

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DÖNGEL BİTKİSİ (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) MEYVELERİNDEKİ
POLİFENOL OKSİDAZ AKTİVİTESİNİN KARAKTERİZASYONU

83297

Barbaros DİNÇER

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde




“Yüksek Lisans Kimya”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08.01.1999

Tezin Savunma Tarihi : 10.02.1999

83291

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Saadettin GÜNER 
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Serdar KARABÖCEK 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU 

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU 

TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Trabzon 1999

ÖNSÖZ

Bu çalışma, döngel bitkisi meyvelerindeki polifenol oksidaz aktivitesinin karakterizasyonunu içermektedir. Ayrıca bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş olup, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Lisans Üstü Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, danışmanlığımı yapan ve manevi desteğini benden esirgemeyen Doç. Dr. Saadettin Güner' e ve Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yaşar Gök' e desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Barbaros DİNÇER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar	4
1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri	9
1.4. Esmerleşme Reaksiyonlarının Substratları	12
1.5. Enzim Aktivitesini Tayin Metodları	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	18
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar	18
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	18
2.3. Ham Ekstrağın Hazırlanması	19
2.4. Protein Tayini	19
2.5. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini	20
2.6. Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	21
2.7. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidazın Kinetiğinin İncelenmesi	22
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4. ÖNERİLER	37
5. KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	43

ÖZET

Bu çalışmada, döngel bitkisi (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) meyvelerinden hazırlanan ekstraktlarda polifenol oksidaz (PFO) aktivitesi çeşitli biyokimyasal ve kinetik veriler açısından detaylı bir şekilde incelenmiştir. Katekol, 4-metil katekol, DOPA (dihidroksifenilalanin), DHPPA (3,4-dihidroksifenil propiyonik asit) ve epikatekin adlı fenolik substratların oksidasyonunu etkin bir şekilde katalizleyen döngel PFO 0.96 mg protein/ml değerlerine kadar sabit bir artış göstermiş ve her bir substrat ile spesifik pH ve sıcaklık değerlerinde etkileşim sağlamıştır. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda döngel PFO in basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve en yüksek derecede 4-metil katekol substratına ilgi duyduğu ve bu substrat ilgisinin sırasıyla 4-metilkatekol>DOPA>katekol>epikatekin>DHPPA şeklinde değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca, kinetik verilerden elde edilen Hill grafiği her bir substrat için $h < 1$ değerini vererek enzimin tek bir substrat bağlanma bölgesine sahip olduğu ve dolayısıyla kooperativite göstermediği tespit edilmiştir. Sistein, sodyum azid ve benzoik asit gibi genel PFO inhibitörleri enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etmiştir. Tüm bu veriler, döngel meyvelerinde mevcut olan PFO in diğer bitki PFO aktivitelerinden oldukça yüksek olmasına rağmen benzer biyokimyasal ve kinetik davranışlar gösterdiğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol Oksidaz, difenolaz, döngel meyveleri (*Mespilus germanica*), DOPA, DHPPA

SUMMARY

Characterization of polyphenol oxidase activity from medlar fruits, (*Mespilus germanica* L., Rosaceae)

In this work, polyphenol oxidase (PPO) activity in the extracts prepared from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) was investigated in detail from the point of biochemical and kinetics data. Medlar PPO enzyme activity catalyzed efficiently the oxidation of phenolic substrates, catechol, 4-methyl catechol, DOPA (3,4-dihydroxyphenyl alanine), DHPPA (3,4-dihydroxyphenyl propionic acid) and epicatechine, and the activity was linear up to 0.96 mg protein/ml. The enzyme showed different activities at specific pH and temperature values for each substrate. Kinetic studies have shown that the medlar PPO enzyme obeys the simple Michaelis-Menten kinetics with the greatest degree of affinity for 4-methyl catechol and the order of affinity was observed to be 4-methyl catechol>DOPA>catechol>epicatechin>DHPPA. Moreover, the Hill plots for each substrate with Hill constants lower than 1 have indicated that there is only one binding site for the substrates with no cooperativity. The three of the common inhibitors of PPO enzymes, cystein, sodium azide and benzoic acid, all inhibited the activity very effectively. All the data support that the PPO enzyme activity detected in medlar fruits, although it is relatively higher, has similar biochemical and kinetic characteristics to other plant PPO enzymes.

Key words: Polyphenol oxidase, diphenolase, medlar fruits (*Mespilus germanica*), DOPA, DHPPA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Döngel bitkisi meyvelerinden hazırlanan ekstraktların protein içeriğinin belirlenmesi için sığır serum albumini standardı ile hazırlanan kalibrasyon grafiği	23
Şekil 2. Döngel bitkisi meyvelerinden hazırlanan ekstraktlardaki protein içeriğinin polifenol oksidaz aktivitesine etkisi	24
Şekil 3. 4-metil katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	25
Şekil 4. Katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	25
Şekil 5. DOPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	26
Şekil 6. Epikatekin substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	36
Şekil 7. DHPPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi	36
Şekil 8. 4-metil katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi	27
Şekil 9. Katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi	28
Şekil 10. DOPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi	28
Şekil 11. Epikatekin substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi	29
Şekil 12. DHPPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi	29
Şekil 13. 4-metil katekol substratı varlığında PFO in substrat-satürasyon grafiği	30
Şekil 14. Katekol substratı varlığında PFO in substrat-satürasyon grafiği	31
Şekil 15. DOPA substratı varlığında PFO in substrat-satürasyon grafiği	31
Şekil 16. Epikatekin substratı varlığında PFO in substrat-satürasyon grafiği	32
Şekil 17. DHPPA substratı varlığında PFO in substrat-satürasyon grafiği	32
Şekil 18. Çeşitli substratlar varlığında elde edilen Hill eğrileri	33
Şekil 19. Döngel PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu	35
Şekil 20. Döngel PFO aktivitesinin sistein ile inhibisyonu	35
Şekil 21. Döngel PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu	36

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. PFO aktivitesi tayininde kullanılan karışımın içeriği	20
Tablo 2. Çeşitli fenolik bileşiklerin MBTH ile PFO varlığında verdikleri katılma ürünlerinin Spektral Özellikleri	21
Tablo 3. Optimum pH ve Sıcaklık Deneylerinde Kullanılan Tipik Reaksiyon Karışımı	22
Tablo 4. Çeşitli fenolik substratların PFO ile olan reaksiyonları Optimizasyonu	30
Tablo 5. Polifenol oksidaz aktivitesi ile ilgili çeşitli enzim kinetiği değerleri	33
Tablo 6. İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyonu aktivitesine etkisi	36

SEMBOLLER DİZİNİ

BSA	: Bovine serum albümin
DHPPA	: 3,4-dihidroksifenil propiyonik asit
DMF	: Dimetilformamid
DOPA	: Dihidroksifenilalanin
EC	: Enzim kod numarası
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IUB	: Uluslararası Biyokimya Derneği
MBTH	: 3-metil-2- benzotiyozolinon hidrazon
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
PFO	: Polifenol Oksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan

1. GENEL BİLGİLER

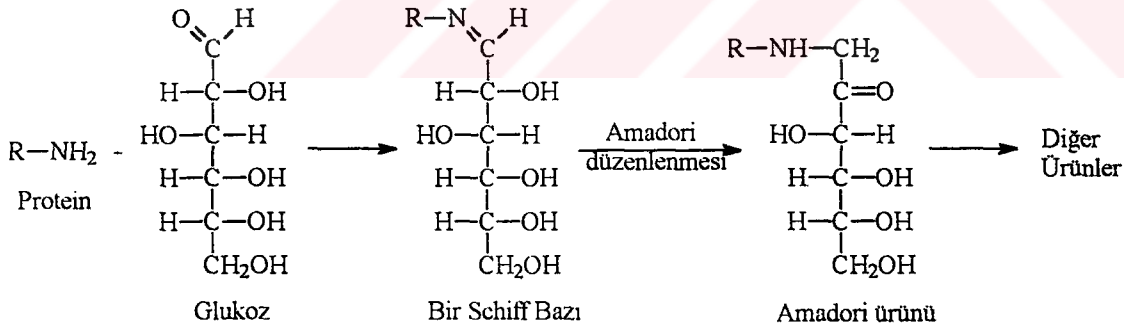
1.1. Giriş

Birçok meyve ve meyve ekstraktlarında, esmerleşme (browning) genel adıyla bilinen renk değişimleri fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu ile sonuçlanan ve çok iyi bilinen bir olaydır. Farklı meyve kültürleri arasında esmerleşme derecesinin fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz (PFO) adı verilen enzimin aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir ve böyle bir ilişki çeşitli bitkiler için ortaya konmuştur. Enzimatik olarak rengin esmerleşmesi oksijen varlığında PFO'nun, özellikle *o*-difenol grubu ve fenolik maddeleri renkli bileşiklere yükseltmesinden kaynaklanır. Gerçekte, PFO'larla katalizlenen esmerleşme reaksiyonlarında oluşan kinonlar oldukça reaktif olup, esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşirler (Whitaker, 1972; Friedman, 1996; 1997). Bu kahverengi pigmentin oluşumu bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez bu oksidasyon işlemleri arzu edilen seviyede durdurulamadıklarından özellikle besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında oluşturulurlar ve besinlerin duyu ve besinsel özelliklerinde değişimlere sebep olurlar. Bu, genelde besinin renk, koku ve besin değerinde istenmeyen değişimler şeklinde ortaya çıkarlar. Bunlar da besinin, hem ekonomik ve hem de besinsel değerini azaltırlar.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkilerde iki şekilde ortaya çıkabilir (Friedman, 1996; 1997). Bunlardan birisi sebze ve meyvelerde bulunan polifenol bileşiklerinin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu işlemlerle oluşan kinonlar daha sonra yapıları tam olarak bilinmeyen siyah renkli melanin pigmentlerine polimerleşirler. Muz, armut, marul ve patatese ayrıca meyve sularında klorojenik asidin böyle bir oksidasyonu ile oluşan kahverengi veya siyah lekeler bu tür pigmentlerin oluşumunu gösterir. Diğer bir enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise polifenol türevli kinonların serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır. Patates ve kazein içeren karışık besinlerde okside olmuş klorojenik asidin kazein ile reaksiyonları bu türden işlemlerdir. Tüm enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitki tür ve çeşidine göre farklılıklar gösterir ve PFO'nun aktivitesi; fenolik substratlara ve O₂'e bağlıdır. Bu

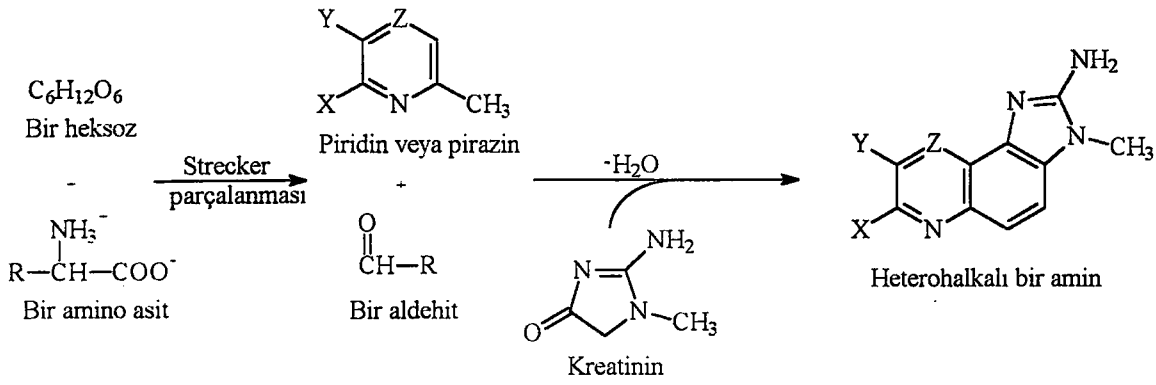
faktörlerden birinin ortadan kaldırılması ile enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını durdurulabilir veya azaltılabilir.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları yanında enzimlerin doğrudan etkisiyle ortaya çıkmayan ve enzimatik olmayan esmerleşme şeklinde tanımlanan diğer tür reaksiyonlar da bu esmer pigmentin oluşumundan sorumludurlar (Friedman, 1996; 1997). Bu işlemler Maillard reaksiyonları olarak tanımlanırlar ve enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına göre daha farklı ara ürünler üzerinden ve farklı mekanizmalarla gerçekleşirler (Reaksiyon 1). Proteinlerin, peptitlerin ve amino asitler gibi amin grubu içeren biyomoleküllerin karbohidratlarla olan ve ısı ile katalizlenen reaksiyonları bu türden işlemlerdir. Mesela, undaki gluten ile glukozun reaksiyonu, laktalbumin ile süt tozunda bulunan laktozun reaksiyonu ve serbest amino asitlerin kızarmış patatesteki glukoz ile olan reaksiyonları birer örnek oluştururlar. Bunun dışında *in vivo* protein-karbohidrat etkileşimleri de söz konusudur. Mesela, diyabet hastalarda hemoglobin ile glukozun reaksiyonu, kataraktlarda göz lensi proteininin glukoz ile reaksiyonu söz konusudur ve bu reaksiyonlar enzimatik olmayan yollarla esmer bir pigmentin oluşumundan sorumludurlar. Ayrıca, proteinlerin okside olmuş yağ asitleri ile gerçekleştirdikleri reaksiyonlar da önemlidirler. Kazein adlı protein okside olmuş linoleik asit ile böyle bir etkileşime girebilir (Friedman, 1996; 1997).



(Reaksiyon 1, Proteinlerdeki fonksiyonel gruplarla glukozun oluşturduğu bazı esmerleşme reaksiyonları ara ürünleri)

Bu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları dışında ısı ile katalizlenen ve heterohalkalı aminlerin oluşumu ile sonuçlanan bazı reaksiyonlarda vardır(Reaksiyon 2). Sadece hayvansal besinlerde bulunabilen amino asitler, karbohidratlar ve kreatinin arasındaki etkileşimlerle bu tür esmerleşme işlemleri gerçekleşebilir (Friedman, 1996; 1997).



(Reaksiyon 2, Heterohalkalı aminlerin oluşturulduğu esmerleşme reaksiyonları ve ürünleri (R, X ve Y harfleri H veya metil grubu; Z ise CH veya N)

Besinsel kalitedeki azalma, zorunlu amino asitlerin bu tür işlemlerle bozunması sonucu bu besinlerin sindirilmesinde oluşabilecek problemler ve çeşitli proteolitik ve glikolitik enzimlerin inhibisyonu şeklinde ortaya çıkar. Besinsel değeri olmayan ve toksik maddelerin oluşması besin değerini ve besinlerin güvenli olmasını da azaltır.

Tüm bu özellikleri ile beraber esmerleşme olayı, besin endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplardan sorumludur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimlerindeki değişimlerinin besinsel ve toksikolojik özelliklerine etkisinin ortaya konulması gereklidir. Ayrıca, esmerleşmenin kimyasal, biyokimyasal, besinsel ve toksikolojik açılarından tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin engellenmesine ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işlemi mümkün olabileceğinden dolayı, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konması hem insan beslenmesi ve hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak yönünden oldukça önemlidir.

Besinlerdeki esmerleşme reaksiyonlarını önlemek ya da en aza indirmek, besleyici olmayan ve toksikolojik etkilerini ortadan kaldıracak çözümler bulma amacıyla çeşitli yaklaşımlarda bulunmaktadır. Sistein veya glutatyon gibi kükürt içeren moleküller toksik maddelerin toksisitelerinin azaltılmasında ve dolayısıyla biyotransformasyonlarında önemli bir rol oynarlar. Bu türden kükürt içeren amino asitler ve kükürtçe zengin proteinlerin toksik esmerleşme ara ürünleri ile etkileşerek ve böylece toksisitenin oluşma şansını azaltırlar.

Amino gruplarının modifikasyonunun da bu grupların esmerleşme reaksiyonlarına katılmasını engellediği gözlenmiştir. Kimyasal yöntemlerle proteinlerde bulunan lizin amino gruplarının amit gruplarına dönüştürülmesi ile proteinlerin esmerleşme reaksiyonlarına maruz kalması önlenmiştir. Birçok sayıda antioksidan maddenin de esmerleşmeyi baskıladığı gözlenmiştir. Esmerleşmeyi engelleyecek bazı reaksiyonların geliştirilmesi de mümkün olmuştur. Bu amaçla saflaştırılmış bazı enzimler kullanılarak Maillard reaksiyonları ters yönde gerçekleştirilmiştir (Reaksiyon 1).

1.2. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında rol oynayan temel enzim polifenol oksidazdır (PFO) ve oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir (EC 1.14.18.1). PFO bakır içeren bir metaloenzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi), diğeri ise *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi) dir. Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinonoid maddeler kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler şeklinde polimerleşirler (Whitaker, 1972; Friedman, 1996; 1997).

Bazı türlerde tirozinaz olarak bilinen PFO aktivitesinin birçok organizmada yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir (Mayer, 1987). Omurgalılarda yapılan çalışmalar pigmentasyon ile fonksiyonel bir tirozinaz geni arasında doğrudan bir ilişki olduğu göstermiş olmasına rağmen PFO ların bitkilerdeki fizyolojik fonksiyonu tam olarak ortaya konamamıştır. Yüksek bitkilerde enzimatik esmerleşmenin temel sebebi PFO dir ve membrana bağlı olmasına rağmen integral bir membran protein değildir (Vaughn, 1988). Bu enzimin fenolik yapıdaki substratları vakuollerde bulunduğundan bu organelin kaybına yol açan doku hasarlarının bir sonucu olarak esmerleşme reaksiyonu meydana gelir.

Patateste PFO aktivitesi özellikle yumru, kök ve çiçeklerde oldukça yüksek olmasına rağmen yaprak ve saplarda daha düşük seviyelerde gözlenmiştir. Karakterize edilen PFO genlerinin pek çoğu fotosentetik dokulardan izole edilmiştir. Ancak bu enzimler fotosentetik olmayan dokularda da bulunmaktadır. PFO tarafından katalizlenen enzimatik esmerleşme özellikle *Solanum tuberosum* (patates) yumrularında ortaya çıkmıştır (Corsini, 1992). Patatesten izole edilen iki PFO geninin yaprak, çiçek ve köklerde ifade edildiği, yumrulara ise ekspresyon gözlenmediği bildirilmiştir (Hunt, 1993). Bununla birlikte, doku hasarını

takiben yumrular da PFO aktivitesinin yüksek düzeylere ulaşabildiği dolayısıyla enzimin bitki savunma sisteminde rol oynayabileceği bildirilmektedir (Thygesen, 1994).

Elmadaki PFO in hem difenolaz aktivitesi ve hem de monofenolaz aktivitesi ve bu aktiviteye çok çeşitli inhibitörlerin etkisi detaylı bir şekilde çalışılmıştır (Nicolas, 1994). Monofenolaz aktivitesi, enzimin izolasyon işlemlerine duyarlı olmasından dolayı ekstraksiyonu sırasında çok düşük oranlarda ve NMR spektrokopisi ya da HPLC gibi oldukça pahalı teknikler yardımıyla tespit edilebilmiş, ancak son yıllarda geliştirilen bir spektrofotometrik teknik yardımıyla elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağımlılığı izlenebilmiştir. Ayrıca PFO Triton X-114 deterjanı yardımıyla izole edilip kısmen saflaştırılmış ve kinetik karakterizasyonu sonucunda enzimin tek bir aktif bölgeye sahip olduğu ve katalitik işlem sırasında iki farklı konformasyonu halinde bulunabileceği öne sürülmüştür (Espin, 1995).

Monofenolaz aktivitesi avokado bitkisinde de tespit edilmiştir ve bu bitkide PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980). Avokadoda monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan ekstraktlar kullanılarak ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde oldukça düşük bulunmuştur. Ayrıca avokado PFO monofenolaz aktivitesi çeşitli substratlar varlığında radyometrik ve spektrofotometrik metotlar yardımıyla tespit edilmiştir. Yine Triton X-114 deterjanı kullanılarak kısmen izole edilen avokado PFO , 4-hidroksi anisol substratı kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu kinetik verilerden elde edilen bilgiler bu bitkiden izole edilen enzimin diğer kaynaklarda çalışılan PFO leri için önerilen reaksiyon kinetiğine tamamen uyduğu gösterilmiştir (Espin, 1997).

Çeşitli meyve kültürleri arasındaki esmerleşme derecesinin fenolik içerik ve PFO aktivitesindeki farklılıklara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Şeftali meyvelerindeki tannin içeriğinin ve çeşitli fenolik substratların konsantrasyonunun meyvenin gelişimi sırasında düzenli bir şekilde azaldığı ve hasat dönemine kadar bu düzeylerde kaldığı tespit edilmiştir. Bu bitkide PFO aktivitesi de fenolik bileşiklerin içeriğine benzer bir değişim göstermiştir. Yüksek PFO aktivitesine sahip şeftali kültürlerinin yüksek derecede esmerleşme hızına sahip olduğu gözlenmiştir (Lee, 1990). Şeftali dışında kayısı, erik, badem ve kiraz gibi meyvelerde de PFO ların aktif ve inaktif formları Triton X-100 ile kısmen izole edilmiş, ve enzimin pH 4.0-5.5 değerlerinde maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. SDS-PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile yapılan elektroforetik çalışmalarla

ve Western emdirme yöntemi ile de elma ve fasulye yapraklarına karşı geliştirilen antikorlar kullanılarak bu aktif ve inaktif formlar gözlenmiş, ve aktif formların temel bir formun proteolizi sonucu oluştuğu tespit edilmiştir. Denatürasyon şartlarında temel aktif formların 63 ve 43 kDa lık moleküler ağırlıklarına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlardan farklı türler arasında PFO ların biyokimyasal karakterleri açısından birçok temel benzerliklerin olduğu ortaya çıkmıştır (Fraignier, 1995).

Tropik bitkilerden biri olan papaya meyvelerinde de PFO ın varlığı bilinmektedir (Cano, 1995). Bu meyvelerden kısmen izole edilen PFO ın türlere göre değişimi incelenmiş ve toplam çözünebilen PFO aktivitesi dişi meyvelerde diğerlerine göre çok daha yüksek bulunmuş ve yeşil papaya meyvelerinde daha fazla PFO aktivitesi gözlenmiştir. Bu meyvelerden elde edilen enzimlerin elektroforetik karakterleri incelendiğinde hermafrodit meyvelerde 6 izoenzimin varlığı gözlenmesine rağmen dişi meyvelerde dört izoenzimin varlığını gösteren bandlar tespit edilmiştir (Cano, 1996).

Marulda gözlenen en önemli bozukluklardan birisi koyu kırmızı noktaların oluşumudur ve bu daha çok sebzenin taşınması ve saklanması sırasında ortaya çıkar. Bu tür lekelerin flavonoidlerin ve klorojenik asit türevlerinin bir PFO etkisiyle oksidasyonu sonucu bu dokularda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Ke, 1988). Marulda tilakoid membrana bağlı bir enzim olan PFO Triton X-114 kullanılarak izole edilmiştir ve enzim fenolik bileşiklerden ve klorofillerden ayrılarak %70 oranında saflaştırılmıştır. Klorojenik asit ve butilkatekol substratları kullanılarak bu PFO ın kinetiği hem aktif ve hem de aktif olmayan enzim formlarını içeren örneklerde çalışılmıştır. Marulda aktif olmayan enzim formlarının sodyum dodesil sülfat ile aktive edilebileceği gösterilmiştir (Chazarra, 1996).

Özellikle salata halinde tüketilen fasulye tohumları bir esmerleşme reaksiyonuna maruz kalarak rengi yeşilden kahverengiye doğru değişir. Bu reaksiyonlar bitkinin besinsel değerinde bir kayıba yol açtığından, esmerleşme reaksiyonunun bu bitki tohumlarında kontrol edilebilmesi için saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan PFO ın elektroforetik molekül ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuş ve pirogallol, katekol ve dihidroksifenilalanin gibi çeşitli substratlar varlığında oldukça yüksek aktiviteler gözlenmesine rağmen tirozin, kresol, kafeik asit ve klorojenik asit varlığında daha düşük aktiviteler gözlenmiştir. Tiyol gruplarını içeren çeşitli maddelerin PFO aktivitesini inhibe ettiği de tespit edilmiştir (Chilaka, 1993).

PFO ların biyokimyasal özellikleri besin endüstrisi açısından önemli olan çeşitli şifalı bitkilerde de çalışılmıştır. *Allium sp.* den izole edilen PFO ın aktivitesi çeşitli substratlarla incelenmiş ve enzimin en fazla katekole karşı spesifite gösterdiği gözlenmiştir. İzole edilen enzimin pH 7.5 de en iyi aktiviteye sahip olduğu ve 40 °C nin üzerinde PFO aktivitesinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Bu bitkiden elde edilen PFO , askorbik asit, 2-merkaptoetanol ve sodyum metabisülfid gibi genel PFO inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu da bulunmuştur (Arslan, 1997).

Afrikada önemli karbohidrat kaynaklarından birisi olan yer patatesinin depolama ve işleme teknikleri sırasında gerçekleşen esmerleşme reaksiyonları sonucu önemli derecede besinsel kayıplara uğradığı ve bu bitkinin her yıl yaklaşık 5 milyon tonunun sadece Nijerya’ da kullanılamaz duruma geldiği bildirilmektedir (Anosike, 1985). Çalışılan bazı yer patatesi türlerinde bu esmerleşme reaksiyonlarının %90 kadarının PFO ile ilişkili olduğu ancak bazı türlerde ise PFO aktivitesi düşük olmasına rağmen esmerleşmenin %60 tan daha fazlasının PFO aktivitesine bağlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu türlerde mevcut PFO aktivitesinin optimum sıcaklığı 30 °C olarak gözlenmiş ve esmerleşme reaksiyonunun PFO aktivitesi yüksek türlerde genel PFO inhibitörlerine oldukça duyarlı olduğu da bulunmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının enzimatik olmadığı patates türlerinde ise inhibitörlerin etkisinin azaldığı bildirilmiştir (Omidiji, 1996).

Çay bitkisinin (özellikle filizlerinin) polifenoller ve PFO’ca oldukça zengin olduğu bilinmektedir ve PFO nin çayın fermentasyonunda anahtar enzim olduğu bildirilmektedir. PFO bu bitkide flavanollerin, theaflavin ve thearubigin olarak tanımlanan siyah çayın bileşenlerine oksidasyonunda önemli bir rol oynar (Mayer, 1991). PFO çay bitkisinin hemen hemen tüm bölümlerinde bulunur ve çay kalitesi bu enzimin çay filizlerindeki içeriği ile pozitif olarak ilişkilidir (Biswas, 1971). Çay bitkisinin çeşitli organlarından hazırlanan enzim ekstraktlarında yapılan enzimatik deneyler, enzimin çözünür ve bağlı formlarının içeriklerinin bir tür içerisinde farklılıklar göstermiştir (Singh, 1994). Bitkiden hazırlanan PFO ve peroksidaz enzimleri ile yeşil çay yapraklarından izole edilen flavanoller *in vitro* muamele edilmiştir ve oluşan reaksiyon ve ürünler HPLC ile izlenmiştir. Bu iki enzimin çayın fermentasyonuna ya da kararmasına etkisi araştırılmış ve PFO varlığında daha yüksek düzeylerde theaflavin ve thearubigin gözlenmiştir ki bu iki bileşen çayın kalitesinden sorumludurlar (Finger, 1994). PFO ın etkin olduğu bitkilerden birisi de mantarlardır. Endüstriyel olarak en az düzeyde işlenmiş mantarların raf ömrü saklanması sırasında

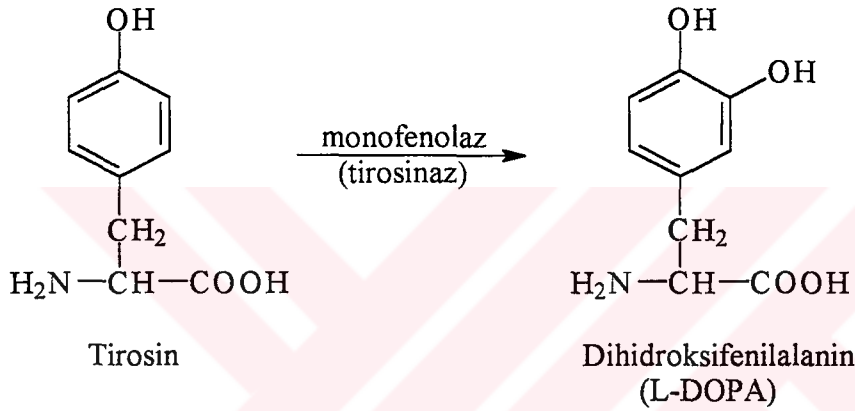
enzimatik esmerleşmeden dolayı birkaç gün ile sınırlıdır. Mantarlardaki esmerleşmeye sebep olabilecek enzimler olan PFO, lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri çeşitli mantar türlerinde çalışılmış ve hem PFO in mantar dokularında en bol bulunan enzim olması ve hem de kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO dan kaynaklandığı belirtilmiştir (Zhang, 1997; Ratcliffe, 1994).

Bitkilerde PFO in hücrelerdeki bulunuş yerleri farklılık gösterir ve genellikle bitki hücrelerinin plastitlerinde bulunur. Dolayısıyla, vakuollerde bulunan fenolik substratlarından fiziksel olarak ayrılır (Vaughn, 1988). Patateste PFO membrana bağlı bir şekilde plastitlerde bulunur. Ispanak köklerinde ise PFO aktivitesi plastid membranlarında ve mitokondrilerde oldukça yüksektir. Buğday, yulaf, yonca ve şeker kamışı gibi bazı bitki türlerinde ise enzim kloroplastlarda lokalize olmuştur. Olgunlaşmış elmalarda ise PFO in daha çok kloroplastlarda ve mitokondrilerde aktif olduğu gözlenmiştir. Çeşitli muz türlerinde PFO aktivitesinin meyvenin dokularına göre değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı zeytin türlerinde enzim kloroplastlara sıkı sıkıya bağlıyken siyah zeytin türlerinde enzim çözünebilir bir formda bulunur (Vaughn, 1988).

Son yıllarda, bitkilerden PFO genlerinin izolasyonu konusunda çeşitli çalışmalar yapılmış ve domates (Newman, 1993), patates (Hunt, 1993), fasulye (Cary, 1992) ve üzümünden (Dry, 1994) PFO ni kodlayan genler izole edilmiştir. Bu bitkilerin dokularında aktif formda bulunan PFO in yaklaşık 59-60 kDa lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bitkilerden en çok çalışılan domatesten yedi bireysel genomik klon izole edilmiştir ve elde edilen her bir genin tam nükleotit dizisi belirlenmiştir. Bu bitkide PFO ekspresyonunun floral organlarda oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu PFO genlerinin tümü bakteri, mantar ve memeli PFO larının bir karakteristiği olan iki muhtemel bakır bağlama bölgesini kodlamaktadırlar (Newman, 1993). Patateste ise gelişmekte olan dokularda ekspresyon gözlenmiş fakat tamamen gelişmiş dokularda da düşük düzeylerde belirlenmiştir (Hunt, 1993) . Üzüm cDNA nın 10 kDa lık bir kloroplast transit peptidini, 41 kDa lık ve iki bakır-bağlama bölgesini içeren katalitik bir birimi ve 16 kDa lık C-ucu kısmından oluşan ve bütün olarak 67 kDa lık bir proteini kodladığı tespit edilmiştir. Southern emdirme yöntemi ile de üzümde tek bir PFO geninin varlığı belirlenmiştir (Dry, 1994).

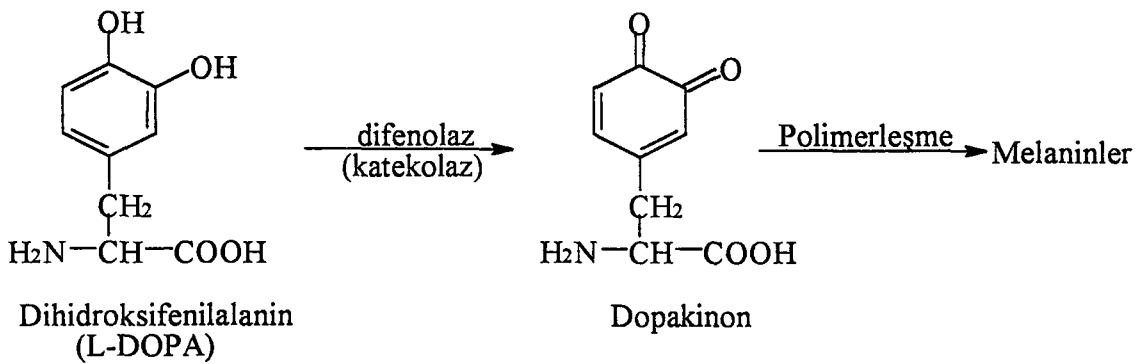
1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri

Uluslararası Biyokimya Derneğine (IUB) bağlı Enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada tüm PFO ların yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizlediğinden dolayı birinci sınıftan enzim oldukları belirlenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre PFO iki farklı aktivite göstermektedir ki bunlardan biri monofenolaz aktivitesi yada tirozinaz, kresolaz veya, L-DOPA(dihidroksifenilalanin)-oksijen oksidoredüktaz [E.C.1.14.18.1] olarak tanımlanmış ve enzimin monofenolleri difenollere dönüştürdüğü kabul edilmiştir (Reaksiyon 3).



(Reaksiyon 3, PFO ın monofenolaz aktivitesi)

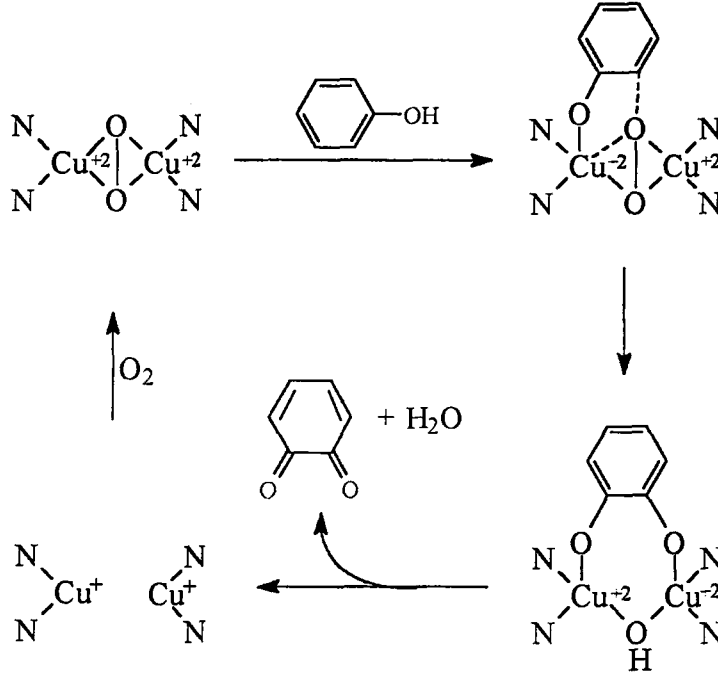
PFO ın diğer bir aktivitesi ise difenolaz aktivitesi ya da katekolaz veya difenol-oksijen oksidoredüktaz [E.C.1.10.3.2] olarak tanımlanmış ve bu aktivitenin ise difenolleri kinonoidlere dönüştürdüğü kabul edilmiştir (Reaksiyon 4) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), 1989).



(Reaksiyon 4, PFO ın difenolaz aktivitesi)

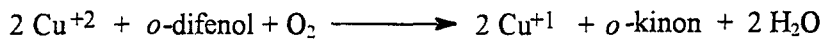
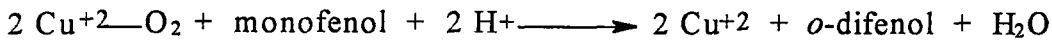
PFO ortalama 55-65 kDa molekül ağırlığına sahip olup enzimde iki bakır-bağlanma bölgesinin bulunduğu belirtilmiştir. Bakır içeriklerinin patates, tütün ve mantarda %0.2-0.3 arasında değiştiği de bulunmuştur. Taze hazırlanan enzim ekstraktlarında bakırın Cu(I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu(II) şekline yavaşça okside olduğu gözlenmiş ancak bu değişimin aktivitede bir kayıba yol açmadığı belirlenmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değildir ancak Cu(II) nin ilavesi ile aktivite geri kazanılabilmektedir (Kertesz, 1962). Apoenzim, saf enzimin sulu çözeltisinin potasyum siyanür içeren çözeltiye karşı diyaliz edilmesi ile hazırlanabilmektedir. Saf PFO renksizdir, ancak benzer bir aktivite gösteren lakkaz enzimi mavi renklidir. Konsantre edilen PFO çözeltileri nötral pH değerlerinde oldukça kararlıdır. Bu çözeltiler kısa bir süre için 60 °C ye kadar ısıtıldığında ise enzim tamamen inaktif olur. Bu enzimin nötral pH değerlerinde ve fosfat tamponundaki konsantre çözeltileri 1 °C de veya -25 °C de dondurulmuş olarak aktivitede herhangi bir kayıp olmaksızın birkaç ay saklanabilir. Bununla birlikte uzun sürelerde saklandığında aktivitede kayıplar gözlenebilir ve aktivitedeki bu kayıp dönüşümsüzdür. Bu işlem sırasında bakır(I) okside olarak Cu(II) e dönüşür ancak aktivitedeki kayıp oksidasyondan kaynaklanmaz. PFO aktivitesi, bakır ile kararlı kompleksler oluşturabilen H₂S, KCN, CO ve *p*-aminobenzoik asit gibi maddelerle inhibe edilebilir.

PFO ın fenolik bileşikler üzerindeki etki mekanizması oldukça komplekstir. Bakır enzimin prostetik grubunu oluşturduğundan, bakırın valens durumu PFO aktivitesini sağlar. Kimyasal ve spektroskopik veriler PFO ların bakır içeren tip III türü iki çekirdekli aktif bölgeye sahip olduklarını desteklemektedir (Fenton, 1995). PFO ların katalitik etki mekanizması çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Enzimin deoksi formu önce oksijen ile oksî-PFO formunu oluşturur ve fenolik substrat bu oksî-PFO formundaki bakır atomlarının birine aksiyal olarak koordine olur. Oluşan beş-koordinatlı ara ürününün yeniden düzenlenmesini takiben fenolik substratın *orto*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir. Molekül içi elektron transferi sonucu *orto*-benzokinon ürünü oluşur ve bu sırada enzimin deoksi-PFO hali böylece yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir (Reaksiyon 5).



(Reaksiyon 5, PFO tarafından katalizlenen reaksiyon için önerilen mekanizma)

Böyle bir çevrimle monofenolik substratların önce *o*-difenollere ve *o*-difenoller de *o*-kinon bileşiklerine dönüşür. PFO'nun aktif bölgesinde gerçekleşen bu etki mekanizması aşağıdaki eşitlikler halinde yazılabilir (Reaksiyon 6).



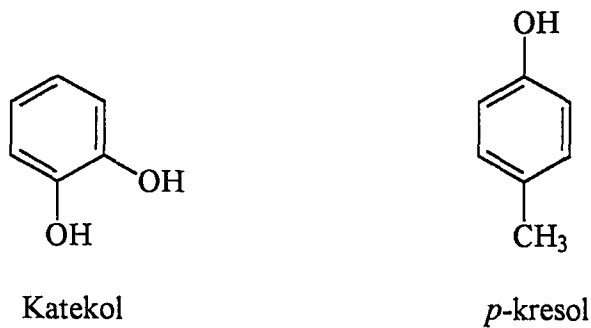
(Reaksiyon 6, PFO'nun aktif bölgesinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması)

Oluşturulan *o*-kinon bileşikleri, canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı bir şekilde ve kolayca polimerleşerek koyu kahverengi ve suda az çözünen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece esmerleşme reaksiyonlarının karakteristiği olan pigmentler oluşturulur.

1.4. Esmerleşme Reaksiyonlarının Substratları

Farklı kaynaklardaki PFO aktiviteleri kendi spesifik substratları ile oldukça değişir. Fenolik ve polifenolik bileşikler sayısız bitki türünde ikincil bitki metabolitleri olarak oluşturulurlar ve fenolik bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunmada rol oynadığı tahmin edilmektedir. Polimerik yapıda olan polifenolik bileşikler klorojenik asit gibi fenolik monomerlerinden çok daha fazla toksisiteye sahiptir. PFO ile katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Polifenolik bileşiklerin ayrıca antimutajenik, antikarsinojenik, antiglisemik ve antioksidatif özelliklerinin olduğu da bilinmektedir. Bu özellikler, küf oluşumunun engellenmesi ve proteinsel besin değerinin artırılması amacıyla kullanılabilirler (Friedman, 1997).

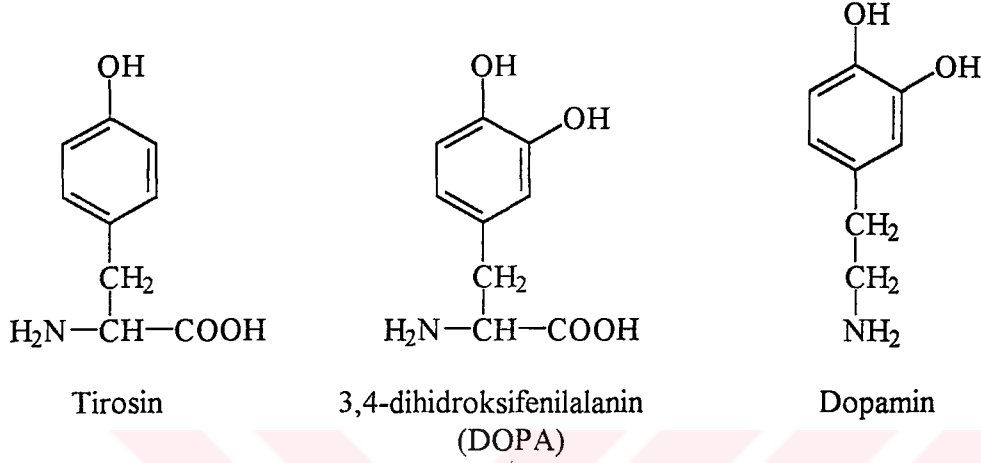
Bitkiler farklı dokularında oldukça çeşitli fenolik bileşikleri içerirler ancak bu fenolik bileşiklerin sadece bir kısmı PFO'nun substratlarıdır. Bu fenolik yapılar uygun şekillerde ekstrakte edildikten sonra gaz-kromatografisi (GC), yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve ultraviyole spektrofotometrisi (UV-Vis) teknikleri yardımıyla belirlenmişlerdir. PFO'nun bitkilerdeki en yaygın substratları basit yapılu fenoller, klorojenik asit ve türevleri ile flavonoid tipi fenollerdir. Basit fenoller, katekol ve kresol gibi bileşikler yanında tirozin ve türevleri ile sinamik asit türevleri de oluşur (Formül 1).



(Formül 1, PFO'nun basit fenolik substratları)

Birçok besin maddesinde bulunabilen tirozin, enzimatik oksidasyon sonucu 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan

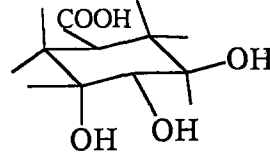
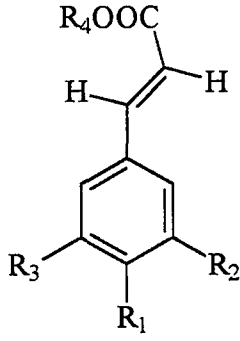
substratlardandır. Şeker pancarından izole edilen PFO'nun difenolaz aktivitesi oldukça etkindir ve pancar dokularında daha yüksek düzeylerde bulunmasına rağmen monofenolik yapıdaki tirozin substratı üzerinde etkili olmazken, dihidroksi türevi olan dopamin oksidasyonunu sağlayabilmektedir (Formül 2).



(Formül 2, PFO'nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları)

Sinnamik asit daha çok klorojenik asit türevleri ve flavonoidlerin oluşturulmasında rol oynar. Bu türevlerin pek çoğu enzimatik olmayan yollarla bitkilerde esmerleşme reaksiyonlarına katılırlar. Patatesteki klorojenik asit patates yumrularının fenolik içeriğinin yaklaşık % 90'ını oluşturur ve bu bileşiğin bir çok izomeri çeşitli teknikler yardımıyla tespit edilmiştir (Formül 3). Patates, şeftali ve fasulye yaprağı PFO ların aktiviteleri klorojenik asit ve kafeik asitler durumunda oldukça farklılık gösterirken 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin üzerinde benzer aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (Whitaker, 1972).

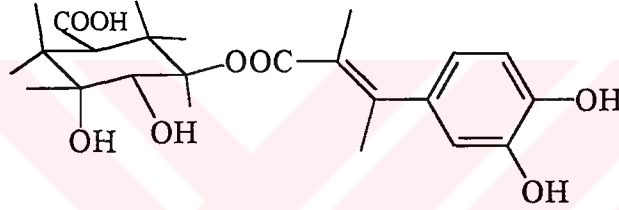
Flavonoidler ise bitkilerin çeşitli dokularında ve çok farklı oranlarda dağılmışlardır (Formül 4). Genellikle kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında oldukça yoğun olarak bulunurlar. Çeşitli oranlarda bulunsalar bile flavonoid yapılı bileşikler bitkide esmerleşme reaksiyonlarının meydana gelmesi için yeterlidirler. Birçok bitki izolatlarında bağıl oranları açısından farklılık gösteren flavonoid sistemine sahip çok çeşitli sayıda bileşik tespit edilmiştir.



Kinik asit

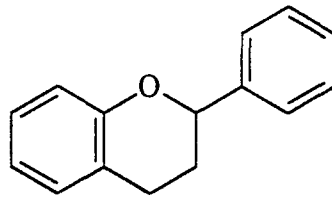
sinnamik asit: $R_1=R_2=R_3=R_4=H$

p-kumarik asit: $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_4=H$
 kafeik asit: $R_1=R_2=OH$, $R_3=R_4=H$
 ferulik asit: $R_1=OH$, $R_2=OCH_3$, $R_3=R_4=H$
 klorojenik asit: $R_1=R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=kinik\ asit$



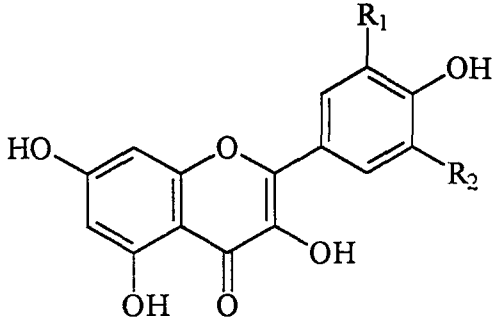
klorojenik asit (5-O-kafeilklinik asit)

(Formül 3, Sinnamik asit ve klorojenik asit türevli PFO substratları)

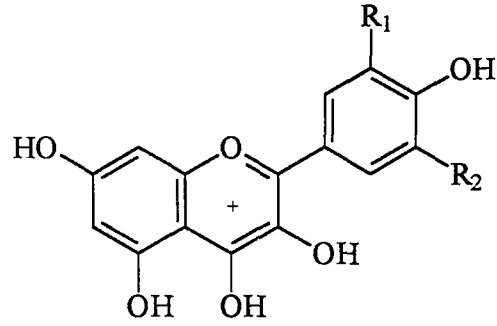


(Formül 4, Flavonoid Genel İskeleti)

Antoksanin pigmentleri olarak da tanımlanan flavonoller çeşitli teknikler yardımıyla izole edilip karakterize edilmişlerdir. Bu yapılar birçok durumda kuersetin, mirisetin ve kamferol olarak adlandırılan birçok türevleri halinde esmerleşme reaksiyonlarına doğrudan katılırlar. Antosiyeninler ise pelargonidin, siyanidin ve delfinedin olarak tanımlanan türevleri halinde daha çok ikincil reaksiyonlarda rol oynarlar (Formül 5).



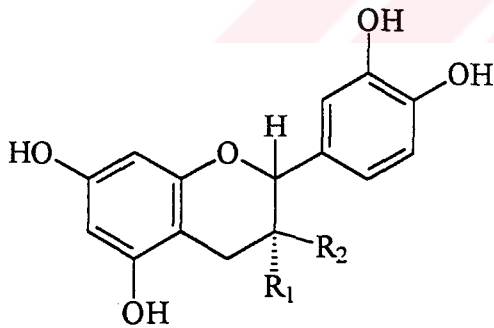
Kuersetin: $R_1=OH$, $R_2=H$
 Mirisetin: $R_1=R_2=OH$
 Kamferol: $R_1=R_2=H$



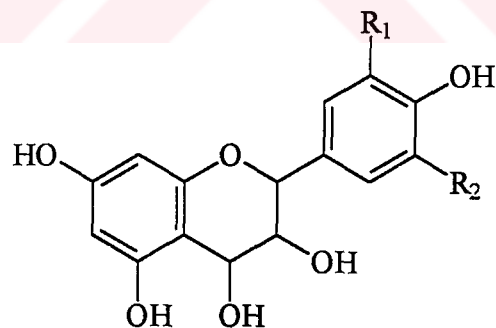
Pelargonidin: $R_1=R_2=H$
 Siyanidin: $R_1=OH$, $R_2=H$
 Delfinidin: $R_1=R_2=OH$

(Formül 5, PFO ın flavonoid türevli substratları)

Katekin ve epikatekin flavonoid iskelete sahip bileşikler çeşitli bitki ekstraktlarından izole edilip karakterize edilmişlerdir. Lökoantosiyandinler olarak tanımlanan flavonoidler de genellikle lökosiyanidin ve lökodelfinidin şeklinde tanımlanmışlardır (Formül 6) (Ganguly, 1958).



Katekin: $R_1=H$, $R_2=OH$
 Epikatekin: $R_1=OH$, $R_2=H$



Lökosiyanidin: $R_1=OH$, $R_2=H$
 Lökodelfinidin: $R_1=R_2=OH$

(Formül 6, PFO ın flavonoid türevli substratları)

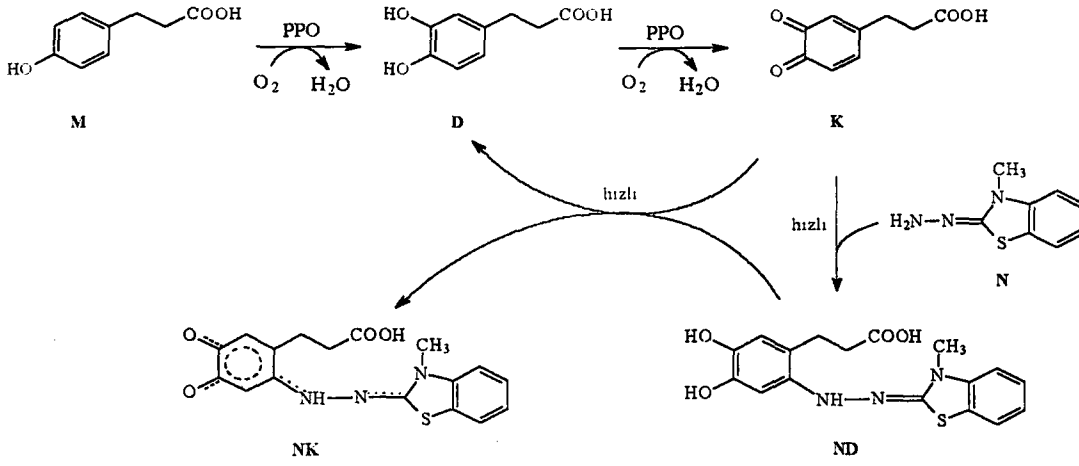
Bitkilerin çeşitli dokularında bulunan fenolik bileşiklerin esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşturdukları kinonlar oldukça reaktif türler olup, ya diğer kinonlarla ya da amino asitler, proteinler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi biyomoleküllerle renkli bileşikler

oluştururlar. Bu fenolik bileşiklerin farklılığı, dokularda bulunma oranları ve buldukları bölgeler açısından kahverengi-kırmızı polimerik pigmentlerin renk şiddetleri de değişebilmektedir.

1.5. Enzim Aktivitesini Tayin Metodları

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli manometrik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O₂, bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülebilir. Kronometrik metotta ise askorbik asit varlığında reaksiyon sırasında rengin ilk görüldüğü an tespit edilir. Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızının ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972). L-DOPA, katekol, pirogallol, epikatekin ve klorojenik asit bu tür spektrofotometrik enzim aktivitesi tayini çalışmalarında yaygın olarak kullanılan substratlardır ve kendilerine özgü dalga boylarında verdikleri maksimum absorbanslarla karakterize edilirler. Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen bu teknikler oldukça pahalı enstrümantasyon gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmazlar.

PFO in monofenolaz aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil varlığında oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metot nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen o-kinonların enzimatik olmayan reaksiyonlarını esas alır. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşturulan o-kinon nükleofil ile renkli katılma ürünleri verirler ve bu katılma ürünleri 500 nm deki karakteristik absorpsiyonları ile belirlenirler (Reaksiyon 7). Bu metodun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuş olup (Rodríguez, 1994) elma ve avokado meyvelerindeki PFO aktivitelerinin tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Espin, 1995; 1997).



(Reaksiyon 7, Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: *o*-kinon, N: kromojenik nükleofil, ND: nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü)

Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişebilen ve muşmula olarak bilinen *Mespilus germanica* L., esmerleşme reaksiyonlarının oldukça hızlı olduğu bir türdür. Bu çalışmada, PFO'nun bu bitki meyvelerinde bulunuşu ve diğer bitkilerin PFO lar ile benzerlikleri, aktivitesi, katalizledikleri reaksiyonlar ve reaksiyon kinetiği açısından izlenebilme kolaylığı sağlayacağı düşünüldükçe model bir sistem olarak düşünülmüştür. PFO leri ile ilgili mevcut bilgilerin ışığında bu çalışmada gerçekleştirilmesi düşünülen amaçlar şu şekilde özetlenebilir: i) PFO'nun döngel bitkisi meyvelerinden ekstraksiyonu, ii) Enzim ekstraktlarının çeşitli spektroskopik teknikler yardımıyla karakterize edilmesi, iii) ekstraktlardaki aktivitenin sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu ve substrat konsantrasyonu ve çeşitli inhibitörlerle değişimi, iv) enzim ile katalizlenen reaksiyonun kinetiği ve çeşitli kinetik parametrelerin elde edilmesi, dolayısıyla spekülatif yapı-fonksiyon ilişkisinin ortaya konulması. Metodoloji olarak daha önce geliştirilen ve MBTH nükleofili yardımıyla çeşitli substratların varlığında PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi ve kinetik karakterizasyonu amaçlanmıştır. Monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin kinetikleri, pH etkisi yanında, enzim ve substrat konsantrasyonunun etkisi de incelenerek döngel bitkisi PFO'nun çeşitli substratlara karşı davranışı ortaya konabilir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bu çalışmada, tampon çözeltilerini hazırlamakta dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum asetat, asetik asit, etilendiamintetraasetikasit, magnezyum klorür, tris(hidroksimetil)amino metan (Tris), dimetilformamid (DMF), askorbik asit, L-sistein kimyasalları Merck A. G. (Darmstadt, Germany) den sağlanmıştır. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan TX-114 deterjanı, fenilmetilsulfonyl florür (PMSF) ve substrat olarak kullanılan katekol, 4-metil katekol, epikatekin, 3,4-dihidroksifenil propiyonik asid (DHPPA), dihidroksifenilalanin (L-DOPA), 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon hidroklorid (MBTH), protein tayininde kullanılan bovine serum albümin (BSA), sodyumdodesilsülfat (SDS) ve Folin adlı kimyasallar Sigma Chemical Co., St Louis (MO, USA) dan satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup diğer firmalardan sağlanmıştır.

Santrifüjleme işlemleri Sanyo MSE model MS60 marka ultrasantrifüj ile, spektrofotometrik ölçümler Unicam UV2-100 UV-Vis spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. pH ölçümleri için Jenway 3010 pH-metresi, doku homojenizasyonu için Braun marka el blendırı kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM fosfat tamponu; bir litre saf suda 8.709 g K_2HPO_4 çözünmesiyle hazırlanan dibazik fosfat çözeltisinin 38 ml si ile bir litre suda 6.748 g KH_2PO_4 çözünmesiyle hazırlanan monobazik fosfat çözeltisinin 62 ml si karıştırılıp 200 ml ye saf su ile tamamlanmasıyla pH 6.5 olarak fosfat tamponu hazırlanır.

50 mM asetat tamponu; 5.2 g (0.05 mol) sodyum asetat 700 ml saf suda çözüldükten sonra 50 mM asetik asit ile pH 5.5 oluncaya kadar titre edilir ve çözelti 1000 ml ye saf su ile tamamlanır.

50 mM Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) tamponu; 6.057 g (0.05 mol) Trizma bazı 700 ml saf suda çözüldükten sonra 0.05 M lık HCl asit ile pH 'ı 7.5; 8.5; 9.5 olacak

şekilde ayarlanarak ve litreye tamamlanır. Böylece farklı pH değerlerine sahip tris tamponu çözeltileri hazırlanır.

Ekstraksiyon çözeltisi; 80 ml asetat tamponu (pH=5.5) içine %6 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM fenilmetilsulfonyl florür (PMSF) ilavesi ve çözeltinin tampon çözeltisi ile 100 ml 'ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

Substrat çözeltileri; herbiri 100 mM olmak üzere katekol, 4-metil katekol, 3,4-dihidroksifenilpropiyonik asit (DHPPA), epikatekin ve kromojenik nükleofil olan 10 mM 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) safsu ile 25 ml 'ye tamamlanır.

2.3. Ham Ekstrağın Hazırlanması

Trabzon' un Çaykara ilçesinden toplanan döngel bitkilerine ait meyveler sıvı azot içerisinde laboratuvara kadar ulaştırıldıktan sonra 50 g 'ı dewar içindeki sıvı azot ile 15 dakika kadar ozmotik şoka tabii tutuldu. Ozmotik şoka tabii tutulan meyveler, 4 °C 'de el blendırı yardımıyla 100 ml ekstraksiyon çözeltisi ilavesiyle 10 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 katlı tülbentten süzülde. Elde edilen süzüntü 4 °C de 20 dakika bekletildikten sonra 4 °C de 20,000 devir/dk de 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatanta proteazları inhibe etmek amacıyla 1mM PMSF ilave edildi. Elde edilen bu ekstraktaki PFO aktivitesi bir ay süre ile aktivitesini koruyabilmektedir.

2.4. Protein Tayini

Hazırlanan bitkisel ekstraktlardaki protein tayini biüret metodu ile tayin edildi (Lowry, 1951). 10 µl protein içeren ekstrak 190 µl 0.1 N NaOH, %0.1 sodyum dodesil sülfat içeren çözelti ile 200 µl ye seyreltilerek bazikleştirilir. Bu karışıma eşdeğer oranlarda karıştırılmış %0.2 Na₂CO₃ ın 0.1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12.5 ml) ve %2 sodyum-potasyum tartaratın %1 lik CuSO₄ daki çözeltisinden (0.25 ml) 1 ml ilave edilir. 5-10 dakikalık çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µl ilave edilir ve 30 dakika olgunlaşmaya bırakıldıktan sonra 650 nm deki absorbansları okunur. Aynı reaktiflerle hazırlanan sığır serum albumini standart protein çözeltileri için de elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla ekstraktların protein içerikleri tayin edilir.

2.5. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini

Polifenol oksidaz (PFO) aktivitelerinin ölçümünde çeşitli substratlar varlığında spektrofotometrik yöntem kullanıldı (Espin, 1995). Aktivite ölçümleri için 50 µl enzim + x µl Substrat (100 mM) + x µl MBTH (10 mM) + 20 µl DMF + y µl tampon (50 mM) çözeltisi ilave edildi ve 500 nm 'de absorbans değerleri ölçüldü. Ancak 4-metilkatekol substratı için 494 nm de maksimum absorbans gözlemlendiğinden bu dalga boyundaki değişimler okundu. Tampon olarak 50 mM Asetat pH=4.5-5.5, 50 mM fosfat pH=6.5 ve 50 mM Tris pH=7.5-9.5 tamponları kullanıldı. 1-25 mM substrat konsantrasyonlarında çalışıldı (Tablo 1). Absorbansdaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi. Kör olarak enzim dışındaki çözeltiler aynı miktarda kullanıldı. Enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampon ilave edildi. Aktivite birimi olarak 50 µL enzim çözeltisinin 1-25 mM konsantrasyonlardaki substratlardaki 1 dakika başına absorbansa meydana getirmiş olduğu 0.001 birimlik değişme kullanıldı.

Tablo 1. PFO aktivitesi tayininde kullanılan karışımın içeriği

Substrat (100 mM)	MBTH (10 mM)	Tampon (50 mM)	DMF	Enzim ekstrağı	Toplam hacim
10 µl	10 µl	910 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
20 µl	20 µl	890 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
40 µl	40 µl	850 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
80 µl	80 µl	770 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
100 µl	100 µl	730 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
160 µl	160 µl	610 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
200 µl	200 µl	530 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
250 µl	250 µl	430 µl	20 µl	50 µl	1000 µl

Katekol, 4-metil katekol, DHPPA, L-Dopa, epikatekin substratları ve MBTH nükelofil kromojeni kullanılarak gerçekleştirilen aktivite deneylerinde veriler her bir substratın maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki molar absorplama katsayıları kullanılarak analiz edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Çeşitli fenolik bileşiklerin MBTH ile PFO varlığında verdikleri katılma ürünlerinin Spektral Özellikleri.

Fenolik substrat	λ_{maks} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Katekol	500	32500
4-metil katekol	494	32500
DHPPA	500	40000
L-DOPA	500	38000
Epikatekin	500	32500

2.6. Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Optimum pH çalışması; katekol, 4-metil katekol, DHPPA, L-Dopa, epikatekin substratlarına MBTH ve DMF ilave edilerek yapıldı. Önce enzim pH 4.5-9.5 arasındaki değerlere sahip uygun tamponlarda oda sıcaklığında bir öninkübasyona bırakıldı. Bu substratlarla enzimin substrata doyduğu noktalarda uygun tampon çözeltilerde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Optimum sıcaklık çalışması yine aynı substratlarda gerçekleştirildi. Substratların optimum pH değerlerinde, sıcaklık değerleri 5-65 °C aralığında değiştirilerek optimum sıcaklık değerleri araştırıldı. İstenilen sıcaklıklar oda sıcaklığının altında buz banyosunda oda sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda termostatlı su banyosunda ayarlandı. Tampon ve substrat karışımının küvete boşaltılması sırasında meydana gelebilecek sıcaklık kayıplarını da önlemek amacıyla küvetler birkaç dakika su ve buz banyosu içinde bekletildi ve mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi substratı içeren karışıma pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

Optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirmesi için yapılan deneylerde, tampon çözeltisi, substrat, enzim ekstreği, MBTH ve DMF tablo 3 'de verilen oranlarda kullanıldı.

Tablo 3. Optimum pH ve Sıcaklık Deneylerinde Kullanılan Tipik Reaksiyon Karışım

Deneme Bileşeni	Stok Çözelti	İlave Edilen	
		Hacmi	Nihai Konsantrasyonu
Tampon çözelti	50 mM	730 μ l	36.5 mM
Substrat	100 mM	100 μ l	10 mM
Enzim ekstrağı (protein içeriğı)	12 mg/ml	50 μ l	0.6 mg/ml
MBTH	10 mM	100 μ l	1 mM
DMF		20 μ l	%2
Toplam inkübasyon hacmi		1000 μ l	

2.7. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi

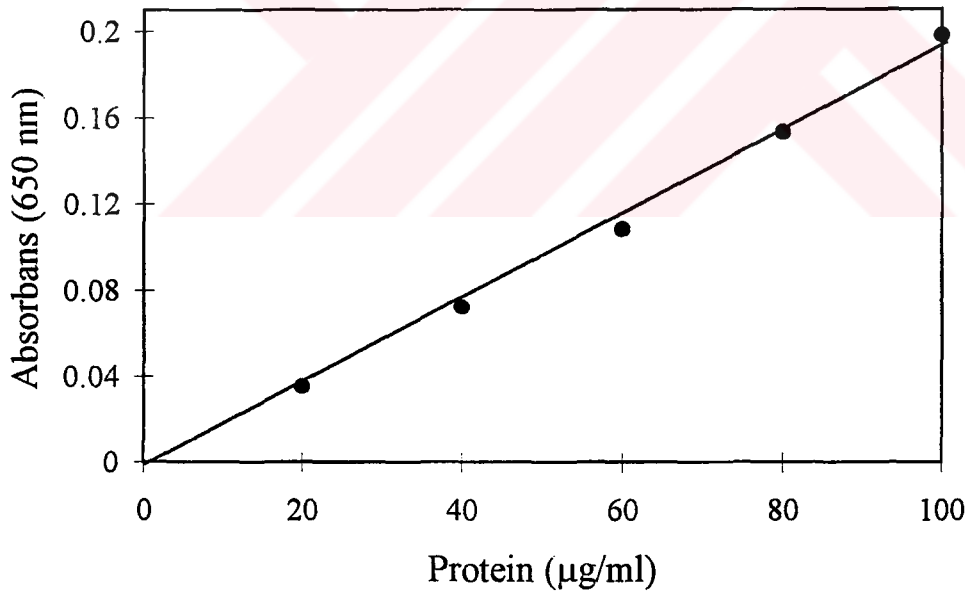
Bitkisel ekstraktlardaki PFO'nun çeşitli substratlara karşı davranışını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda 4-metil katekol, katekol, DHPPA, L-Dopa, epikatekin substratları için 1-20 mM konsantrasyonlarında değiştirilerek PFO aktivitesi ölçümleri yapıldı. 500 nm dalga boyunda ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (μ M/dak) olarak alındı. Michaelis-Menten eşitliği esas alınarak değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı hiperbolik grafik (Michaelis-Menten), bu değerlerin çift resiprokları ile elde edilen lineer grafik (Lineweaver-Burk grafiğı) ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilerek enzimin substrat ile doyumunda ulaşılan maksimum reaksiyon hızı (V_{maks}) ve Michaelis sabiti (K_m) değerleri ile beraber, dönüşüm sayısı (k_{kat}) ve substrat spesifite oranları (k_{kat}/K_m) bu eğrilerden elde edilen veriler yardımıyla hesaplandı. Lineer ve lineer olmayan eğriler, MS Excel sürüm 7.0 kullanılarak elde edildi ve analiz edildi.

İnhibitörlerin PFO aktivitesine etkisi ve enzimin bu maddelere karşı davranışı yine inhibitörler yokluğunda veya varlığında benzer denemeler yapıldıktan sonra elde edilen veriler yukarıda belirtilen grafiklere ilave olarak Dixon eğrileri yardımıyla değerlendirilip, inhibisyon türleri ve inhibisyon sabitleri hesaplandı ve sonuçlar analiz edildi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada döngel bitkisi meyvelerindeki esmerleşme reaksiyonlarda rol oynayan polifenol oksidazın (PFO) fonksiyonu, enzim aktivitesinin karakterizasyonu ve aktiviteye enzim konsantrasyonunun, substrat konsantrasyonunun, reaksiyon ortamının sıcaklığının, pH ın ve çeşitli inhibitörlerin etkisi araştırılmıştır.

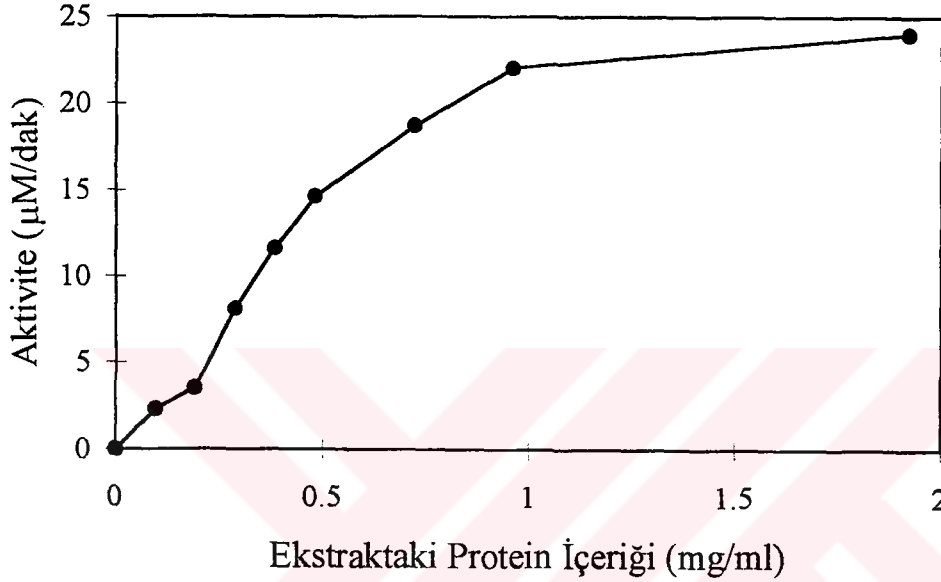
Homojenizasyon ve santrifüjleme işlemleri ile uygun tamponda hazırlanan taze ekstraktların önce protein içeriği belirlendi. Bu çalışmada 1-2 µl lik ekstraktlardaki protein miktarı, sığır serum albumini standart protein olarak alınarak 650 nm de spektrofotometrik olarak elde edilen absorbens değerleri ile çizilen kalibrasyon grafiği kullanıldı (Şekil 1). Protein miktarı bu doğrusal eğrinin eğimi kullanılarak hazırlanan her enzim ekstreği için taze hazırlanarak yapıldı. Böyle bir işlemde protein miktarı genellikle 9.5 ± 1.5 mg/ml civarında değişmiştir.



Şekil 1. Döngel bitkisi meyvelerinden hazırlanan ekstraktların protein içeriğinin belirlenmesi için sığır serum albumini standardı ile hazırlanan kalibrasyon grafiği

Uygun tampon çözeltilerde hazırlanan ekstraktlardaki PFO aktivitesi, içerilecek protein miktarına da bağlı olacaktır. Optimum bir enzim aktivitesi sağlayacak protein

içeriğinin belirlenmesi için 10-200 µl lik ham enzim ekstraktları tampon çözeltilerle seyreltilerek protein içeriği değişen enzim çözeltileri hazırlandı ve her bir çözeltinin PFO aktivitesi tayin edildi. Bu farklı protein içeriklerine karşı aktivite değerlerinin çizilmesi ile elde edilen grafikten (Şekil 2) kinetik deneylerde kullanılacak enzim ekstreğindeki protein miktarı yaklaşık olarak 0.48 mg/ml (50 µl) şeklinde belirlendi.



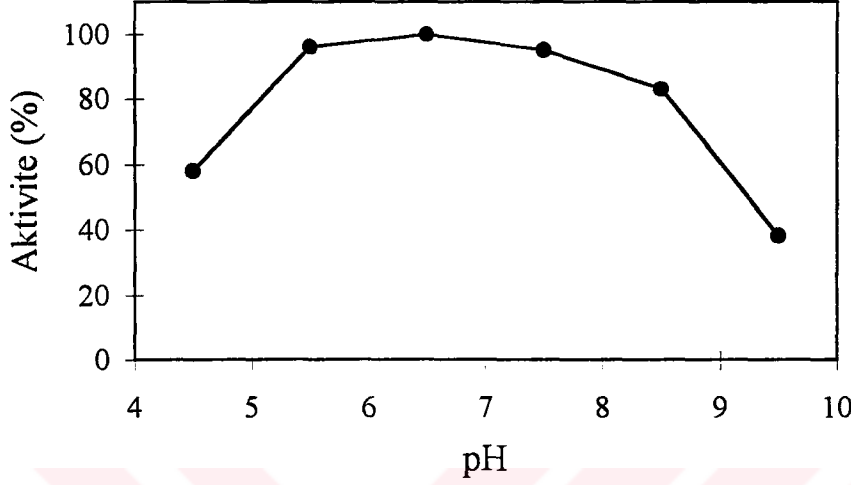
Şekil 2. Döngel bitkisi meyvelerinden hazırlanan ekstraktlardaki protein içeriğinin polifenol oksidaz aktivitesine etkisi

Uygun tampon çözeltilerde hazırlanan ekstraktların PFO aktivitesi tampon çözeltinin pH 'ına bağlı olarak katekol, 4-metil katekol, epikatekin, 3,4-dihidroksifenil propiyonik asid (DHPPA) ve dihidroksifenilalanin (L-DOPA) gibi fenolik substratlar varlığında tespit edildi. Döngel meyvelerinden hazırlanan bu ekstrakta mevcut olan PFO tüm denenen fenolik substratlar üzerinde oldukça yüksek aktiviteler göstermiştir.

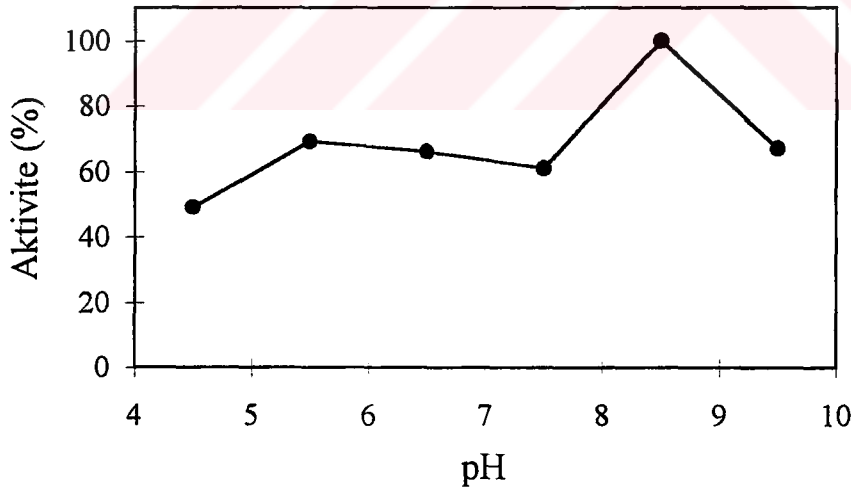
Fenolik özelliğe sahip substratların, ortamın pH 'ına bağlı olarak enzim aktif bölgesine karşı davranışı ve enzim-substrat etkileşimi farklılıklar göstermiştir (Şekil 3,7). 4-metil katekol durumunda diğer substratlardan farklı olarak pH-aktivite eğrisi yayvan bir şekilde ortaya çıkmış ve dolayısıyla optimum pH değeri 5.5-7.5 değerleri arasında gözlenmiştir (Şekil 3).

PFO 4-metil katekol substratı ile göstermiş olduğu pH-aktivite profilinin aksine katekol substratı varlığında optimum pH 8.5 gibi bazik bir değere ulaşmıştır (Şekil 4).

DOPA, epikatekin ve DHPPA durumunda ise optimum pH değerleri katekole göre daha asidik pH değerlerine karşılık gelmiştir (Şekil 5-7).



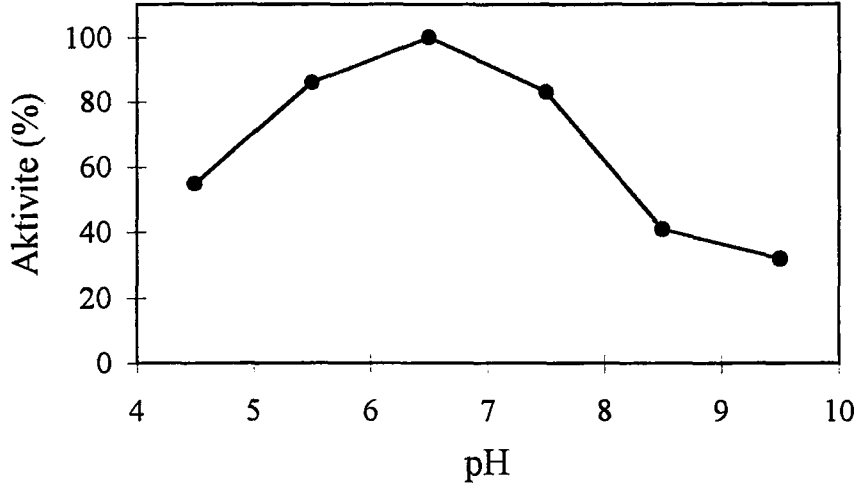
Şekil 3. 4-metil katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi



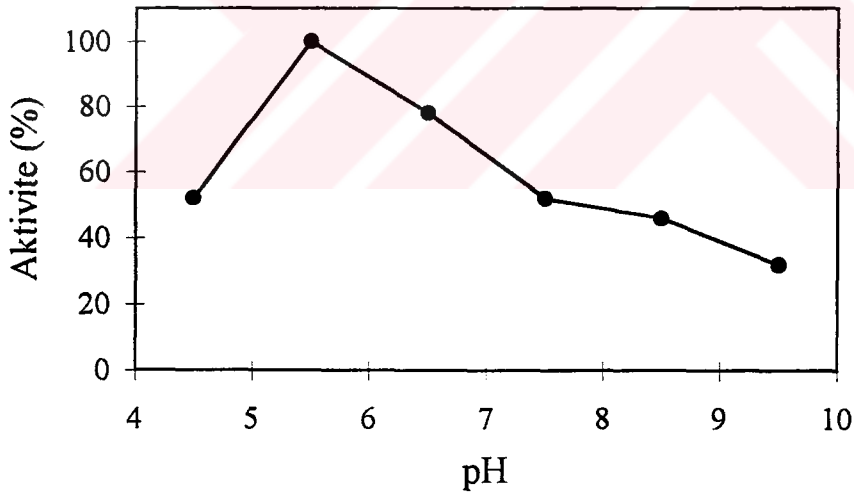
Şekil 4. Katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

Epikatekin ve DHPPA substratları durumunda maksimum aktiviter pH 5.5 değerinde ortaya çıkarken DOPA durumunda ise biraz daha fizyolojik pH değerine yakın bir değer şeklinde (pH 6.5) tespit edilmiştir.

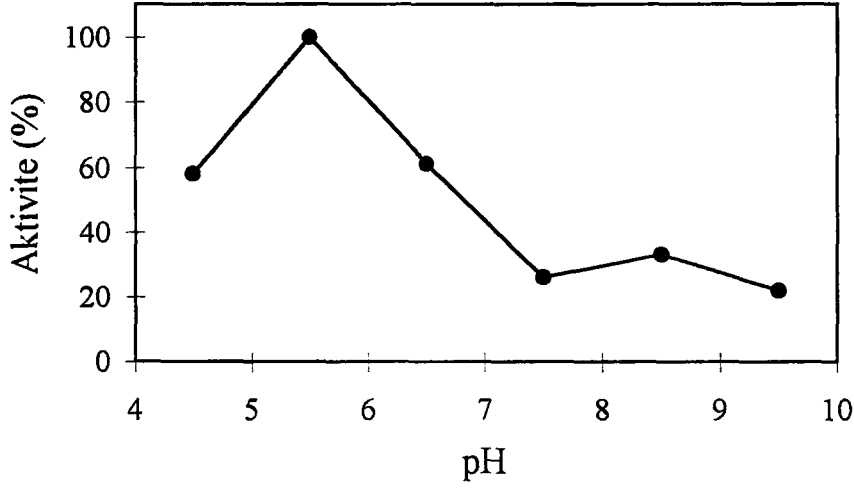
Bu substratlarının kimyasal özellikleri ile pH-aktivite eğrilerinden elde edilen değerler karşılaştırıldığında daha önce çeşitli PFO ların aktivite-pH ilişkileri ile oldukça benzerlik göstermektedir (Fraignier, 1995; Cano, 1996; Arslan, 1997).



Şekil 5. DOPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

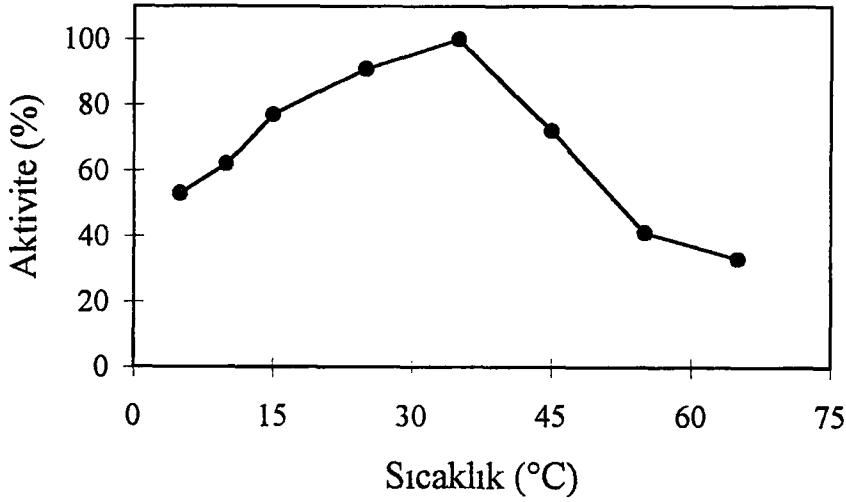


Şekil 6. Epikatekin substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

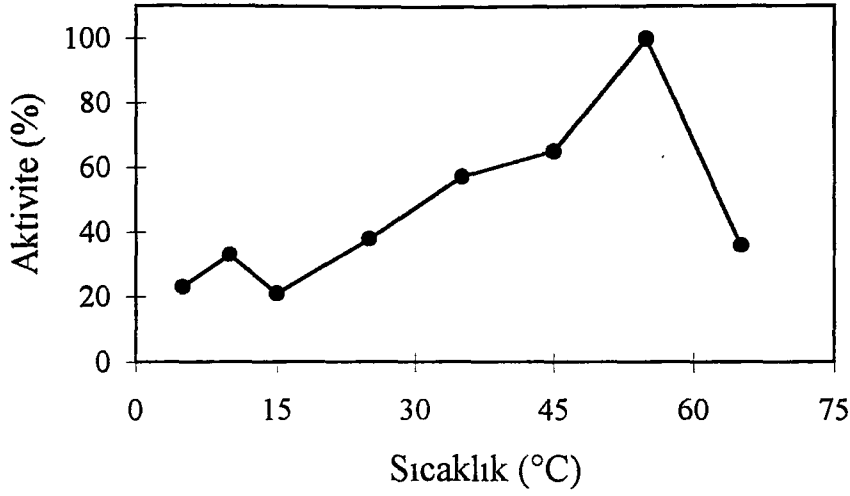


Şekil 7. DHPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

PFO aktivitesinin sıcaklığa bağımlılığı da yukarıda belirtilen katekol, 4-metil katekol, epikatekin, DHPA ve DOPA gibi fenolik substratlar varlığında araştırılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan ekstraktlarda bu substratlar varlığında 5-70 °C sıcaklıkları arasında PFO aktivitesinin değişimi ve maksimum aktivitenin sağlandığı optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Şekil 7-11).

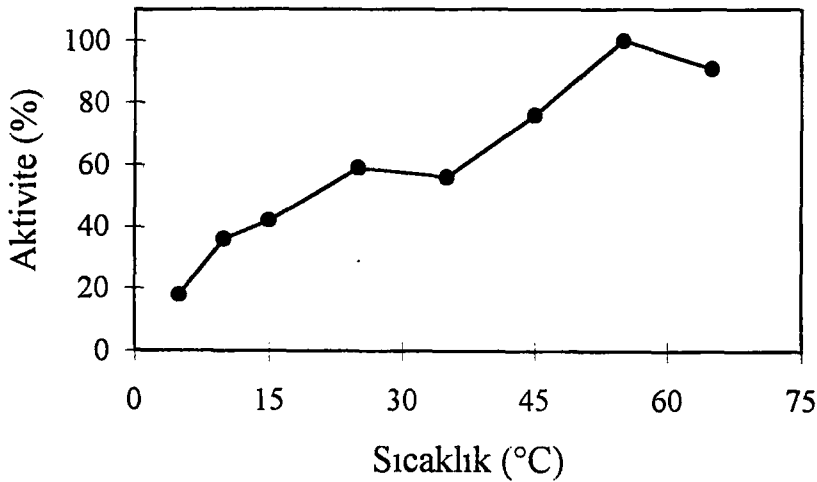


Şekil 8. 4-metil katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi



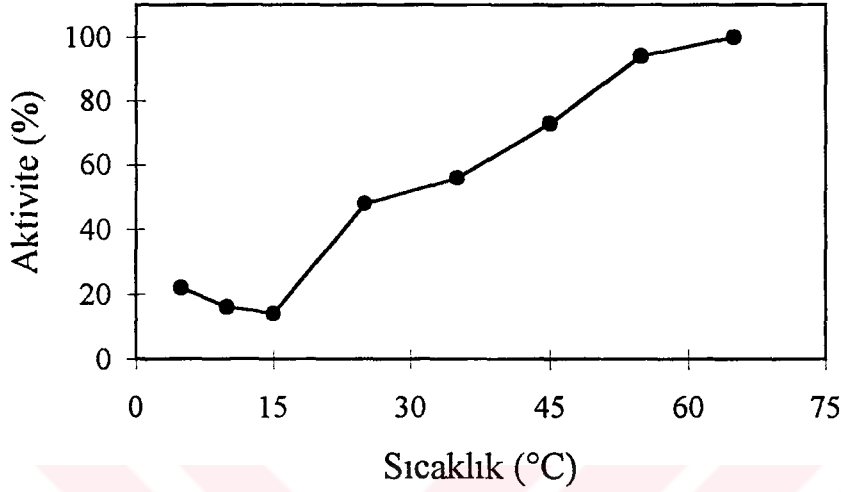
Şekil 9. Katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

Spektrofotometrik olarak ve çeşitli sıcaklıklarda elde edilen PFO aktivitesi değerleri ile elde edilen eğriler substratlara karşı farklılıklar göstermiştir. Optimum aktivite değerleri bu substratlardan katekol durumunda 55 °C ve 4-metil katekol durumunda ise 35 °C olarak ortaya çıkarken epikatekin, DOPA ve DHPPA substratları durumunda ise 55 °C nin üzerinde bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda 55 °C nin üzerinde aktivitenin yükselmesi substratın, enzimatik katalizden bağımsız bir şekilde otooksidasyona uğradığı belirtilmektedir (Sıddıq, 1992).



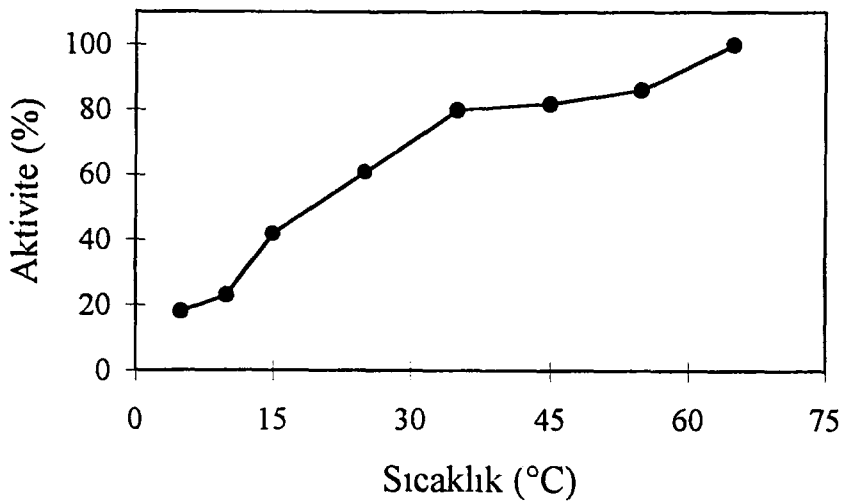
Şekil 10. DOPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

DOPA substratı varlığında 25 °C de gözlenen enzimatik aktivite, 35 °C nin üzerindeki sıcaklıklarda yerini, oluşan ürünlerin otooksidasyonuna bırakmaktadır. Benzer bir sıcaklık-aktivite profili epikatekin substratı durumunda da gözlenmiştir.



Şekil 11. Epikatekin substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

DHPPA varlığında ise diğer dört substrattan biraz daha farklı olarak 10 °C nin üzerinde böyle bir otooksidasyon olayı gözlenmiştir.



Şekil 12. DHPPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

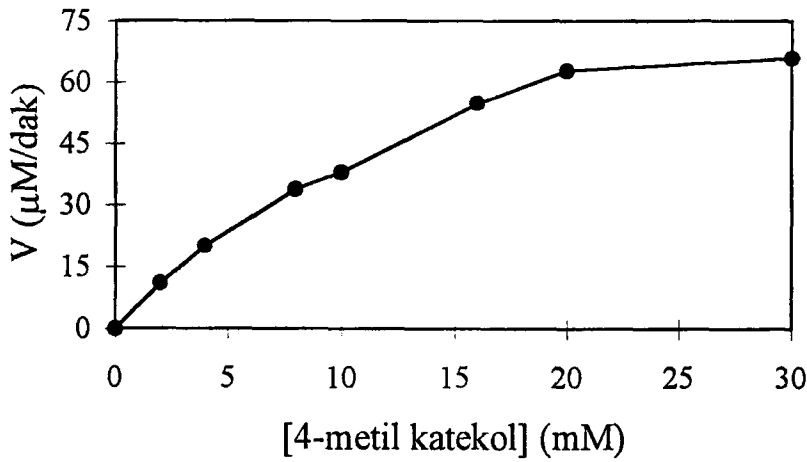
Sıcaklık ve pH çalışmaları ile elde edilen verilerden, PFO ın kinetik çalışmaları için optimum deney şartları tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Çeşitli fenolik substratların PFO ile olan reaksiyonların Optimizasyonu

Fenolik substrat	λ_{maks} (nm) ^a	pH	Sıcaklık (°C)
Katekol	500	8.5	55
4-metil katekol	494	6.5	35
DHPPA	500	5.5	35
DOPA	500	6.5	55
Epikatekin	500	5.5	25

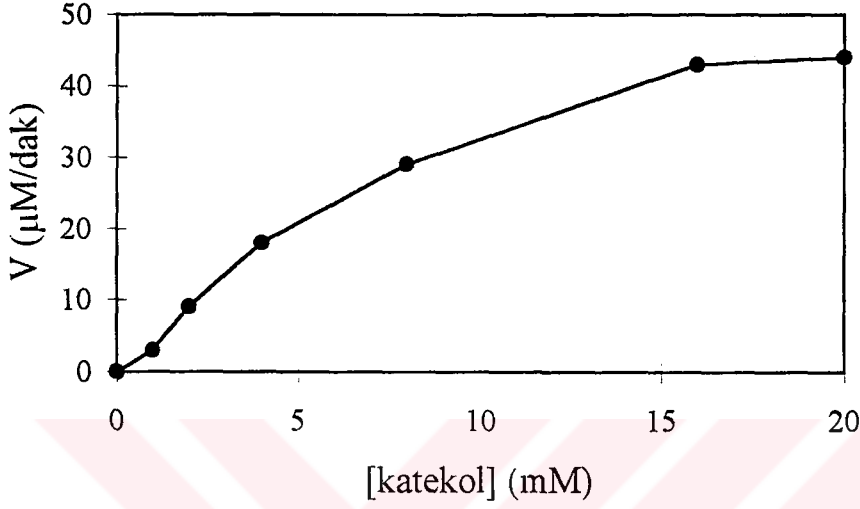
^aEspin, 1997 den alınmıştır.

Kinetik parametrelerin belirlenmesi amacıyla önce ekstraktlardaki PFO aktivitelerinin Michaelis-Menten eşitliğine uygun olarak substrat konsantrasyonuna bağımlılığını gösteren substrat-satürasyon eğrileri çizilmiştir (Şekil 13-17). Substrat konsantrasyonlarının değişimine (0-30 mM) bağlı olarak ölçülen reaksiyon hızı değerleri arasındaki grafikten 4-metil katekol durumunda 20 mM konsantrasyonda doyuma ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 13).



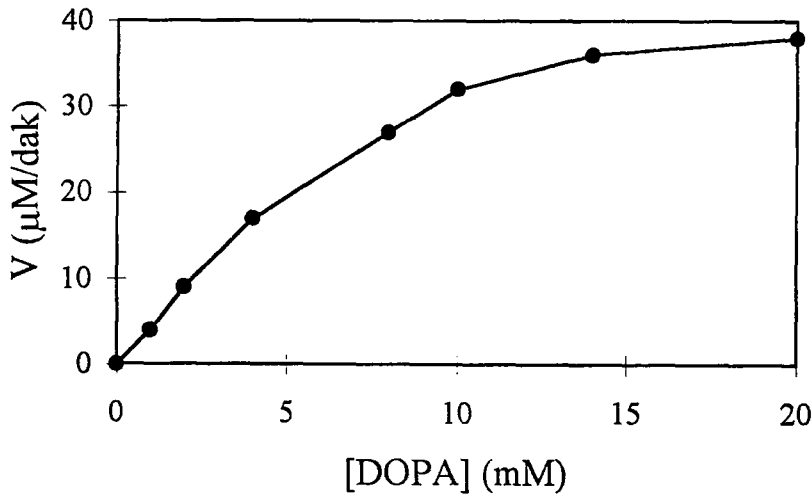
Şekil 13. 4-metil katekol substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği

Katekol varlığında ise yaklaşık 15 mM substrat konsantrasyonuna kadar hemen hemen enzim kinetiğine uygun olarak doğrusal bir artış göstermiş ve 16 mM konsantrasyonların yukarısındaki değerlerde ise PFO bu substrat ile doyuma ulaşmış ve artık substrat konsantrasyonundan bağımsız bir şekilde devam etmiştir (Şekil 14).



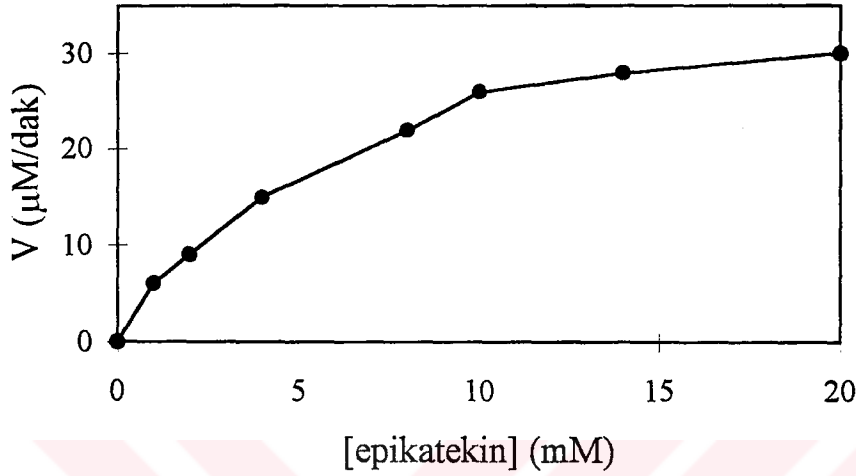
Şekil 14. Katekol substratı varlığında PFO'nun substrat-satürasyon grafiği

DOPA substratı ise 12 mM 'a kadar hemen hemen doğrusal bir artış gösterdikten sonra PFO 14 mM DOPA konsantrasyonundan sonra doyuma ulaşmıştır (Şekil 15).

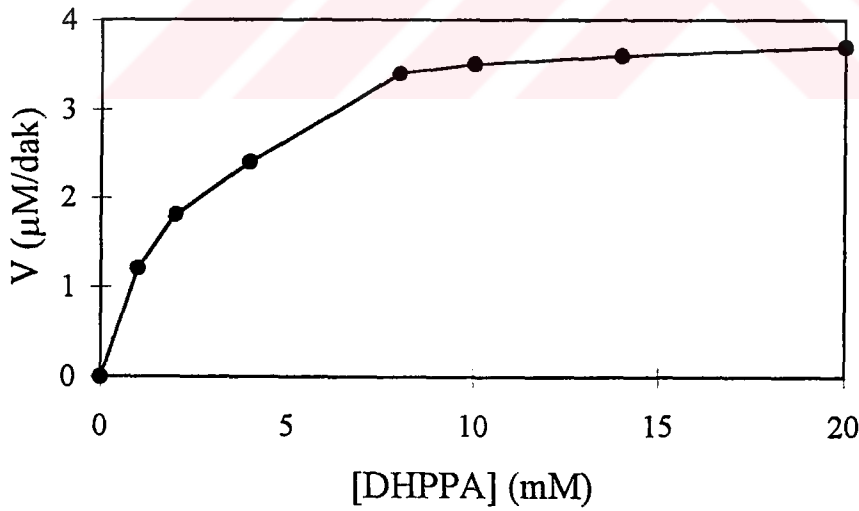


Şekil 15. DOPA substratı varlığında PFO'nun substrat-satürasyon grafiği

Substrat-satürasyon eğrileri epikatekin ve DHPPA substratları varlığında ise sırasıyla 10 mM ve 8 mM lık konsantrasyonlardan sonra PFO in doyduğunu göstermektedir (Şekil 16, 17).



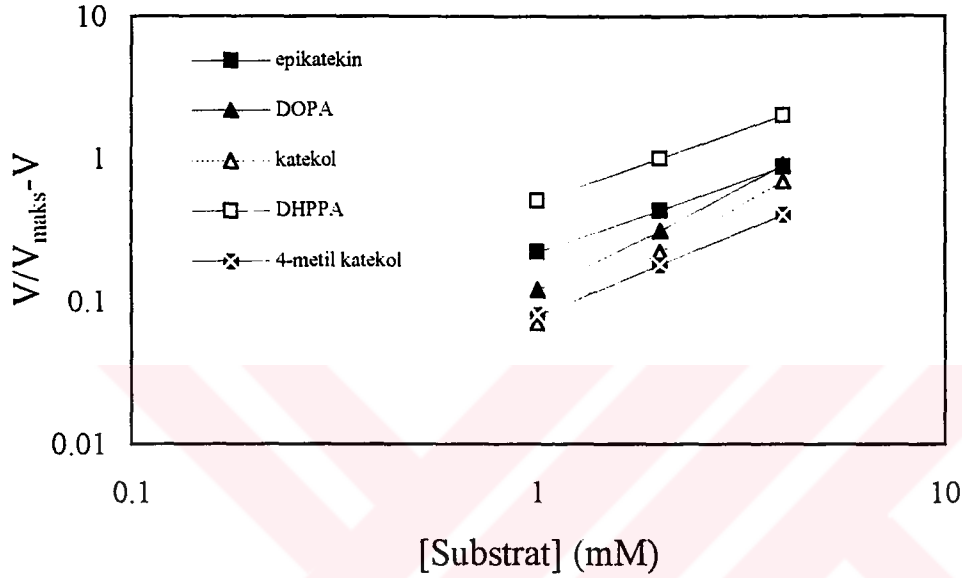
Şekil 16. Epikatekin substratı varlığında PFO'nun substrat-satürasyon grafiği



Şekil 17. DHPPA substratı varlığında PFO'nun substrat-satürasyon grafiği

Enzim kinetiği çalışmalarında, döngel meyvelerindeki PFO aktivitesinde kullanılan 4-metilkatekol, katekol, DOPA, epikatekin ve DHPPA substratlarıyla optimize edilmiş deneme ortamında ulaşabileceği maksimum hız (V_{maks}) değerleri ve her bir substrata karşı

PFO'nun ilgisini gösteren Michaelis sabiti (K_m) değerleri de yukarıda verilen substrat-satürasyon eğrilerinden tespit edilmiştir (Tablo 5). Ayrıca her bir substrat varlığında değişen substrat konsantrasyonlarına karşılık okunan hız (V) ve karşılık gelen V_{maks} değerleri kullanılarak elde edilen $V/(V_{maks}-V)$ oranlarına Hill eşitliği gereğince grafiğe geçirilerek bu farklı substratlar için PFO üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperatif olup olmadıkları da tespit edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Çeşitli substratlar varlığında elde edilen Hill eğrileri

Hill grafiğinde her bir substrata ait doğruların eğimleri Hill sabitlerini (h) vermiştir ve tüm çalışılan substratlar durumunda bu değerlerin $h < 1$ olması (Tablo 5) enzim döngel meyveleri PFO üzerinde substratların bağlanabileceği tek bir bölgenin varlığını göstermektedir. Böyle bir sonuç PFO'nun fenolik substratları ile etkileşiminde bir kooperativite göstermediğinin de bir delili olarak kabul edilebilir (Chilaka, 1993).

Tablo 5. Polifenol oksidaz aktivitesi ile ilgili çeşitli enzim kinetiği değerleri

Substrat	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak}$)	K_m (mM)	V_{maks}/K_m (dak^{-1})	Hill sabiti (h)
Katekol	88.0	5.7	0.0154	0.2
4-metil katekol	129.6	7.5	0.0173	0.1
DHPPA	7.2	1.9	0.0038	0.5
DOPA	76.2	4.7	0.0162	0.3
Epikatekin	60.6	4.0	0.0152	0.2

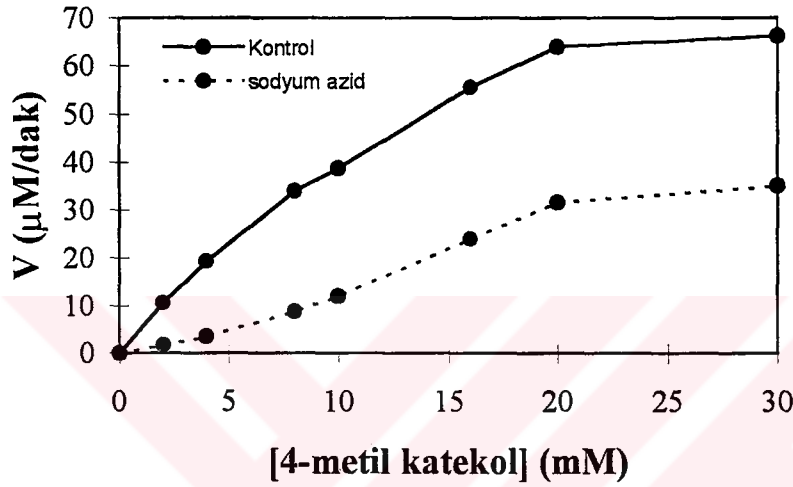
Elde edilen bu eğrilerden her bir substratın döngel bitkisi PFO aktif bölgesi ile olan etkileşimleri ile ilgili bazı genellemeler yapılabilir. Genellikle her bir substrat için elde edilen doyma eğrilerinden PFO bu substratlara karşı farklı davranışlar göstermesine rağmen 10 mM dan daha büyük konsantrasyon değerlerinde tamamen doyduğu söylenebilir. Doyuma ulaşan PFO'nun aktivitesi, substratların konsantrasyonunun daha fazla artırılması ile oldukça az değişmekte ve dolayısıyla PFO ile katalizlenen enzimatik reaksiyon bu konsantrasyon değerlerinden sonra substrat konsantrasyonundan bağımsız olarak ilerleyerek V_{maks} değerlerine ulaşmaktadır. Bu substrat konsantrasyonlarının üzerindeki değerlerde reaksiyon hızı sadece ortamda bulunan toplam enzim konsantrasyonu ile ilişkilidir. Maksimum hızlara ulaşmadan önce elde edilen hız değerleri daha fazla Michaelis-Menten eşitliği gereğince daha fazla doğrusallık gösterir. Bu maksimum hız değerlerinin yarısına varmak için enzimin etkileştiği substrat konsantrasyonları eğrilerin doğrusal olan bu bölgelerinde yer alır ve bu konsantrasyon değerleri PFO'nun her bir substratla olan etkileşimlerini gösteren K_m sabitleridir. K_m değerlerinden daha düşük substrat konsantrasyonlarında ise ortamdaki PFO'nun aktif bölgesinin tamamen doygunluğa ulaşmasını sağlayacak düzeyde olmadığından enzimatik hız hem substrat ve hem de enzim konsantrasyonuna bağlı olarak gelişmektedir.

Kinetik verilerle çizilen substrat-doyma eğrilerinden her bir substrat varlığından elde edilen V_{maks} ve K_m değerleri birbirlerine oranlanarak V_{maks}/K_m değerleri de hesaplanmıştır. Spesifite oranları olarak tanımlanan bu değerler, bir enzimin farklı substratlardan hangisine ve ne kadar ilgi duyduğunu ya da daha iyi etkileştiğini ifade eden bir değerdir. V_{maks} değerleri yukarıda da bahsedildiği gibi sadece PFO konsantrasyonuna bağlıdır ve böyle bir hız eşitliği katalitik hız sabiti ya da dönüşüm sayısı olarak da tanımlanan bir sabiti (k_{kat}) de içerir. Toplam enzim konsantrasyonunun bilinmediği durumlarda spesifite sabitinin bulunmasında V_{maks} değerlerinin kullanılması uygundur. Dolayısıyla V_{maks}/K_m oranları böyle durumlarda spesifite oranı olarak ifade edilir. Bu değerler de topluca tüm substratlar için değerlendirilecek olursa, döngel PFO'nun yapılan deney şartlarında en fazla 4-metilkatekol substratına ilgi duyduğu ve bu ilginin sırasıyla 4-metilkatekol>DOPA>katekol>epikatekin>DHPPA şeklinde olduğu söylenebilir.

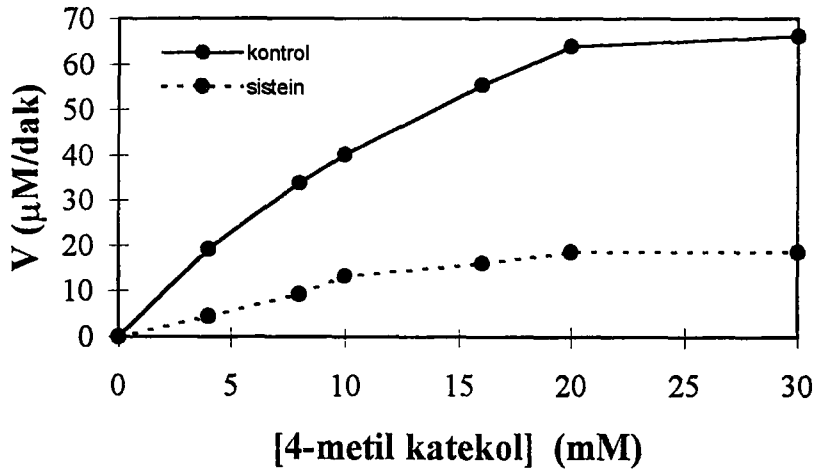
Çeşitli kaynaklardan izole edilen PFO ların en önemli özelliklerinden birisi de çeşitli inhibitörlere karşı gösterdiği davranışlardır (Valero, 1991; Arslan, 1997). Bu amaçla diğer bitki PFO leri için denenen PFO inhibitörleri olan sodyum azit, sistein ve benzoik asit döngel PFO için de test edilmiş ve enzim aktivitesine karşı gösterdikleri inhibisyon türleri de

belirlenmiştir (Şekil 19, 20, 21). İnhibisyon denemelerinden elde edilen sonuçlardan döngel PFO aktivitesinin diğer PFO dan elde edilen sonuçlarla uyumlu ve denenen inhibitörlere oldukça duyarlı olduğu ve tipik bir şekilde inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 6).

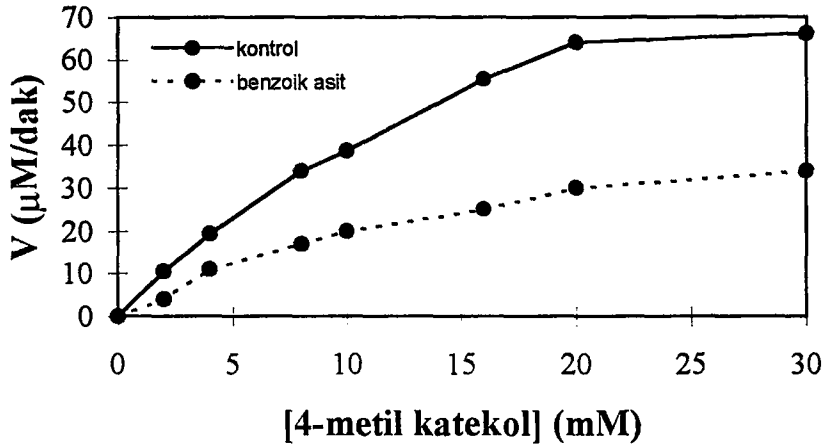
Sodyum azid ile döngel PFO aktivitesinin inhibisyonu diğer iki inhibitörden farklı olarak karışık inhibisyon profili göstermiştir ve K_m sabiti 13.0 mM olarak tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Döngel PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu



Şekil 20. Döngel PFO aktivitesinin sistein ile inhibisyonu



Şekil 21. Döngel PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu

Benzoik asit ve sistein varlığında ise PFO aktivitesi yarışmasız olarak inhibe edilmiş olup K_m değerleri 7.6 mM ve 7.9 mM olarak bu tür inhibisyonun bir karakteristiği şeklinde birbirine oldukça yakın bulunmuşlardır (Şekil 20,21).

Tablo 6. İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyonu aktivitesine etkisi

İnhibitör	V_{maks} (µM/dak)	K_m (mM)	İnhibisyon türü
Kontrol	129.6	7.5	-
Sodyum azid	72.9	13.0	karışık
Benzoik asit	70.8	7.6	yarışmasız
Sistein	43.7	7.9	yarışmasız

Elde edilen tüm sonuçlar, döngel bitkisi meyvelerinde bulunan PFO aktivitesinin substratlarına karşı diğer bitki PFO aktivitelerinde gözlenen değerlerle oldukça uyumlu olduğunu ve PFO inhibitörlerine karşı da yüksek duyarlı olduğu gözlenmiştir.

4. ÖNERİLER

PFO ın meyve ve sebzelerde esmerleşmeye ve dolayısıyla hem bitkinin özellikleri ve hem de ekonomik açıdan istenmeyen bazı kayıplara yol açtığı çok çeşitli bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu esmerleşmenin, farklı meyve ve sebze kültürlerindeki fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz aktivitesine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Temel olarak PFO leri ile katalizlenen bu reaksiyonlarda oluşan kinonlar oldukça reaktif olup esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşirler. Bu polimerik kahverengi pigmentin oluşumu bitkinin duyuşal ve besinsel özelliklerinde değişmelere sebep olur ki böylece ürünün hem ekonomik hem de besinsel değeri azalır. Bundan dolayı bu esmerleşme olayı gıda endüstrileri açısından ciddi ekonomik kayıplara yol açar. Dolayısıyla, farklı bitki türlerinde esmerleşmeyi sağlayan PFO aktivitelerinin detaylı karakterizasyonu bu aktivitenin önlenmesi için önemli bilgiler sağlayacaktır.

Çalışmamıza başlamadan önce yapılan fizibilite aşamasında PFO aktivitesi diğer bitki türlerinde tespit edilen değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Çok fazla endüstriyel bir önem taşımamasına rağmen aktivitenin yüksek olması oldukça ilgi çekicidir. Dolayısıyla, diğer PFO lerinin katalizledikleri enzimatik reaksiyonlara göre döngel PFO ın davranışlarındaki değişiklikler ekstraktların protein konsantrasyonu, deney ortamının pH ve sıcaklığı, substrat konsantrasyonunun ve çeşitli PFO inhibitörlerinin etkileri açısından irdelenmiştir. Enzimin 3-boyutlu yapısının bilinmediği durumlarda kinetik ve çeşitli biyokimyasal veriler enzimin spekülatif yapısı hakkında faydalı bilgiler verir. Dolayısıyla böyle bir çalışma, PFO aktivitesini çeşitli bitkilerde kontrol etmek, böylece esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimlerindeki değişimlerinin besinsel ve toksikolojik özelliklerine etkisinin ortaya konulması için önemli bir adımı oluşturur. Ayrıca, esmerleşmenin kimyasal, biyokimyasal, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin engellenmesine ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işlemi mümkün olabileceğinden dolayı, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konması hem beslenme ve hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından faydalı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Anosike, E.O., Ikediobi, C.O., 1985, The biochemistry of the browning of yam tubers. In: Advances in Yam Research (1st edn), ed. Osuji G., Biochemical Society of Nigeria, Nigeria, pp. 145-160
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., 1997, Polyphenol oxidase from *Allium sp.*, J. Agric. Food Chem., 45, 2681-2683
- Biswas A.K., Sarkar, A.R., 1971, Biological and chemical factors affecting the valuation of North East Indian plains teas. J Sci Food Agric 22, 196-204
- Cano, M.P., de Ancos, B., Lobo, G., 1995, Peroxidase and polyphenoloxidase activities in papaya during postharvest ripening and after freezing-thawing, J. Food Sci., 60, 815-820
- Cano, M.P., Lobo, M.G., de Ancos, B., Galeazzi, M.A.M., 1996, Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits, J. Agric Food Chem., 44, 3075-3079
- Cary, J.W., Lax, A.R., Flurkey, W.H., 1992, Cloning and characterisation of a cDNA coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. Plant Mol Biol, 20, 245-253
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-Carmona, F., 1996, Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce, J. Agric. Food Chem., 44, 984-988
- Chilaka, F.C., Anosike, E.O., Egbuna P.C., 1993, Purification and properties of polyphenol oxidase from oil bean seeds, J. Sci. Food Agric., 61, 125-127
- Corsini, D.L., Pavek, J.J., Deab, B., 1992, Difference in free and protein-bound tyrosine among potato genotypes and their relationship to internal blackspot resistance, Am. Pot. J. 69, 423-434
- Dry, I.B., Robinson, S.P., 1994, Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase, Plant Mol. Biol., 26, 495-502
-

- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1995, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdedoncella apple, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2807-2812
- Espin, J.C., Trujano, M.F., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1997, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas Avocado, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1091-1096
- Fenton, D.E., 1995, Dioxygen management-involvement in enzymes. In: *Biocoordination Chemistry*, Oxford Science Publications, Oxford, Great Britan, pp. 52-53
- Finger, A., 1994, *In-vitro* studies on the effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation of polyphenolic black tea constituents, *J Sci Food Agric*, 66, 293-305
- Fraignier, M.P., Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1995, Biocehmical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *prunus*, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2375-2380
- Friedman, M., 1996, Food Browning and Its Preventin, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 631-653
- Friedman, M., 1997, Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1523-1540
- Ganguly, K., Seshado, T.R., 1958, Isolation of the more commanly occuring leucoanthocyanidins of plants, *J. Sci. Ind. Res.*, 17, 168-173
- Hunt, M.D., Eanetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M., Steffens, J.C., 1993, cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase, *Plant Mol Biol* 21, 59-68
- Jimenez, M., Garcia-Carmona, F., 1996, Kinetics of the slow pH-mediated transition of polyphenol oxidase, *Arch. Biochem Biophys*, 331, 15-22
- Jimenez-Atienzar, M., Pedreno, M.A., Garcia-Carmona, F., 1996, Activation of polyphenol oxidase by polyamines, *Biochem. Int.*, 1991, 25, 861-868
- Ke, D., Salveit, M.E., 1988, Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce, *Plant Physiol.*, 88, 1136-1140

- Kenten, R.H., 1957, Latent phenolase in extracts of broad bean. Activation by acid and alkali *Biochem. J.*, 67, 300-307
- Kertesz, D., Zito, R., 1962, Phenolase. In: *Oxygenases* (O. Hayaichi, ed) Acaemic Press, New York, p.307
- Khan, V., Pomerantz, 1980, S.H., Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase, *Phytochemistry*, 19, 379-385
- Lee, C.Y., Kagan, V., Jaworski, A.W., Brown, S.K., 1990, Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 99-101
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin Phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
- Mayer, A.M., 1987, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry*, 26, 11-20
- Mayer, A.M., Harel, E., 1991, Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: *Food Enzymology* (Vol 1) ed. Fox PF, Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, pp 373-398
- Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., de Vincette, M.C., Tanksley, S.D., Steffens, J.C., 1993, Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family, *Plant Mol. Biol.*, 26, 495-502
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert S.Y., 1994, Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rv. Food Sci. Nutr.*, 34, 109-157
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), 1989, Nomenclature of electron-transfer proteins, *Eur J Biochem*, 200, 599-611
- Omidiji, O., Okpuzor, J., 1996, Time course of PFO-related browning of yams, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 190-196

- Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J., Dawley, R., 1994, Tyrosinase, laccase and peroxidase in mushrooms, *J. Food Sci.*, , 59, 824-827
- Rodriguez-Lopez, J.N., Escribano, J., Garcia-Canovas, F., 1994, A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, *Anal. Biochem.*, 216, 205-212
- Sanches-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F., 1990, Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning, *Anal. Biochem.*, 184, 279-282
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., Garcia-Carmona, F., 1993, Substrate dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactans. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1583-1586
- Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J., Garcia-Carmona, F., 1989, Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase, *Phytochemistry*, 91, 1321-1325
- Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., 1992, Characterization of polyphenol oxidase from stanley plums, *J. Food Sci.* 57, 5, 1177-1179
- Singh, H.P., Ravindranath, S.D., 1994, Occurrence and distribution of PFO activity in floral organs of some standard and local cultivars of tea, *J. Sci. Food Agric.*, , 64, 117-120
- Swain, T., Mapson, L.W., Robb, D.A., 1966, Activation of *Vicia faba* tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry*, 5, 469-482
- Thygesen P.W., Dry, I.B., Robinson, S.P., 1994, Polyphenol oxidase in potato tubers. In W.R. Belknap, M.E. Vayda, W.D. Park, eds., *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, Ed 2. CAB International, Wallingford, UK, pp 151-159
- Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O., 1988, Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol Plant* 72, 659-665

Whitaker, J.R., 1972, Polyphenol oxidase. In: Principles of enzymology for the food sciences, (Fennema, O.R., Ed.) Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 571-582

Zhang, X., Flurkey, W.H., 1997, Pheoloxidases in Portabella Mushrooms, J. Food Sci., 62, 97-100



ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon' un Çaykara İlçesinde doğdu. Trabzon Lisesi'nden 1991 yılında mezun oldu. Lisans eğitimini Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nde tamamladı. Yabancı dili İngilizcedir.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ