Şekil 3.40. Asetil Salisilik Asit için İnhibisyon grafiği 45
Şekil 3.41. Parasetamol için inhibisyon grafiği 45
Şekil 3.42. Sodyum Sülfat için inhibisyon grafiği 45
Şekil 3.43. Bakır Sülfat için inhibisyon grafiği 46
Şekil 3.44. Sodyum Nitrit için inhibisyon grafiği 46
Şekil 3.45. Sodyum Klorür için inhibisyon grafiği 46
Şekil 3.46. Glisin için inhibisyon grafiği 47
Şekil 3.47. Sodyum Azid için inhibisyon grafiği 47
Şekil 3.48. Askorbik Asit için inhibisyon grafiği 47
Şekil 3.49. 2-merkaptoetanol için inhibisyon grafiği 48
Şekil 3.50. Sitrik Asit için inhibisyon grafiği 48
Şekil 3.51. EDTA için inhibisyon grafiği 48
Şekil 3.52. p-aminobenzoik Asit için inhibisyon grafiği 49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Farklı kaynaklardan izole edilen PPO enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma yöntemleri 10

Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimininin substratları 12

Çizelge 3.1. Iğdır Kayısısı'ndan saflaştırılan Polifenol Oksidaz enziminin saflaştırma sonuçları 30

Çizelge 3.2. Farklı inhibitörlerle PPO 'nin K_i değerleri ve inhibisyon tipleri 49

Çizelge 3.3. Bazı ilaçların PPO ile etkileşmesi sonucu regresyon grafiğinden bulunan I_{50} değerleri 50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
^{o}C	Santigrad derece sıcaklığı
dk	Dakika
g	Gram
h	Saat
L	Litre
Ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µg	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 kompleks

1. GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

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.

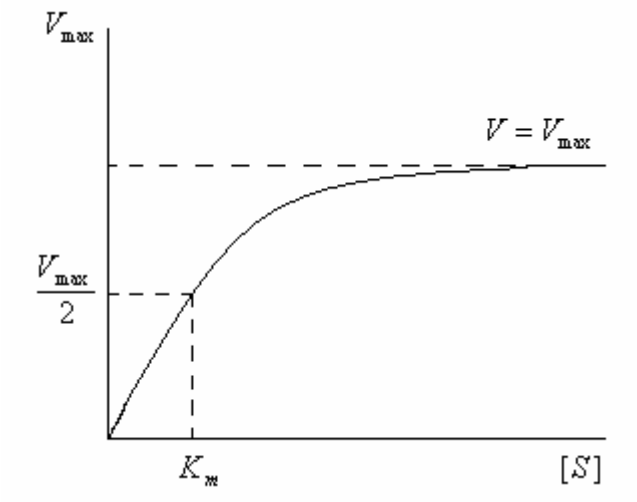
Enzimler de protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Onlar gibi makromoleküller olması itibarıyla sellofan ve kolodyum zarlarından geçemezler ve bu özelliklerden dolayı ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ayrıca ortamın alkali veya asit oluşuna karşıda oldukça hassastırlar. 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.

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

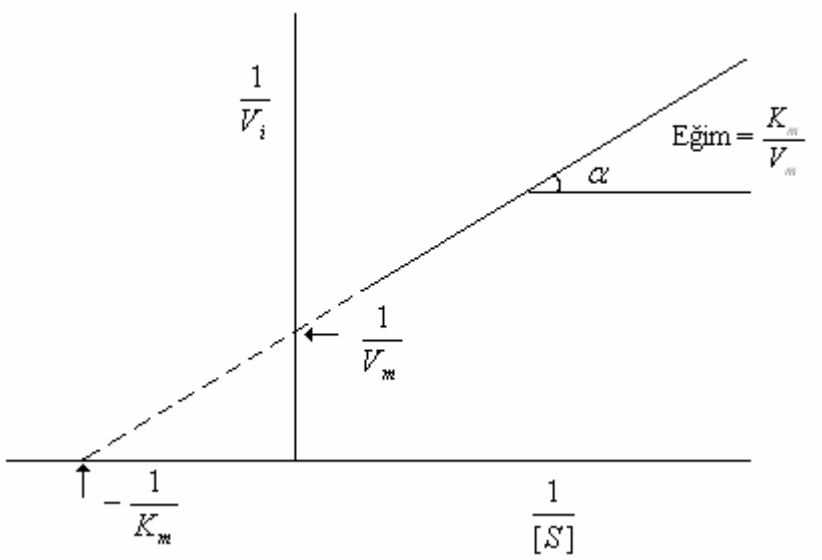
V_{max}: hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yansına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] << K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlannda herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] >> K_m$ 'dir. $V = V_{max}$ 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).

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

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m /V_{max}' 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.

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

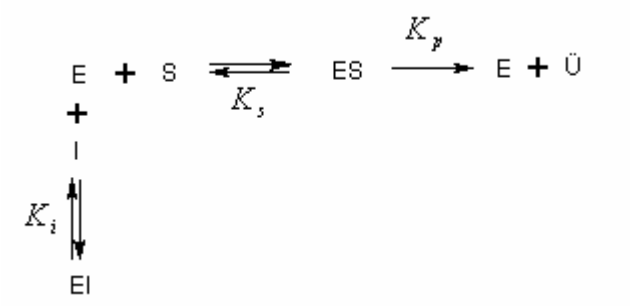
2) Yarı yarışmalı (Uncompetitive) inhibisyon

3) Basit yanşmasız (Simple nonconıpetitivc) inhibisyon

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

1)Yarışmalı (competitive) inhibisyon

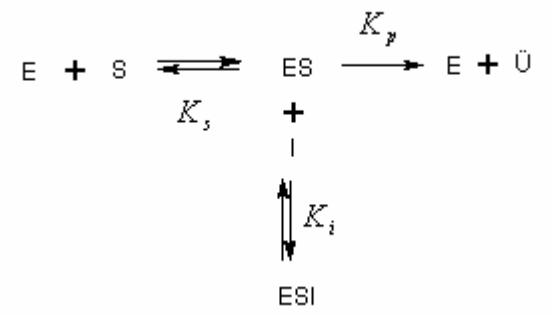
Yarışmalı inhibitör (I), molekül yapısı bakımından substrata (S) benzer ve substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını engelleyecek tarzda, sağlanarak enzimin aktivitesini azaltır (Ziyan, 1998). Reaksiyon mekanizması:



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

2) Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon

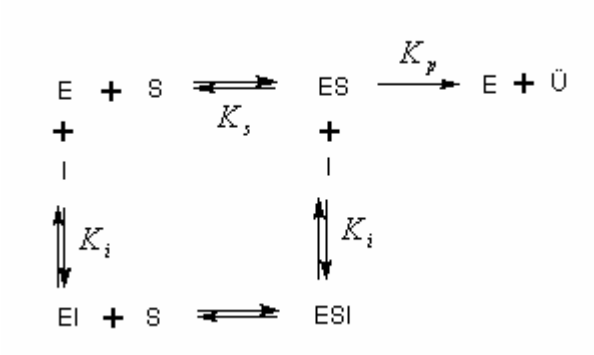
Tek substratlı sistemlerde inhibitör, serbest enzime bağlanamadığından bu tür inhibisyona çok az rastlanmaktadır. Bu tür inhibisyonda inhibitör, enzimle birleşip EI kompleksi vermediği için enzim önce substratla ES kompleksi verir, daha sonra bu kompleks inhibitörle etkileşir (Ziyan, 1998). Mekanizması:



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

3) Basit yarışmasız (simple noncompetitive) inhibisyon

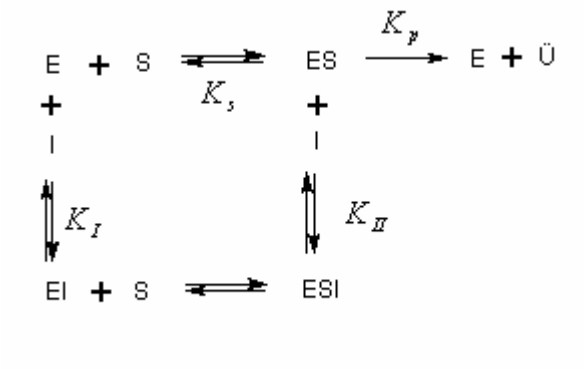
Bu tür inlıibisyonda substrat ve inhibitör gelişigüzel bir tarzda birbirinden bağımsız ve tersinir olarak farklı merkezlere bağlanırlar. Sonuçta ES ve EI komplekslerini oluşturabilirler. Ayrıca ES, I ile ve EI, S ile birleşerek ESI üçlü kompleksini meydana getirirler, oluşan ESI üçlü kompleksi katalitik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



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

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: $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{II}}\right)$

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 işlemleri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin bu özelliklerini şöyle sıralayabiliriz:

a) Molekül büyüklüğü (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).

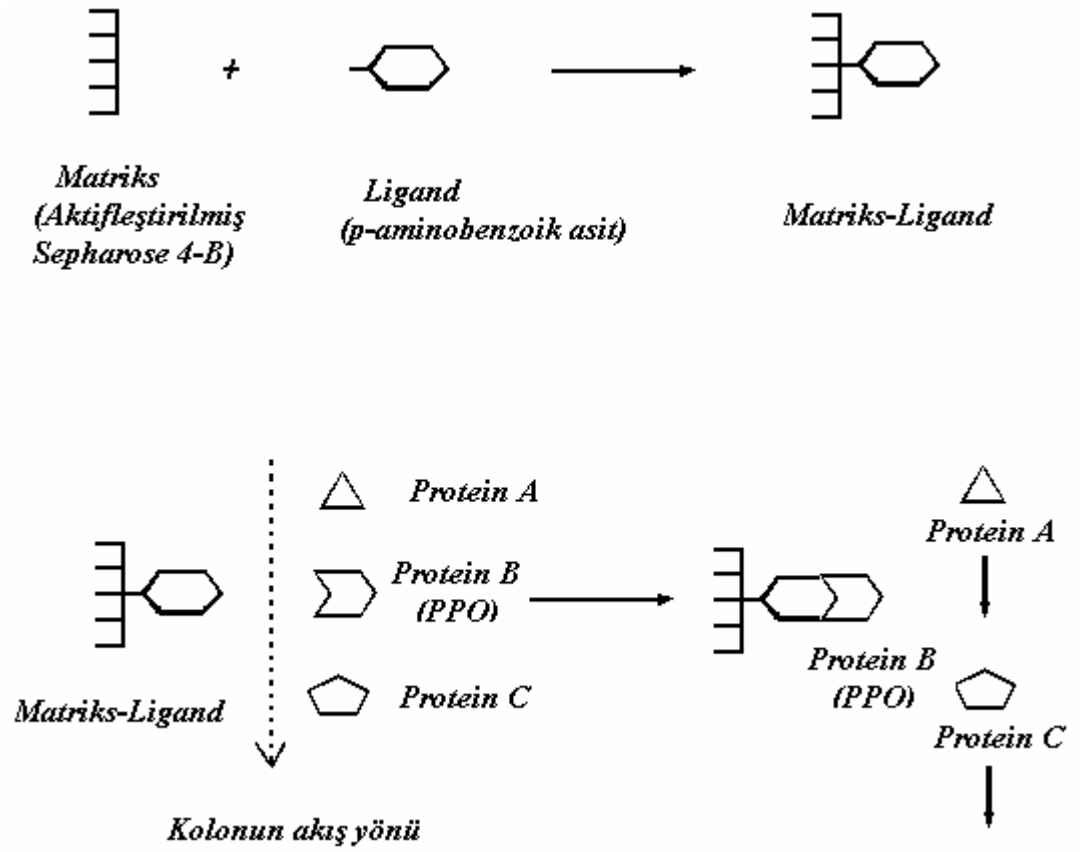
c) Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (elektroforez, iyon değişim kromatografisi).

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 kromatografisi 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 kromatografinin, 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.

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

1.2.1. 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.

1.2.2. 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).

1.2.3. 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

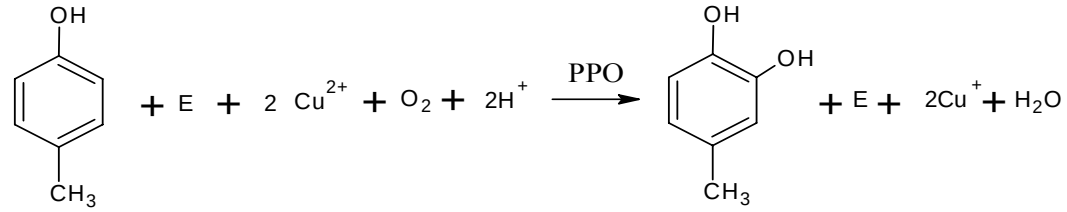
1.2.4. Katalizlediği reaksiyonlar

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;

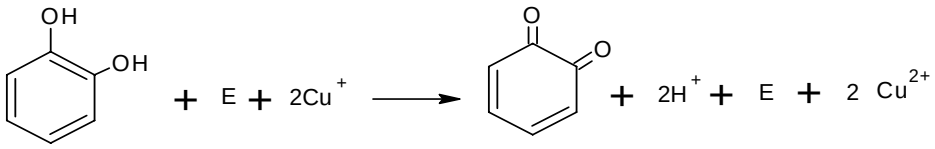
1) Hidroksilasyon reaksiyonu: Monofenollerin hidroksilasyonu ile o-dihidroksifenollere yükseltgenmesi (Krezolaz aktivitesi)

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).

1.2.5. 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).

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

1.2.6. 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).

1.2.7. 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).

1.2.8. 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. Ancak

bazı 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.

1.3. Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi siyaha kadar olan farklı tonlardaki bu renk değişimlerine kararma denir. PPO, o-kinonlara yükseltgenen ve daha sonra bitkide bulunan doğal bileşenlere bağlı olarak kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentlere polimerleşen monofenollerin; o-difenollere hidroksilasyonunu katalizler (Laurila ve ark., 1988).

Enzimatik kararma reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan o-kinonlar renksiz bileşikledir ve bizzat herhangi bir renk bozulmasına sebep olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve bunlar sonra büyük moleküllü bileşiklere polimerize olurlar. İşte, renk bozulmasının esas nedeni esmer renkli olan bu polimerlerdir (Meweeny, 1974; O'brein, ve Morrisey, 1989).

Enzimatik kararmanın olabilmesi için polifenol oksidaz enzimi, bunun etkilediği fenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir.

Ayrıca sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik kararma, fenolik madde moleküller oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılmasıyla durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfit ve askorbik asit gibi bazı bileşiklerin ilavesi, ortamın pH'sının değiştirilmesi veya yüksek basınç uygulaması ile önlenebilir (Pekyardımcı, 1992).

1.4. Iğdır Kayısısı Hakkında Kısa Bilgi

Bugün dünyada 1750'nin üzerinde kayısı çeşidi ve melezi bulunmakla birlikte her ülkede ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılan kayısı çeşidi sayısı 5-10'u geçmemektedir.

Iğdır yöresi ve çevresinde 2 çeşit kayısı yetişmektedir. Bunlar:

1.4.1. Şalak (Aprikoz)

Iğdır ve Kağızman bölgesinin sofralık kayısı çeşididir. Bu çeşidin orijini tam olarak bilinmemektedir. Ermenistan'da bu çeşide Erevani denmektedir. Yayvan taçlı fakat çok kuvvetli büyüyen ağaçlar meydana getirir. Ağaçları çok verimlidir.

Meyve şekli eliptiktir. Meyve oldukça iri olup ortalama meyve ağırlığı 50-65 g arasında değişir. Meyve kabuk (L64.78 a+10.13 b+39.63) ve et rengi sarıdır. Meyve tatlı ve meyve et dokusu orta sertliktedir. Meyve belirgin şekilde simetriktir. Çekirdekleri uzun şekilli, tatlı, 2.1-2.6 g ağırlığında ve meyve etine yapışık değildir. SÇKM miktarı % 17-20, pH 4.4-4.8 ve toplam asitlik % 0.30-0.50'dir. Erkenci bir çeşit olup meyveleri Malatya şartlarında Haziran ayının son haftasında olgunlaşmaya başlar (İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma ve Uygulama Merkezi Web Sitesi, 2007).

1.4.2. Şekerpare

Ülkemizin birçok yerinde değişik kayısı çeşitlerine Şekerpare ismi verilmekle birlikte Iğdır Şekerparesi en tanınmış olanıdır. Iğdır ve çevresinde sofralık ve kurutmalık olarak yetiştirilmektedir. Ağaç şekli yayvan olup kuvvetli büyür. Ağaçları yüksek verimlidir.

Meyve ufak, 25-30 g ağırlığında, oval şekilli, meyve kabuk (L62.44 a+13.89 b+34.39) ve et rengi sarıdır. Meyve tatlı, et dokusu orta sertlikte olup meyveler belirgin bir şekilde kırmızı yanak oluşturur. Meyve kabuğu paslı ve beneklidir. Yuvarlak şekilli çekirdekleri tatlı olup 1.8-2.3 g ağırlığında ve meyve etine yapışık değildir. SÇKM miktarı % 20-25, pH 4.1-5.2 ve toplam asitlik % 0.20-0.30'dur. Meyveleri Malatya şartlarında Temmuz ayının birinci haftası olgunlaşmaya başlar. Soğuklama gereksinimi 950-1000 saattir (İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma ve Uygulama Merkezi Web Sitesi, 2007).

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 Kaysısından saflaştırılacak olan PPO enzimi üzerinde çeşitli ilaç ve kimyasalların inhibisyon etkileri araştırılacak ve kinetiği incelenecektir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, p-aminobenzoik 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, sodyum bikarbonat, polietilenglikol (PEG), coomassie brillant blue, Glisin, katekol, 2-merkaptaetanol, Merck A.G'den; amoksilin, parasetamol, asetil salisilik asit (aspirin) ve 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.

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

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 $NaOHCO_3$ 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.

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.

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.

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_2PO_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 suda

çözüldü, 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.

6) İnhibisyon etkisi incelenecek ilaç ve kimyasal çözeltilerinin hazırlanması: İnhibisyon etkisi incelenecek ilaç ve 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 1L' ye tamamlandı. Böylece 0.4 mM'lık inhibitör çözeltileri hazırlanmış oldu ve konsantrasyonlar değiştirilerek değişik inhibitör konsantrasyonlarında inhibisyon kinetikleri incelendi.

7) SDS-elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0.65 ml Tris-HCl pH 6 .8,1 ml % 0.1 bromfenol mavisi, 3 ml %10'luk SDS çözeltisi ve 1 ml gliserin karıştırılarak toplam hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce 1 ml numune tamponuna 50 μl β-merkapto etanol kullanıldı.

8) SDS-elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ve 7.2 g gliserin bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiye 5 ml % 10' luk SDS ilave edildi. Toplam hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

9) SDS-elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0.66 g Coomassie brillant blue R-250 çözeltisi, 120 ml metanol de çözüldü. Bu çözeltiye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml saf su eklendi.

10) SDS-jel elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisi: 175 ml saf su ve 15 ml metanol ile hazırlandı (Bu çözelti hazırlanırken, % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 su oranları kullanıldı).

11) SDS-elektroforezinde kullanılan ayırma jeli: 15 ml pH 8.8 olan 1 M Tris-HCI, 13.2 %

30’ luk akrilamid ve % 0.8’ lik bisakrilamid (6 g akrilamid, 0.16 g N’N’-bis akril amid saf suda çözülerek toplam hacim saf su ile 20 ml’ ye tamamlandı) eklendi. 0.6 ml % 10’ luk SDS, 0.4 ml %5’ lik TEMED (N,N,N’,N’-tetrametil etilen diamin), 9.4 ml saf su ve en son olarak da 0.8 ml % 1.5’luk PER [$(NH_4)_2S_2O_8$: Amonyum persulfat] çözeltisi ilave edildi. PER kullanılmadan kısa süre önce, taze olarak hazırlandı.

12) SDS-jel elektroforezinde kullanılan yığma jeli: 1.24 ml 1 M’ lık Tris –HCl (pH 6.8), 7.36 ml saf su, 1 ml % 30’ luk akrilamid % 0.8’ lik bis akrilamid, 0.1 ml % 10’luk SDS, 0.1 ml % 5’ lik TEMED karıştırıldı. Bu çözeltiye taze hazırlanmış % 1.5’ luk PER’ den 0.20 ml ilave edildi.

2.4. Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Araştırmada kullanılan Iğdır Kayısısı 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 kolunu, p-aminobenzoik asit ise enzimi

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;

- **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 280 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:**

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-L-tirozin 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 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Elüatlarda Bradford metoduyla kantitatif, 280 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) 280 nm'de 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 100 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 420 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu, 1 Enzim ünitesi (U) reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0.001'lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak "1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişme" kullanıldı.

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. Ayrıca çeşitli ilaç ve kimyasallar kullanılarak K_i ve I_{50} değerleri tespit edildi.

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^{o} C 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, 0.25 M, 0.30 M, 0.35 M, 0.50 M konsantrasyonlarda amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

2.4.5.4. Enzim üzerine bazı kimyasalların ve ilaçların inhibisyon etkisi

Bu çalışmada inhibitor olarak amoksilin, asetil salisilik asit, parasetamol, askorbik asit (vitamin C) ilaçları; sodyum sülfat, bakır sülfat, glukoz, sodyum nitrit, sodyum klorür, glisin, sodyum azid, 2-merkaptoetanol, tirozin, sitrik asit, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve p-aminobenzoik asit (P.A.B.A) 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). İlaç katılmadan önceki aktivite % 100 olarak kabul edildi (Çifçi ve ark., 2000). Her ilaç için ilave edilen ilaç miktarıyla % aktivite grafikleri çizilip bu grafiklerden yararlanarak I_{50} değerleri bulundu. K_i değerleri Lineweaver-Burk denkleminden saptandı. Bütün kinetik incelemeler 25 ^{o}C'de ve optimal pH'da yapıldı (fosfat tamponu, pH 8.5).

2.5. Iğdır Kayısısı'ndan Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enziminin SDS-Poliaakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografi ile Iğdır Kayısısı'ndan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin,

saflık derecesini kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Bu metotta % 10'luk konsantrasyonunda akrilamid, kesikli SDS-PAGE Laemmli tarafından (Laemmli, 1970) anlatıldığı gibi uygulandı.

Jelin hazırlanması ve çalışma şu şekilde yapıldı; elektroforez plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Plakaları birleştiren mikaların iki tarafına da ince tabaka halinde vazelin sürüldü ve iki cam plaka birbiri üzerine konulup kıskaçla tutturuldu ve jel hazırlama cihazına konuldu. Önce kaynama sıcaklığına getirilip sonra 40-50 ^{0}C'ye kadar soğutulan agar, iki cam plaka arasına döküldü ve plakaların arası kapatıldı.

Taze olarak hazırlanan ayırma jeli, enjektör yardımıyla cam plakaların arasına dikkatlice döküldü. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0.1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Jelin katılaşması için 30 dakika kadar beklendi. Daha sonra ayırma jeli üzerindeki % 0.1'lik SDS döküldü. Üst yüzeye kadar çok dikkatli bir şekilde, enjektörle yığma jeli ilave edilip üzerine tarak yerleştirildi. Jelin donması için bir müddet beklendi. Donan jel üzerindeki tarak çıkarıldı. Jel üzerinde tarağın açmış olduğu yarıklar saf su dolduruldu ve bir gece beklendikten sonra yarıklardaki su boşaltılarak plakalar arasındaki jel elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşlukların başlama yerleri işaretlenerek, jelin üstü önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Elektroforez için numune şu şekilde hazırlandı; numunelerin her birinde 20 μg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 75 μl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Daha sonra bu çözelti karışımı kaynar su banyosunda 3 dakika kadar bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Soğutulan numuneler, çok ince bir enjektör yardımıyla jel oyuklara tatbik edildi. Tank kapağı kapatıldı ve alt taraftan (+) yüklü kablo (anot), üst taraftan (-) yüklü kablo (katot) yerleştirildi. Yarım saat 80 voltta bekletildikten sonra, voltaj 150 volta çıkarılıp, oda sıcaklığında 5-6 saat (protein ve boya çözeltisin yürümesi için) bekletildi. Yürütme işlemi, jelin alt ucundan 1-2 cm mesafeye kadar devam edince, akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere kabına konuldu. Yığma jel kesilip ayrıldıktan sonra, protein bantlarını içeren ayırma jeli özel kabına konularak, üzeri örtülünceye kadar renklendirme çözeltisi döküldü. 1.5-2 saat çalkalayıcı üzerinde çalkalandıktan sonra, jel renklendirme çözeltisinden renksizleştirme çözeltisine aktarıldı. Belirli aralıklarla çözelti değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı renksizleştirme çözeltisi aktif karbon süzülerek, yeniden kullanılabilir hale geldi.
Böylece protein bantları belirgin hale geldi. Belirginleşen protein bantlarının standart

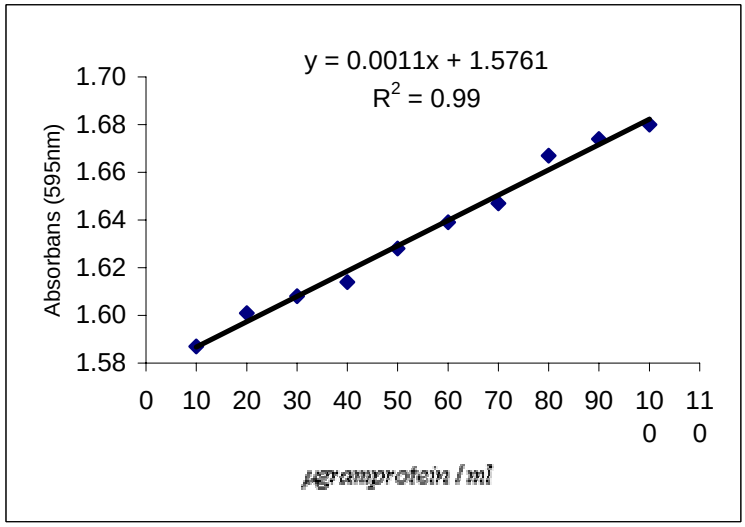
(referans) ile birlikte fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraf şekil 3.3 de gösterilmiştir.

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.

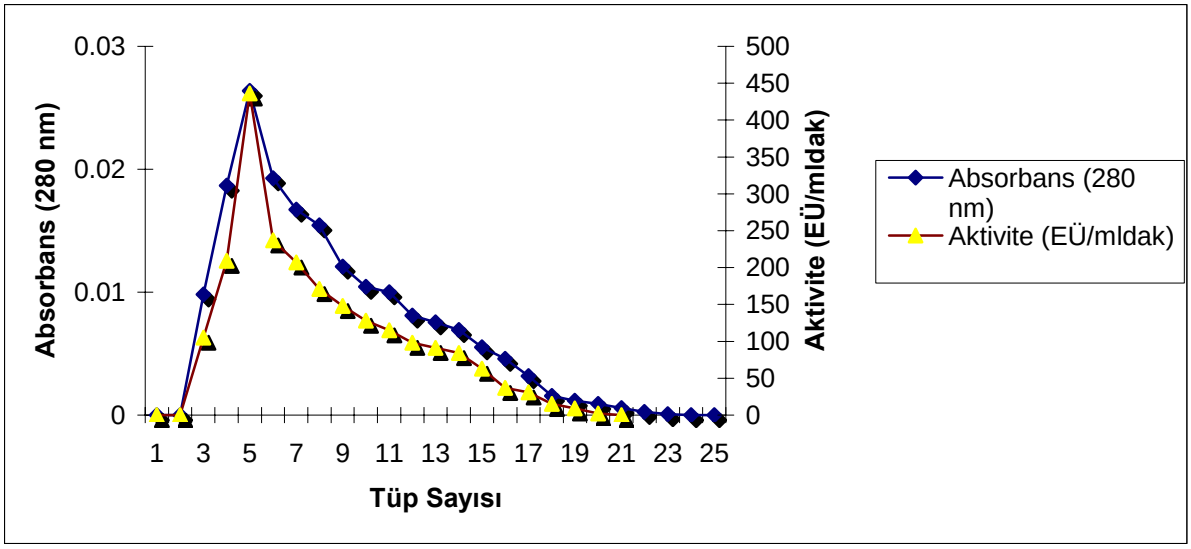


Şekil 3.1. Coomassie Blue Yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik.

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 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu, kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de de aktivite tayini yapıldı (Şekil 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.



Şekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayin grafiği.

Homojenat için yapılan protein tayininde ml'deki protein miktarı 520.62 mg olarak bulundu. Enzim ünitesi 567 EÜ/ml olarak hesaplandı. Homojenat için spesifik aktivite

$$\frac{EÜ / ml}{mgprotein / ml} = \frac{567}{520.62} = 2.677\ EÜ / mgprotein$$

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 1090 EÜ ml'deki protein miktarı da 2.677 mg olarak bulundu.

Enzim çözeltisi için spesifik aktivite:

$$\frac{EÜ/ml}{mgprotein/ml} = \frac{1090}{2{,}677} = 477\ EÜ/mgprotein$$

olarak bulundu.

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

$$Saflastirma\ Oranı = \frac{407}{1.09} = 373.39$$

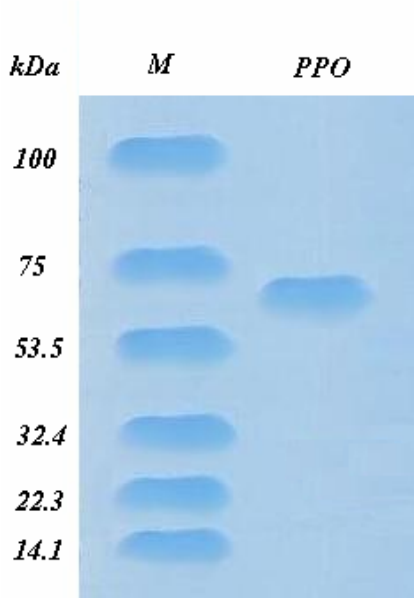
kat olarak bulunmuştur.

Bulunan bu değerlere göre homojenatın doğrudan affinite kolonuna uygulanması sonucunda, homojenattan enzim 373.39 kat saflaştırılmış oldu.

Çizelge 3.1. Iğdır kayısısından saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Enzim aktivitesi (EÜ/ml)	Top.Enzim ünitesi (EÜ)	Toplam protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg.pro)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	60	567	34320	520.62	1.09	…….
Afinite kolonu	45	1090	59950	2.677	407	373.39

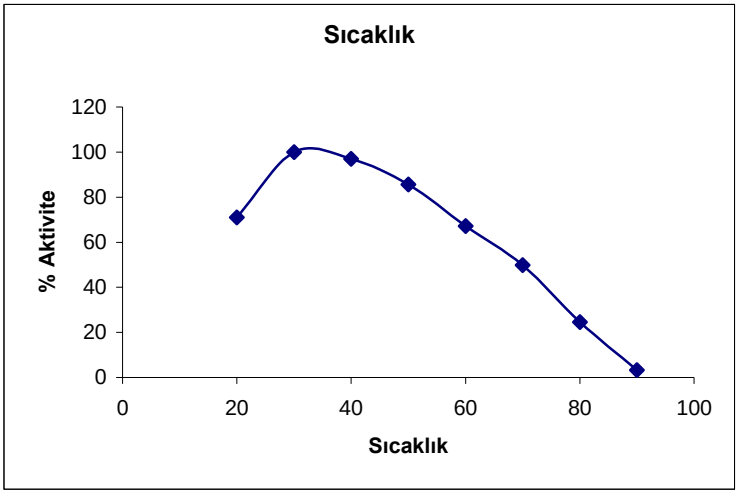
Saflaştırma sonucu elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve bu fotoğraf Şekil 3.3.'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile Iğdır Kayısısı'ndan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin SDS-PAGE bantı.

3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

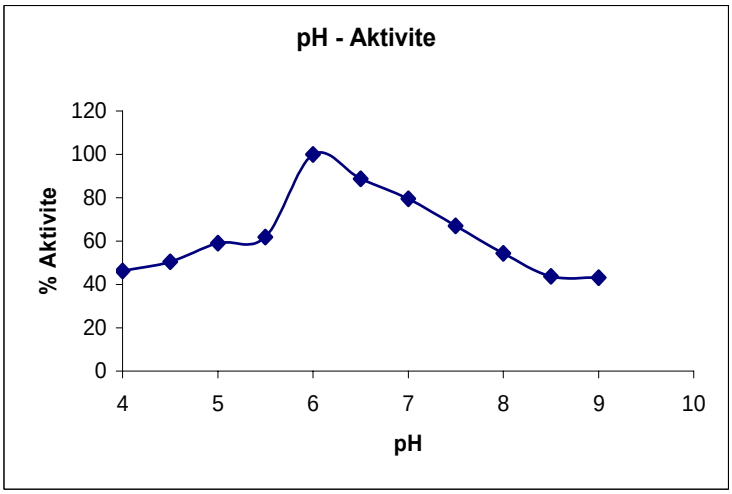
Sıcaklığın, enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları üzerine etkileri bilinmektedir. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları genellikle optimum sıcaklığa kadar doğru orantılı bir şekilde artar. İlk başta sıcaklığın artması ile birlikte ortamın kinetik enerjisi de artar ve buna paralel 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 3.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği.

3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

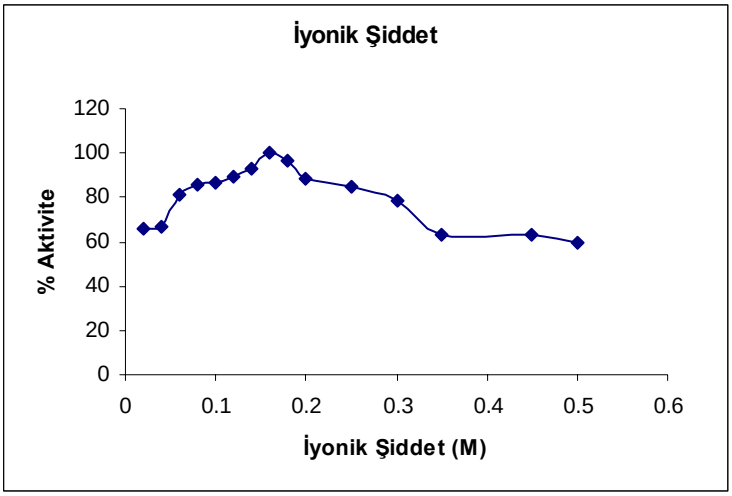
PPO enziminin aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) katekol substratı kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.4'de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar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



Şekil 3.5. Enzim aktivitesinin pH'ya bağlılığını gösteren grafik.

3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi

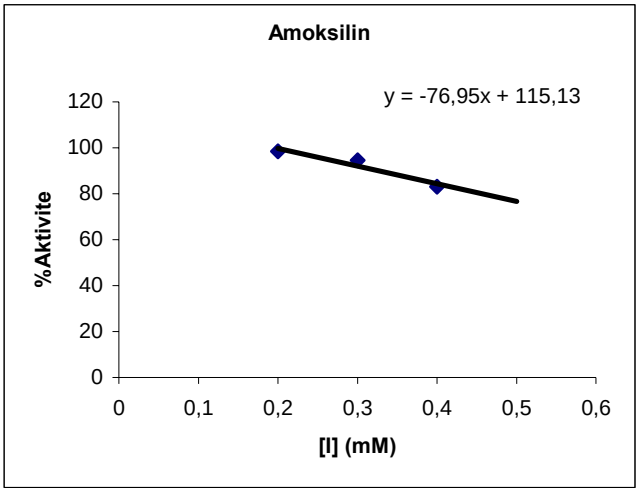
Enzimin iyonik şiddete karşı gösterdiği davranışlar şekil 3.5.'da gösterilmiştir. Buna göre en yüksek aktivite 0.16 Molar $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunda göstermektedir. Her protein farklı iyonik şiddetli ortamda çökelme gösterdiğinden bu yolla proteinler birbirinden ayrılmaktadır. Proteinler salting-out sırasında konformasyonlarını korurlar ve uygun ortamlarda tekrar çözelti fazına alınabilirler. İşte enzimler en uygun tuz konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterirler.



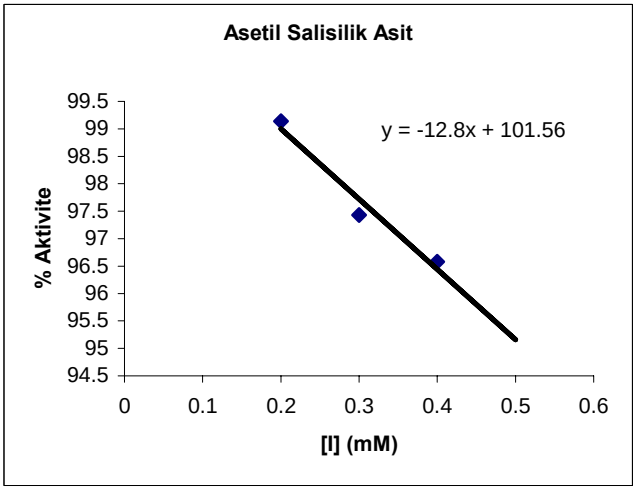
Şekil 3.6. Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlılığını gösteren grafik.

3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Etkisi

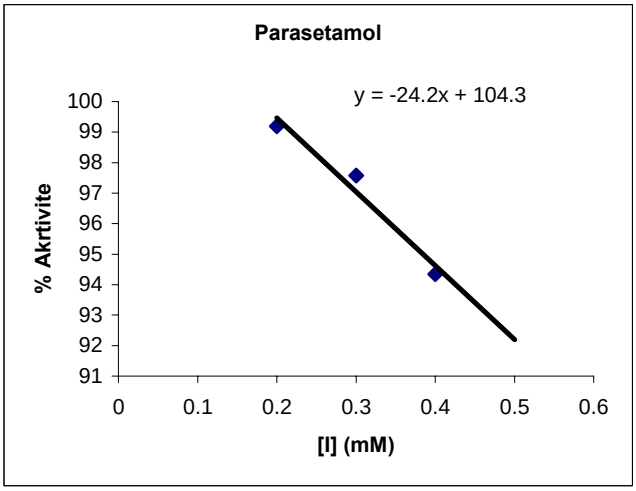
Her ilaç için ilave edilen ilaç miktarıyla % aktivite grafikleri çizilip bu grafiklerden yararlanarak I_{50} değerleri bulundu. K_i değerleri Lineweaver-Burk denkleminden saptandı. Bütün kinetik incelemeler 25 ^oC'de ve optimal pH'da yapıldı (fosfat tamponu, pH 8.5).



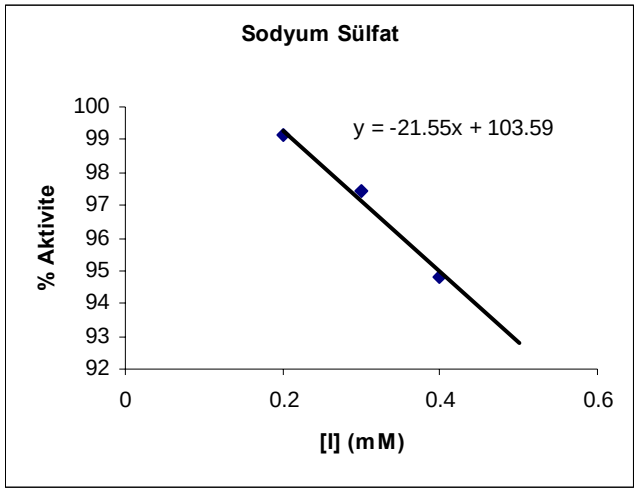
Şekil 3.7. Amoksilin için % Aktivite-[I] grafiği.



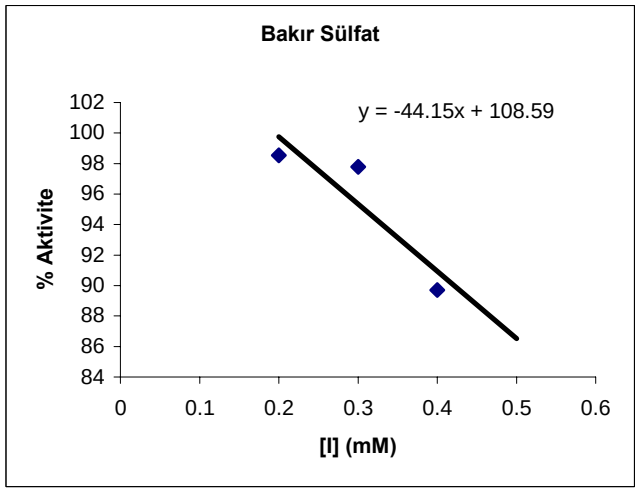
Şekil 3.8. Asetil Salisilik Asit için % Aktivite-[I] grafiği.



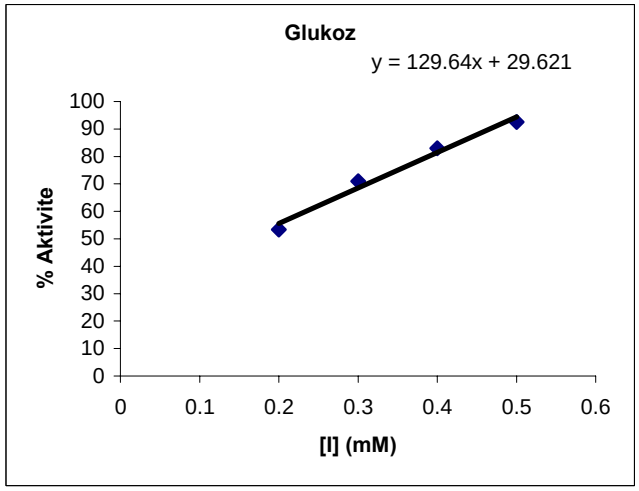
Şekil 3.9. Parasetamol için % Aktivite-[I] grafiği.



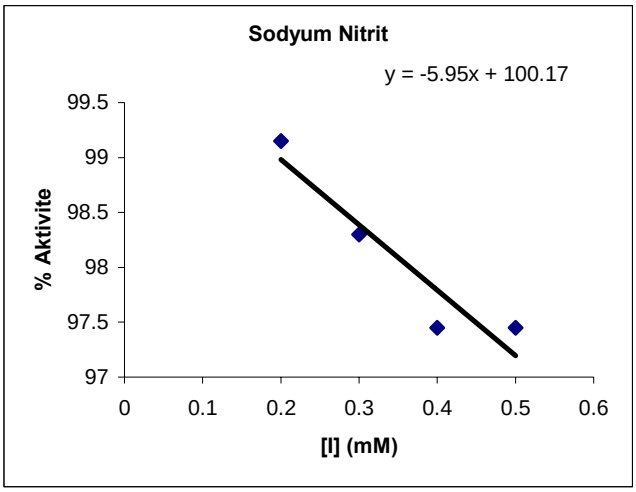
Şekil 3.10. Sodyum Sülfat için % Aktivite-[I] grafiği.



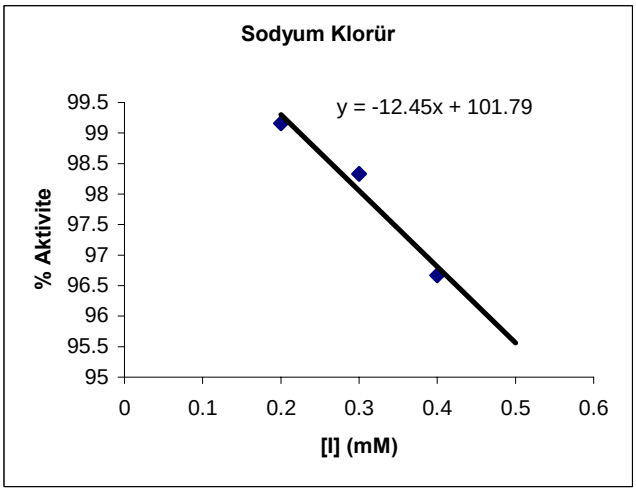
Şekil 3.11. Bakır Sülfat için % Aktivite-[I] grafiği.



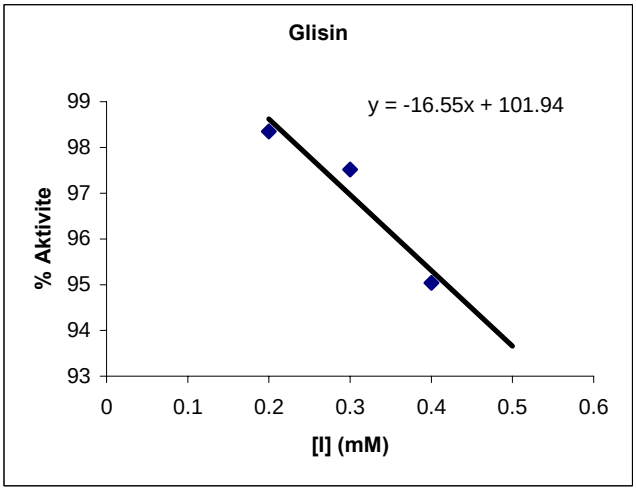
Şekil 3.12. Glukoz için % Aktivite-[I] grafiği.



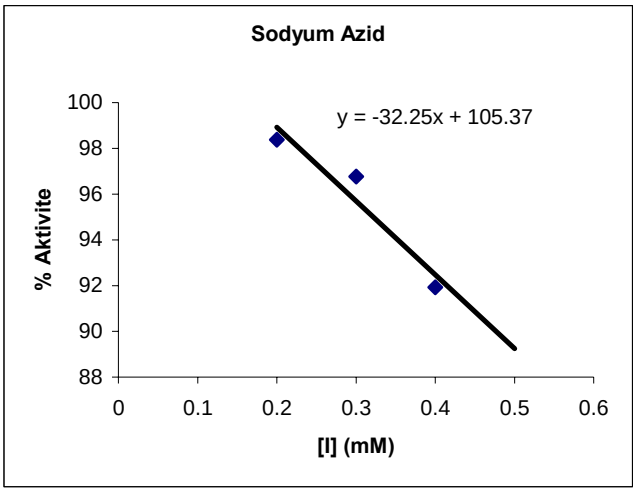
Şekil 3.13. Sodyum Nitrit için % Aktivite-[I] grafiği.



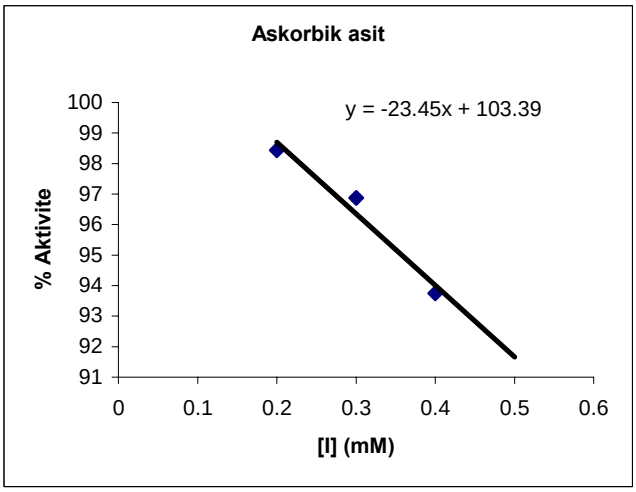
Şekil 3.14. Sodyum Klorür için % Aktivite-[I] grafiği.



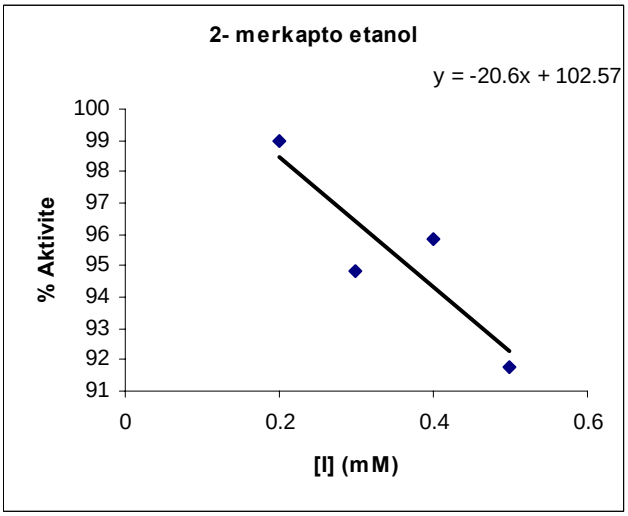
Şekil 3.15. Glisin için % Aktivite-[I] grafiği.



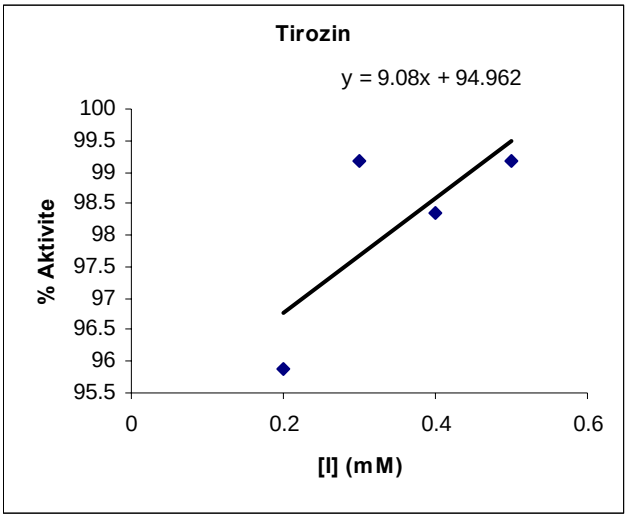
Şekil 3.16. Sodyum Azid için % Aktivite-[I] grafiği.



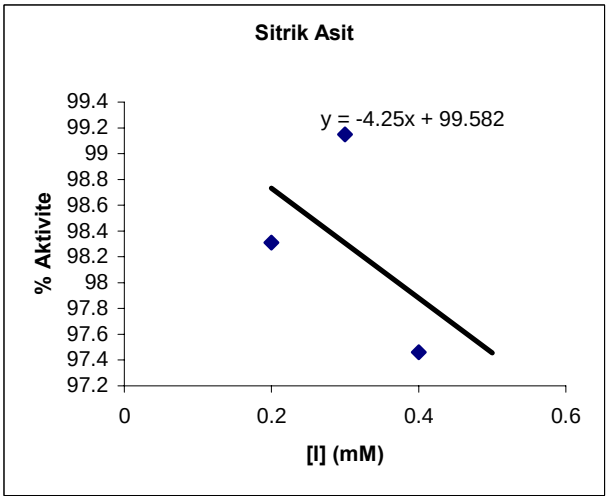
Şekil 3.17. Askorbik Asit için % Aktivite-[I] grafiği.



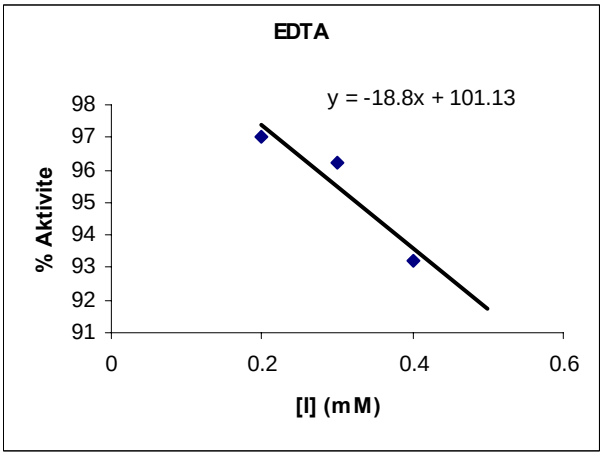
Şekil 3.18. 2-merkaptoetanol için % Aktivite-[I] grafiği.



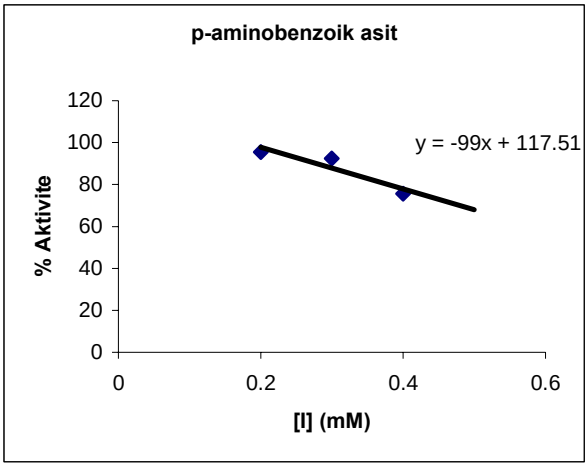
Şekil 3.19. Tirozin için % Aktivite-[I] grafiği.



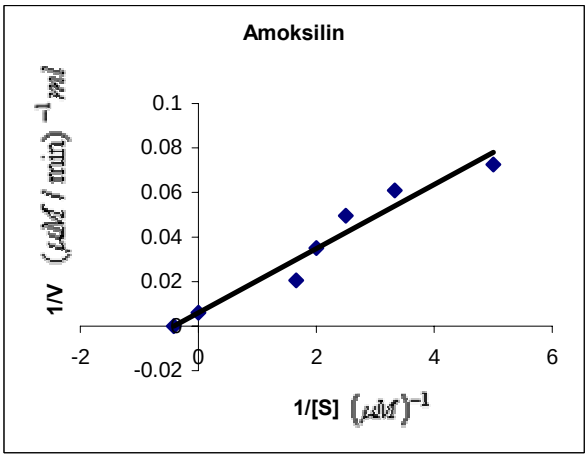
Şekil 3.20. Sitrik Asit için % Aktivite-[I] grafiği



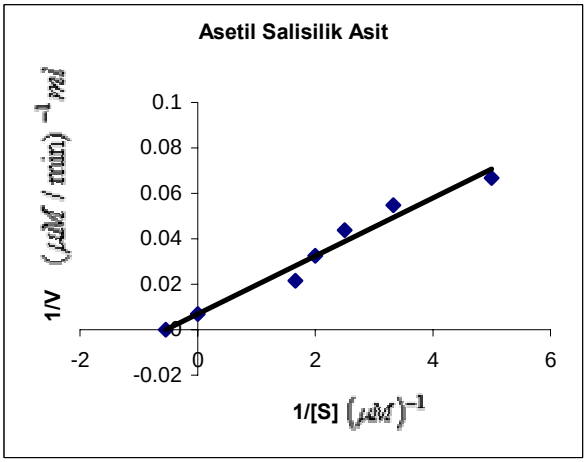
Şekil 3.21. EDTA için % Aktivite-[I] grafiği.



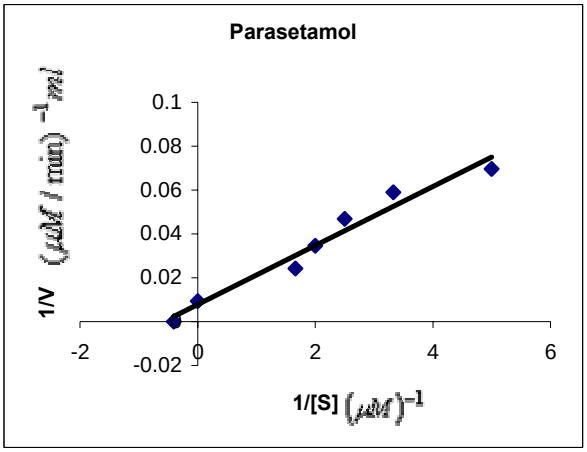
Şekil 3.22. p-aminobenzoik Asit için % Aktivite-[I] grafiği.



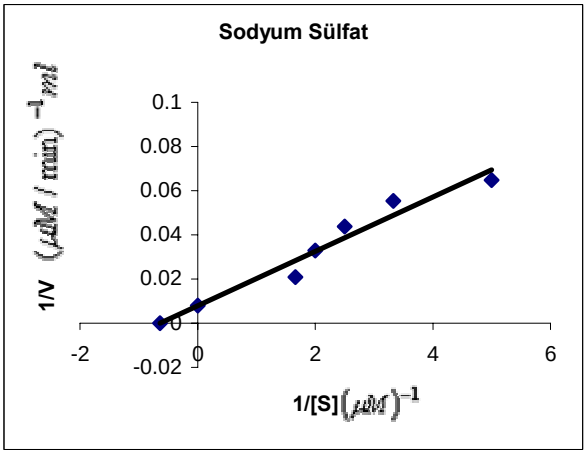
Şekil 3.23. Amoksilin için Lineweaver-Burk eğrisi.



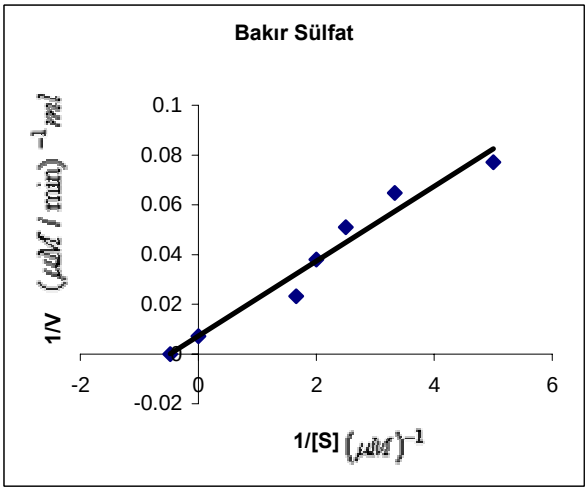
Şekil 3.24. Asetil Salisilik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi.



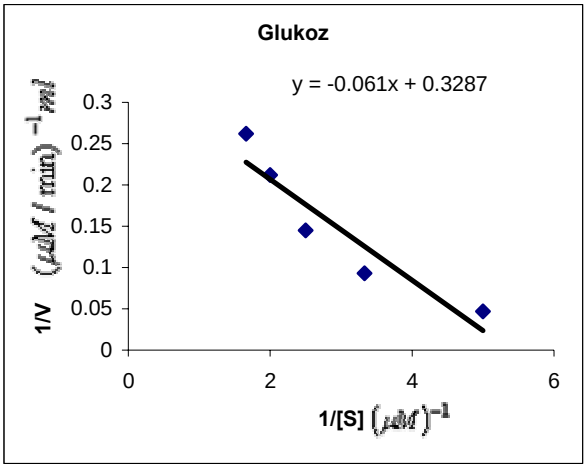
Şekil 3.25. Parasetamol için Lineweaver-Burk eğrisi.



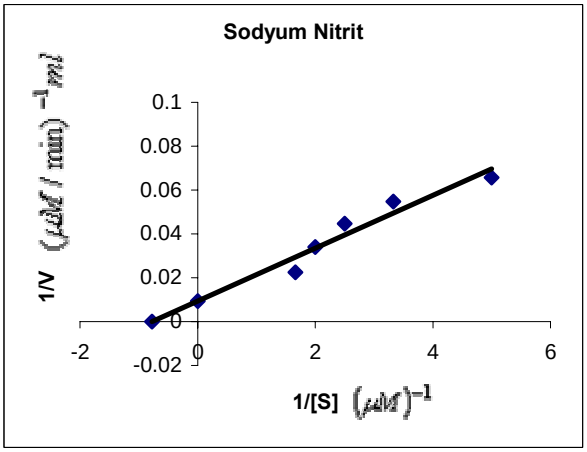
Şekil 3.26. Sodyum Sülfat için Lineweaver-Burk eğrisi.



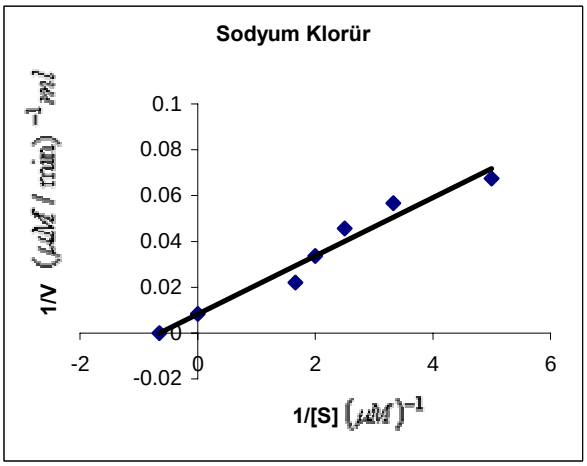
Şekil 3.27. Bakır Sülfat için Lineweaver-Burk eğrisi.



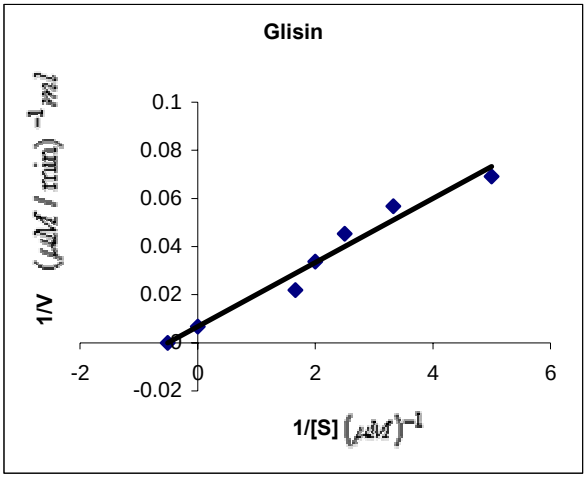
Şekil 3.28. Glukoz için Lineweaver-Burk eğrisi.



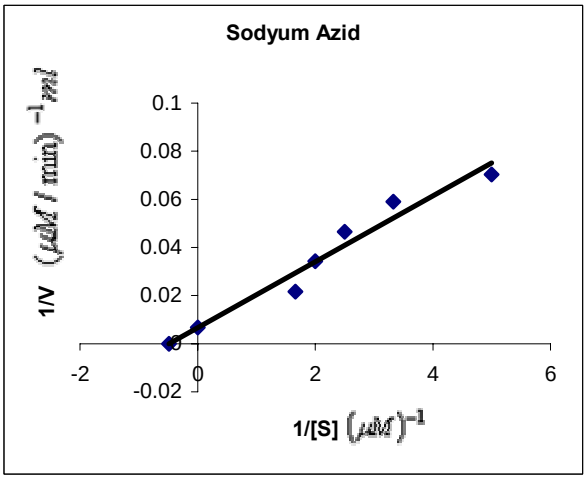
Şekil 3.29. Sodyum Nitrit için Lineweaver-Burk eğrisi.



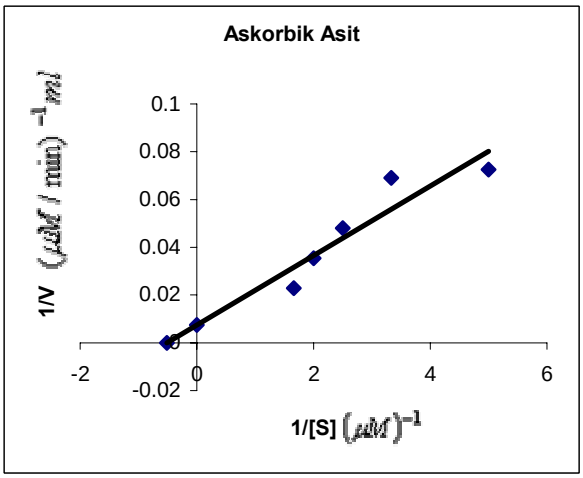
Şekil 3.30. Sodyum Klorür için Lineweaver-Burk eğrisi.



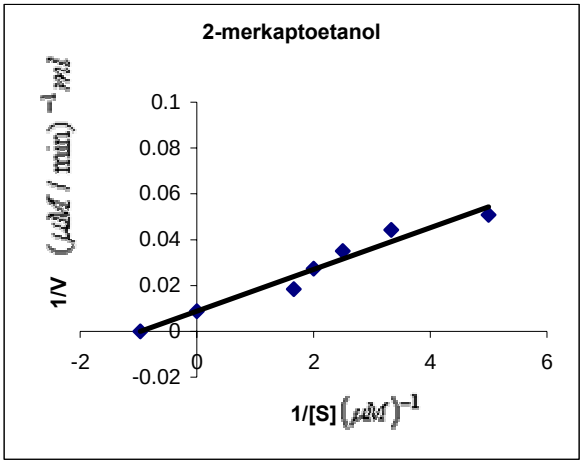
Şekil 3.31. Glisin için Lineweaver-Burk eğrisi.



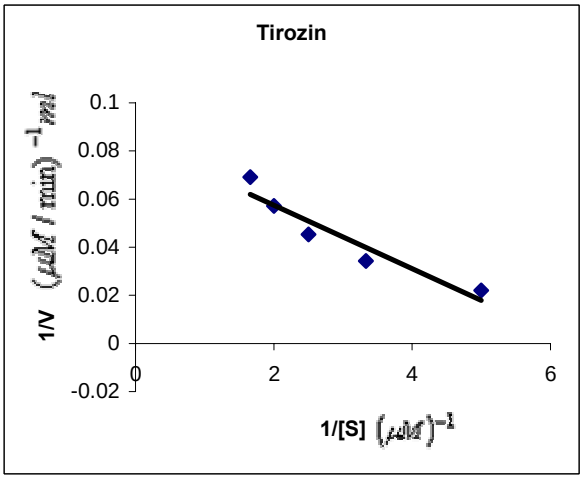
Şekil 3.32. Sodyum Azid için Lineweaver-Burk eğrisi.



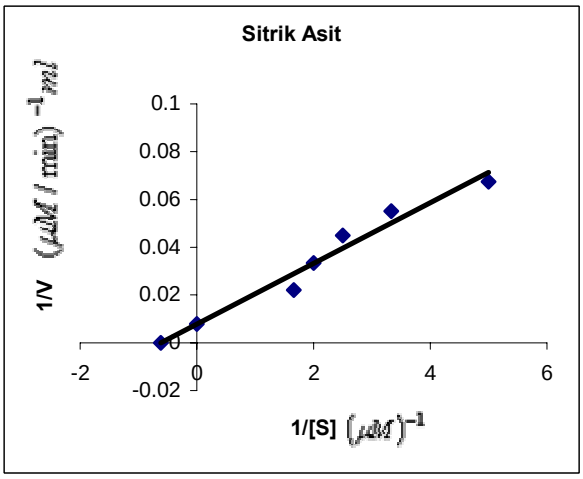
Şekil 3.33. Askorbik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi



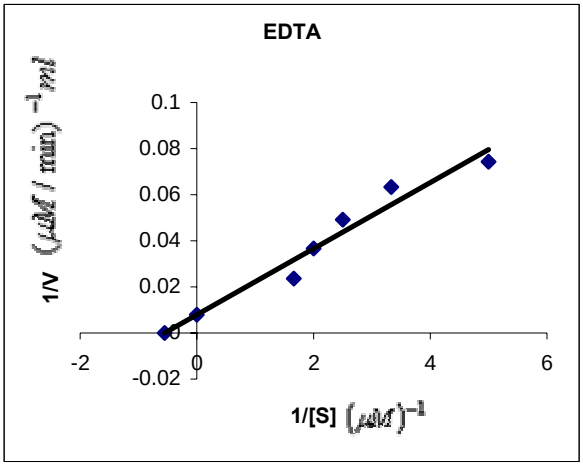
Şekil 3.34. 2-merkaptoetanol için Lineweaver-Burk eğrisi



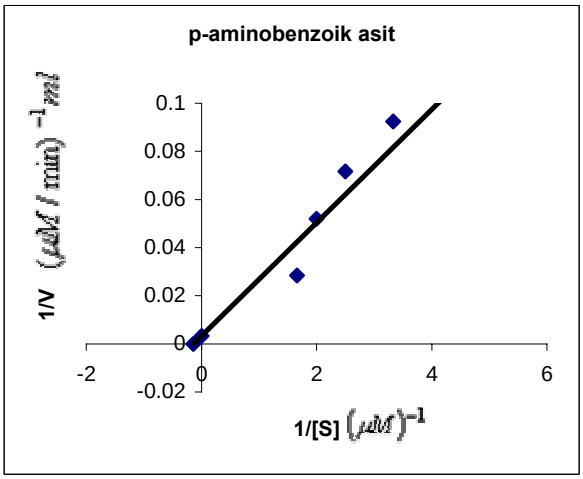
Şekil 3.35. Tirozin için Lineweaver-Burk eğrisi.



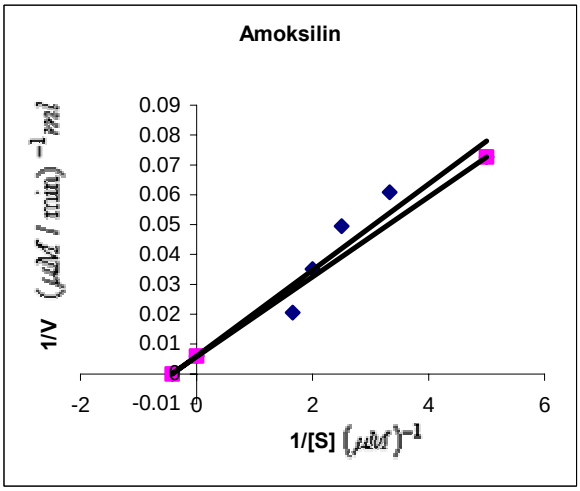
Şekil 3.36. Sitrik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi.



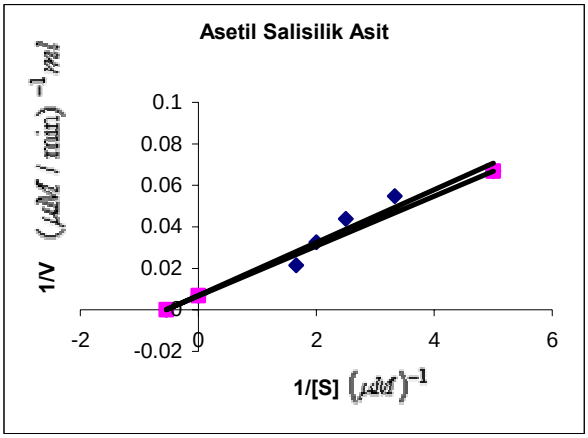
Şekil 3.37. EDTA için Lineweaver-Burk eğrisi.



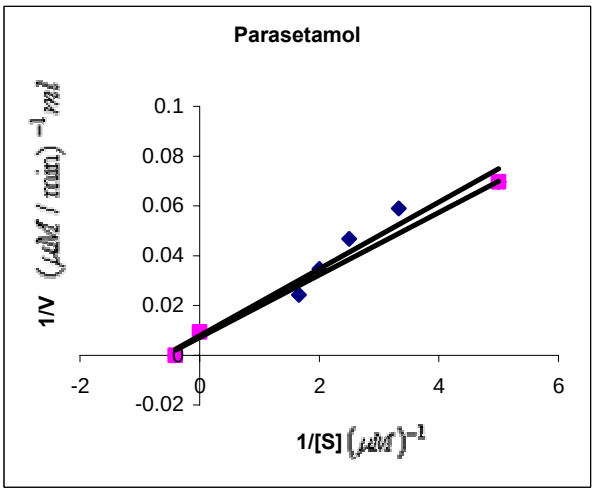
Şekil 3.38. p-aminobenzoik Asit için Lineweaver-Burk eğrisi.



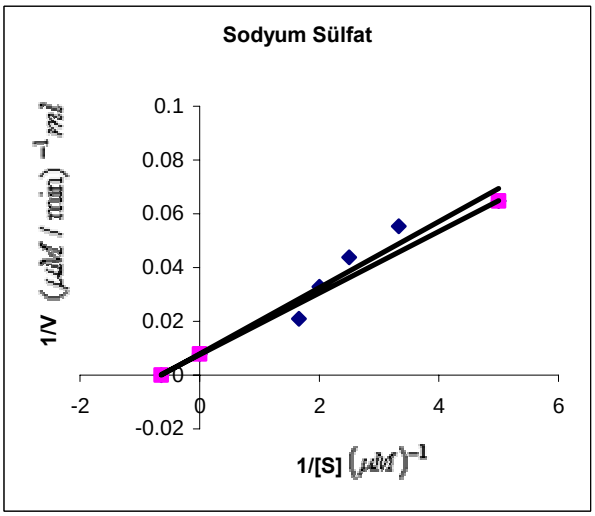
Şekil 3.39. Amoksilin için inhibisyon grafiği.



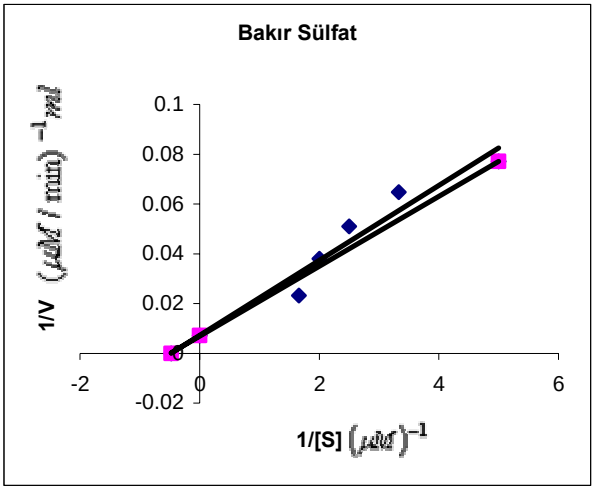
Şekil 3.4.0. Asetil Salisilik Asit için inhibisyon grafiği.



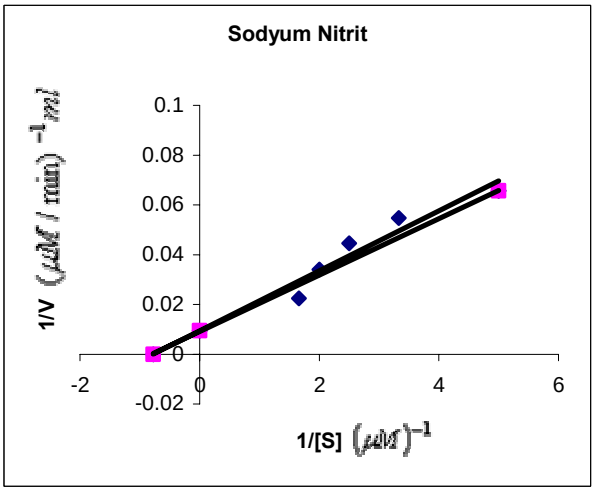
Şekil 3.41. Parasetamol için inhibisyon grafiği.



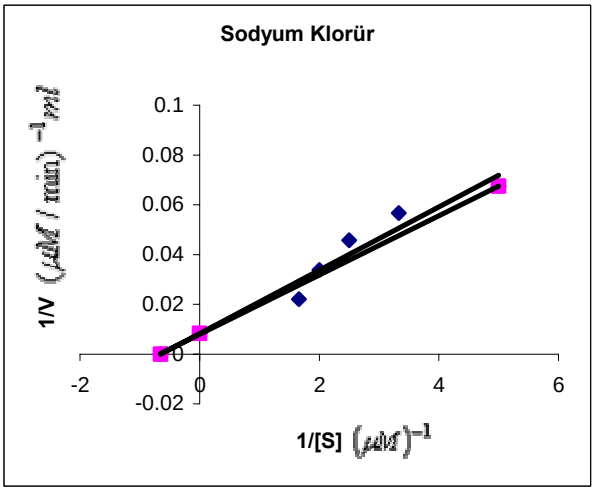
Şekil 3.42. Sodyum Sülfat için inhibisyon grafiği.



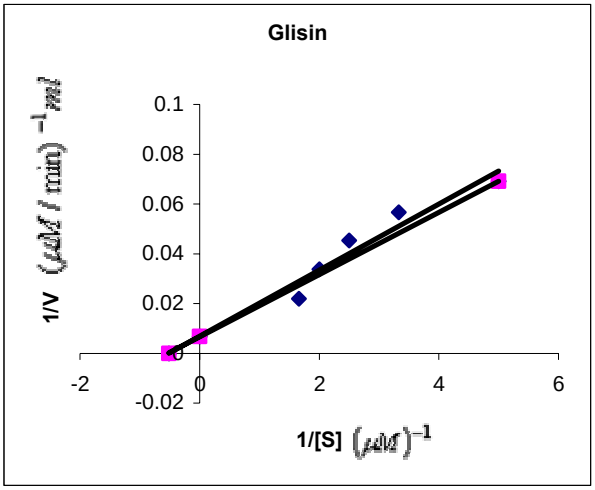
Şekil 3.43. Bakır Sülfat için inhibisyon grafiği.



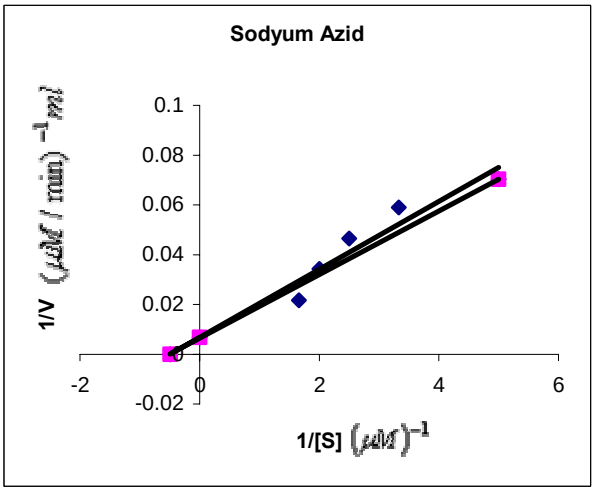
Şekil 3.44. Sodyum Nitrit için inhibisyon grafiği.



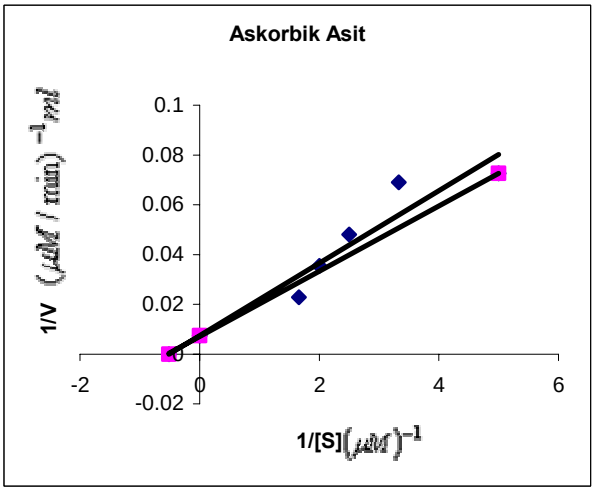
Şekil 3.45. Sodyum Klorür için inhibisyon grafiği.



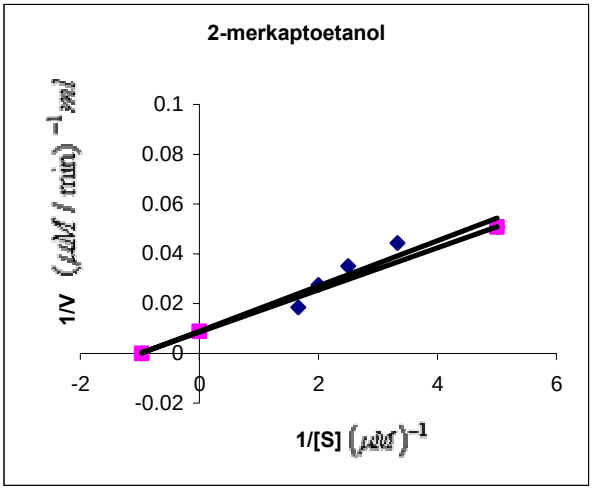
Şekil 3.46. Glisin için inhibisyon grafiği.



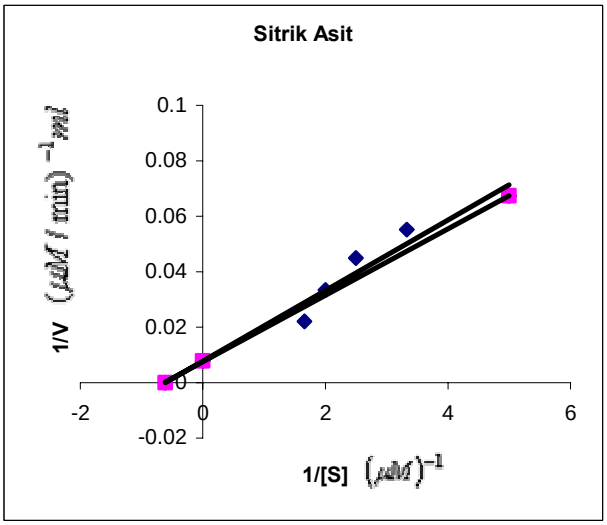
Şekil 3.47. Sodyum Azid için inhibisyon grafiği.



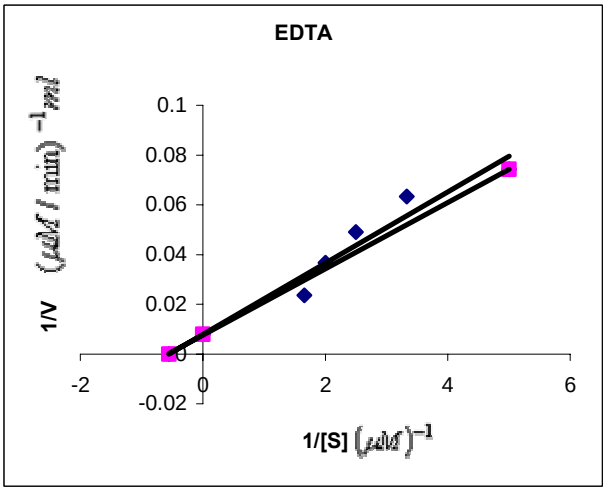
Şekil 3.48. Askorbik Asit için inhibisyon grafiği.



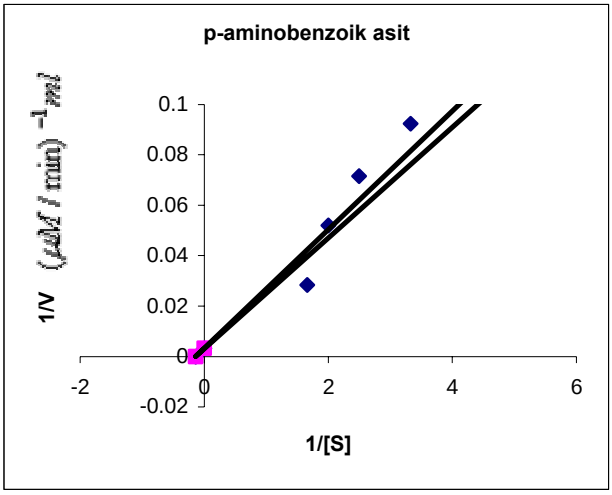
Şekil 3.49. 2-merkaptoetanol için inhibisyon grafiği.



Şekil 3.50. Sitrik Asit için inhibisyon grafiği.



Şekil 3.51. EDTA için inhibisyon grafiği.



Şekil 3.52. p-aminobenzoik Asit için inhibisyon grafiği.

Çizelge 3.2. Farklı inhibitörlerle PPO 'nin K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.

İnhibitör	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Amoksilin	0.819	Yarışmasız
Asetil salisilik asit	0.167	Yarışmasız
Parasetamol	0.308	Yarışmasız
Sodyum Sülfat	0.278	Yarışmasız
Bakır Sülfat	0.552	Yarışmasız
Glukoz	Aktive	-
Sodyum Nitrit	0.0822	Yarışmasız
Sodyum Klorür	0.166	Yarışmasız
Glisin	0.221	Yarışmasız
Sodyum Azid	0.404	Yarışmasız
Askorbik Asit	0.304	Yarışmasız
2-merkaptoetanol	0.271	Yarışmasız
Tirozin	Aktive	-
Sitrik Asit	0.0594	Yarışmasız
EDTA	0.255	Yarışmasız
p-aminobenzoik Asit	1.018	Yarışmasız

Çizelge 3.3. Bazı ilaç ve kimyasalların PPO ile etkileşmesi sonucu regresyon grafiğinden bulunan I_{50} değerleri.

İlaç	I_{50} (mM)
Amoksilin	0.846
Asetil salisilik asit	4.131
Parasetamol	2.243
Sodyum Sülfat	2.487
Bakır Sülfat	1.327
Glukoz	Aktivatör
Sodyum Nitrit	8.432
Sodyum Klorür	4.159
Glisin	3.138
Sodyum Azid	1.717
Askorbik Asit	2.276
2-merkaptoetanol	2.552
Tirozin	Aktivatör
Sitrik Asit	11.666
EDTA	2.719
p-aminobenzoik Asit	0.681

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Iğdır Kayısısı'ndan saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi üzerinde bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon kinetiği 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 kinetik özellikleri incelenmiş ve çeşitli ilaç ve 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 kaysısından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması laboratuarımızda gerçekleştirilmiştir. Söz konusu olan bu enzimin kolondan elüsyonu için en uygun elüsyon çözeltisinin 1M NaCl içeren 0.05M 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 A^o 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 373.39 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Bu değer afinite kromatografisi yardımı ile yapılmış olup bulunan saflaştırma katsayısı değeri oldukça yüksek bulunmuştur. Iğdır kaysısından yapılan bu çalışmada bulduğumuz saflaştırma katsayısının çok yüksek olmasının muhtemelen sebebi, birincisi afinite kromatografisi kullanılarak PPO saflaştırmak ki literatürde kısıtlı sayıdadır, ikincisi Iğdır kaysısının türü olan şalak 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 kaysısından 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 kaysısından 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.

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflığının kontrolü SDS-Poliakrilamid Jel Eletroforezi ile yapıldı (Laemmli, 1970). Elektroforez sonucunda tek bant gözlenmiştir. Elektroforezde tek bant olması tatbik edilen çözeltide sadece bir tek proteinin var olduğunun kanıtıdır. Bu protein de polifenol oksidaz enzimidir (Şekil 3.3). Genellikle polifenol oksidaz izoenzimlerinin molekül ağırlıkları, 55.000-70.000 dalton arasında olduğu çalışmalarda bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada kayısıdan polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmış elektroforez sonucu 67.1 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ve tek bant görülerek kayısının tanımlanması yapılmıştır (Chevalier ve ark., 1999). Değişik kaynaklardan yapılan çalışmalarda elma üzerinde polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 25 kDa bulunmuştur (Jharna ve ark., 1997). Yapılan başka bir çalışmada enginarda PPO saflaştırılmış ve yapılan elektroforez sonrası molekül ağırlığı yaklaşık 52 kDa olarak tespit edilmiştir (Doğan ve ark., 2005). Ankara armudu üzerinde yapılan bir çalışmada ise PPO enziminin SDS-Page ile yapılan elektroforez sonucu molekül ağırlıkları sırasıyla 60, 40 ve 28 kDa olarak saptanmıştır (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz değerin literatür bulgularıyla paralel olduğu saptanmıştır. Ancak çeşitli kayısı türlerinde polifenol oksidaz enziminin araştırılması çalışmaları literatürlerde kısıtlı sayıdadır. Bu yüzden çok fazla karşılaştırma yapılamamıştır, yapılan bu çalışmanın literatüre tarafımızdan büyük katkısı olacağı düşüncesindeyiz.

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, beta-merkapto 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 kayısısından saflaştırılan PPO enzimi üzerinde amoksilin, asetil salisilik asit, parasetamol, askorbik asit, sodyum sülfat, bakır sülfat, glukoz, sodyum nitrit, sodyum klorür, glisin, sodyum azid, 2-merkaptoetanol, tirozin, sitrik asit, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve p-aminobenzoik asit gibi inhibitörler kullanılarak en etkili inhibitörün p-aminobenzoik asit olduğu I_{50} değerlerinden anlaşılmaktadır. Ayrıca kullanılan bu inhibitörlerin sırasıyla Amoksilin, asetil salisilik asit, parasetamol, askorbik asit, sodyum sülfat, bakır sülfat, glukoz, sodyum nitrit, sodyum klorür, glisin, sodyum azid, 2-merkaptoetanol, tirozin, sitrik asit, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve p-aminobenzoik asit yarışmasız inhibisyon gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 3.2.).

Enzimin kinetik özelliğini gösteren V_{max} ve K_m değerleri Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla saptandı. K_m = 14088 mM ve V_{max} = 8.17 U olarak hesaplanmıştır. V_{max} enzimin katalitik olarak aktivitesinin ölçüsüdür. Elde edilen V_{max} değeri yapılan literatür çalışmalarına göre farkılık arzetmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalarda PPO enzimlerinin farklı substratları için farklı V_{max} değerleri bulunmuştur. Örneğin; Çin lahanası, Malatya kayısısı, hurma ağacı, yali armudu ve fasulyeden elde edilen PPO enzimleri için katekol substratı kullanılarak V_{max} değerleri sırasıyla 67.6, 833, 91, 766 ve 3846 U/mLdak; hurma ağacı ve fasulye PPO'su için 4-metil katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 750 ve 2577 U/mLdak olarak saptanmıştır (Weber ve Stahmann, 1964; Szabo, 1999; Mihalyi ve Vamos-Vigyazo, 1976; Euclides ve ark., 1990; Nagai ve Suzuki, 2001).

Iğdır kayısısından saflaştırılan PPO enzimi için katekol substratı kullanılarak K_m değeri 14088 mM olarak bulundu. Aynı substratla V_{max} değeri ise 8.17 (EÜ/ml) olarak bulunmuştur. *Anetham graxeolens* PPO' i için K_m 1.6 mM, V_{max} ise 333 (EÜ/ml); *Allium sp* PPO'ı için K_m 25 mM, V_{max} ise 666 (EÜ/ml); Malatya kayısısı için PPO'nda K_m 6.6 mM V_{max} ise 833 (EÜ/ml) olduğu bulunmuştur. Daha farklı kaynaklı PPO enzimleri için katekol substratı ile 3.0 10^{-3} M 'dan 0.12 M 'a kadar değişen K_m değerleri saptanmıştır (Vamos-Vigyazo, 1981), Amasya elması, hurma ağacı, fasulye, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden saflaştırılan PPO enzimlerinin 4-metil katekol substratı için elde edilen K_m değerleri 1.6 - 4.0 mM arasında olduğu bulunmuştur (Mihalyi ve Vamos-Vigyazo, 1976; Beena ve Gowda, 2000; Schaller, 1972; Euclides ve ark., 1990).Yapılan başka bir çalışmada Van elması üzerinde PPO için K_m değeri 14.28 mM olarak bulunurken; V_{max} değeri ise 1.232 (EÜ/ml) olarak bulunmuştur (Demir ve ark., 2006). Iğdır kaysısından saflaştırılan PPO enzimin kinetik parametreleri olan K_m ve V_{max} değerleri literatür değerleri ile uyum içersinde olduğu söylenebilir.

İnhibisyon etkisi K_i sabiti ve I_{50} değerlerini bulmak için Lineweaver – Burk eğrisi ve ilaç - derişim grafiklerinden yararlanılarak bulunmuştur. I_{50} değerini belirlemek daha pratik oluğu için araştırmalarımızda bu değer saptanmıştır. Bu amaçla beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % aktiviteler belirlenmiştir. Bu grafiklerden hesaplanan I_{50} değerleri Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.

Iğdır kaysısından saflaştırılan PPO enzimin yüksek miktarda saflaştırılması ve bu saflaştırma oranının şimdiye kadar yapılan çalışmalarda görülmemesinin 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) Asetilkolinesteraz 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 ribonucleoenzyme, 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.

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.

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.

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

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.

Cuatrecases, P., 1970. Protein purification by affinity chromotography. ***The Your of Biochem.,*** **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.

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.

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

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.

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.

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.

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 o-dihydroxyphenolase activity polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. ***J. Food Sci.,*** **50:**111.

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

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

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.

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 of Bacteriophage T_4-*** 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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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

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.

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

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.

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.

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

1982 yılında Malatya'nın Doğanşehir ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Doğanşehir'de, lise öğrenimini Adıyaman'da tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde yüksek öğrenime başladı. 2001 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı'na bağlı Biyokimya Laboratuarı'nda staj yaptı. 2003 yılında yüksek öğrenimini tamamladı. 2003 yılında başladığı Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya anabilim dalında tezsiz yüksek lisans programından 2004 yılında mezun oldu. 2005 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya anabilim dalında yüksek lisans programına başladı.