KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YOMRA ELMASINDAN (*Malus sylvestris*) ELDE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZIN MONOFENOLAZ VE DİFENOLAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehra CAN

HAZİRAN 2010
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YOMRA ELMASINDAN (*Malus sylvestris*) ELDE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZIN MONOFENOLAZ VE DİFENOLAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Zehra CAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"Yüksek Lisans (Kimya)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.06.2010
Tezin Savunma Tarihi : 23.06.2010**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

Yomra Elması *(Malus sylvestris*) polifenol oksidaz enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisansa tez danışmalığımı üstlenerek çalışma sırasında hoşgörüsünü ve bilgisini benden esirgemeyen değerli danışman hocam, sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, çalışmanın başlangıcından bitimine kadar önemli katkılar sağlayan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e ve değerli hocam sayın Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e teşekkürü bir borç bilirim. Maddi, manevi her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN ve Zeynep İSKEFİYELİ'ye sonsuz teşekkürler. Aynı zamanda Biyokimya Araştırma Laboratuarı Arş. Gör. Esra ULUSOY'a ve Öğr. Gör. Özlem TARHAN'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca benim yanımda olan ve benim en büyük destekçim olan değerli aileme sonsuz teşekkürler.

Zehra CAN
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ II
İÇİNDEKİLER III
ÖZET V
SUMMARY VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
TABLOLAR DİZİNİ IX
SEMBOLLER DİZİNİ X
1. GENEL BİLGİLER 1
1.1. Giriş 1
1.2. Yomra Elması ve Elmalar Hakkında Genel Bilgi 3
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları 5
1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları 5
1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları 7
1.4. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar 8
1.5. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri 11
1.6. Polifenol Oksidazın Substratları 14
1.7. Polifenol Oksidazın İnhibisyonu 18
1.8. Enzim Aktivitesinin Tayin Metodları 19
1.9. Çalışmanın Amacı ve Önemi 20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 22
2.1. Materyal 22
2.1.1. Kullanılan Cihazlar 22
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 22
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar 23
2.2. Ham Ekstrağın Hazırlanması 26
2.3. Protein Tayini 26
2.4. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi 26
2.5. Substrat ve Coomassie Brillant Blue R- 250 Boyanması 27
2.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini 28
2.7. Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi 28

2.8. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi 29
3. BULGULAR 30
3.1. Uygun Ekstraksiyon Çözeltisinin Belirlenmesi 30
3.2. Protein Tayini ve Doğal Elektroforeze Ait Bulgular 30
3.3. Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular 31
3.4. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular 34
3.5. Yomra Elması PFO'su ile İlgili Kinetik Veriler 37
3.5.1. Monofenolaz Aktivitesi ile İlgili Kinetik Veriler 37
3.5.2. Difenolaz Aktivitesi ile İlgili Kinetik Veriler 40
3.6. PFO İnhibisyon Kinetik Verileri 43
3.6.1. PFO Sodyum metabisülfit İnhibisyonu 44
3.6.2. PFO Askorbik Asit İnhibisyonu 45
3.6.3. PFO Sodyum Azid İnhibisyonu 47
3.6.4. PFO Benzoik Asit İnhibisyonu 48
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR 51
5. ÖNERİLER 54
6. KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada, Trabzon ilinin endemikleri arasında yer alan Yomra Elması (*Malus slyvestris)* meyvesinden hazırlanan ekstraktta polifenol oksidazın (PFO) monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri ve çeşitli biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Monofenolaz aktivitesi 3-(3,4,hidroksifenil) propiyonik asit (MHPPA), L-tirozin monofenolik substratları ve difenolaz aktivitesi de katekol, 4-metil katekol, L-DOPA (dihidroksifenilalanin), difenolik substratları varlığında belirlenmiştir. Her bir substrat için PFO'un en iyi çalışacağı pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda Yomra Elması PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve difenolaz aktivitesinin en yüksek derecede katekol substratına ilgi duyduğu ve bu substrat ilgisinin sırasıyla 4-metil katekol ve L-DOPA'nın izlediği, monofenolaz aktivitesi için ise sırasıyla MHPPA, L-Tirozin şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca askorbik asit, sodium azid, sodium metabisülfit ve bezoik asit gibi genel PFO inhibitörlerinin enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Tüm bu veriler *Malus slyvestris* mevcut olan PFO'ın diğer bitki PFO ile aynı benzer özelliklere sahip olduğu desteklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol Oksidaz, Monofenolaz, Difenolaz, Yomra Elması, (*Malus Slyvestris)*

SUMMARY

Investigation Monophenolase and Difenolase Activities of Polyphenoloxidase from Yomra Apple (*Malus sylvestris*)

In this study, polyphenol oxidase (ppo) activity in the extracts prepared from Yomra Apple (*Malus Slyvestris)* was investigated in detail from the point of biochemical data. 4-methyl catecol, catecol, dopa (dihidroksifenilalanin), MHPPA3-(3,4,hidroksifenil propiyonik asit), and activity was linear up to 0,05 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 kinetic with the greatest degree of affinity for catecol and the order of affinity was displayed to be catecol> 4- methyl catecol> MHPPA > L-Tirozin> L-Dopa. Moreover, the four of the prevelant inibitors, of PPO enzymes, ascorbic acid, sodium azide, benzoic acid and sodium metabisulfite, all inhibited the activity very effectively. All the support the presence of a activity in *Malus Slyvestris* having similar properties to other polyphenol oxidases.

Key Words: Polyphenoloxidase, Monophenolase, Diphenolase, Yomra Apple, *Malus slyvestris*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Proteinlerdeki fonksiyonel gruplarla glukozun oluşturduğu bazı Esmerleşme Reaksiyonları ara ürün 6

Şekil 2. Heterohalkalı aminlerin oluşturulduğu esmerleşme reaksiyonları ve ürünleri..... 7

Şekil 3. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)..... 12

Şekil 4. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)..... 12

Şekil 5. PFO tarafından katalizlenen reaksiyon için önerilen mekanizma 13

Şekil 6. PFO ın aktif bölgesinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması..... 14

Şekil 7. Polifenol oksidazın kromojenik nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri 20

Şekil 8. Yomra Elması PFO'nun doğal poliakrilamid jel elektroforezi 31

Şekil 9. MHPPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi..... 32

Şekil 10. L-Tirozin substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi 32

Şekil 11. Katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi 33

Şekil 12. 4-metil katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi 33

Şekil 13. L-DOPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi 34

Şekil 14. MHPPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi 35

Şekil 15. L-Tirozin substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi..... 35

Şekil 16. Katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi 36

Şekil 17. 4- metil katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi..... 36

Şekil 18. L-DOPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi 37

Şekil 19. MHPPA substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği..... 38

Şekil 20. MHPPA substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği.....38

Şekil 21. L-Tirosin substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği 39

Şekil 22. L-Tirosin substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver- Burk grafiği.....39

Şekil 23. Katekol substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği..... 40

Şekil 24. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği 41

Şekil 25. 4-metil katekol substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği 41

Şekil 26. 4-metil katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği 42

Şekil 27. L-DOPA substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği..... 42

Şekil 28. L-DOPA varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği 43
Şekil 29. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu 44
Şekil 30. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu Lineaweaver-Burk grafiği.....45
Şekil 31. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu ikincil grafiği 45
Şekil 32. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu..... 46
Şekil 33. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu Lineawear- Burk grafiği 46
Şekil 34. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği..... 47
Şekil 35. Elma PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu 47
Şekil 36. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu Lineawear-Burk grafiği 48
Şekil 37. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu ikincil grafiği.....48
Şekil 38. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu..... 49
Şekil 39. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile Lineawear- Burk grafiği..... 49
Şekil 40. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği..... 50

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kullanılan Cihazlar 22

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler 22

Tablo 3. Lowry protein tayininde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışı 23

Tablo 4. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı 23

Tablo 5. Tampon çözeltilerinin hazırlanışı 24

Tablo 6. Substrat çözeltilerinin hazırlanışı 25

Tablo 7. İnhibitör çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanışı 25

Tablo 8. Çalışmada kullanılan diğer çözeltilerinin hazırlanışı 25

Tablo 9. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri 27

Tablo 10. Sustratların PFO ile olan reaksiyonların optimizasyonu 37

Tablo 11. Polifenol Oksidaz Aktivitesi İle İlgili Çeşitli Enzim Kinetiği Değerleri 43

Tablo 12. İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyonu aktivitesine etkisi 50

SEMBOLLER DİZİNİ

APS : Amonyum persülfat

BSA : Bovin Serum Albumin

DHPPA : 3-(3,4-dihidrokisfenil) propiyonik asit

DİECA : Dietil ditiyo karbamat

DMF : Dimetil foramid

DOPA : 3,4-dihidroksifenilalanin

E.C. : Enzim kod numarası

EDTA : Etilendiamin tetrasetik asit

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IUB : Uluslararası Biyokimya Derneği

MBTH : 3-metil-2-benzotiyazolinon

MHPPA : 3-(3,4-hidroksifenil) propiyonik asit

mM : milimolar

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PFO : Polifenol oksidaz

PMSF : Fenilmetilsülfonilflorür

PHPPA : 3-(4-hidroksifenil) propiyonik asit

SDS : Sodyum dodesilsülfat

TEMED : N,N,N'N'-Tetraetilendiamin

Tris : Tris (hidroksimetil) aminometan

E.Ü. : Enzim ünitesi

[S] : Substrat konsantrasyonu

V_{maks} : Maksimum hız

K_m : Michaelis- Menten sabiti

Y.E. : Yomra Elması

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Birçok besinlerin dokularında, toplama ve depolama esnasında, çarpma, kesme, dilimleme ve kabuk soyma gibi fiziksel işlemler sonucunda sarıdan kahverengine kadar gelişebilen renk değişimleri meydana gelir. Esmerleşme veya kararma olarak bilinen bu renk değişimleri fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonuyla sonuçlanan çok yaygın olarak bilinen bir olaydır. Esmerleşme genellikle fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu ve takibende bu reaktif ara ürünler enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonlarıyla hızlı ve kolay bir şekilde polimerleşerek koyu renkli ve suda az çözünen melanin olarak bilinen pigmentlerin oluşmasıyla son bulan bir takım reaksiyonlar zinciridir (Whitaker, 1972; Friedman, 1996; 1997; Laurila vd., 1998). Bu kahverengi pigmentin oluşumu bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez bu oksidasyon işlemleri istenilen seviyede durdurulamadıklarında özellikle besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında besinlerin duyusal ve besinsel özelliklerinde değişimlere sebep olurlar. Bu genelde besinin renk, koku ve besin değerinde istenmeyen değişimler şeklinde ortaya çıkarlar. Bunlarda besinin, hem besinsel değerini hem de ekonomik değerini azaltır (Whitaker ve Lee, 1995).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin olgunluğuna göre değişim gösterirken esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif polifenol oksidaz (PFO) konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir (Mayer ve Harel, 1981, 1991, Lee, 1992,Fragnier, Marques, Fleuriet ve Macheix,1995,Yoruk ve Marshall,2003). Bu faktörlerden birinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla, enzimatik esmerleşme reaksiyonları durdurulabilir veya kontrol edilebilir.

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, özellikle ısı etkisi ile artan bir esmerleşmeye uğradıkları gözlenmektedir. Kurutulmuş ürünlerde renk esmerleşmesi daha çok enzimatik olmayan bir yolla meydana gelmektedir. Esmerleşme olayı, üretim sırasında uygulanan ısıl işlem sonucu oluştuğu gibi depolama sırasında da yavaş bir hızda devam etmektedir. Buna göre bu tip esmerleşme reaksiyonları ısı ile

şiddetlenen ve düşük sıcaklıklarda zamana bağlı olarak sürekli artan bir olaydır (Wetherilt ve ark., 1992).

Enzimatik olmayan esmerleşme olarak bilinen renk değişmeleri, aminoasitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi reaksiyonun sonucudur ve oksijensiz ortamda da yürüyebilir. Koku ve renkte bir iyileştirme sağlayan bu reaksiyonlar lezzet endüstrisinde oldukça önemlidir. Olayın ilk aşamasında, amino grubu, şekerin indirgen hidroksil grubuna bağlanarak N-glikozitleri oluşturmaktadır. Bunu izleyerek gelişen karmaşık polikondensasyon olayları sonucunda, esmer renkli "melanoidin" adı verilen bileşikler oluşmaktadır. Enzimatik olmayan renk bozulmaları, ısı, ışık, metaller ve oksijen gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986; Bolin ve Steele, 1987).

Besinlerde esmerleşme denildiği zaman, genellikle besinin üretiminden oluşum sürecine kadar, esmerleşmenin zararlı etkileri belirtilir. Ancak bazı enzimatik esmerleşme reaksiyonları, besin için çok faydalıdır. Çay, kahve ve kakao, birçok ülke için oldukça önemli ürünlerdir (Ensminger vd., 1995). Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi, özellikle fermentasyon ve kuruma döneminde enzimatik esmerleşmeye bağlıdır. Ayrıca, üzüm, erik, hurma ve incir gibi bazı meyvelerin kurutulmasıyla, karakteristik sarı veya kahverengini almaları da enzimatik esmerleşmenin bir sonucudur.

Polifenol oksidazların, böcek ve mikroorganizmaların bitkilere saldırmasını ve çürük oluşumunu önlemede anahtar fizyolojik rol oynadığı düşünülür. Meyve ve sebzeler olgunlaştıkları zaman, onların fenolik bileşenlerinde meydana gelen azalmadan dolayı, hastalıklara karşı hassasiyetleri artar. PFO, fenolik bileşiklerden kinonların oluşumunu katalizler ve oluşan kinonlar, polimerizasyon reaksiyonlarıyla polimerleşirler. Bu polimerleşme, antibakteriyal ve antifungal aktivite gösteren melaninlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Oluşan bu melaninler, aynı zamanda sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına yardımcı olur (Marshall vd., 2000).

Enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin, antibakteriyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olmaları, araştırmacıların enzimatik esmerleşmeye büyük bir ilgi duymasına neden olmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için, besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işleminin meydana gelmesi mümkündür. Bu nedenle, çeşitli bitkilerdeki

esmerleşme olaylarının ortaya konulması, etkilerinin anlaşılması ve çözümler bulunması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından, oldukça önemlidir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en geçerli yöntem, PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren, uygun yeni teknolojilerle birlikte, meyve ve sebzelerin kişi başına düşen tüketimindeki artış, birçok ülke için ekonomik yararlar sağlayacaktır (Labuza, 1992).

1.2. Yomra Elması ve Elmalar Hakkında Genel Bilgi

Yomra Elması Rosacea familyasının malus cinsine ait *Malus sylvestris* türünün bir kültüvarıdır. Yomra Elması adını da aldığı Doğu Karadeniz Bölgesinin Trabzon ili Yomra ilçesi ve çevresinde yetişmektedir. Yomra Elması Trabzon ilinin endemik türleri arasında yer almaktadır. Elma güz mevsiminde (Kasım) olgunlaşıp, tüketilmektedir. Elma hasat edildikten sonra uzun süre saklanılabilmekte ve bu saklanma süresi boyunca lezzet kazanmaktadır. Ayrıca elmanın çekirdeği olgunlaşma evresine doğru kaybolmaktadır. Yomra Elması hakkında literatürlerde ve yazılı belgelerde henüz ayrıntılı bir bilgi bulunmamaktadır. Ama günümüzde elmaların yetiştiriliciliği, kimyasal içerikleri, biyokimyasal özellikleri ve sağlık açısından yararları ile ilgili birçok literatür bulunmaktadır.

Yomra Elması şekil olarak sap kısımlarından basık, ortadan şişkince olduğu bilinmesine rağmen şekli düzgün olamayan birçok elmalara da rastlanmaktadır. Dış renk güneşlenmeye bağlı olarak yeşil üzerinde gizli benekli kırmızı, bordo, turuncu, sarı karışımı bir görünümdedir. Elmanın tadı mayhoş olup olgunlukla beraber tat artmakta ve meyve eti de yumuşamaktadır. Sap çukuru ve çiçek çukuru da derindedir. Çiçekler 5 çanak, 5 taç, 15–20 erkek organ ve 5 bölmeli yumurtalıktan oluşur. Partenokarpiye eğimli olduğundan olgunlaşma süresince çekirdeği erimektedir. Yapılan araştırmalarda yüksek oranda çekirdeksizlik saptanmıştır. Yomra elması bitkisi yavaş gelişme göstermektedir. Bu durum da poliploidi ile alakalı olduğunu düşündürmektedir. Halk arasında yomra elması olarak da tabir edilen elma, yaşlı ve hastalıklı insanlara şifalı olduğuna inanıldığı için hediye edilmektedir (Her Yönüyle Yomra).

Endüstriyel yönden gelişmiş ülkelerde iki önemli hastalık çok yaygın olarak rastlanmaktadır. Bunlar, kalp ve damar hastalıklarıyla kanser hastalıklarıdır. Bunların

ortaya çıkmasında önemli sebeplerin başında yaşam biçimi ve beslenme alışkanlıkları gelmektedir. Bu etkili azaltmada en büyük yardımcı olarak meyve ve sebzeler gelmektedir. Bu meyvelerden biri olan elmayı ele aldığımızda faydaları oldukça fazladır. Elma suyunun antioksidan etkisi en fazla olan meyve sularından biri olduğunu, "Kuercetin" adlı güçlü bir antioksidan içeren elma suyu sağlıklı beslenmede önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda elma suyunun içerdiği antioksidan sayesinde hücresel hasarı önleyici potansiyel bir etkisi olduğu, bu etkinlik sonucunda LDL olarak bilinen kötü kolesterolün oksidasyonunu önleyebildiği görülmüştür. Buna bağlı olarak görülen yüksek tansiyon ve ritim bozukluğu görülen hastalarda olumlu etki gösterdiği ve kalp krizi riskini %24 oranında düşürdüğü ifade edilmiştir. İngiltere'deki Milli Kanser ve Tıp Araştırma Merkezi'nin her gün elma yeme alışkanlığı olan 2 bin kişiyi kapsayan ve 77 yıl süren araştırması sonucunda, elma yemeyenlerin yiyenlere oranla kalp krizi riskinin daha yüksek olduğunu ortaya konmuştur. Ayrıca British Medical Journal adlı tıp dergisinde yayınlanan araştırma sonuçlarına göre her gün başta elma olmak üzere meyve veya meyve suyu tüketme alışkanlığı olanlarda inme (felç) riski böyle bir alışkanlığı bulunmayanlara oranla %32 daha az olduğu belirtilmektedir.

Ayrıca elma suyunun;

1- Aç karnına içilen bir bardak elma suyu vücuttaki toksinlerin atılmasına yardımcı olduğu,

2- Uykudan önce içilirse rahatlattığı ve uykuya geçişi kolaylaştırdığı,

3- Mide bulantısını engellediği, sindirimi kolaylaştırdığı,

4- Gastritten kaynaklanan yanmaları hafiflettiği,

5- Bağırsakları çalıştırdığı ve yumuşattığı,

6- Enerji verdiği,

7- Cildi güzelleştirdiği,

8- Rejim yapanların tatlı yeme arzusunu giderdiği,

9- Kalbi güçlendirdiği,

10-İdrar yolları şikâyetlerini hafiflettiği, bilinmektedir.

Ülkemiz sahip olduğu iklim ve ekolojik özellikler bakımından bazı tropik meyveler dışında birçok meyvenin yetişmesine elverişlidir. Elmanın ana vatanı, Anadolu'yu da içine alan Güney Kafkaslardır. Ekolojik şartların uygunluğu ve gen merkezi olması nedeniyle elma, yurdumuzun hemen hemen her yerinde yetiştirilebilmekte olup en uygun kültür merkezleri, yabanisinin yayılma alanlarına paralel olarak, Kuzey Anadolu'da

bulunmaktadır. Kuzey Anadolu, Karadeniz kıyı bölgesi ile İç Anadolu ve Doğu Anadolu yaylaları arasındaki, geçit bölgeleri de elmanın önemli yetiştiricilik alanlarını kapsamaktadır.

Elma, içerdiği mineral besinler ve vitaminler bakımından beslenmedeki önemi büyüktür. Taze elma meyvesinin %84'ünü su teşkil eder. Kuru madde içerisinde karbonhidratlar, malik asit, proteinler, yağlı maddeler, vitaminler, pektinler ve mineral maddeler yer alır. Elmada bulunan A ve C vitaminleri ile, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve sodyum gibi elementler birleşerek bir takım tuzları oluşturur. Bu tuzların organik kısımları yani organik asitler kanda enerji sağlamak için okside oldukları zaman, geride baz teşkil eden bileşenler kalır. Böylece elma, kandaki asit- baz dengesi üzerinde olumlu bir etki yapar. Bitkiler kendilerini patojenler ve zararlılara karşı korumak üzere çok sofistike yöntemler geliştirmişlerdir ve doğada bir bitkinin hastalanması - patojen populasyonunun büyüklüğü düşünüldüğünde - ender bir olaydır. Ekolojik tarımda albenisi ve verimi modern çeşitler kadar yüksek olmayan, ancak olumsuz koşullara, patojen ve zararlılara karşı nispeten daha dayanıklı olan "eski" varyetelerin üretimine devam edilmesi tercih edilebilir. Ancak bu, ekolojik tarımın ıslah yoluyla verimi ve dayanıklılığı arttırılmış çeşitlerden yararlanmayacağı anlamına gelmez. Albenisi az da olsa, dayanıklı "eski" köy çeşitlerinin yetiştirilmesi tercihi biyolojik çeşitliliğin sürmesine katkıda bulunma ilkesini de taşımaktadır.

Çeşitlerin seçiminde doğal olarak yalnız dayanıklılık değil, vejetasyon süresi, pazar talebi, sertifikalı tohum temininde kolaylık gibi faktörler de rol oynar. Dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıyla patojen ve zararlıların populasyonları belirli bir büyüklükte tutulabilir ve böylelikle kimyasal savaşıma gerek kalmaz. Dayanıklı çeşitler patojen sporlarının duyarlı çeşitlere ulaşmalarını engelleyen bir bariyer olarak da yetiştirilebilirler.

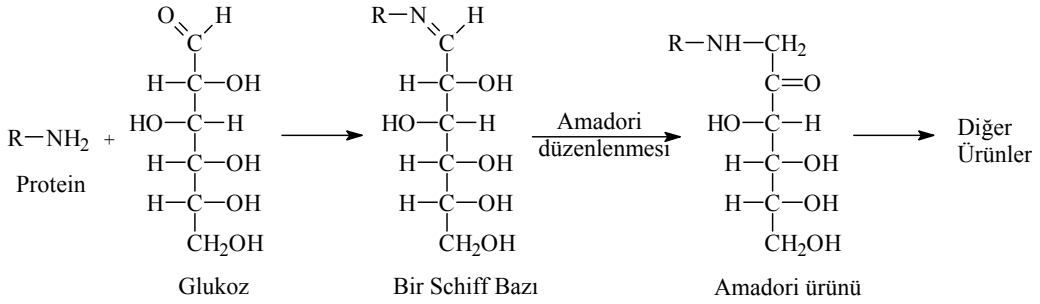
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları

1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları yanında enzimlerin doğrudan etkisiyle ortaya çıkmayan ve enzimatik olmayan esmerleşme şeklinde tanımlanan diğer tür reaksiyonlar da bu esmer pigmentin oluşumundan sorumludur (Friedman, 1996; 1997). Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına göre daha farklı ara ürünler ve farklı mekanizmalarla

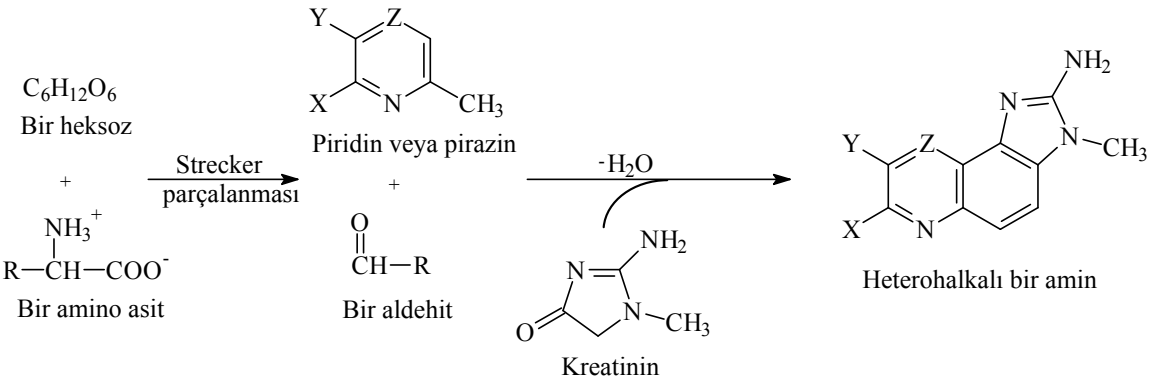
gerçekleşen reaksiyonlar Maillard reaksiyonları olarak bilinir (Mauron,1981; Lee ve Nagy, 1988).

Proteinlerin, peptitlerin ve aminoaistler gibi amin grubu içeren biyomoleküllerin karbohidratlarla olan ve ısı ile katalizlenen reaksiyonlar bu türden işlemler. Örneğin, undaki glutein ile glukozun reaksiyonu, laktalbumin ile süt tozunda bulunan laktozun reaksiyonu ve serbest aminoasitlerin kızarmış patatesteki glukoz ile olan reaksiyonları birer örnek oluştururlar. Bunun dışında in vivo protein-karbohidrat etkileşimleride söz konusudur. Örneğin, diyabet hastalarda hemoglobin ile glukozun reaksiyonu, kataraktlarda göz lensi proteininin glukoz ile reaksiyonu söz konusudur. Bunun yanında, proteinlerin okside olmuş yağ asitleri ile gerçekleştirdiği reaksiyonlar da önemlidir. Kazein adlı protein okside olmuş linoleik asit ile böyle bir etkileşime girebilir (Friedman,1996; 1997).



Şekil 1. Proteinlerdeki fonksiyonel gruplarla glukozun oluşturduğu bazı Esmerleşme Reaksiyonları ara ürünleri

Bu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları dışında ısı ile katalizlenen ve heterohalkalı aminler oluşumu ile sonuçlanan bazı reaksiyonlar vardır (Reaksiyon 2). Sadece hayvansal besinlerde bulunan aminoasitler, karbohidratlar ve keratinin arasındaki etkileşimlerle bu tür işlemleri gerçekleşebilir (Friedman, 1996; 1997).



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

1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

Esmerleşme reaksiyonları içinde en yaygın olarak rastlanan enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları genelde fenol bileşiklerince zengin bitkilerde bulunur ve iki şekilde ortaya çıkabilir (Friedman, 1996; 1997). Bunlardan biri, sebze ve meyvelerde bulunan polifenol bileşiklerin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan kinonoid bileşikler, daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlarla kahverengi melanin pigmentlerine polimerleşirler (Laurila vd., 1998). Normal şartlarda enzim hücre içersinde oksijenle temas halinde değildir, fakat meyve veya sebze kesildiği ya da zedelendiğinde zaman, enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında, bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girer ve renkli bileşikleri oluşturur (Lee vd., 1990; Valero ve Garcia- Carmona, 1998; Rocha vd., 1998; Manzocco vd., 1999; Chang vd., 2000; Mathewson 2000).

Bir diğer enzimatik esmerleşme reaksiyonu ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest aminoasit ve proteinlerle esmer polimeri oluşturmasıdır (Labuza vd., 1992). Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlarıdır.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları, bitkinin çeşidine, türüne, yetiştiği bölgeye ve meyvenin olgunluğuna göre değişim gösterir. Enzimatik esmerleşmenin olabilmesi için, PFO, bitki vakuollerinde bulunan ve PFO'nun etkilediği fenolik substratlar ve moleküler oksijenin bir arada bulunması gerekir. Ayrıca, sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında oluşan ve ilk kilit madde olan *o*-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bu kinonlar herhangi bir renk

bozulmasına sebep olmazlar. Ancak, oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve oluşan bu bileşikler daha büyük moleküllü bileşiklere polimerize olurlar. Esmer renkli olan bu polimerler besinlerde ki renk bozulmasına sebep olurlar (Mcweeny, 1974; O'brein ve Morrissey, 1989).

1.4. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar

Bakır içeren proteinlerin bir grubu olan polifenol oksidazlar, oksidoredüktaz sınıfının bir üyesi olup enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (EC.1.14.18.1) (Robb, 1984; van Gelder vd., 1997; Dincer vd., 2002). PFO oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birincisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi), diğeri ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi) (Yang vd., 2000) dur. Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinonoid maddeler kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler şeklinde polimerleşirler (Whitaker, 1972; Friedman, 1996; 1997).

PFO, memeliler, mikroorganizmalar, meyve, sebze, mantarlar ve deniz ürünlerine kadar çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunur. Buna ek olarak, bazı toprak türlerinde, glikoz oksidaz gibi oksidoredüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO'nun varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar vd., 1989; Mos'ko vd., 1992; Gul'ko, ve Khaziyev, 1993). Farklı bitkilerin PFO içeriği, bitkinin türüne ve yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi, meyve ve sebzelerin olgunluğuna, bitkilerin ise türüne ve yaşına, bağlıdır (Harel vd., 1964; Tolbert, 1973; Stephens ve Wood, 1974; Padron vd.,1975; Mayer, 1987).

Elmadaki PFO'ın hem monofenolaz aktivitesi hemde difolaz aktivitesi ve bu aktiviteye çok çeşitli inhibitörlerin etkisi incelenmiştir (Nicolas, 1994). Monofenolaz aktivitesi enzim izolasyonu işlemlerine duyarlı olmasından dolayı ekstraksiyon sırasında çok düşük oranlarda ve NMR spektroskopisi ya da HPLC gibi teknikler yardımıyla tespit edilmiş, ancak son yıllarda geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağımlılığı izlenebilmiştir. PFO Triton X- 114 deterjanı ile izole edilip kısmen saflaştırılmış ve kinetik karakterizasyonu sonucunda enzimin tek bir aktif bölgeye sahip olduğu ve katalitik işlemler sırasında iki farklı konformasyonu halinde bulunabileceği ileri sürülmüştür (Espin, 1995).

Esmerleşme derecesinin çeşitli meyve kültürleri arasında fenolik içerik ve PFO aktivitesinde ki farklılıklara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Şeftali meyvesinin gelişimi sırasında tannin içeriğinin ve çeşitli fenolik substratların konsantrasyonunun düzenli bir şekilde azaldığı ve hasat dönemine kadar bu seviyede 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).

Döngel (*Mespilus germanica L.)* meyvesinde ki PFO enziminin monofenolik ve difenolik subtratlar içersinde en iyi substrat olarak 4-metil-katekol olduğu belirlenmiştir. Monofenolik substratlara karşı döngel meyvelerinde ki enzimin zayıf aktivite gösterdiği belirlenmiştir. PFO enzimin optimum pH'nın 7, optimum sıcaklığın 30 $^{\circ}$C belirlenmiştir. 4-metil katekol için Km değeri 26 mM, en iyi inhibitörün sodyum metabisülfit olduğu, Cu^{+2}, Hg^{+2}, Al^{+3} iyonlarının difenolaz aktivitesini kuvvetlice inhibe ettiği belirlenmiştir (Ayaz vd., 2008).

Malatya kayısısı (*Prunus armeniaca L.*) Türkiye'de yetiştirilen kayısı türeleri arasında en iyisi olan Malatya kayısısı depolanma esnasında kararma olmakta ve buda ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında ve fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Augusin vd., 1985). Değişik substratlara karşı aktivite belirlenmiş ve en iyi aktiviteyi katekol substratına karşı gösterdiği belirlenmiştir. Bu substrat için K_m değeri 6,6 mM, optimum pH'sını 8,5 olduğu belirlenmiştir. Enzimin monofenolaz aktivitesine sahip olmadığı, askorbik asit ve 2-merkaptoetanolün bu enzim için en iyi inhibitör olduğu belirlenmiştir (Arslan vd., 1998).

Çeşitli meyve kültürleri arasındaki esmerleşme derecesinin PFO aktivitesindeki farklılıklara ve fenolik içeriğine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu meyve kültürlerinden şeftalinin tanin içeriğinin ve fenolik substratların konsantrasyonunun meyvenin gelişimi sırasında düzenli bir şekilde azaldığı ve hasat dönemine kadar bu düzeylerde kaldığı tespit edilmiştir. Şeftalideki PFO aktivitesi de fenolik bileşiklerin içeriğine bezer bir şekilde 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 maksimum aktivite gösterdiği pH 4,0–5,5 değerlerinde olduğu tespit edilmiştir. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile yapılan elektroforetik çalışmalarla ve Western emdirme

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

Zeytinde görülen kararmalar fenolik içeriğe ve PFO enzimin aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Esmerleşme sonucu oluşan renk, sofralık siyah zeytin için istenilen bir değişimdir. Polifenollerin oksidatif kararması, zeytinde bulunan enzimlerin (difenolaz) veya zeytinde bulunmayan ve dışarıdan katılan metal katyonların katalitik etkisiyle oluşmaktadır (Garcia vd., 1996; Robards vd.,1999). Çukurova bölgesinde yetiştirilen Domat çeşidi zeytinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan PFO enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikler araştırılmış, substrat olarak 4-metil katekol kullanılmıştır. Enzimin Km değerinin 14,52 mM, V_{max} değerinin ise 1,73 M/dk olduğu bulunmuş. PFO aktivitesi için optimum pH değeri 4,5 optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuş. Çeşitli inhibitörler kullanılarak en düşük inhibisyonun askorbik asit varlığında olduğu tespit edilmiştir.

Yemeklik olarak tüketilen fasulye esmerleşme reaksiyonlarına maruz kalarak renginde değişim gösterir. Bu reaksiyonlar bitkinin besinsel değerinde bir kayba yol açtığından, esmerleşme reaksiyonunun bu bitkide kontrol edilebilmesi için saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar arasında İspir şeker fasulyesinden polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürülmesiyle izole edilerek biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Katekol substratı varlığında optimum pH'sı 5,5 optimum sıcaklığının 40°C, K_m değerinin 2,4875 M, V_{max} değerinin 3,148 U $ml^{-1}dak^{-1}$ tespit edilmiştir.

Avokado bitkisinde monofenolaz aktivitesi tespit edilmiş ve PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980). Avokado monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan ekstraktlar kullanılarak ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Triton X–114 deterjanı kullanılarak kısmen izole edilip 4-hidroksi anisol substratı varlığında avokado PFO enzimi karakterize edilmiştir (Espin, 1997).

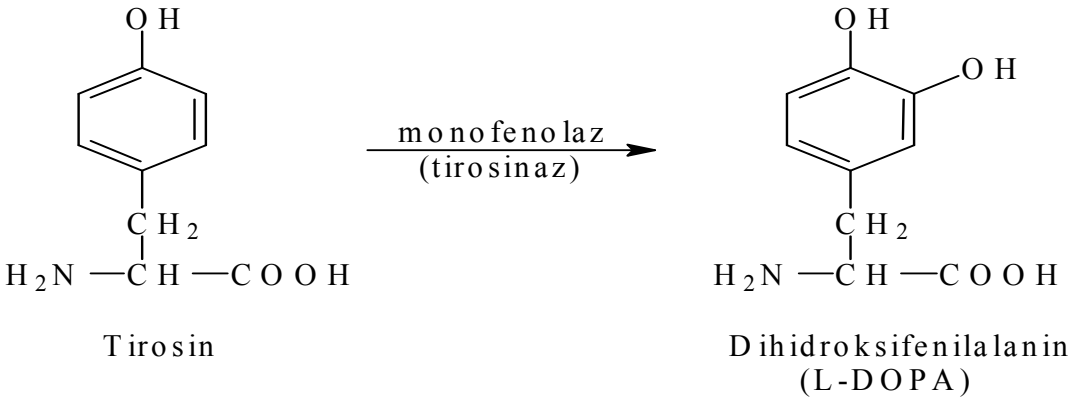
Patateste PFO aktivitesi saplarda düşük seviyede olurken özellikle yumru, kök ve hücrelerde oldukça yüksek olduğu gözlemiştir. Karakterize edilen PFO genlerinin pek

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). Patatesden izole edilen iki PFO geninin yaprak, çiçek ve köklerde ifade edildiği, yumrularda ekspresyon gözlenmediği belirtilmiştir (Hunt, 1993). Bununla birlikte, doku hasarını takiben yumrularda da PFO aktivitesinin yüksek düzeylerde olduğunu ve bunun neticesinde enzimin bitki savunma sisteminde rol oynayabileceği tespit edilmiştir (Thygesen, 1994).

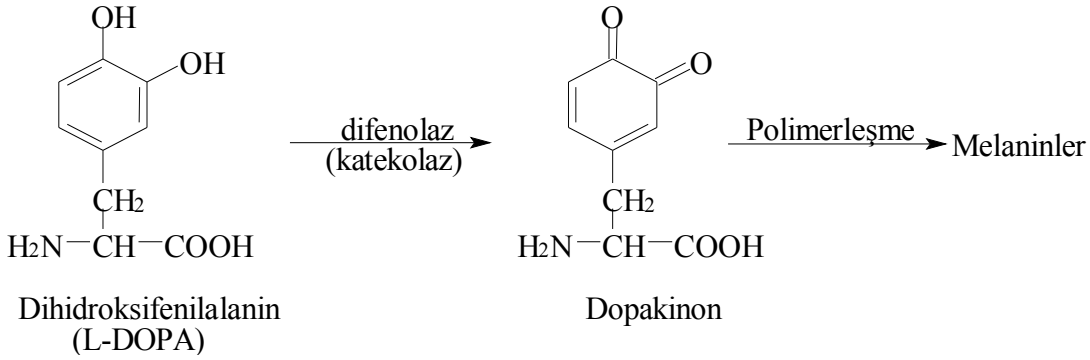
Karayemiş bitkisinin (*Laurocerasus officinalis Roem.*) henüz olgunlaşmamış meyvelerinde yapılan incelemede 3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik asit (DHPPA) substratı varlığında optimum sıcaklığın 40°C olduğu, optimum pH'ın 5,0 olduğu ve alkali pH'larda enzimin %80 aktivitesinin kaybolduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesinin askorbat ve metabisülfite karşı hassas olduğu gözlenmiştir (Colak vd., 2005).

1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri

Uluslararası Biyokimya Derneği (IUB)'ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün FO'ların yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için, birinci sınıf enzim olarak adlandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre PFO, iki farklı aktivite göstermektedir ve bunlardan ilki, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1) ve enzimin bu aktivitesi, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır. Bir diğer aktivite ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonuyla oluşan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve bu enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Fenol vd., 200; Espin vd.,2001; Brooks vd.,2004) (Şekil 3 ve 4).



Şekil 3. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)

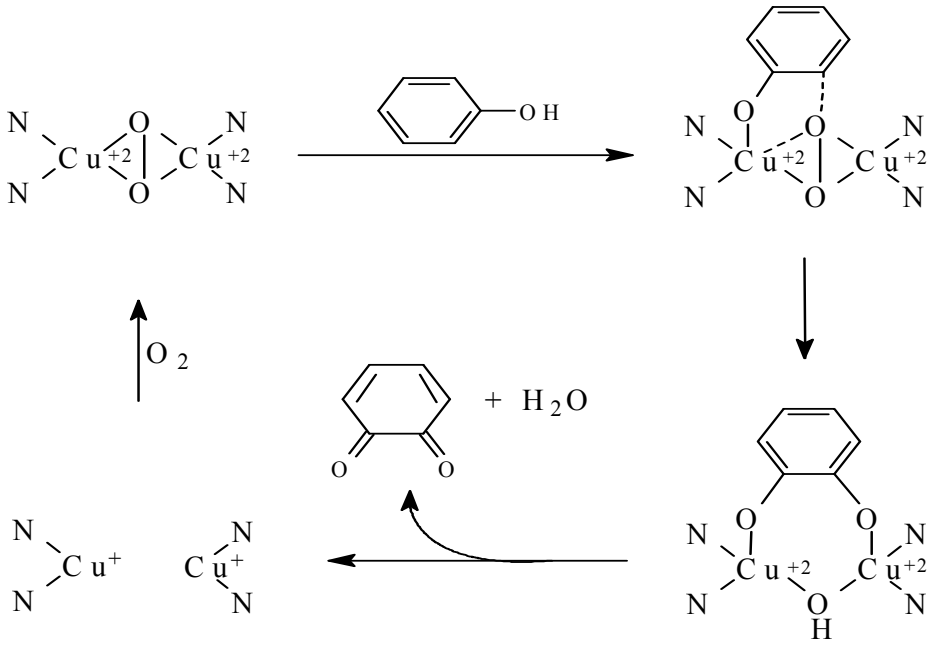


Şekil 4. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)

PFO ortalama 55–65 kDa molekül ağırlığına sahip olup enzimde iki bağlanma bölgesinin bulunduğu belirtilmiştir. Patates, tütün ve mantarda bakır içeriklerinin %0,2- 0,3 arasında değiştiği bulunmuştur. Taze hazırlanan enzim ekstraklarında bakırın Cu(I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu(I)'ın Cu(II)'ye yavaşça okside olduğu gözlenmiş olup bu değişimin herhangi bir aktivite kaybı olmadığı tespit edilmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değilken Cu(II) ilave edilmesi ile aktivite geri kazanılabilmiştir (Kertesz, 1962). Apoenzim, saf enzimin sulu çözeltisinin potasyum siyanür içeren çözeltiye karşı diyaliz edilmesiyle hazırlanmıştır. Saf PFO enzimi renksiz iken benzer aktivite gösteren lakkaz enzimi mavi renklidir. Konsantre edilen PFO çözeltileri nötral pH değerleri oldukça kararlı olup kısa bir süre için 60°C ye kadar ısıtıldığında ise enzimin katalitik fonksiyonu tamamen veya kısmen kaybetmektedir (Ultrich 1975). Bu enzimin nötral pH değerlerinde ve fosfat tamponundaki konsantre çözeltileri -25°C de dondurulmuş olarak aktivite kaybı olmaksızın birkaç ay saklanılabilir. Ancak daha uzun süreli saklamalarda aktivite kaybı

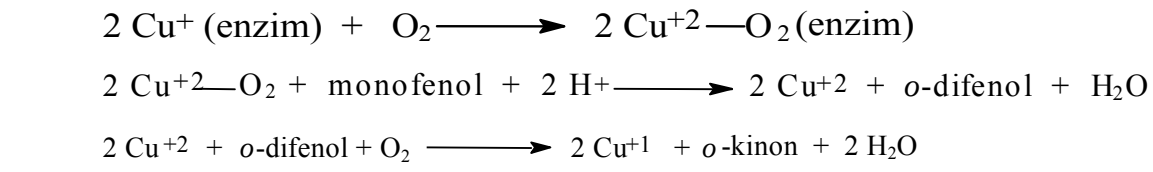
olur ve aktivitede ki bu kayıp dönüşümsüzdür. Bu işlem sırasında Cu (I) okside olarak Cu (II) dönüşür ancak aktivitede ki bu kayıp oksidasyondan kaynaklanmaz. PFO aktivitesi, bakır ile kararlı kompleksler oluşturabilen H_2S, KCN, CO ve *p*-aminobenzoik asit ile inhibe edilebilir.

PFO'ın fenolik bileşikler üzerindeki etki mekanizması oldukça komplesktir. PFO proestetik grup olarak bakır iyonu ihtiva eder, bakırın valens durumu PFO aktivitesini sağlar (Kolcuoglu vd., 2007). Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu PFO'ların aktif bölgesinin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığı göstermektedir (Inlow vd., 2006). PFO'ların katalitik etki mekanizması çeşitli çalışmalarl ortaya koyulmuştur. İlk önce enzimin deoksi formu oksijen ile oksi-PFO formunu oluşturur ve fenolik substrat bu oksi-PFO formundaki bakır atomlarının birine aksiyel olarak koordine olur. Oluşan beş-koordinatlı ara ürünün 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 esnada enzimin deoksi-PFO hali böylece yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir (Şekil 5).



Şekil 5. PFO tarafından katalizlenen reaksiyon için önerilen mekanizma

Böyle bir çevrimle monofenolik substratların önce *o*-difenollere ve *o*-difenollerinde *o*-kinon bileşiklere dönüşür. PFO ‘ın aktif bölgesinde gerçekleşen bu etki mekanizması eşitlikler halinde yazılabilir (Şekil 6).



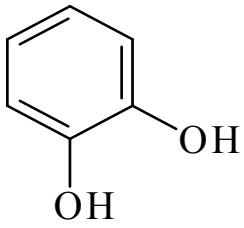
Şekil 6. PFO ın aktif bölgesinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması

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 reaksiyonunun karekteristiği olan pigmentler oluşturulur.

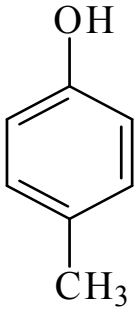
1.5. Polifenol Oksidazın Substratları

Sebze ve meyvelerde çok eşitli fenolik bileşikler içermesine rağmen bunlardan çok az kısmı PFO’ya substrat olabilmektedir. Fenolik ve polifenolik bileşikler sayısız bitki türünde ikincil metabolitler oldukları ve bu bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin, bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunma sisteminde rol oynadıkları tahmin edilmektedir. PFO ile katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Polifenolik bileşiklerin ayrıca antimutajenik, antikanserojenik, antiglisemik ve antioksidatif özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir. Bu özellikler, küf oluşumunun engellenmesi ve proteinsel besin değerinin artırılması amacıyla kullanılabilir (Friedman, 1997). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, bitkini türüne, kültürünün yapılmasına, büyüme ve saklanması sırasında çevresel şartlara ve olgunlaşma derecesine göre çeşitlilik göstermekte hem de bitkinin rengine ve tadına da katkıda bulunmaktadır (Marshall vd., 2000).

PFO’nun en yaygın olan substratları basit yapılı fenoller, klorojenik asit ve türevleri flavonoid tipi fenollerdir. Basit fenoller, katekol ve kresol gibi bileşiklerin yanında trosin ve türevleri ile sinnamik asit türevleride oluşur.

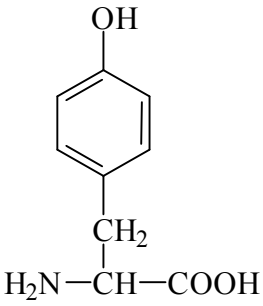


Katekol

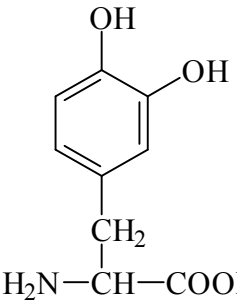


p-kresol

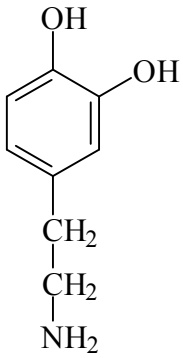
Birçok besin maddesinde bulunabilen tirosin, enzimatik oksidasyon sonucu, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan substratlardandır.



Tirosin



3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA)

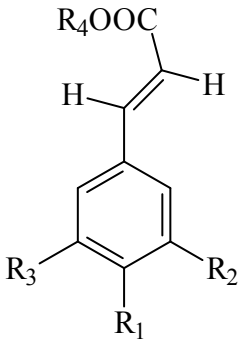


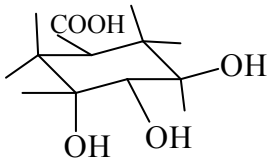
Dopamin

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

Flavonoidler ise bitkilerin çeşitli dokularında ve çok farklı oranlarda dağılmışlardır. Çoğunlukla kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında diğer bölgelere oranla daha yoğun bulunmaktadırlar. Çeşitli oranlarda bulunsalar bile flavonoid yapılı bileşikler bitkide esmerleşme reaksiyonun meydana gelmesi için yeterlidir. Birçok bitki izolatlarında bağıl

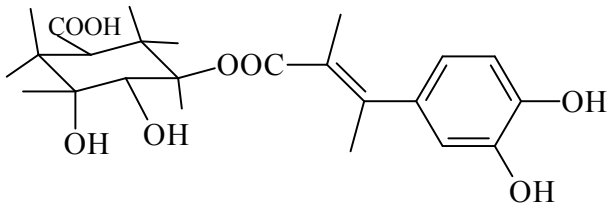
oranlar açısından farklılık gösteren flavonoid sistemine sahip çok çeşitli sayıda bileşik tespit edilmiştir.



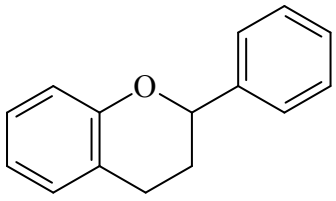


Kinik asit

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

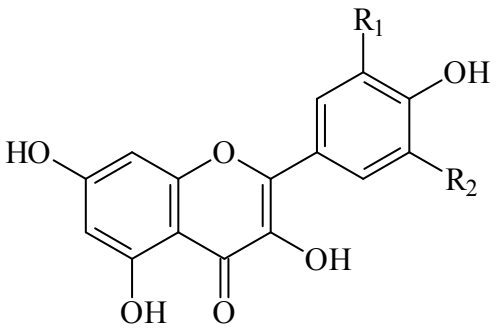


klorojenik asit (5-O-kafeilkinik asit)

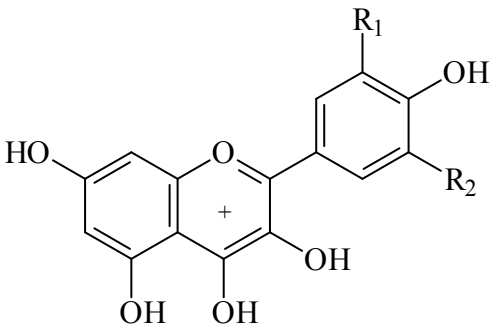


Flavonoid Genel İskeleti

Flavonoller, antoksantin pigmentleri olarak da tanıplanıp çok çeşitli teknikler yardımıyla izole edilip karakterize edilmişlerdir. Bu yapılar birçok durumda mirisetin, kuersetin ve kamferol olarak isimlendirilen birçok türevleri halinde esmerleşme reaksiyonlarına doğrudan katılırlar. Antosiyaninler ise, pelargonidin, siyanidin ve delfinedin olarak tanımlanan türevleri halinde daha çok ikincil reaksiyonlarda rol oynarlar.

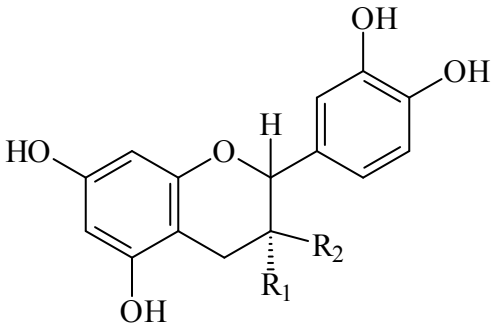


Kuersetin: R_1=OH, R_2=H
Mirisetin: R_1=R_2=OH
Kamferol: R_1=R_2=H

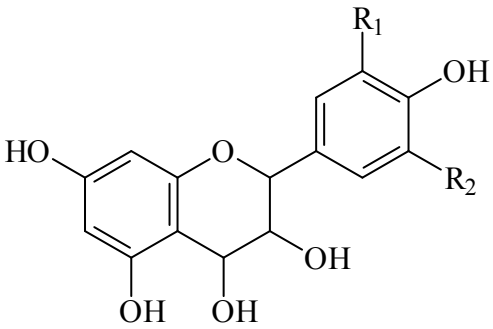


Pelargonidin: R_1=R_2=H
Siyanidin: R_1=OH, R_2=H
Delfinidin: R_1=R_2=OH

Kateşinler, flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olup doğada (+) – kateşin ve onun stereoizomeri olan (-) epikateşin olarak bulunurlar (Ganguly ve Seshado, 1958).



Kateşin: R_1=H, R_2=OH
Epikateşin: R_1=OH, R_2=H



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

Bitkilerin çeşitli dokularında mevcut bulunan fenolik bileşiklerin esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşturdukları kinonlar oldukça reaktif olup, ya diğer kinonlarla ya da aminoasitler, proteinler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi biyomoleküllerle renkli bileşikler oluşturlar. Bu fenolik bileşiklerin farklılığı, dokularda bulunma oranları ve bulundukları yer açısından kahverengi-kırmızı polimerik pigmentlerin renk şiddetleri de değişmektedir.

1.7. Polifenol Oksidazın İnhibisyonu

Meyvelerin olgunlaşması, depolanması ve işlenmesi esnasında enzimatik esmerleşmeden kaynaklanan ciddi ekonomik kayıplar meydana geldiği için, enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin işleme endüstrisinde oldukça önemli olup araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir (Lee ve Park, 2005). Gıda endüstrisinde PFO tarafından sebep olunan esmerleşme reaksiyonlarının ehemmiyetinden dolayı birçok bileşik potansiyel PFO inhibitörü olabilme açısından değerlendirilmiştir (Seo vd., 2003).

Esmerleşme reaksiyonlarının inhibe ettiği bilinen bileşikler sülfitler, askorbik asit ve türevleri, okzalik asit, sitrik asit ve tiyol bileşikleri olarak sıralanabilir (Altukaya ve Gökmen, 2008). PFO aktivite tayininde inhibitör olarak askorbik asit olarak kullanıldığında reaksiyon başlangıcında absorbanstaki değişim belli bir süre izlenememektedir. Bu lag periyodu olarak bilinmektedir. Bu süre sonunda hemen hemen bütün askorbik asit dehidroaskorbik aside dönüşmekte ve bu periyoda ulaşıldıktan sonra PFO tarafından üretilen *o*-kinon miktarı artar (Çolak vd., 2007).

Sülfitler, PFO'da çok kullanılan inhibitör olmasına rağmen meyve sebzelerin taze olarak pazara sunulması, satılması durumunda kullanımına izin verilmemektedir (FDA, 1996). Enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeyi önleyen sülfitler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder, ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici madde olarak rol oynar. Sülfit kullanımının avantajlarının yanında dezavantajları da vardır. Besinlerin yıkıcı özelliği, bitki ve meyvelerin doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir (Anonymous, 1991; McEvily vd., 1991).

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

PFO, prostetik grup olarak bakır ihtiva eden bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon, monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir (Laurila vd., 1998).

Bezoik asit ve sinamik asidi bazı türevleri elma, armut, kayısı, tatlı, kiraz ve patateslerden elde edilen enzimler üzerinde kompetitiv inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Ki değerleri, sinamik asit, *p*-kumarik asit, feruluk asit, m-kumarik asit, o-

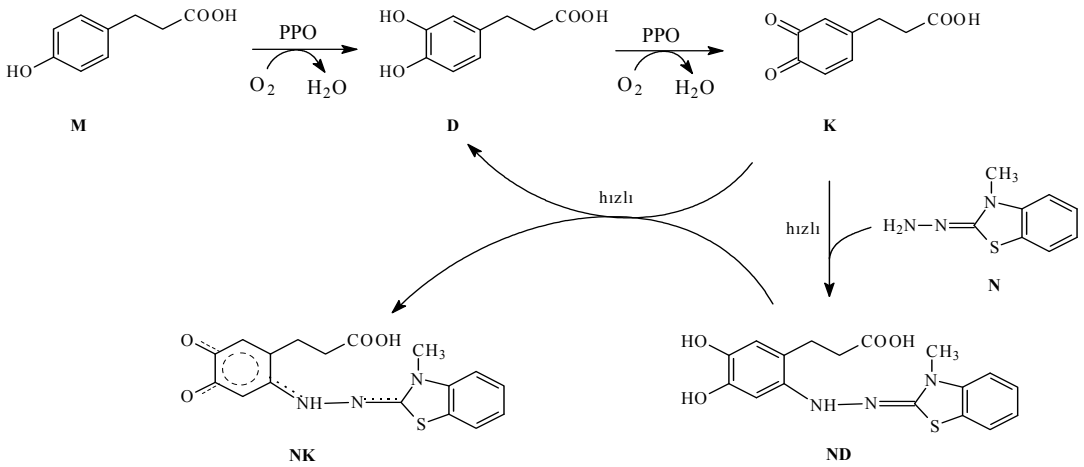
kumarik asit ve benzoik asit sırasıyla artış gösterirler. Aromatik asit inhibitörleri ya direkt benzen halkası üzerinde ya da konjüge poziyonda serbest bir karboksilik grup ihtiva etmeleri gereklidir. Düz zincirli asit inhibitörleri etki göstermeleri için, en az iki konjüge etilen grubuna sahip olmaları gereklidir. Metilasyon inhibisyon ve Ki değerlerinin daha düşük olduğu bulunmuştur. İnhibitörün benzen halkasının metilasyonu ya da hidroksilasyonu aktif bölgeyi yarışmalı olarak inhibisyona neden bulunmuştur (Soler-Mahnez et al. 1965).

Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PFO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkapto-2metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil- 2-merkaptoimidazol)'dür (Espin ve Wichers, 2001).

1.8. Enzim Aktivitesinin Tayin Metodları

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli monomerik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O_2, bir respirometre ile sistemin oksijen harcanması esasına göre manomerik olarak ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülebilir. Kronometrik yöntemle ise askorbik asidin varlığında reaksiyon sırasında rengin ilk göründüğü an tespit edilir. Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızının ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir.

PFO'un monofenolaz ve difenolaz aktivitesi 3-metil- 2- benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofilik varlığında, oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metod nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen *o*-kinonlarını esas alır. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşan *o*-kinon nükleofil ile katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm civarındaki karakteristik absorbsiyonlar ile belirlenir (Rodriguez-Lopez vd., 1994) (Reaksiyon 7).



Şekil 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)

Son yıllarda spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Böylece PFO aktivitesi daha doğru belirlenmesine olanak sağlayabilen substratlar tasarlanmış ve sentezlenerek difenolaz ve monofenolaz aktivitsenin doğrudan kantitatif olarak belirlenmektedir. Bunlardan biride, geleneksel substratlar yerine bunlardan yapısal olarak benzeyen diazo-türevleri olan substraların kullanılmasıyla sağlanmış olur (Haghbeen ve Tan, 2003). Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromotografi yöntemleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen bu yöntemler ve uzmanlığı gerektirdiği için yaygın olarak kullanılmazlar.

1.9. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Gelişmekte olan teknolojiyle birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgide artmaktadır. Gıda, sağlık, tekstil gibi alanlarda artan talebi karşılamak amacıyla daha hızlı, az enerji maliyetli, çevreye daha az zarar verebilen yöntemler tercih edilmektedir. Klasik kimyasal yöntemler spesifik olamaması, veriminin düşük olması ve çevreye daha çok atık vermesinden dolayı tercih edilmemektedir. Bu yüzden bu klasik yöntemlerinin artık günümüzde enzim katalizli reaksiyonlar almaktadır. Canlı sistemler tarafından metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran biyolijik katalizör olan enzimler, oldukça spesifik

reaksiyonları 10^8- 10^{20} kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünleri oluştururlar. Bu şekilde elde edilen ürünler klasik yöntemler göre daha kısa sürede sentezlenir.

Günümüzde talebe bağlı olarak üreticiler raf ömrü uzun ve göze hoş görünen meyvelerin üretimi tercih etmektedirler. Bu özellikleri sağlayan meyvelerinde üretimi genelde gen translasyonu ve hormon takviyesiyle gerçekleştirebilmektedir. Bu tür müdahaleler meyvelerin sağlık açısından sağlayacağı bazı faydalı yanlarını azaltmaktadır. Oysaki meyveler sağlık açısından oldukça önemli besinlerdir besinlerin sağlıklı bir şekilde korunması ve raf ömrünün uzatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyeceklerin sentetik yoldan elde edilmiş kimyasallarla ya da farklı yöntemlerle korunması sonucu gıdalarda tat ve besin değeri kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Bu türden oluşumlar da insan sağlığını tehdit ettiğinden bu konularda çevre ve sağlık örgütleri tarafından hassasiyet gösterilmekte ve pek çok gelişmiş ülkede enzimlerle elde edilen yeni ürünlerin ya da bilinen ürünlerin yeniden modifiye edilmesi çalışmalarına hız verilmektedir.

Bu çalışmada Doğu Karadeniz bölgesinin Trabzon'un Yomra ilçesinde doğal olarak yetişemkte olan Yomra Elması özütüdeki *(Malus Slyvestris*) karamaya sebep olan PFO enziminin değişik substratlar varlığında kinetik çalışmaları ve yaygın olarak bilinen inhibitörler varlığında inhibisyon çalışması yapılması amaçlanmıştır. İlk kez yapılan bu çalışma sonucu Yomra elmasının potansiyel PFO kaynağı olup olmadığı irdelenmiş olacaktır. Bu türdeki çalışmalarla beraber meyvedeki doğal türlerimizde gıda ve ilaç endüstrisine kazandıırlması sağlanabilir. Böylelikle yöre halkına ve ülke eknomisine katkı sağlanabileceği amaçlanmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 1. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrofotometre	UV/VİS	Unicam
Soğutmalı santrifüj	Universal 320R	Hettich
Protein elektroforezi	P8DS	Owl Scientific
pH metre	Hana ph 213	Hanna
Blendar	Shaker Hand Blendar K- 1253	Arçelik
Soğutmalı İnkübatör	ES110	Nüve
Thermoblok	Mr Hei-Standard	Heidolph

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Firma
Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Triton X- 114, PMSF, EDTA ve $MgCl_2$	MP Biomedicals, Sigma
Protein Elektroforezinde Kullanılan N, N, N' N'- tetrametilen diamin(TEMED), Amonyum persülfat (APS), Akrilamid, N, N'- metilen bisakrilamid, Gliserol, Bromofenol Mavisi, Glisin, Commansie Brillant Blue R- 250	 Sigma, Fluka, Carlo Erbo
Substratlar	Sigma, Merck
İnhibitörler	Sigma

Tablo 2'nin devamı

Tampon Çözeltilerinde Kullanılan Sodyum Asetat, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Tris Bazı	Sigma, Merck
Lowry Protein Tayininde Kullanılan Sığır Serum Albumini(BSA), Na_2CO_3, $CuSO_4.5H_2O$, Na-K Tartarat ve Folin Reaktifi	Sigma, Merck
Çözücüler HCl, Asetik Asit ve Metanol	Merck

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

Tablo 3. Lowry protein tayininde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
Lowry A	0,1 N NaOH içinde %2(w/v) Na_2CO_3
Lowry B	% 1 (w/v) bakır sülfat ve %2 (w/v) sodyum potasyum tartarat (1:1)
Lowry C	50 ml Lowry A +1 ml Lowry B
Lowry D	1 hacim folin reaktifi: 1 hacim saf su

Tablo 4. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris- HCl)	36,3 g Tris bazı 150 ml saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 8,8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 ml'ye tamamlandı
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	24,2 g Tris bazı 150 ml saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 ml'ye tamamlandı
% 10 APS	1 g APS 5 ml saf suda çözüldü, hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
TEMED	Orijinal şişesinden kullanıldı
%30 Akrilamid/ Bisakrilamid: % 29 (w/v) Akrilamid + %1 (w/v) N,N'-metilen bisakrilamid	29 g akrilamid ve 1 g N,N'-metilen bisakrilamid 50 ml saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı

Tablo 4'ün devamı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 M Tris-HCl (pH 6,8) %0,1 Bromofenol mavisi % 20 Gliserol
Doğal Jel Yürütme Tamponu	500 ml'de 25 mM Tris bazı (1,5 g) 500 ml'de 250 mM Glisin (7,5 g) 450 ml saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH 8,3'e ayarlandı saf su ile hacmi 500 ml'ye tamamlandı
Boyama (Staining) Çözeltisi	1g Commasie brillant blue R- 250 100 ml Glasiyal asetik asit 300 ml Metanol 600 ml saf su
Boya Uzaklaştırma (Destaining) Çözeltisi	100 ml Glasiyal asetik asit 300 ml Metanol 600 ml Saf su
Substrat Boyama Çözeltisi (L- DOPA)	24 mM L-DOPA 100 ml saf suda hazırlandı

Tablo 5. Tampon çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
Sitrat-Fosfat Tamponu (50 mM pH 3,0)	2,81g sitrik asit ve 1,80 g NaH_2PO_4 450 ml saf suda çözülüp 1M HCl ile pH 3,0'a ayarlanıp hacim saf su ile 500 ml tamamlandı
Asetat Tamponu (50 mM pH 4,0- 5,0)	3,40 g sodyum asetat 450 ml saf suda çözülüp 1M asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı
Fosfat Tamponu (50 mM pH 6,0- 7,0)	3,55 g Na_2PO_4 450 ml saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı
Tris-HCl Tamponu (50 mM pH 8,0- 9,0)	3,02 g Tris bazı 450 ml saf suda çözlüp 1M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf suyla 500 ml'ye tamamlandı

Tablo 6. Substrat çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
100 mM 4-Metil Katekol	0,124 g 4-metil katekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
100 mM Katekol	0,11 g katekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
100 mM MHPPA (3-(3,4-hidroksifenil) propiyonik asit)	0,182 g MHPPA az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
100 mM L-Tirosin	0,181 g L-Tirosin az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı

Tablo 7. İnhibitör çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
10 mM Askorbik Asit	0,0177 g askorbik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
10 mM Sodyummetabisülfit	0,0199 g $Na_2S_2O_5$ saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
80 mM Bezoik Asit	0,098 g benzoik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
100 mM Sodyum Azid	0,065 g NaN_3 az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı

Tablo 8. Çalışmada kullanılan diğer çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik /Hazırlanışı
10 mM MBTH	0,022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı
Ekstraksiyon çözeltisi	80 ml 50 mM pH 5,5 asetat tamponu, % 6 (w/v) TX- 114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF ilavesiyle ve tampon çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı

2.2. Ham Ekstrağın Hazırlanması

Trabzon'un Yomra ilçesinden toplanan elma meyveleri sıvı azot içerisinde laboratuara kadar ulaştırıldıktan sonra sonra 50 g'ı dewar içersindeki sıvı azot ile 20 dakika ozmotik şoka tabii tutuldu. Ozmotik şoka tabii tutulan meyveler, 4 °C 'de el blendırı yardımıyla 100 ml ekstraksiyon çözeltisi ilavesiyle 15 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 katlı tülbentten süzüldü. Elde 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 amacı 1mM PMSF ilave edildi. Elde edilen bu ekstraktaki PFO aktivitesi bir ay süre ile aktivitsini koruyabilmektedir.

2.3. Protein Tayini

Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı (Lowry, 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albumin çözeltisi kalibrasyon grafiği için hazırlandı. Protein tayini için şu işlemler yapıldı:

1. BSA standartları, kör, protein içeren ekstrak, 5'er ml Lowry C belirteci ile karıştırıldı.
2. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
3. 0,5 ml Lowry D belirteci hızla tüplere eklendi ve vortekslendi.
4. Tüpler 30 dakika karanlıkda bekletildi.
5. 650 nm'de absorbanslar ölçüldü.
6. BSA standartları ile kalibrasyon grafiği çizildi.
7. Kalibrasyon grafiği yardımıyla ekstrakların protein içerikleri tayin edildi.

2.4. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Enzim ekstraktı PFO'nun varlığında, SDS'siz ve soğuk ortamda gerçekleştirilen doğal jel elektroforezi yapılarak, hem substrat hem de coomasie brillant blue R- 250 boyamayla ortaya koyuldu. Doğal elektroforez işlemi için kullanılan %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli Tablo 4'teki gibi hazırlandı.

Tablo 9. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli(%12)	Yükleme Jeli(%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	-	0,63 ml
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	5,0 ml	-
% 30 Akrilamid/ Bisakrilamid	8,0 ml	0,83 ml
Saf su	6,8 ml	3,45 ml
% 10 APS	0,2 ml	0,05 ml
TEMED	0,008 ml	0,005 ml

Elektroforez cam plakalar saf ve etil alkol ile iyice yıkandıktan ve kurutulduktan sonra, cam plakalar arası boşluk oluşturabilmek için plastik aparatı yerleştirildi ve cam plaklar kıskaçlarla tutturuldu. Tablo 4'te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli, plaklar arasına üst yüzeyde 3–4 cm kalana kadar bir mikropipet yardımıyla hiçbir hava boşluğu olmayacak şekilde doldurulduldu. Jel yüzeyin kurumaması ve düzgün olması için, jel yüzeyine saf su koyuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan koyulan saf su boşaltılıp ve üst yüzeye Tablo 4'te belirtilen yükleme jeli ile tamamen doldurularak tarak hemen yükleme jeline dikkatlice yerleştirildi. Jel donduktan sonra tarak çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Tank doğal elektroforez yürütme tamponuyla dolduruldu. Doğal elketroforez yükleme boyası ile karıştırılan ve 15–20 μg protein içeren örnekler, jelin her iki tarafına karşılıklı olarak şekilde Hamilton şırıngasıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan mavi boya renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar 15 mA'de, yükleme jelinden çıkıp ayırma jeline girdiğinde, akım 25 mA'e artırıldı ve işlem sonuna kadar bu akımda devam ettirildi. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sisteminden dikkatlice çıkartıldı ve boyama işlemine geçildi.

2.5. Substrat ve Coomassie Brillant Blue R- 250 Boyanması

Doğal elektroforez sonucu sisteminden çıkartılan jel ikiye bölündü. Jelin bir tarafı substrat boyama çözeltisi (4- metil katekol) diğer tarafı da Coomasie Brillant Blue R- 250 boyama çözeltisi içerisinde hafifçe çalkalanarak 2 saat bekletildi. Protein bantlarının daha iyi görünmesi için coomasie brillant blue R- 250 boyama çözeltisi ile boyanan jel %30 metanol, %10 asetik asit karışımıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yaklaşık 3–4 saat

muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntülüme cihazında kaydedildi.

2.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini

Çeşitli substratlar varlığında spektrofotometrik yöntemlerle PFO aktivite ölçümleri yapıldı (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 edilerek 500 nm'deki absorbans değerleri tespit edildi. Tablo 3'deki tamponlar kullanıldı. Tampon olarak 50 mM pH: 3,0; 50 mM Asetat pH: 4,0- 5,0; 50 mM fosfat pH:6,0- 7,0; 50 mM Tris pH: 8,0- 9,0 tamponlar kullanıldı. 1- 32 mM substrat konsatrasyonlarında çalışıldı. Absorbansdaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi.

L-Dopa, MHPPA, 4-metil katekol, katekol, L-Tirozin substratları ve MBTH nükleofil kromojeni kullanılarak gerçekleştirilen aktivite deneylerinde verilen her bir substratın maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki molar absorplama katsayıları kullanılarak analiz edildi.

2.7. Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Optimum pH çalışması; 4-meil katekol, katekol, L-Dopa, MHPPA, L-Tirozin substratları varlığında pH 4,0- 9,0 arasındaki değerlere sahip uygun tamponlarda oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bu substratlarla enzimin substrata doyduğu noktalarda uygun tampon çözeltilerde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Optimum sıcaklık değerleri yine aynı substratlarda yapıldı. Substratların optimum pH değerlerinde PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10 ˚C'lik artışlarla 0- 80 ˚C aralığında incelendi. İstenilen sıcaklıklar oda sıcaklığının altında olanlar soğutmalı inkübatörde, oda sıcaklığının üzerinde olanlar ise Thermoblok'ta ayaralandı. PFO aktivitesi, karışıma tampon, MBTH, DMF ve enzim çözeltisi ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir şekilde aktivite ölçümleri yapıldı (Dinçer vd., 2003).

2.8. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi

Meyve ekstraklarındaki PFO'ın çeşitli substratlara karşı davranışını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda katekol, 4-metil katekol, L-Tirozin, MHPPA, L-Dopa substratları için 1- 32 mM konsantrasyonlarında değiştirilerek PFO aktivitesi 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. 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) ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilerek enzimin substrat ile doyuma ulaştığı 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 belirlendi.

PFO için çok yaygın olarak bilinen dört genel inhibitör kullanılmıştır. İnhibitörlerin PFO aktivitesine etkisi ve enzimin bu maddelere karşı davranışı yine inhibitör yokluğunda ve varlığında benzer denemeler yapılmış ve ondan 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

Bu çalışmada yomra elması (*Malus sylvestris*) meyvesindeki esmerleşme reaksiyonlarda rol oynayan polifenol oksidazın (PFO) enziminin karakterizasyon çalışması ilk kez çalışıldı. Sulu ortamda hazırlana ham ekstrakların monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri olmak üzere iki farklı enzim enzim aktivitesine karşı L-Dopa, 4MK, Katekol, MHPPA ve L-Tirozin substratlara karşı karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Enzimin optimum substrat konsantaryonları, pH, sıcaklık ve çeşitli inhibitörlere karşı inhibisyon değerleri tespit edildi.

3.1. Uygun Ekstraksiyon Çözeltisinin Belirlenmesi

4,5-8,5 pH aralığındaki tamponlarla yapılan Yomra Elması özütlerinde 4-MK substratı (10 mM) varlığında PFO aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda PFO aktivitesi pH 4.5'da 14.9, pH 5.5'da 22.1, pH 6.5'da 17.9, pH 7.5'da 3.7 ve pH 8.5'da 3.3 M/dak olarak belirlendi. En yüksek aktivitenin gözlendiği pH 5.5 tamponlu ekstraksiyon çözeltisi özüt hazırlama işlemlerinde kullanılmasına karar verildi.

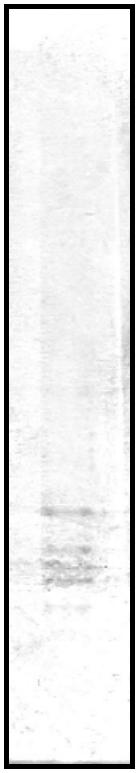
3.2. Protein Tayini ve Doğal Elektroforeze Ait Bulgular

En yüksek PFO aktivitesini gösteren ekstraksiyon çözeltisiyle hazırlanan ham ekstraktan elde edilen süpernattın protein içeriği Lowry metoduna göre tayin edildi. Bunun için değişik bovine serum albumin (BSA) konsantrasyonlarına karşı 650 nm de ölçülen absorbans değerlerine göre bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Grafiğin doğru denkleminden yararlanılarak enzim ekstrağın çözünen protein miktarı ortalama 1,0 mg/mL olarak hesaplandı.

Optimum bir enzim aktivitesi sağlayacak protein içeriğinin belirlenmesi için 10-200 l lik ham enzim ekstrakları 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 kinetik deneylerde kullanılacak enzim ekstrağındaki protein miktarı 50 g (50 L) olarak belirlendi.

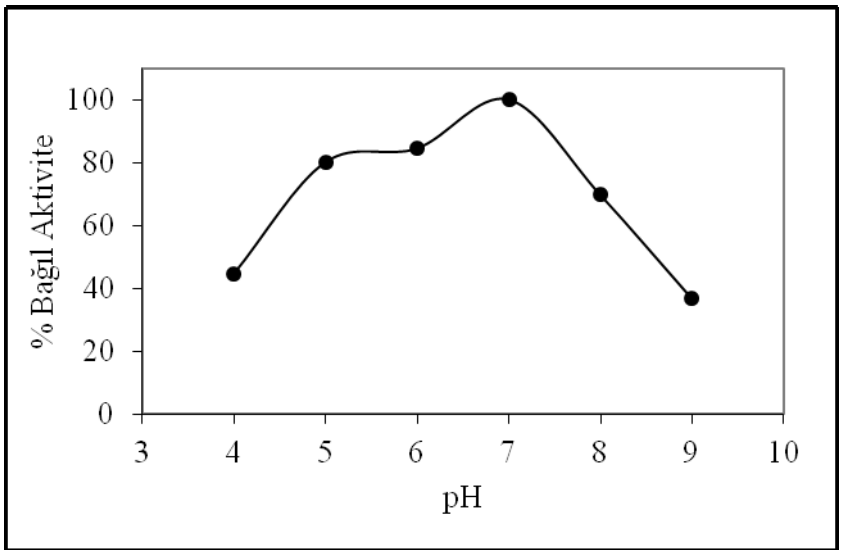
Yapılan doğal poliakrilamid jel elektroforezinden elde edilen jel, L-DOPA ile boyanmasından sonra Yomra Elması elde edilen özütte PFO'nun dört farklı izoenzim bandı olduğu belirlendi (Şekil 8).



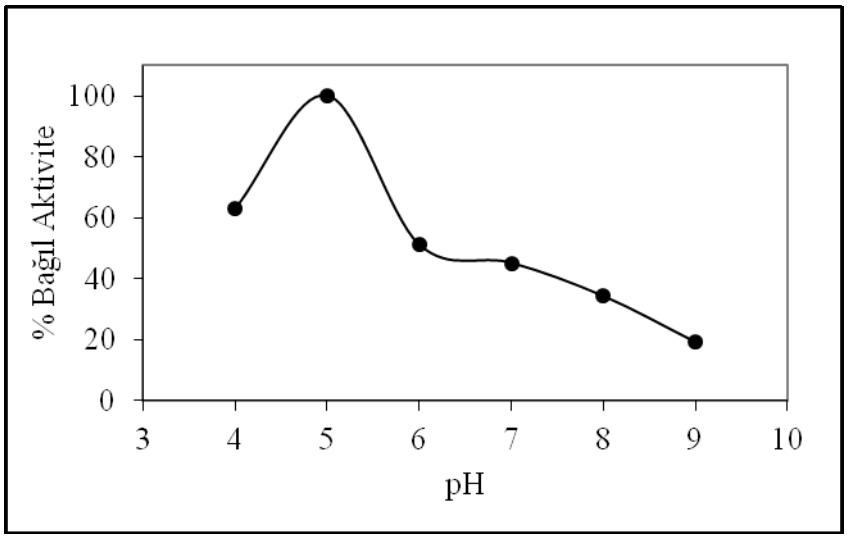
Şekil 8. Yomra Elması PFO'nun doğal poliakrilamid jel elektroforezi

3.3. Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

PFO'nun 3-(4-hidroksifenil) propiyonik asit ve L-Tirozin substratları varlığında en yüksek monofenolaz aktivitesini gösterdiği pH değerini belirlemek için pH 4,0- 9,0 değerleri arasında hazırlanan tamponlar kullanıldı. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiğinden enzimin en yüksek monofenolaz aktivitesini, MHPPA substratı için pH 7,0'de, L-Tirozin substratı için pH 5,0'de gösterdiği tespit edildi (Şekil 9, 10).



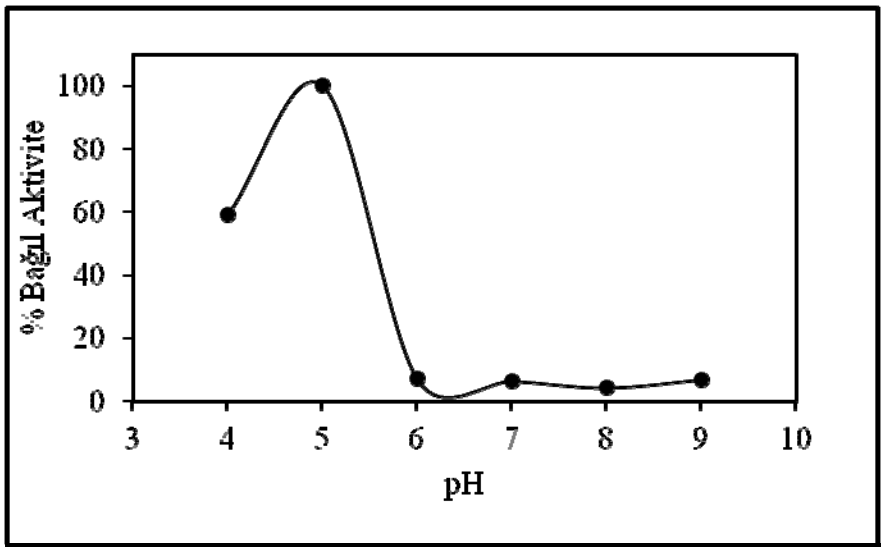
Şekil 9. MHPPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi



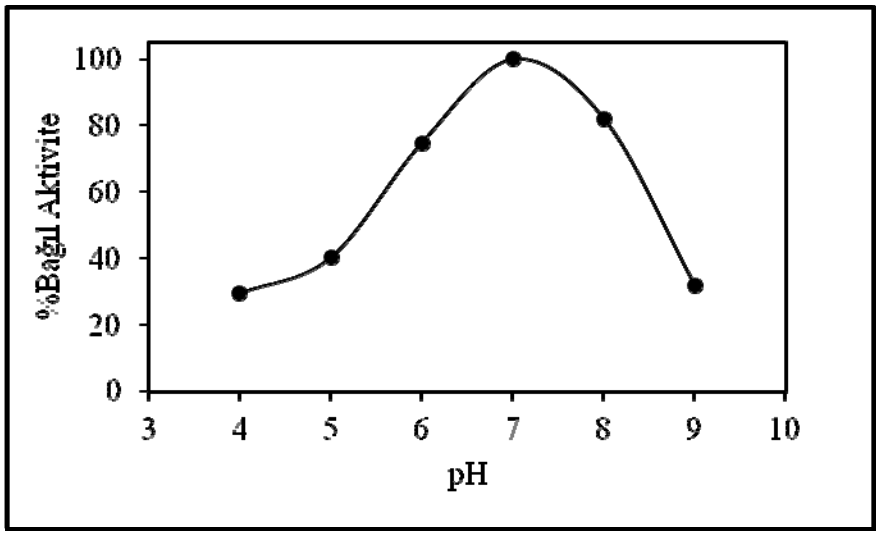
Şekil 10. L-Tirozin substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

PFO'un difenolaz aktivitesinin katekol, 4-metil katekol, L-dopa gibi fenolik substratların varlığında tespit edildi. Elma meyvesinden hazırlanan bu ekstrakta mevcut olan PFO tüm denenen fenolik substratlar üzerinde oldukça yüksek aktiviteler göstermiştir.

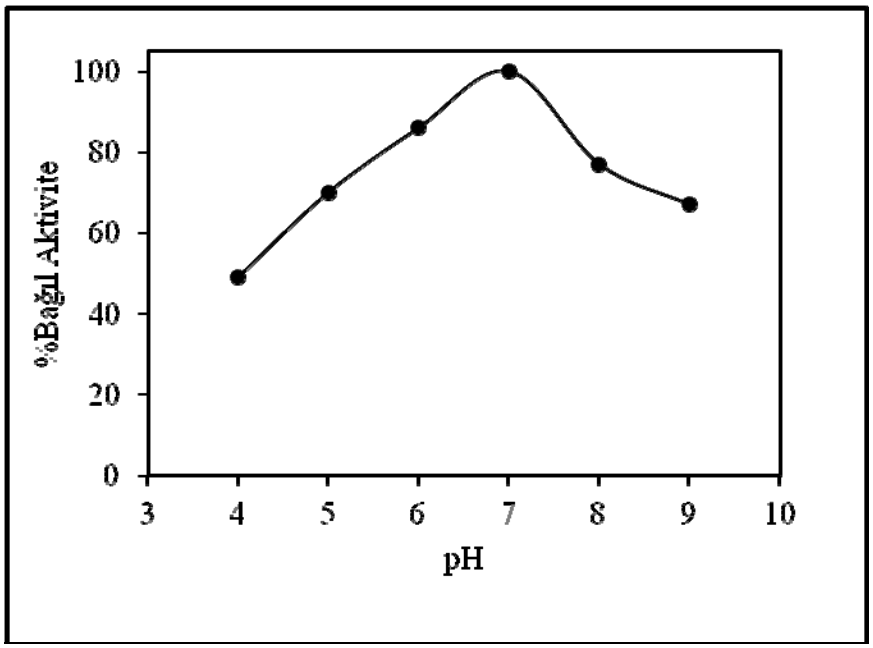
Fenolik özelliğine sahip olan substratların, ortamın pH'ına bağlı olarak enzim aktif bölgesine karşı davranışı ve enzim-substrat etkileşimi farklılık göstermiştir. Difenolaz aktivitesi katekol substrat substratıyla en yüksek aktiviteyi pH 5,0'da gösterirken, L-dopa ve 4-metil katekol substratlarıyla pH 7,0'da gösterdiği tespit edildi (Şekil 11, 12 ve 13).



Şekil 11. Katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi



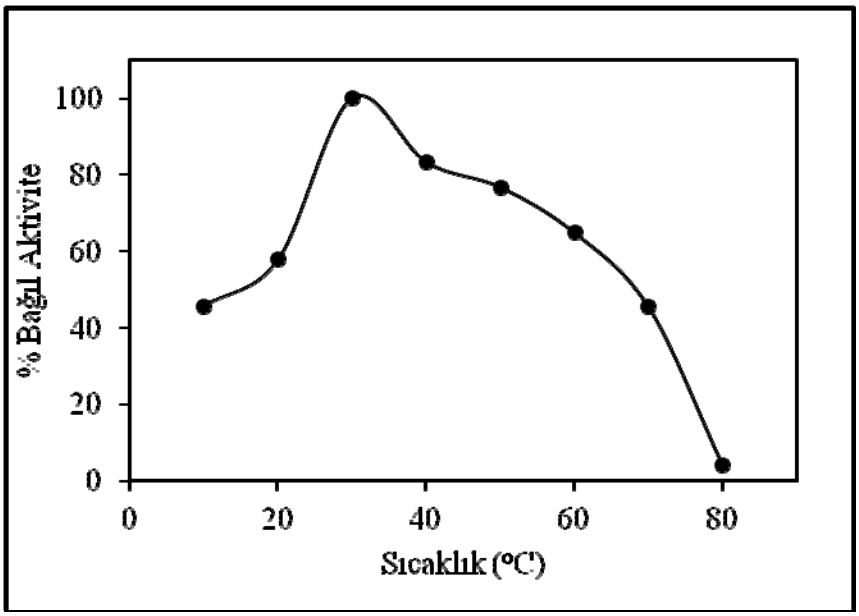
Şekil 12. 4-metil katekol substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi



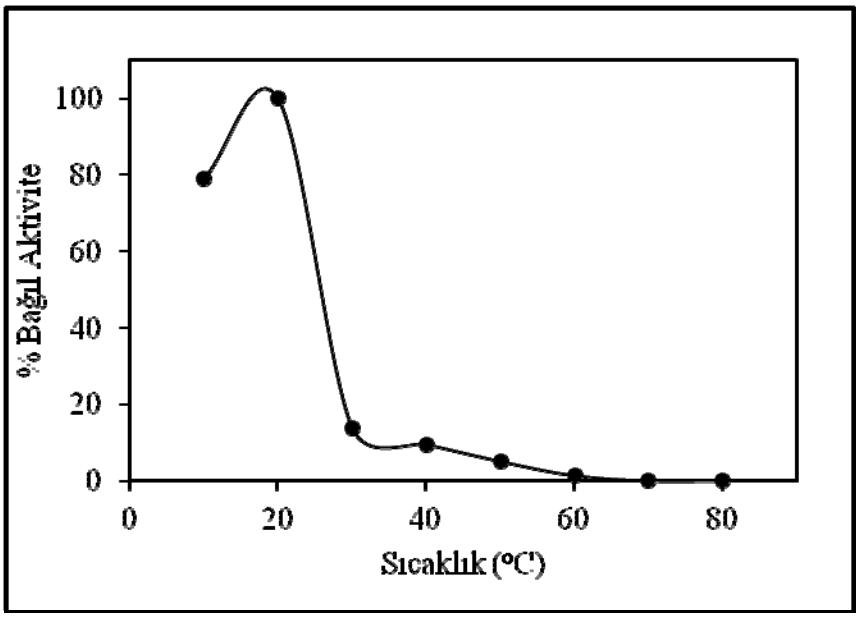
Şekil 13. L-DOPA substratı varlığında pH-PFO aktivitesi ilişkisi

3.4. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

PFO aktitivitesinin sıcaklık üzerine etkisini incelemek üzere 10- 80 ˚C aralığında 10˚C'lik artışlarla PFO aktivitesinin değişimi ve maksimum aktivitenin sağlandığı optimum sıcaklık değerleri belirlendi (Tablo 10). MHPPA ve L-tirozin substratlar varlığında PFO'nun monofenolaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklıklar sırasıyla 30 ve 20 ˚C olarak belirlendi. 40˚C ve üzerinde ise enzim aktivitesini giderek azaldığı ve 70˚C'de enzim aktivitesini kaybettiği belirlendi (Şekil 14 ve 15).

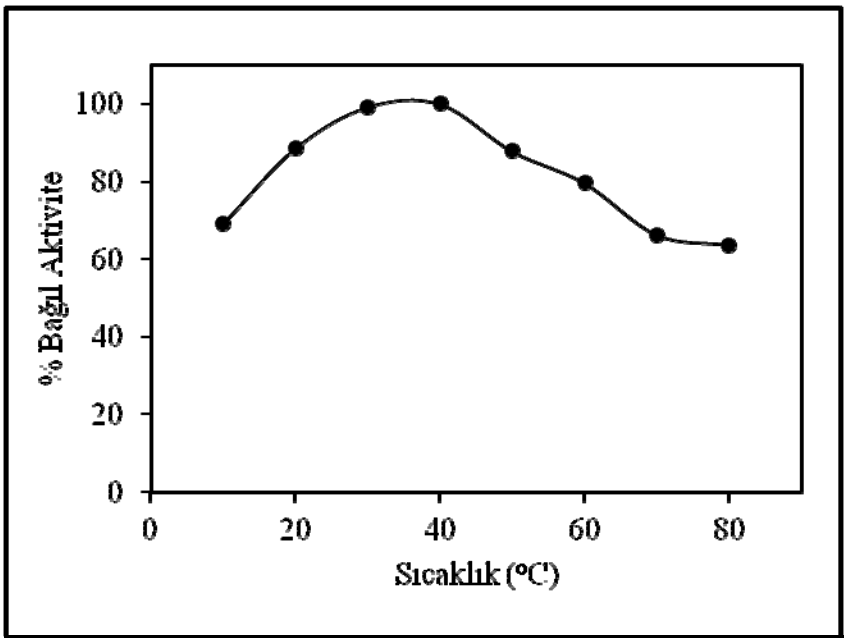


Şekil 14. MHPPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

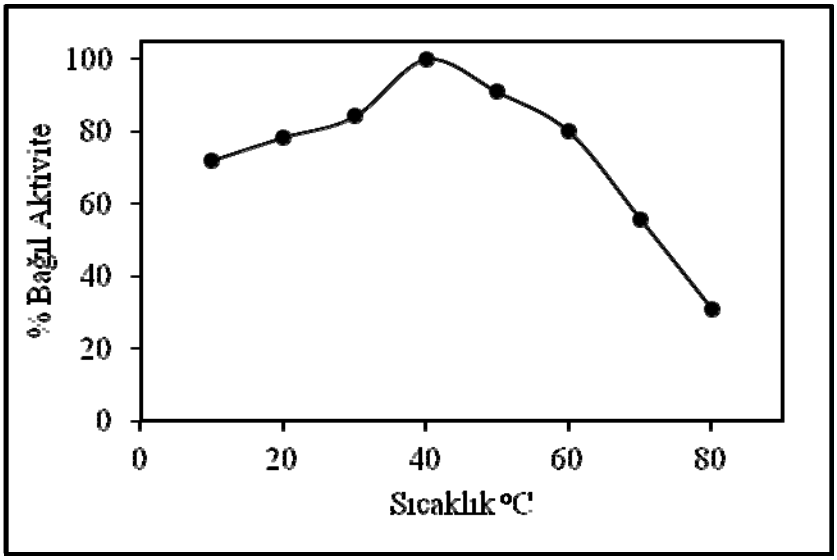


Şekil 15. L-Tirozin substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

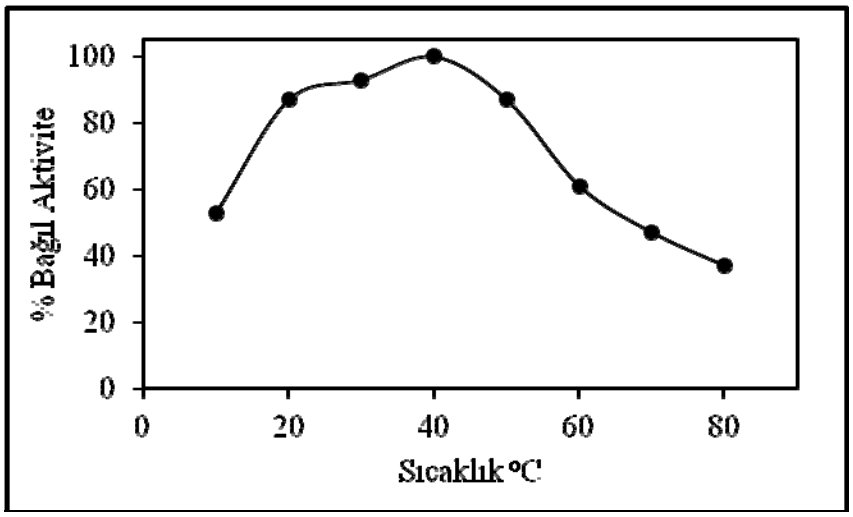
PFO'un difenolaz aktivitesi 4-metil katekol, katekol, L-dopa fenolik substratları varlığında araştırıldı. Sıcaklık değerlerini belirlemek üzere 10-80 ˚C aralığında 10 ˚C artışlarla enzim aktivitesi ölçülerek sıcaklık-% bağıl aktivite grafikleri çizildi (Şekil 16, 17ve 18). PFO en yüksek difenolaz aktivitesini katekol ve 4- metil katekol ve L-dopa substratları varlığında 40˚C'de gösterdiği tespit edildi.



Şekil 16. Katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi



Şekil 17. 4- metil katekol substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi



Şekil 18. L-DOPA substratı varlığında sıcaklık-PFO aktivitesi ilişkisi

Tablo 10. Sustratların PFO ile olan reaksiyonların optimizasyonu

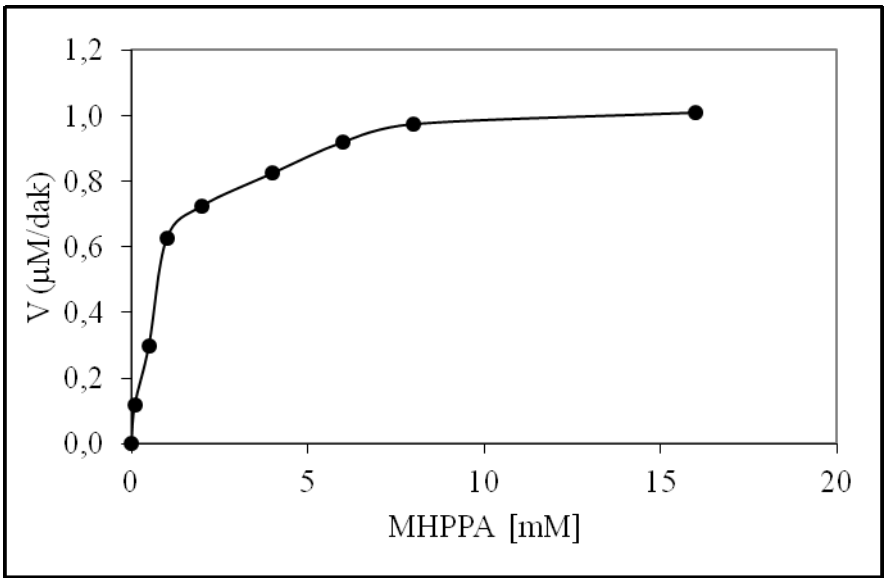
Substratlar	$_{maks}$ (nm)[a]	pH	Sıcaklık°C
4-metil katekol	494	7	40
Katekol	500	5	40
MHPPA	500	7	30
Dopa	500	7	40
L-tirozin	500	5	20

3.5. Yomra Elması PFO'su ile İlgili Kinetik Veriler

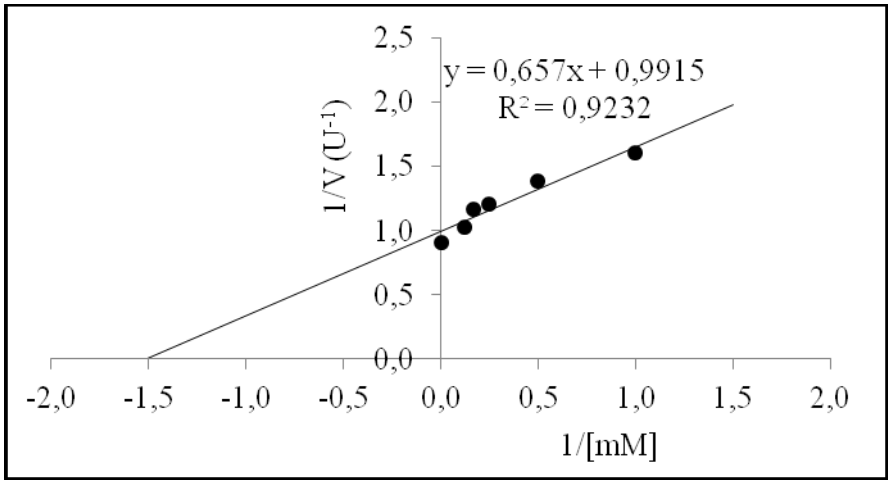
3.5.1. Monofenolaz Aktivitesi ile İlgili Kinetik Veriler

Yomra Elması PFO'suna ait kinetik verilerinin belirlenmesi amacıyla, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0-16 mM aralığında değişen substrat varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis- Menten eğrisi çizildi. Etkin bir enzim aktivitesi gösterebilmesi MHPPA kosantrasyonunun 6 mM olması gerektiği belirlendi (Şekil 19). L-tirozin varlığında ise 6 mM substart konsantrasyonuna kadar hemen hemen enzim kinetiğine

uygun olarak doğrusal bir artış göstermiş 8 mM konsatrasyonunun yukarısında ki değerlerde ise PFO bu substrat ile doyuma ulaştı (Şekil 20).

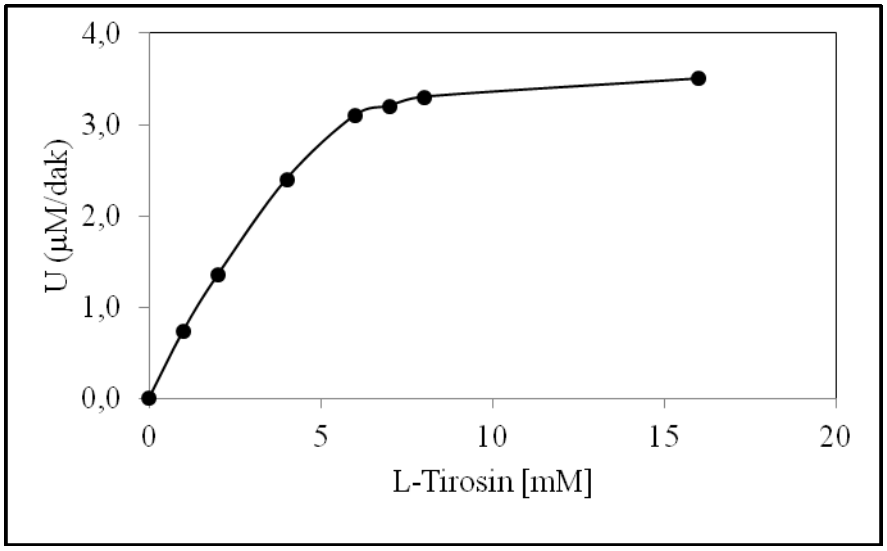


Şekil 19. MHPPA substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği



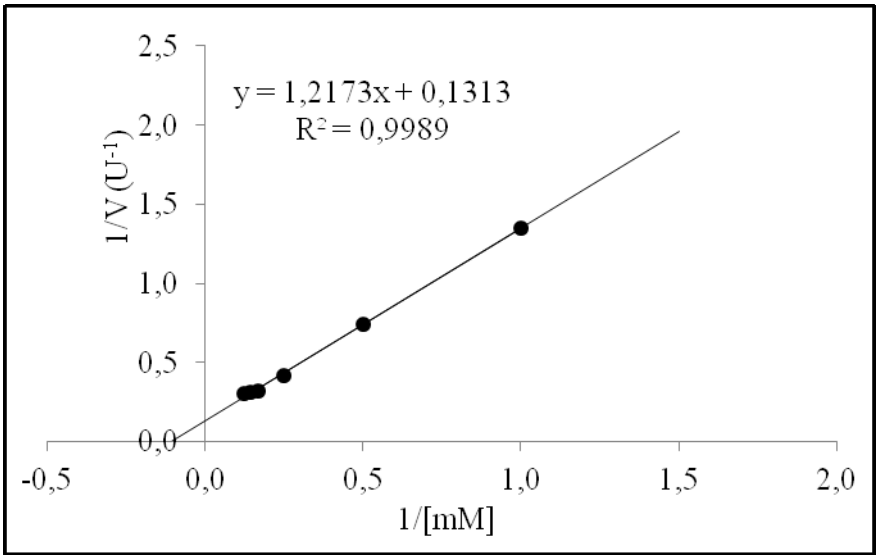
Şekil 20. MHPPA substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

MHPPA monofenol substratı için çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden elde edilen doğru denklemi sonucunda K_m değeri 0,7 mM, V_{maks} değeri de 1,0 M/dak olarak hesaplandı (Şekil 21).



Şekil 21. L-Tirosin substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği

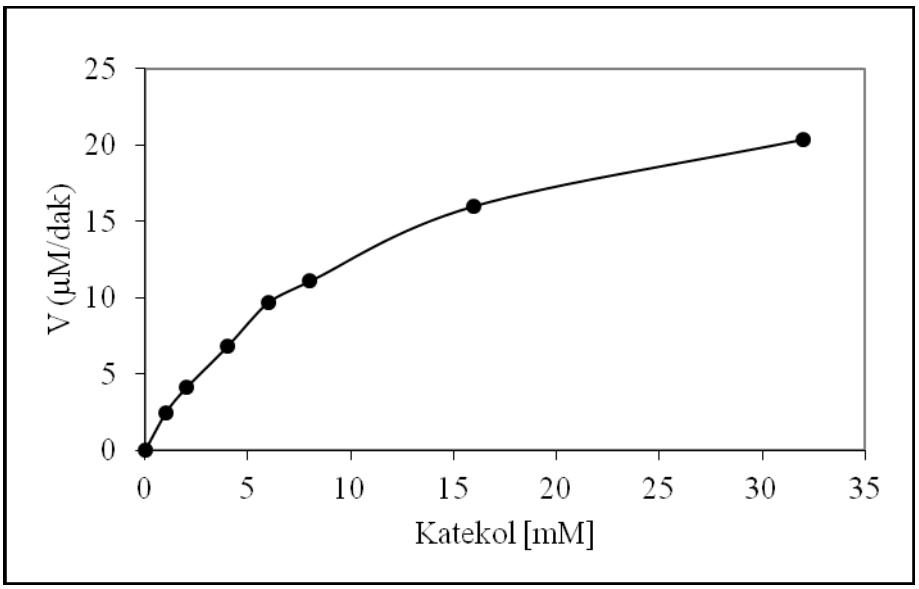
L-tirozin substratı için çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden elde edilen doğru denklemi sonucunda K_m değeri 9,3 mM, V_{maks} değeri de 7,6 M/dak olarak belirlendi (Şekil 22).



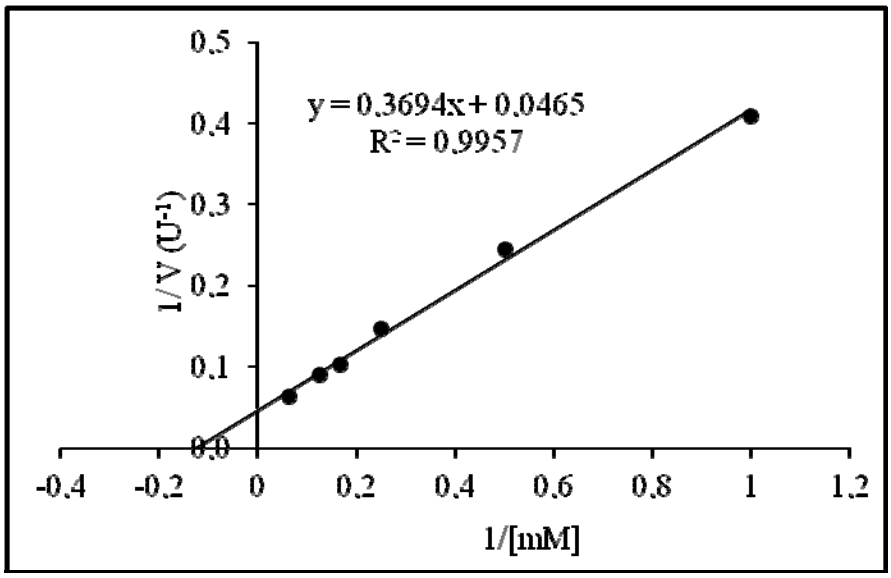
Şekil 22. L-Tirosin substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

3.5.2. Difenolaz Aktivitesi ile İlgili Kinetik Veriler

Yomra Elması PFO'ın difenolaz aktivitesine ait kinetik verilerinin belirlenmesi amacıyla, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0- 32 mM aralığında değişen substrat varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrisi çizildi. Etkin bir enzim aktivitesi gösterebilmesi katekol kosantrasyonunun 16 mM olması gerektiği belirlenmiştir (Şekil 23). 4-metil katekol varlığında ise 20 mM substrat konsantrasyonuna kadar hemen hemen enzim kinetiğine uygun olarak doğrusal bir artış gösterdi, 24 mM konsantrasyonunun yukarısındaki değerlerde ise PFO bu substrat ile doyuma ulaşmıştı (Şekil 26). L-Dopa substratı ise 15 mM'a doğrusal bir artış göstermiş ve PFO 16 mM L-DOPA konsatrasyonundan sonra doyuma ulaşılmıştı (Şekil 27).

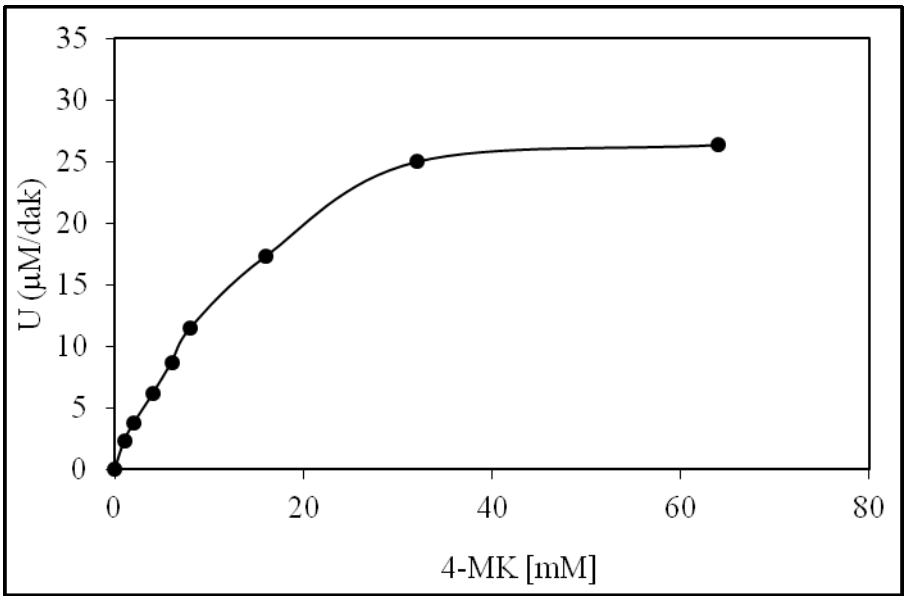


Şekil 23. Katekol substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği

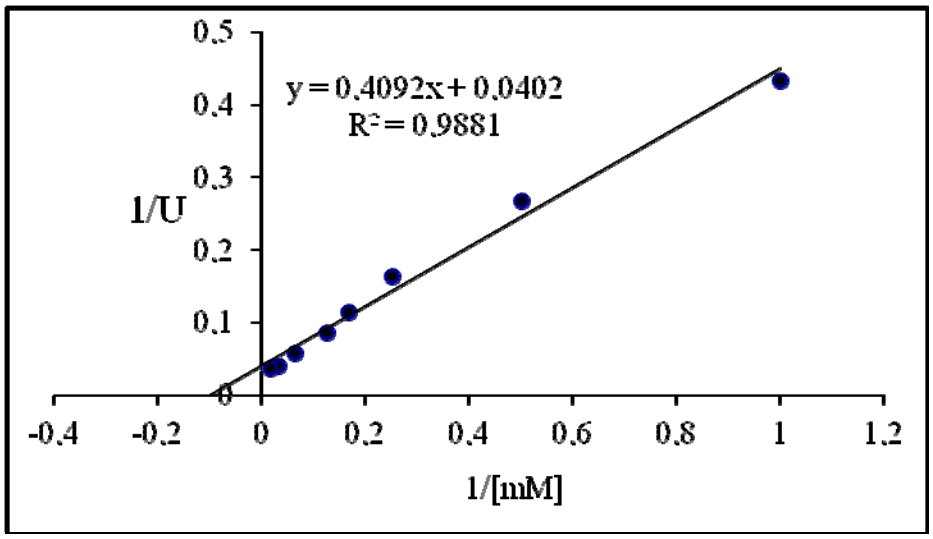


Şekil 24. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

Katekol substratı varlığında PFO'un çizilen Lineaweaver-Burk grafiği elde edilen doğrunun denkleminden hesaplanan V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 21,5 ve 7,9 olarak belirlendi (Şekil 24) (Tablo 6).

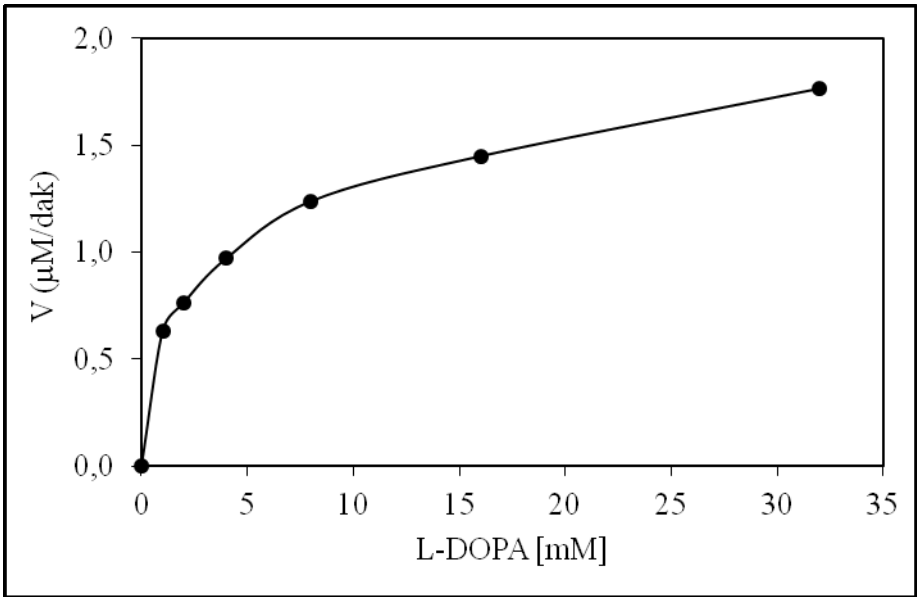


Şekil 25. 4-metil katekol substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği

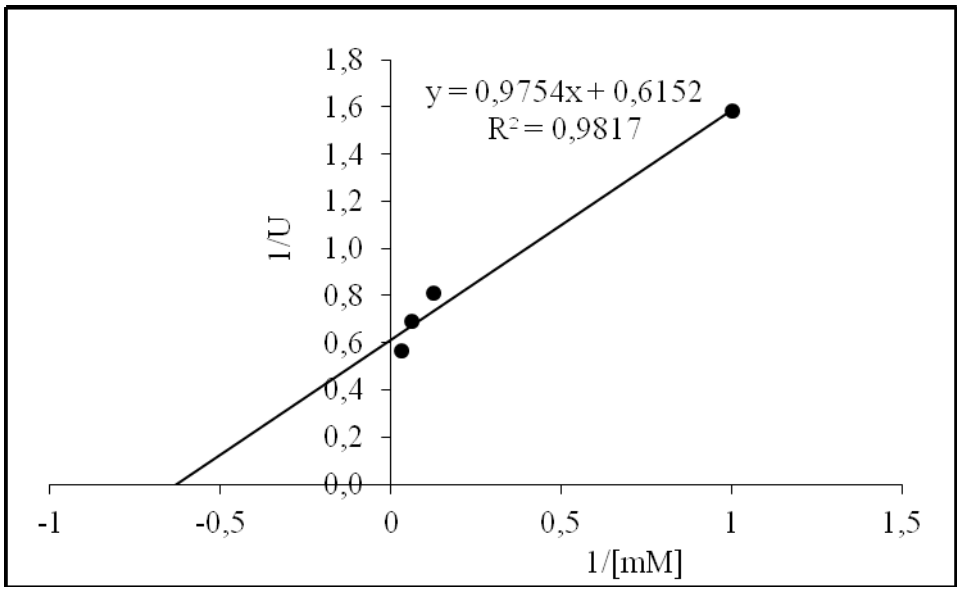


Şekil 26. 4-metil katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

4-Metil katekol substratı varlığında PFO'un çizilen Lineaweaver-Burk grafiği elde edilen doğrunun denkleminden V_{maks} 28,4 ve K_m 10,1 olarak hesaplandı (Şekil 26) (Tablo 6).



Şekil 27. L-DOPA substratı varlığında PFO ın substrat-satürasyon grafiği



Şekil 28. L-DOPA varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

L-DOPA substratı varlığında PFO'un çizilen Lineaweaver-Burk grafiği elde edilen doğrunun denkleminden hesaplanan V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 1,6 ve 2,5 olarak tespit edildi (Şekil 28) (Tablo 11).

Tablo 11. Polifenol Oksidaz Aktivitesi İle İlgili Çeşitli Enzim Kinetiği Değerleri

Substrat	V_{maks} (μM/dak)	K_m (mM)	Vmaks/Km (dak^{-1})
4-metil katekol	24,8	10,1	2,5
Katekol	21,5	7,9	2,7
L-Dopa	1,6	2,5	0,6
MHPPA	1,0	0,7	1,4
L-tirozin	7,6	9,3	0,8

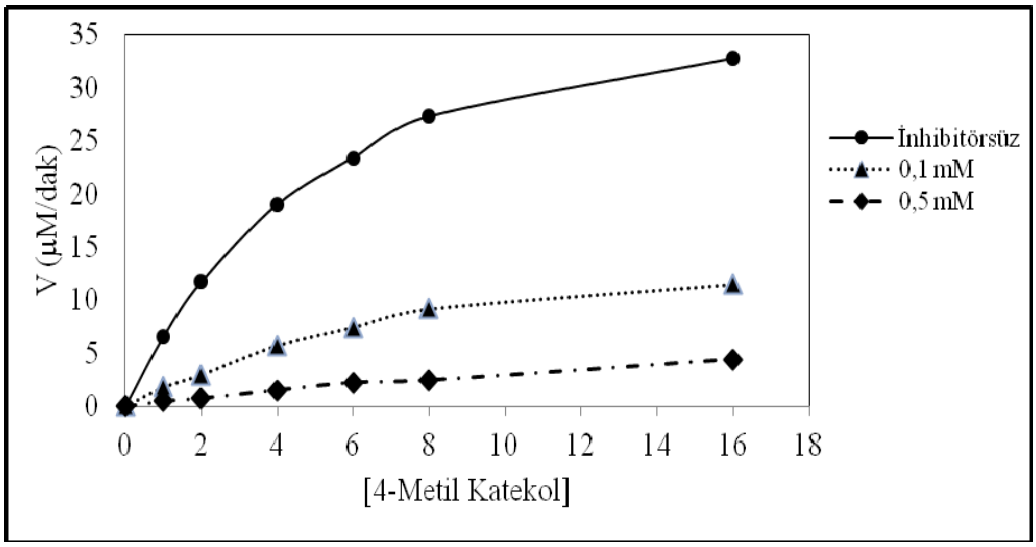
3.6. PFO İnhibisyon Kinetik Verileri

Çeşitli kaynaklardan izole edilen PFO'ların en önemli özelliklerinden biride çeşitli inhibitörlere karşı gösterdiği davranışlardır (Valero, 1991; Arslan, 1997). Bu amaçla diğer bitki PFO'leri için denenen PFO inhibitörleri olan, sodyum metabisülfit, askorbik asit, sodyum azid, benzoik asit elma PFO 'leri içinde denendi ve enzim aktivitesine karşı

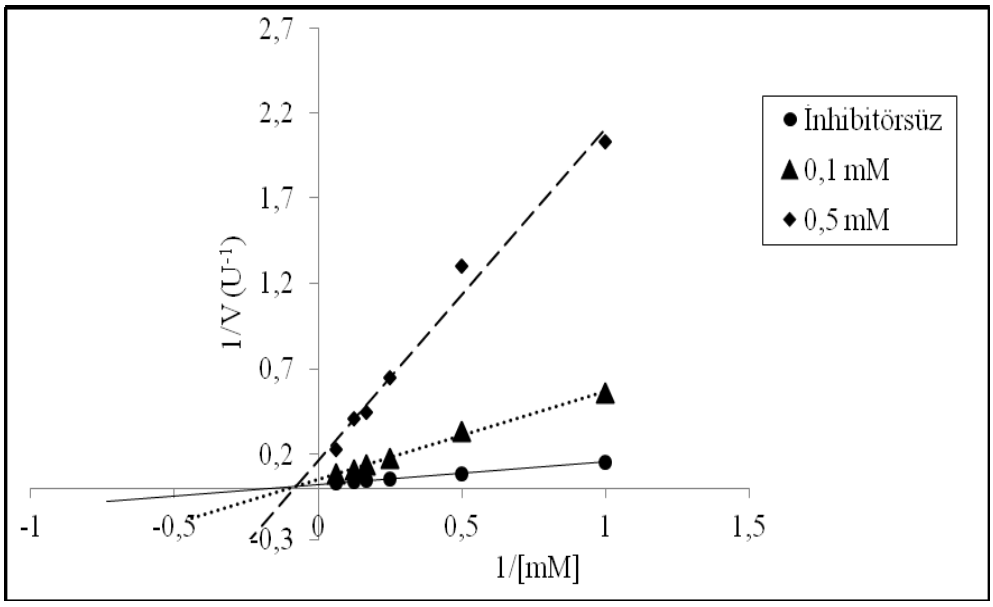
gösterdikleri inhibisyon türleri de belirlendi. İnhibisyon denemelerinden elde edilen sonuçlar elmada ki PFO aktivitesinin diğer PFO'dan elde edilen sonuçarlarla uyumlu olduğu ve denenen inhibitörlere oldukça duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 7).

3.6.1. PFO Sodyum metabisülfit İnhibisyonu

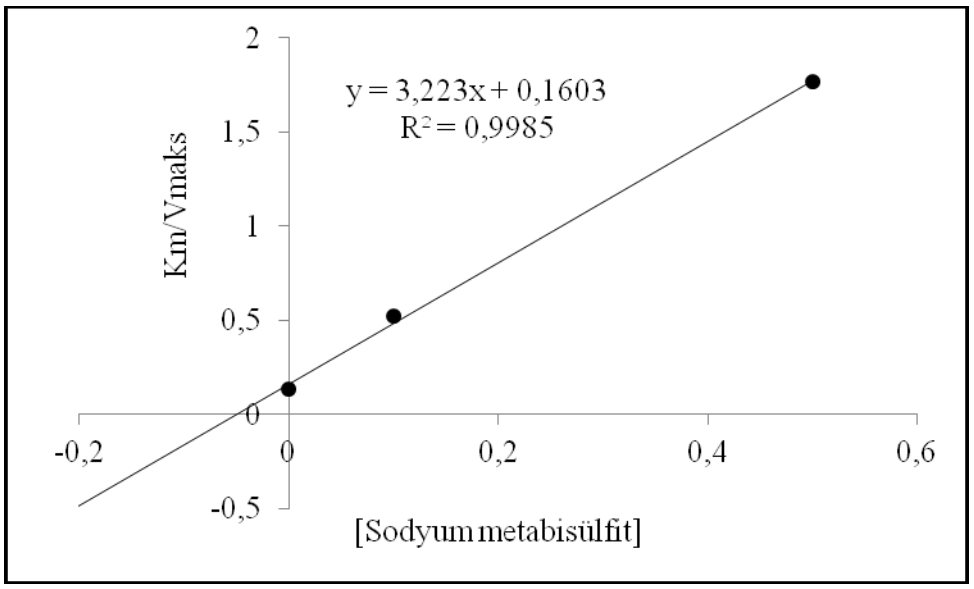
PFO aktivitesinin 4-metil katekol substratı ile sodyum metabisülfit inhibitörü varlığında inhibe olduğu ve K_m değerinin değişmediği, V_{maks} değerinde düşüş gözlendiği tespit edildi (Şekil 29 ve 30). Yarışmasız inhibisyon ikinicil grafiği yardımıyla K_i değeri 0,05 mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 31) (Tablo 7).



Şekil 29. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu



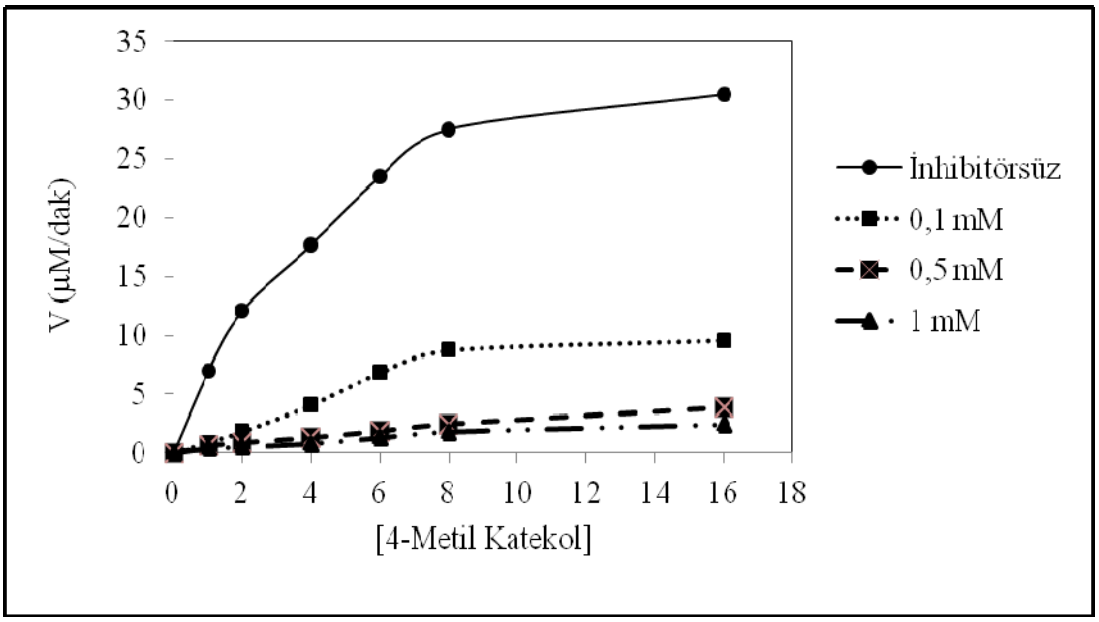
Şekil 30. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu Lineaweaver-Burk grafiği



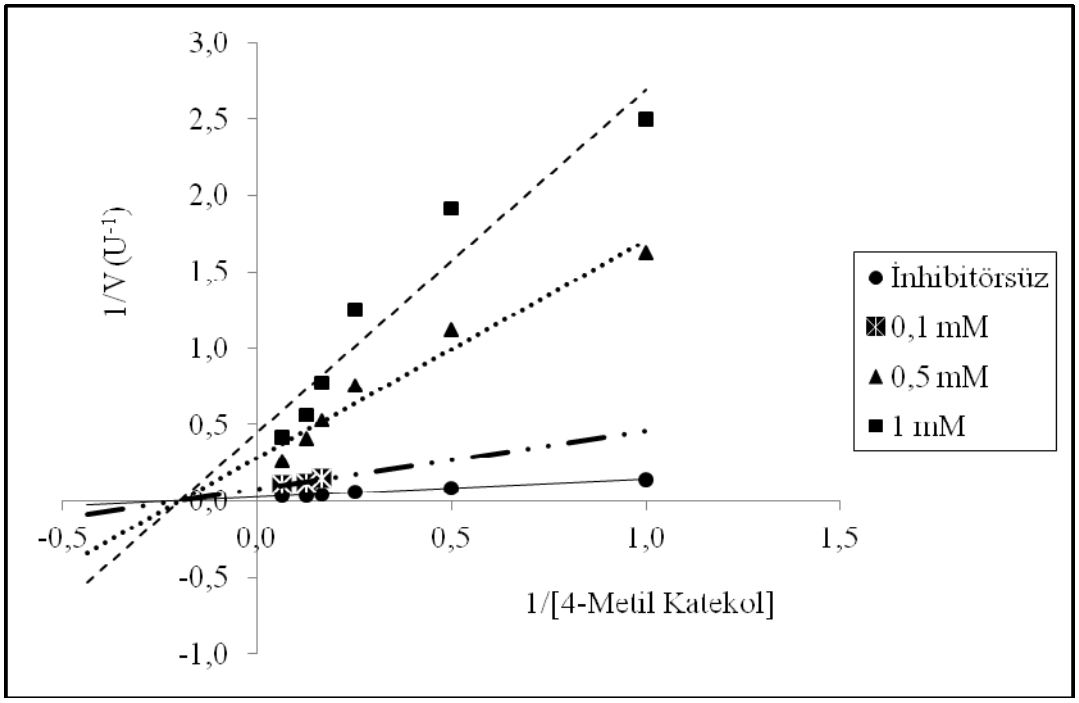
Şekil 31. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum metabisülfit ile inhibisyonu ikincil grafiği

3.6.2. PFO Askorbik Asit İnhibisyonu

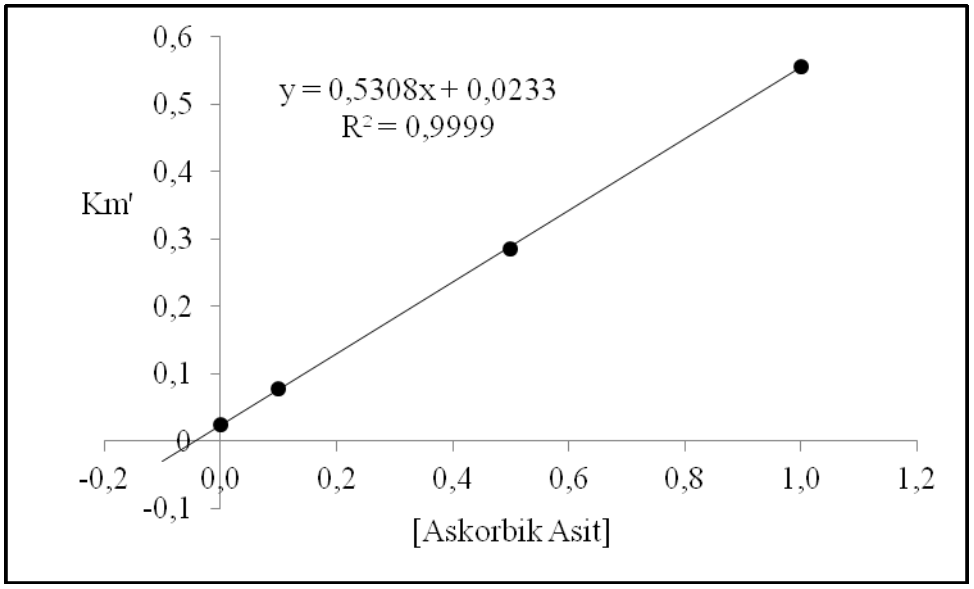
Askorbik asit inhibitörü ile Yomra Elması PFO aktivitesinin inhibisyonunda yarışmasız inhibisyon türü gösterdiği (Şekil 32 ve 33) ve K_i değeri 46,7 M olarak belirlendi (Şekil 34) (Tablo 7).



Şekil 32. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu



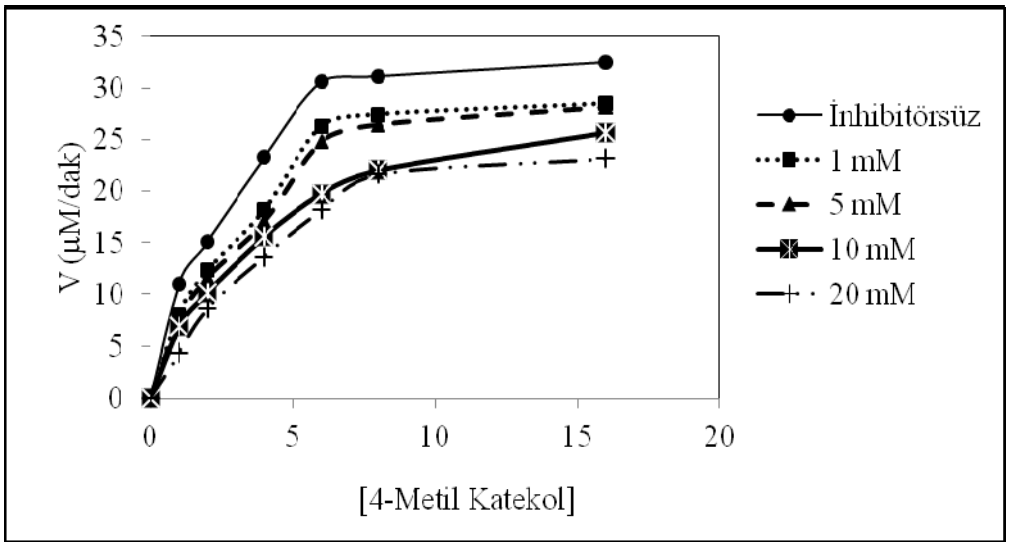
Şekil 33. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu Lineaweaver-Burk grafiği



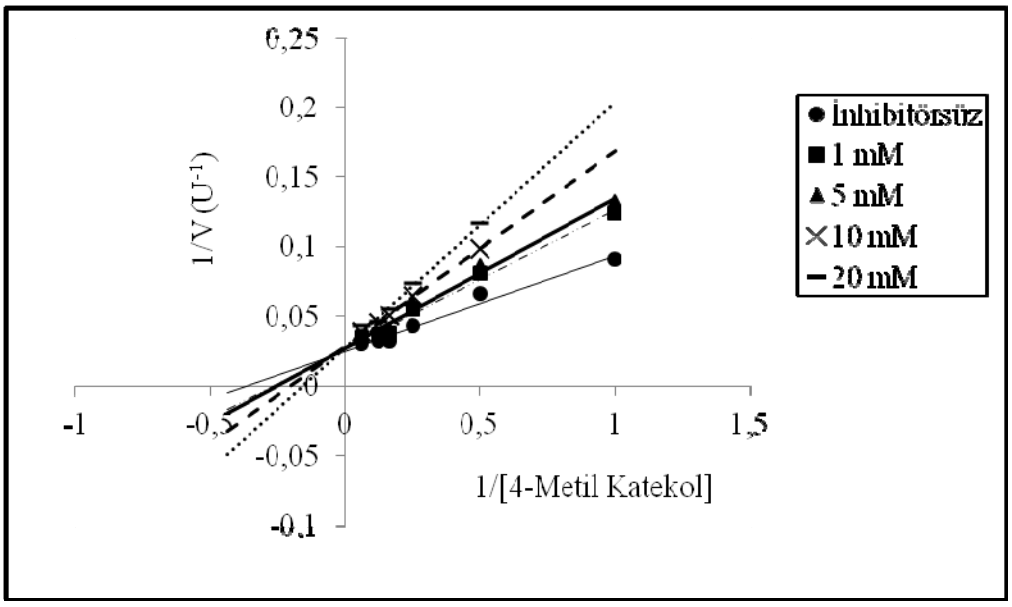
Şekil 34. Yomra Elması PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği

3.6.3. PFO Sodyum Azid İnhibisyonu

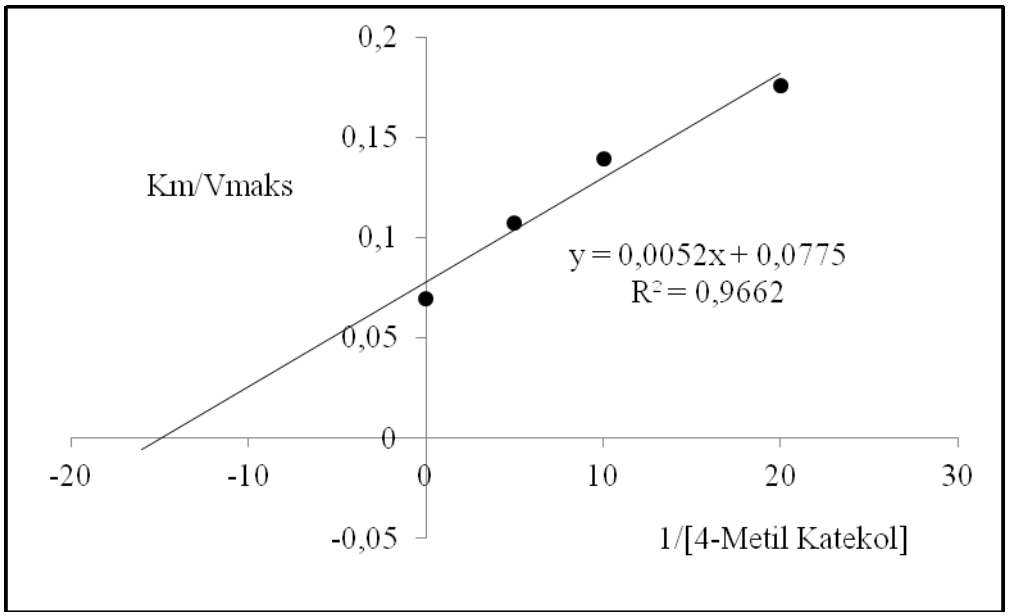
PFO 4-metil katekol subratı ile sodyum azid inhibitörü varlığında karışık inhibisyon türü gösterdiği (Şekil 35 ve 36) ve K_i değerinin 14,9 mM olduğu tespit edildi (Şekil 37) (Tablo 7).



Şekil 35. Elma PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu



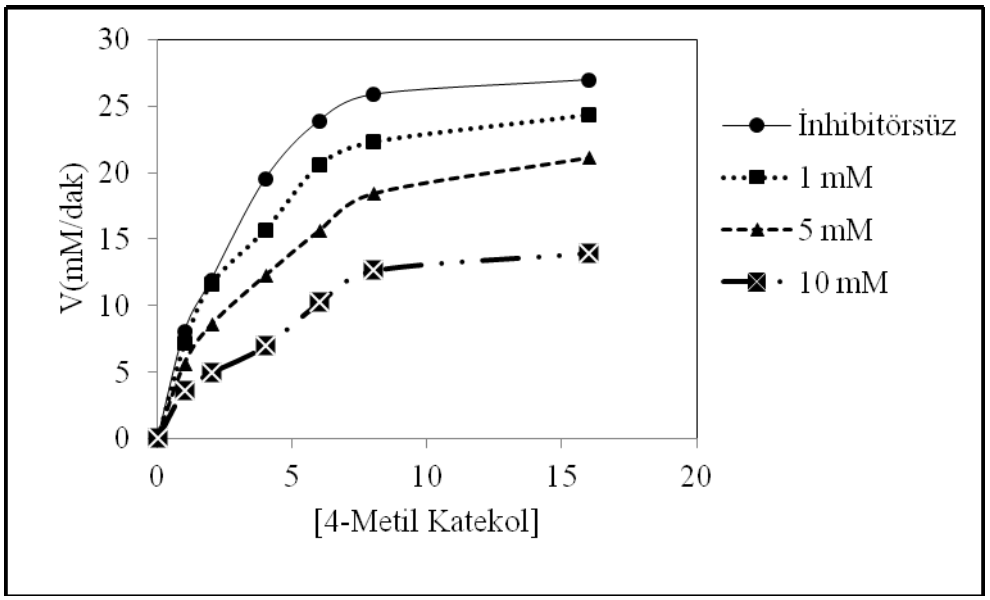
Şekil 36. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu Lineaweaver-Burk grafiği



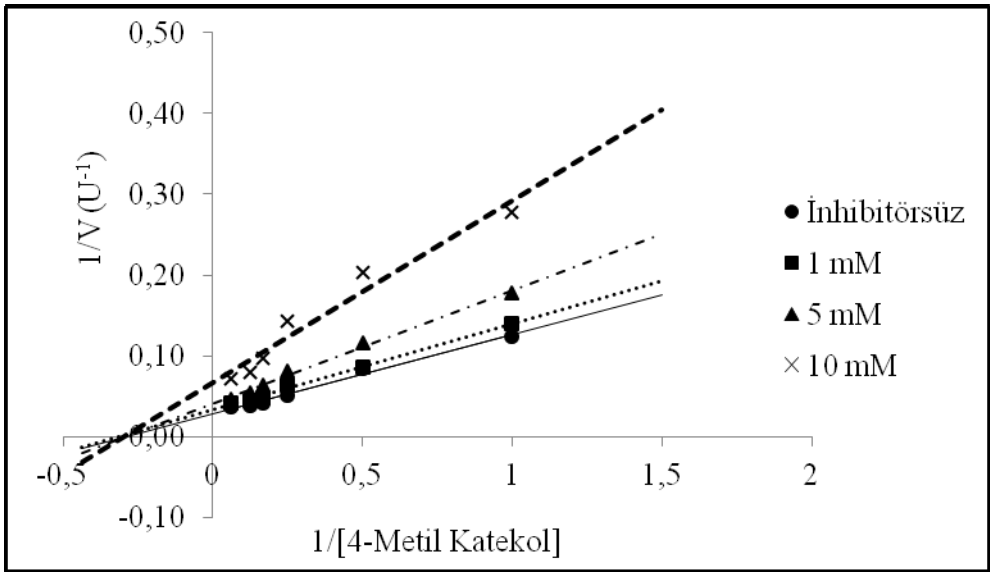
Şekil 37. Yomra Elması PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu ikincil grafiği

3.6.4. PFO Benzoik Asit İnhibisyonu

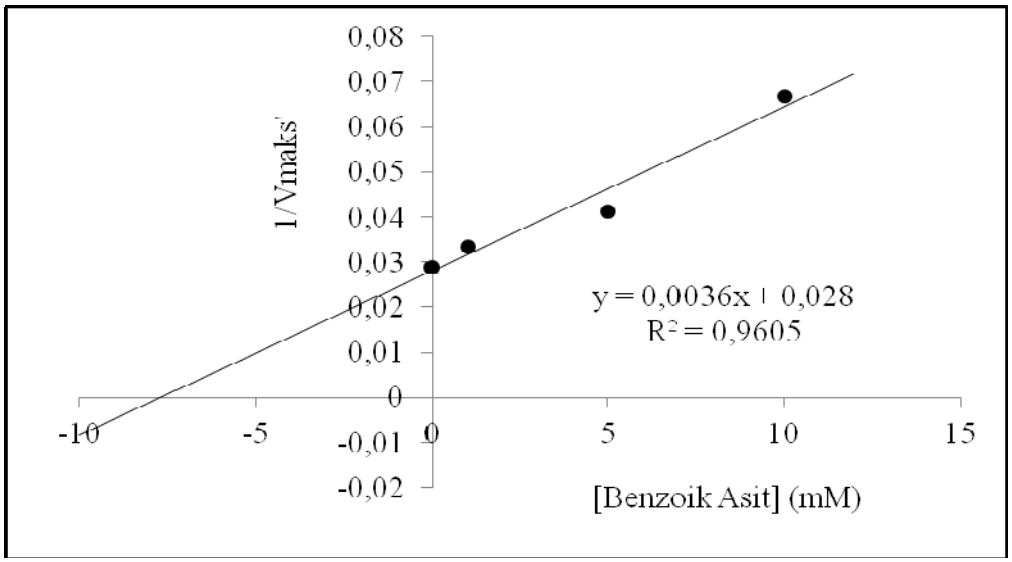
Benzoik asit inhibitörü varlığında ise PFO aktivitesi yarışmasız inhibisyon türü olarak belirlendi (Şekil 38 ve 39) (Tablo 7). Çizilen 1/ Vmaks'-[Inhibitör] ikincil grafiğinin doğru denkleminden K_i değeri 7,8 mM olarak hesaplandı (Şekil 40).



Şekil 38. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu



Şekil 39. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu Lineaweaver-Burk grafiği



Şekil 40. Yomra Elması PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği

Tablo 12. İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyonu aktivitesine etkisi

İnhibitör	K_i (mM)	İnhibisyon türü
Sodyum metabisülfit	0,05	Yarışmasız
Askorbik asit	0,05	Yarışmasız
Sodyum azid	14,9	Karışık
Benzoik asit	7,8	Yarışmasız

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Meyve ve sebzelerde toplama, depolama ve fiziksel işlemler sonucunda meydana gelen kararma reaksiyonlarından sorumlu olan PFO, 30 yıla aşkın zamandır birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır (Seo vd., 2003). Meyve suyu üretim sektörlerinde özelikle elma gibi meyvelerde, üretim aşamalarında uygulan fiziksel işlemler sonuncunda meydana gelen kararma reaksiyonları, meyve suyunun rengini, kokusunu ve besinsel değerini azaltmaktadır. Bu tür reaksiyonların kontrol edilebilmesi ancak PFO'ların meyve suyu ekstraklarındaki davranışlarının belirlenmesiyle mümkün olabilecektir.

Yapılan bu çalışmada Yomra Elması *(Malus sylvestris)*'ndan hazırlanan özütte PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin varlığı bazı kinetik ve inhibisyon çalışmalarıyla ortaya konulmaya çalışıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler literatürlerde yer alan diğer organizmalardaki PFO davranışlarıyla karşılaştırıldı.

Yapılan doğal poliakrilamid jel elektroforezinden L-DOPA substrat boyaması sonucunda, PFO'nun varlığını gösteren dört farklı bant gözlendi (Şekil 1). Daha önce farklı bitki, sebze ve diğer organizmalarda yapılan çalışmalar sonucunda, birden fazla PFO izoenzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları, kuşburnu karayemiş (Colak vd., 2005), Trabzon hurması (Özen vd., 2004), döngel (Dincer vd., 2002), papaya (Cano vd., 1996) (Şakiroğlu vd., 1996) şeklindedir.

Monofenolaz aktivitesinin belirlenmesinde MHPPA ve L-Tirozin monofenolik substratları kullanıldı. MHPPA substratı varlığında PFO, en yüksek aktivitesini pH 7,0'de ve 30 ^{o}C de gösterdiği tespit edildi. L-Tirozin ise en yüksek aktivitesini pH 5,0'de ve 20 ^{o}C'de gösterdiği belirlendi. Değişik organizmalardan hazırlanan ham özütlerdeki veya saflaştırılmış PFO'ların monofenolaz aktivitelerini en yüksek aktivitenin patlıcan için pH 5,5'da (Perez-Gilabert ve Carmona, 2000), Avokado için pH 6.8' de (Espin vd., 1997) olduğu belirtilmektedir.

Yomra Elması PFO'sunun Monofenolaz aktivitesi en yüksek MHPPA substratı varlığında olduğu tespit edildi (Tablo 6).

Difenolaz aktivitesi katekol substratı varlığında en yüksek aktiviteyi pH 5,0'de 40 ^{o}C de, 4-metik katekol substratıyla pH 7,0'de ve 40 ^{o}C de ve L-DOPA substratıyla pH 7,0'de 40 ^{o}C de gösterdiği tespit edildi. Enzimlerde, optimum pH ve sıcaklıklar değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ham enzim özütü hazırlama yöntemine ve kullanılan

substrata göre farklılıklar gösterir (Aylward ve Haisman. 1969; Jiang, 1999). Değişik organizmalardaki difenolazların, 4-metilkatekol varlığında karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, PFO için optimum pH, dutta 5.0 (Arslan vd., 2004), bir tür avakadoda 4.5 ve 5.0 (Gomez-Lopez, 2002), bir tür elmada 5.0 ve 7.5 (Rocha ve Morais, 2001), fasulye tohumlarında ve yaban mersininde 4.0 (Paul ve Gowda, 2000; Kader vd., 1997), ahudududa 8.0 (Gonzales vd., 1999) ve kuşburnunda 8.5 (Şakiroğlu vd., 1996) olarak belirlenmiştir. Ayrıca Amasya Elmasından elde edilen PFO'nun katekol substratıyla en yüksek aktivitesini pH 7'de gösterdiği (Oktay vd.,1995), döngel meyvelerinden elde edilen PFO'un katekol substratıyla pH 8.5'de 55 ^{o}C'de, 4-metil katekol substratıyla pH 6.5'de 35 ^{o}C'de, L-DOPA substratıyla pH 6.5'de 55 ^{o}C'de en yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Dinçer vd., 2002).

Difenolaz aktitesi için yapılan kinetik çalışmalar sonucunda PFO'un en fazla katekol substratına ilgi duyduğu bunu sırasıyla, 4-metilkatekol ve L-DOPA'nın izlediği tespit edildi. Birçok benzer çalışmada PFO'nun katekol ve 4-metil katekol substratlarına daha çok ilgi duyduğu belirtilmektedir (Dinçer vd., 2002; Özen vd., 2005).

Yomra elmasından elde edilen PFO'nun 4-metil katekol substratı varlığında, bilinen genel inhibitörleriyle yapılan inhibisyon çalışmalarından sodyum metabisülfit ve sodyum azidle karışık, Askorbik asit ile yarışmalı ve benzoik asit ile yarışmasız inhibisyon gösterdiği tespit edildi. Birçok organizmada enzimatik esmerleşme, oksijen veya fenolik reaktantların uzaklaştırılmasıyla veya PFO inhibitörünün kullanılmasıyla azaltılabilir veya durdurulabilir. Organizmadan oksijenin tamamen uzaklaştırılması zordur (Dogan ve Dogan, 2004). Enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından kullanılan birçok inhibitör vardır (Dogan vd., 2004; Şakiroğlu vd., 1996; Yang vd., 2001). Mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında, mantar endüstrisinde de ciddi ekonomik kayıplara yol açan, enzimatik esmerleşmenin önlenebilmesi için, en sık başvurulan yol, inhibitörlerin kullanımıdır. Yakın zamana kadar, bu amaçla, en çok kullanılan inhibitör SO_2 olmuştur. Ancak, bu bileşiğin insan sağlığına vermiş olduğu zararlardan dolayı, tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada da, bir çok bitki PFO'su için inhibitör olarak denenen, askorbik asit, sodyummetabisülfit, sodyum azid ve benzoik asit denenmiş ve her bir inhibitör için belirlenen K_i değerleri Tablo 7'de verilmiştir. Elde edilen veriler, kullanılan inhibitörler arasında, enzimi en etkin inhibe eden inhibitörün sodyummetabisülfit ile askorbik asit takiben benzoik asit ve sodyum azid olduğunu belirlenmiştir. Sodyummetabisülfitin gözlenen etkili inhibisyonu, daha önce

belirtildiği gibi, tiol bileşiklerinin PFO'lar için etkili inhibitörler olduklarını desteklemektedir (Friedman ve Bautista, 1995; Ding vd., 1998; Duangmal ve Owusu-Apenten, 1999; Yang vd., 2000). Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Sapers ve Ziolkowski, 1987; Hsu vd., 1988; Dudley ve Hotchkiss, 1989; Ros vd., 1993; Paul ve Gowda, 2000; Aydemir, 2004). Askorbik asit, ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden, enzim aktivitesini azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Daha çok bir antioksidan olarak etki eden askorbat, esmerleşmeye neden olan pigmentlerin oluşmasına izin vermeden, PFO tarafından difenolden oluşturulan kinonu indirger (Aydemir, 2004). Ayrıca, askorbat, PFO tarafından üretilen kinonoid bileşiklerin üretimini, bu bileşiklerle veya enzimin bakır merkezli aktif bölgesiyle şelat oluşturarak kısıtlayabilmektedir (Martinez ve Whitaker, 1995; Sapers, 1993; Zawistowski vd., 1991).

Sonuç olarak, Yomra Elmasından elde edilen PFO monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri optimum pH ve sıcaklık, çeşitli genel PFO inhibitörlerine karşı gösterdiği inhibisyon profilleri, kinetik bazı parametreleri bakımından çeşitli organizmalardaki PFO'lara oldukça benzer davranışlar gösterdiği belirlenmiştir.

5. ÖNERİLER

PFO enzimi içeren birçok meyve ve sebzede meydana gelen esmerleşme reaksiyonları gıdaların görüntü, lezzet ve besinsel değerlerin kaybına ve buna bağlı olarakta ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Enzimatik esmerleşmenin derecesi aktif tirozinaz konsantrasyonuna, fenolik bileşiklere, oksijen varlığına, PH'ya ve dokuların sıcaklığı gibi şartlara bağlıdır. Günümüzde PFO enzimini inaktive etmek amacıyla kullanılan birçok ticari yöntemler mevcuttur, ancak bu yöntemler uygulandığı zaman besinde istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Bu yüzden besinlerde istenmeyen esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi noktasında PFO enzimlerinin incelenmesi, yapı ve mekanizmasının aydınlatılması günümüzde bir ihtiyaç olmuştur. Ayrıca PFO, sentez reaksiyonlarında, tıpta, atık suların temizlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Yapılmış olan bu çalışmada *Malus sylvestris (*Yomra Elması)'den hazırlanan enzim özütünün aktivitesi çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. 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 adım olmuştur. 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.

Çalışmanın başlangıcında PFO aktivitesi diğer bitki türlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yüzden PFO'ın davranışlarındaki değişiklikler ekstrakların protein konsatrasyonu, deney ortamın pH ve sıcaklığı, substrat konsantrasyonun ve çeşitli PFO inhibitörlerin etkileri açısından incelenmiştir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, ham özütte karakterize edilmiş olan PFO enziminin saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli substratlar varlığında davranışlarının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması şeklinde sıralanabilir.

6. KAYNAKLAR

Altunkaya, A. ve Gökmen, V., 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (Lactuca sativa). Food Chemistry, 107, 1173- 1179.

Anonymous, 1991. Sulphites banned, Food Ingredients Processing International, 11, 11.

Arslan, O., Temur, A.ve Tozlu, İ., 1997. polyphenol oxidase from Allium sp.,Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1091- 1096.

Arslan, O., Temur A. ve Tozlu, İ., 1998. polyphenol oxidase from Malatya apricot (Prunus armeniaca L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1239- 1241.

Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S. ve Ozensoy, O., 2004, Purification of mulberry (*Morus alba L.*) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties, Food Chemistry, 88, 479-484.

Augustin, N. A., Hasnah, M. G. ve Hasimah, H., 1985. Polyphenol oxidase from guava (Psidium guajava L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 1259-1265

Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. ve Colak, A., 2008. Charecterization of polyphenol oxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (Mespilus germenica L.) fruit during ripening and over ripening, Food Chemistry, 106, 291- 298.

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

Aylward, F. ve Haisman, D. R., 1969. Oxidation systems in fruits and vegetables-Their relation to the quality of pressured products, Advances Food and Nutrition Research, 17, 1-76.

Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. ve O'Conner, K. E., 2004. Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of Pseudomonas putida F6, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 486-492.

Cano, M. P., Lobo, M. G. ve Galeazzi, M. A. M., 1996. Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3075-3079.

Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N. ve Barrett, D. M., 2000. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 147.

Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (Laurocerasus officinalis Roem.) fruits at early stage of maturation, Food Chemistry, 90, 801-807.

Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A. ve Dincer, B., 2007. Comparative Characterization of Diphenolases from Two Mulberry Fruits (Morus alba L. and Morus nigra L.), Asian Journal of Chemistry, 19, 2961-2972.

Corsini, D.L., Pavek, J. J. ve Deab, B., 1972, Difference in free and protein- bound tyrosine among potate genotypes and their relationship to internal blackspot resistance, Am. Pot. J. 69, 423- 434.

Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (Mespilus germanica L. Rosaceae), Food Chemistry, 77, 1-7.

Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Imahori, Y., 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4144-4149.

Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii*), Food Chemistry, 88, 69- 77.

Duangmal, K. ve Owusu-Apenten, R. K., 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta)* and potato (*Solanum tuberosum var. Romano)*, Food Chemistry, 64, 351- 359.

Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Kolande, J. E. ve Robson, J. R. K., 1995. The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition, CRC Pres, Boca Raton, LA.

Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Analytical Biochemistry, 43, 2807-2812.

Espin, J. C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1084-1090.

Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A. ve Wichers, H. J., 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1187-1193.

Espin, J. C. ve Wichers, H. J., 2001. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro, Biochimica et Biophysica Acta, 1554, 289-300.

FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office of Federal Register, Washington DC, USA.

Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J. N., Varon, R., Garcia-Ruiz, P. A., Garcia-Canovas, F. ve Tudela, J., 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols, Biological Chemistry, 381, 313-320.

Fraignier, M. P., Marques, L., Fleuriert, A. ve Macheix, J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruit of (Prunus), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2375- 2380.

Friedman, M. ve Bautista, F. F., 1995. Inhibition of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 69-76.

Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 631-653.

Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.

Ganguly, K. ve Seshado, T. R., 1958. Isolation of the more commanly occuring leucoanthocyanidins of plants, Journal of Scientific and Industrial Research, 17, 168- 173.

Gomez-Lopez, V. M., 2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avacado, Food Chemistry, 77, 163-169.

Gonzales, E. M., Ancos, B. ve Cano, M. P., 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4068.

Gul'ko, A. Y. ve Khaziyev, F. K., 1993. Soil polyphenol oxidase; their production, immobilization and activity, Eurasian Soil Science, 25, 101.

Haghbeen, K. ve Tan, E. W., 2003. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates, Analytical Biochemistry, 312, 23-32.

Harel, E., Mayer, A. M. ve Shain, Y., 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition, Plant Physiologoy, 17, 921.

Hunt, M. D., Eanetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. ve Steffens, J. C., 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase, Plant Molecular Biology, 21, 59-68.

Hsu, A. F., Shieh, J. J., Bills, D. D. ve White, K., 1988. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase bye ascorbic acid derivatives, Journal of Food Science, 53, 765-767.

Inlow, K. J., Marusek, C. M., Nicole, M. T. ve Flurkey, W. H., 2006. Comparative analysis og polyphenol oxidase from plant and fungal species, Journal of Inorganic Biochemistry, 100, 108- 123.

Jiang, Y. M., 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit., Food Chemistry, 66, 75-79.

Kenten, R. H., 1957. Latent phenolase in extracts of broad bean. Activation by acid and alkali, Biochemical Journal, 67, 300- 307.

Kertesz, D.ve Zito, R., 1962. Phenolase In: Oxygenases (O. Hayaichi, ed) Acaemic Press, New York, 307.

Khan, A., A. ve Huain, Q., 2007. Decolorization and removal of textile and nontextile dyes from polluted wastewater and dyeng effluent by using potato (Solanum Tuberosum) solube and immobilized polyphenol oxidase, Bioresource Technol., 98, 1012- 1019.

Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (Macrolepiota mastoidea), Food Chemistry, 101, 778-785.

Kumar, Anil V. B., Kishor Mohan, T. C. ve Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from barbados cherry (Malpighia glabra L.), Food Chemistry, 11, 328- 333.

Labuza, T. P., Lillemo, J. H. ve Taoukis, P. S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes, Fruit Processing, 2, 9-13

Laurila, E., Kervinen, R. ve Ahvenainen, R., 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits, Postharvest News and Information, 9, 53.

Lee, H. S. ve Nagy, S., 1988. Quality changes and nonenzymic browning. intermediates in grapefruit juice during storage, Journal of Food Science, 53, 168- 172.

Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W. ve Brown, S. K., 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 99.

Lee, S. E., Kim, M. K., Lee, S. G., Ahn, Y. J. ve Lee, H. S., 2000. Inhibitory effects of Linnamomen cassia bark-derived materials on mushroom tyrosinase, Food Science and Biotechnology, 9, 330-333.

Lee, K., M. ve Park, I., 2005. Inhibition of patato polyphenol oxidase by Millard reaction products, Food Chemistry, 91, 57- 61.

Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.ve Randall, R.J., 1951. Protein measurement withthe Folin Phenol reagent, Journal Biochemistry, 193, 265- 275.

Manzocco, L., Nicoli, M. C., Anese, M., Pitotti, A. ve Maltini, E., 1999. Polyphenol oxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties, Food Research International, 31, 363.

Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C., 2000. Enzymatic Browining in fruits, Vegetables and Seafoods.

Mathewson, P. R., 2000. Enzymes, Eagen Pres, Handbook Series, 37.

Mauron, J., 1981. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint, Program The Food and Nutrition Science, 5, 5-35.

Mayer, A.M. ve Harel, E., 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: Food Enzymology. Fox PF, Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, 373- 398.

McEvily, A. J., Iyengar, R. ve Otwell, S., 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis, Food Technology, 45, 80-86.

Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A. ve Klenitskaya, I. A., 1992. Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus, Eurasian Soil Science, 5, 60.

Nicholas, J.J., Richard- Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J. ve Aubert, S. Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Crit. Ry. Food Science Nutrition, 34, 109- 157.

O'brein, J. ve Morrissey, P. A., 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in food, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28, 211.

Özen, A., Colak, A., Dincer, B. Ve Güner, S.,2004. A diphenolase from persimmon fruits *(Diospyros kaki L.,)* Ebenaceae, Food Chemistry, 85, 431- 437.

Padron, M. P., Lorano, J. A. ve Gonsales, A. G., 1975. Properties of o-diphenol oxidoreductase from Musa cavendsha, Phytochemistry, 14, 1959.

Paul, B. ve Gowda, L. R., 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3839-3846.

Robb, D. A. 1984. Copper proteins and copper enzymes, Lontie, R., 2, FL: CRC Press, Boca Raton.

Rocha, A. M. C. N., Cano, M. P., Galeazzi, M. A. M. ve Morais, A. M. M. B. 1998. Characterization of starking apple polyphenol oxidase, Journal of the Science of Food and Agriculture, 77, 527.

Rocha, A. M. C. N. ve Morais, A. M. M. B., 2001. Characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple, Food Control, 12, 85-90.

Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J. ve Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone, Analytical Biochemistry, 216, 205-212.

Sapers, G. M. ve Ziolkowski, M. A. 1987. Comparison of erythorbic acid and ascorbic acid as inhibitors of enzymatic browning in apple, Journal of Food Science, 52, 1732- 1733.

Sapers, G. M. 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means, Food Technology, 47, 75-81.

Sarkar, J. M., Leonowicz, A. ve Bollog, J. M. 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils, Soil Biology and Biochemistry, 21, 223.

Seo, S. Y., Sharma, V. K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2837-2853.

Stephens, G. J. ve Wood, R. K. S. 1974. Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase, Nature, 251, 358.

Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Oktay, M. ve Onganer, Y., 1996. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.)* Polyphenol Oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 2982-2986.

Tygesen, P. W., Dry, I. B. ve Robinson, S.P., 1994. Polyphenol oxidase in potatp 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, 151- 159.

Tolbert, N. E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts, Plant Pathology, 51, 234.

URL -1, http:/www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browining.htlml, 03 Mart 2008.

van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. ve Wichers, H. J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase, Phytochemistry, 45, 1309-1323.

Whitaker, J. R., 1972. Principles of enzymology for the food sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York.

Whitaker, J. R. ve Lee, C. Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. Enzymatic Browning and Its Prevention, C. Y. Lee ve J. R. Whitaker, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, DC, 2-7.

Whitaker, J. R. 1995. Polyphenol oxidase, Food enzymes: Structure and Mechanism, Dominic W. S. Wong, Chapman and Hall, New York, 271- 307.

Yang, C. P., Shuji, F., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) pulp, Journal of Agricultural Chemistry, 48, 2732-2735.

Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusaboyashi, A., Ashafuzzaman, M. A. ve Hayashi, N., 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (Musa sapientum L.) peel, Journal of Agricultural Chemistry, 49, 1446-1449.

Yoruk, R. ve Marshall, R., M., 2003. Pysicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review, Journal Food Biochemistry, 27, 361- 422.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'un Çaykara ilçesinde doğdu. Lise öğrenimini Beşikdüzü Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini 2003-2007 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.