

66950

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARAYEMİŞ (*Prunus laurocerasus* L.) MEYVELERİNDE GELİŞME ve
OLGUNLAŞMAYA BAĞLI OLARAK BAZI ORGANİK MADDE
MİKTARLARI İLE POLİFENOL OKSİDAZ AKTİVİTESİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

Biyolog İlknur YAVRU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

66950

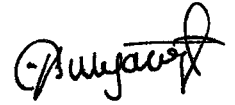
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15. 01. 1997

Tezin Savunma Tarihi : 03. 02. 1997

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Asım KADIOĞLU



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ



Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Asım KADIOĞLU



Ocak -1997

TRABZON

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TRABZON MERKEZİ

ÖNSÖZ

Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşmaya bağlı olarak bazı organik madde miktarı ile polifenol oksidaz aktivitesindeki değişimlerin araştırıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Asım KADIOĞLU'na, değerli jüri üyeleri hocalarıma, bu çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, bu projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Araştırma Fonu'na (Proje no: 96 111 004.3) teşekkür ederim.

Trabzon, Ocak 1997

İlknur YAVRU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Önsöz.....	II
İçindekiler.....	III
Özet.....	V
Summary.....	VI
Şekil listesi	VII
Tablo listesi	IX
Kısaltmalar.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Karayemiş (<i>Prunus laurocerasus</i> L.) Hakkında Genel Bilgiler	3
1.3. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	4
1.3.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması.....	6
1.3.2. Polifenol Oksidazın Katalizlediği Reaksiyonlar.....	6
1.3.3. Polifenol Oksidazın Bitkilerdeki Rolü	8
1.3.4. Polifenol Oksidazın Gıda İşletmeciliğindeki Rolü	9
1.3.5. Polifenol Oksidaz İzoenzimleri.....	10
1.4. Fenolik Bileşikler	11
1.5. C Vitamini (Askorbik asit).....	12
1.6. Toplam Karbohidrat	12
1.7. Meyve Olgunlaşmasının Genel Özellikleri	13
2. MATERYAL ve METOD	14
2.1. Meyvelerin Temini	14
2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini	14
2.2.1. Enzim Özütünün Hazırlanması.....	14
2.2.2. Enzim Aktivitesi Tayini.....	15
2.2.3. Poliakrilamid Jel Elektforezi ile PFO İzoenzimlerinin Belirlenmesi	15
2.3. Çözünbilir Protein Tayini	16
2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini	18
2.5. C Vitamini (Askorbik Asit) Tayini	19
2.6. Toplam Karbohidrat Tayini	21

3. BULGULAR.....	23
3.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesindeki Değişimler	23
3.2. Polifenol Oksidaz İzoenzimlerindeki Değişimler	26
3.3. Çözünebilir Protein Miktarındaki Değişimler	27
3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler	29
3.5. C Vitamini (Askorbik Asit) Miktarındaki Değişimler	30
3.6. Toplam Karbohidrat Miktarındaki Değişimler	32
4. TARTIŞMA.....	34
5. SONUÇLAR.....	39
6. ÖNERİLER.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41
8. ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÖZET

Bu çalışmada, karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşma sürecine bağlı olarak polifenol oksidaz (PFO) aktivitesindeki ve toplam karbohidrat, çözünebilir protein, fenolik madde ile askorbik asit miktarlarındaki değişimler araştırılmıştır.

Bu amaçla, iki karayemiş kùltivarına ait meyvelerde PFO aktivitesi ve diğer parametreler spektrofotometrik metodlarla analiz edilmiş ve bu analizlere çiçeklenmeden iki ay sonra başlanarak, meyvelerin tamamen olgunlaşmasına kadar devam edilmiştir. Yapılan tayinlerde, PFO aktivitesi meyve büyümesi ve gelişimi boyunca gittikçe artmış, olgunlaşma safhasında ise aktivite değerinde azalma olmuştur. Ayrıca sözkonusu periyotta toplam karbohidrat ve çözünebilir protein miktarlarının önemli derecede arttığı, C vitamini (askorbik asit) miktarının ise azaldığı kaydedilmiştir. Fenolik madde miktarında da PFO aktivitesine benzer değişimler tespit edilmiştir. Meyvelerde poliakrilamid jel elektroforezi ile 1-2 PFO izoenzimi belirlenmiştir.

Karayemiş meyvelerinde gelişme ve olgunlaşma sürecine bağlı olarak PFO enziminin özelliklerinin ve meyvenin kimyasal içeriğinin belirlenmesi ile literatüre orjinal katkılar sağlanmıştır. Elde edilen bilgilerin, ileride bu bitkinin kùltür formlarının arttırılması ve değerlendirilmesi çalışmalarına ışık tutacağı umulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Prunus laurocerasus*, Polifenol Oksidaz, Gelişme ve Olgunlaşma, Çözünebilir Protein, Fenolik Madde, C Vitamini, Toplam Karbohidrat

SUMMARY

INVESTIGATION ON THE CHANGES IN THE AMOUNTS OF SOME ORGANIC SUBSTANCES AND POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY DURING DEVELOPMENT AND RIPENING OF CHERRY LAUREL (*Prunus laurocerasus* L.) FRUITS

In this study, the changes of activity in polyphenol oxidase (PPO) during the development and ripening of cherry laurel fruits were investigated. Also, the changes of amounts in total carbohydrate, soluble protein, phenolic substances and ascorbic acid were determined.

For this purpose, PPO activity and the other parameters in fruits which picked up every week from two cherry laurel cultivar were spectrophotometrically measured and, these analyses were begun after two months of pollination and continued until the fruits are mature. At the end of analyses, PPO activity gradually increased during the development of fruits, however, it decreased in the stage of ripening. Total carbohydrate and soluble protein level significantly increased, on the contrary, the level of vitamin C (ascorbic acid) decreased during the development and the ripening of the fruits. The changes in the phenolic substance content of fruits were determined as similar with changes in PPO activity. In addition, one to two PPO isoenzymes in fruits were determined by polyacrylamide gel electrophoresis.

The investigation of features of polyphenol oxidase and the determination of the chemical content of cherry laurel fruits made originally contribution to the literature. It is expected that obtained results can be used for processing of the fruits and for increasing number of their cultivar forms.

Key Words: *Prunus laurocerasus*, Polyphenol oxidase, Development and Ripening, Soluble Protein, Phenolic Substance, Vitamin C, Total Carbohydrate

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Çözünebilir Protein Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik17
- Şekil 4. Toplam Fenolik Madde Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik19
- Şekil 3. C Vitamini Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....20
- Şekil 4. Toplam Karbohidrat Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik22
- Şekil 5. I. Kültivara Ait Karayemiş Meyvesinin PFO İzoenzimlerinin %8 'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....26
- Şekil 6. II. Kültivara Ait Karayemiş Meyvesinin PFO İzoenzimlerinin %8 'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....27
- Şekil 7. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Çözünebilir Protein İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.....28
- Şekil 8. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Fenolik Madde İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.....30
- Şekil 9. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca C Vitamini İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.....31
- Şekil 10. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Karbohidrat İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.....33

Şekil 11. I. Kùltivarın Meyvelerinde Toplam PFO Aktivitesi ile Fenolik Madde Miktarı Arasındaki İlişki.....35

Şekil 12. II. Kùltivarın Meyvelerinde Toplam PFO Aktivitesi İle Fenolik Madde Miktarı Arasındaki İlişki.....36



Tablo 1. Farklı Karayemiş Meyvelerinin Özellikleri	3
Tablo 2. İki Karayemiş Kültivarının Gelişme ve Olgunlaşma Dönemleri	23
Tablo 3. I. Kültivara Ait Karayemiş Meyvesinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca PFO Aktivitelerindeki Değişimler.....	24
Tablo 4. II. Kültivara Ait Karayemiş Meyvesinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca PFO Aktivitelerindeki Değişimler.....	25
Tablo 5. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Çözünebilir Protein Miktarındaki Değişimler.....	28
Tablo 6. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler.....	29
Tablo 7. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca C Vitamini Miktarındaki Değişimler	31
Tablo 8. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Karbohidrat Miktarındaki Değişimler	32

KISALTMALAR

PFO	: Polifenol oksidaz enzimi
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
PEG	: Polietilen glikol
Dopa	: Dihidroksifenilalanin
BSA	: Bovin Serum Albumin
Tris	: Trihidroksimetilaminometan
TEMED	: N, N, N' N' tetrametil etilen diamin



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) Türkiye'nin çeşitli yerlerinde ve özellikle Karadeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren bir bitkidir (1). Kültüre alınan formlarının meyveleri sevilerek tüketilmekle birlikte, yabani formlarının meyveleri de yenmektedir. Karayemiş meyvesinin kimyasal içeriği çok ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. Bu konuda sadece birkaç çalışmaya rastlanılmıştır. Örn; Rusya'da yapılan bir çalışmada karayemiş meyvelerinde fruktoz, glukoz, bazı belirsiz fenolik bileşikler, antosiyanidin türevleri, pheonidin, siyanidin ve leukoantosiyanidin içerikleri belirlenmiştir (2). İtalya' da karayemiş meyvesinin olgunlaşmasını belirten fiziksel özellik ve kimyasal kompozisyon analizleri yapılmıştır (3). Burada meyvenin ihtiva ettiği bazı mono ve disakkaritler ile yağ, protein, bazı element ve birkaç organik asit seviyeleri belirlenmiştir. Mikeladze ve Kutateladze (4), çeşitli muamelelerden ve fermentasyon işlemlerinden sonra karayemiş meyvesinin değişik içki üretimlerinde kullanımı üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Ancak yapılan literatür çalışmasında karayemiş meyvesinde organik madde miktarlarının gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca gösterdiği değişimler ile polifenol oksidaz (PFO) enziminin bu meyvedeki aktivitesi ve özellikleri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Polifenol oksidaz, meyve ve sebzelerde bol olarak bulunan enzimlerden birisidir. Bu enzim, bitkisel ürünlerin toplanması, işlenmesi ve depolanması sırasında bitki dokularının mekanik bir etki ile zarar görmesi sonucu havanın oksijeni ile temas ederek fenollerini kinonlara dönüştürmekte ve enzimatik esmerleşmenin meydana gelmesini sağlamaktadır (5, 6). Enzimatik esmerleşme de ekonomik açıdan bitkisel ürünlerin değerlendirilmesinde bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok meyvede, gelişme ve olgunlaşmanın farklı periyotlarındaki PFO aktivitesi ve kimyasal kompozisyonlarındaki değişimlerle ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur (6, 7, 8, 9). Meyvelerin gelişme ve olgunlaşma sürecine bağlı olarak gösterdiği PFO aktivitesi ve kimyasal kompozisyon değişimlerinin bilinmesi onların değerlendirilmesi bakımından önemlidir.

Karayemiş bitkisinin meyvelerine ait kimyasal içerik iyi bilinmediğinden kültür formlarının arttırılması ve yaygınlaştırılması konusunda önemli bir çalışma mevcut değildir. Karayemiş meyvesinin

ihativa ettiği bazı organik madde seviyelerinin tayin edilmesi sonucu sözkonusu meyvenin içeriğini, diğer meyvelerle karşılaştırmak ve meyvenin bilimsel değerini belirlemek mümkün olacaktır.

Bu bilgiler ışığında çalışmadaki amacımız, Doğu Karadeniz Bölgesi'nin ekolojik koşullarında yetişmesi oldukça kolay olan karayemiş bitkisinin meyvelerinde gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca polifenol oksidaz aktivitesindeki ve bazı organik madde miktarlarındaki değişimleri araştırmaktır. Ayrıca bu meyvenin PFO aktivitesi ve izoenzim özelliklerini belirlemek suretiyle bu konudaki literatür bilgilerine yeni katkılar sağlanacaktır.



1.2. Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) Hakkında Genel Bilgiler

Prunus laurocerasus L., Kuzey İnan, Batı Kafkasya, Anadolu ve Güneydoğu Avrupa'da yayılış gösteren bir türdür. Türkiye'nin kuzeyinde (özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde) ve güneyinde (Amanos Dağları'nda) tabii olarak yetişmektedir.

Bu bitkiye Türkiye'de değişik yöresel adlar verilir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan "karayemiş" ve "taflan"dır. Günümüzde büyüme biçimi, yaprak boyutu ve şekli ile kışa dayanıklılık açısından yaklaşık 20 farklı karayemiş kültüvarı vardır. Büyüklük, şekil, renk, lezzet ve olgunlaşma süresi yönünden varyasyon gösteren karayemiş meyvelerinin yöresel ad ve çeşitli özellikleri Tablo 1'de verilmiştir (10).

Tablo 1. Farklı Karayemiş Meyvelerinin Özellikleri.

Meyve	Yabani karayemiş	Kiraz veya ekmek karayemişi	Ayran veya beyaz karayemiş	Orak veya selvi karayemişi	Su veya acı karayemiş	Fındık karayemişi
Meyveli durumun eksen boyu (cm)	10-20	10-15	6-7	6-7	15-20	8-9
Ekseninin tüylü olup olmadığı	çıplak	çıplak	çıplak	tüylü	tüylü	?
Boyutlar (mm)	11-14x10-14	19-23x19-23	21-22x20	23-27x20-23	18-20x18-22	16-19x17-18
Sap uzunluğu (mm)	4-5	2-5	7-8	7-8	7-8	3-4
Kabuğun (ekzokarp) rengi	koyu kırmızı	koyu kırmızı	pembe	morumsu siyah	morumsu siyah	morumsu siyah
Etili kısmın (mezokarp) rengi	koyu kırmızı	açıksarı kırmızı	açık pembe	koyu kırmızı	pembe	yeşilimsi beyaz
Mezokarp kalınlığı (mm)	2-3	4-5	6-7	5-7	5-6	?
Tohum+endokarp boyutları (mm)	9-10x6-7	11-13x9-10	13-15x10	15-16x10-11	15x10	
Tohum boyutları (mm)	7-8x6	8-9x7-8	10x7	8-9x6-7	9x7	
Olgunlaşma zamanı	Temmuzun ilk haftası-Ağustos	Haziran ortası	Haziran sonu	Temmuz ortası	Temmuz ortası	?
Lezzet	Buruk	Mayhoş veya Hafif Buruk	Tatlı	Tatlı	Acımsı Buruk	Tatlı, Acı Buruk

Prunus laurocerasus L. 1-3 m, nadiren 5-6 m boyunda, kışın yaprağını dökmeyen herdem yeşil ve sert yapraklı ağaç ve çalimsı bir bitkidir. Rosaceae familyasından olan bitkinin yaprakları, çok kısa bir sapla dala bitişmiş vaziyette, uzunca oval şekilli, 10-20 cm uzunluğunda, 4-6 cm genişliğinde, deri gibi sert ve tüysüzdür. Nisan-Mayıs aylarında küçük, beyaz renkli çiçekler açar. Ekseni 10-15 cm olan salkım şeklindeki çiçek durumunda 30-35 çiçek bulunmaktadır. Zeytin şeklindeki sulu meyveleri drupa tipinde olup, önceleri yeşil olgunlaşınca koyu bir renge dönüşür. Meyveler Temmuz-Ağustos aylarında olgunlaşır (11).

Karayemiş tıbbi açıdan da önemli bir bitkidir. Bitkinin taze yapraklarından su buharı distilasyonu ile elde edilen ve %0,1 oranında siyanhidrik asit ihtiva eden suyu, öksürük kesici, spazm çözücü, bulantı kesici ve sinirleri yatıştırıcı preperatlarda kullanılmaktadır. Ancak yapraklarda bulunan siyanhidrik asitin çok zehirli olması nedeniyle tıbbi kullanılışı hiçbir zaman geniş olmamıştır. 100 g yaprakta 120-180 mg arasında siyanhidrik asit bulunmaktadır. Meyvelerin de siyanhidrik asit taşıdığı öne sürülmüş, ancak daha sonra bu maddenin, meyvenin etli kısmında değil de sert kısımda (endokarp+tohum) bulunduğu bildirilmiştir (10).

Karayemiş meyvelerinin sindirimi kolaydır ve diğer meyvelerden farklı olarak insanı tok tutar. Meyveler gıda olarak değerlendirilmelerinin yanısıra, bazı hastalıkların tedavisinde de kullanılır. Özellikle halk arasında sindirim sistemi rahatsızlıklarında, şeker hastalığı, bronşit ve idrar tutukluğu tedavisinde ve ekzamaya karşı kullanımları yaygındır (10).

1.3. Polifenol Oksidaz Enzimi

Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan enzimlerden olan PFO, enzimatik renk kararmalarına neden olmaktadır. Oksijen varlığında bu enzim, özellikle *o*-difenol grubu fenolik maddeleri renkli bileşiklere yükseltmektedir. Enzimatik kararma, bitki tür ve çeşidine göre farklı olabilmektedir. Bu reaksiyonda rol oynayan üç faktörden, yani fenolik madde, O₂ ve PFO enziminden birinin ortadan kaldırılması ile enzimatik renk kararmaları durdurulabilir veya azaltılabilir (12). Bu olayda esas evre PFO'nun fenolik substratları kinonlara dönüştürmesidir. Ortam koşulları uygun olduğunda kinonlar daha koyu renkli maddeleri oluşturmak üzere polimerize olurlar veya proteinlerle kompleks yaparlar. Bu reaksiyonlar

proteinlerin fiziksel, kimyasal ve gıdasal özelliklerinde önemli değişimlere neden olurlar (13).

Polifenol oksidaz, genellikle tüm bitkilerde bulunmakla birlikte özellikle mantarlarda, patates yumrularında ve meyvelerde bol miktarda rastlanılmaktadır (14). Ancak, enzim muhtevası bitki türüne veya çeşidine bağlı olarak çok farklılık göstermektedir. Örneğin; elma, kayısı ve zeytinde PFO aktivitesinin çok yüksek olduğu (6) ve yine elmalarda yapılan bir çalışmada Amasya çeşidinin Golden'e göre daha yüksek PFO aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (15). Elmalardan izole edilen PFO'ların dihidroksifenollerle, monohidroksifenollere göre çok daha yüksek aktivite gösterdikleri de tespit edilmiştir (16). Ayrıca zeytin varyetelerinde mevcut olan enzimatik kararmadaki farklılıkların direkt olarak PFO aktiviteleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (17).

Enzimin bitki hücresindeki konumu, meyve ve sebzenin türüne ve yapı olgunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yeşil yapraklarda PFO aktivitesi çoğunlukla kloroplastlarda bulunmuştur (18,19). Pancarlarda ise PFO aktivitesinin çoğunlukla mitokondri ve plastid zarlarında bulunduğu belirtilmiştir (20). Ispanak, buğday, yulaf, bezelye ve şeker kamışı yapraklarında ise PFO'nun genellikle latent (saklı) durumda olduğu tespit edilmiştir (18). Stanley eriklerinde etli kısımdaki ham enzim aktivitesinin kabuğundakinden 3,5 kat daha fazla olduğu ortaya çıkarılmıştır (21). Enzim aktivitesi üzümde, pulp ve öz suya nazaran kabukta daha fazla bulunmuş ve olgunlaşma esnasında aktivite azalması kabukta daha belirgin olmuştur (6).

Polifenol oksidaz aktivitesinin, bitkilerin farklı dokularında, onların gelişim sürecine bağlı olarak, değişimler gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Örneğin, Vamos-Vigyazo (6), elma ve armutda meyvelerin her tarafında PFO aktivitesine rastlandığını ancak tohum ve kabuk bölgelerinde daha yüksek aktivite olduğunu belirtmiştir. Muzlarda PFO aktivitesinin pulpda diğer kısımlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (22). Avacadoda ise PFO aktivitesinin mezokarpta yüksek olduğu saptanmıştır (23).

Macaristan'da Vamos-Vigyazo ve ark. (24) tarafından yapılan bir araştırmada, elmada meyve olgunlaşmasıyla birlikte enzimatik kararmanın ve PFO aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Şeftalilerde meyve olgunlaşmasının başlangıcında PFO aktivitesinin hızla azaldığı daha sonra ise değişmediği rapor edilmiştir (7). Yine, İsrail'de yapılan bir çalışmada, üzümlerin olgunlaşması sırasında hem PFO aktivitesinin hem de

fenolik madde miktarının azaldığı tespit edilmiştir (25). Muzun olgunlaşmasına paralel olarak enzimatik kararmanın yanısıra, PFO aktivitesi ile spesifik aktivite ve fenolik substratlardan birisi olan dopanın miktarında azalma olduğu saptanmıştır (26). Kumar (27), şeftalilerde yaptığı çalışmada meyve büyümesinin ve gelişiminin başlangıç periyodu boyunca fenolik içerik ve PFO aktivitesinin arttığını, meyve normal büyüklüğe ulaşınca kadar artmaya devam ettiğini ve olgunlaşma sırasında ise azaldığını tespit etmiştir. Bu konuda diğer bazı meyvelerde yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (28, 29, 30).

1.3.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması

Bitki PFO'larının adlandırılması yakın zamanlarda yeniden gözden geçirilerek, monofenol (monofenol, dihidroksifenilalanin: oksijen oksidoreduktaz: E.C.1.14.18.1,PFO) ve difenol oksidaz (katekolaz; difenol, O₂ oksidoreduktaz; E.C.1.10.3.1.) olarak adlandırılmıştır (19, 31). Aynı zamanda mantarlardan ve yeşil bitkilerden elde edilen lakkazlar da aynı enzim kod numarasıyla verilmektedirler (E.C.1.10.3.1).

Diğer bazı yayınlarda da polifenol oksidazlar (difenol; O₂ oksido redüktaz, polifenol oksidaz (PFO) E.C.1.10.3.1) olarak verilmiştir (32, 33).

Diğer taraftan bu enzim birden fazla substrata etki ettiği için, polifenol oksidaz tek bir enzim değil, enzim grubunun ortak adıdır. Mesela, monofenollerden tirosine etki edene tirozinaz, difenollerden dopa, katekol ve kafeik asite etki edenlere de sırasıyla dopa oksidaz, katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz denilmekle birlikte, bu enzimlerin hepsine yaygın olarak PFO adı verilmektedir (5, 6).

1.3.2. Polifenol Oksidazın Katalizlediği Reaksiyonlar

Polifenol oksidaz, yapısında prostetik grup olarak bakır (Cu⁺⁺) bulunduran oksido-redüktaz grubu enzimlerden birisidir. Moleküler oksijen varlığında PFO enzimi tarafından iki tip reaksiyon katalizlenmektedir:

- Monofenollerin hidroksilasyonu ile *o*-dihidroksi fenollerin oluşturulması,

- *o*-Dihidroksi fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu.

Monofenollerin hidroksilasyonu sonucu oluşan dihidroksi fenoller, yine PFO enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla *o*-kinonlara dönüştürülür. Oluşan kinon birimleri polimerleşerek kararlamayı meydana

getirir (6). Ortamda askorbik asit veya *o*-dihidroksi fenollerin bulunması halinde oksidasyon potansiyeli, askorbik asit veya *o*-dihidroksi fenolün indirgenmesi için harcanır. Ancak bu işlem tamamlandıktan sonra hidroksilasyon reaksiyonu başlayabilir.

Monofenollerin hidroksilasyonu ve *o*-dihidroksi fenollerin oksidasyon reaksiyonlarının, aynı enzim tarafından katalizlenip katalizlenmediği konusunda farklı düşünceler ileri sürülmüştür. Bu konudaki bazı görüşler şöyle özetlenebilir (34):

* Hidroksilasyon enzimatik bir işlem değildir, fakat *o*-dihidroksi fenollerden kinonların oluşumu PFO tarafından katalizlenmektedir.

* Her iki reaksiyona da iki ayrı protein molekülünden oluşmuş bir enzimin faaliyeti sebep olmaktadır.

* Her iki reaksiyonda enzimattır, fakat katalizin ayrı ayrı ikinci derecede önemli olan enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği açık değildir.

* Reaksiyonlar iki aktif bölgeye sahip olan bir enzim tarafından katalizlenir.

* Her iki reaksiyonda enzimin aynı aktif bölgesi tarafından yürütülür. Ancak enzimin prostetik grubu veya bakırın değeriği ortama göre sürekli değışir.

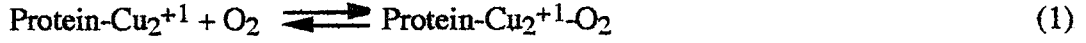
Bugün *o*-dihidroksi fenollerin dehidrogenasyon ve monofenollerin hidroksilasyon reaksiyonlarının her ikisinin de iki ayrı bölgeye sahip olan PFO enzimi tarafından katalizlendiği düşüncesi daha fazla taraftar görmektedir.

Polifenol oksidaz ile yapılan bazı çalışmalarda ilginç bir sonuç olarak, enzimin reaksiyonun ilerlemesi ile inaktif olduğu gözlenmiştir. Bu olay, oluşan kinonların enzimin aktif bölgesine kovalent bağlandığı ve aktivitenin kaybolduğu şekilde izah edilmiştir (35). Çünkü reaksiyon devam ettikçe oluşan ürünler birikir ve enzim inhibe edilir. Bunun sonucu olarak reaksiyon hızı azalır. Bu inhibisyona sebep, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substratı andırmaları ve enzime substrattan daha fazla bağlanmalarıdır.

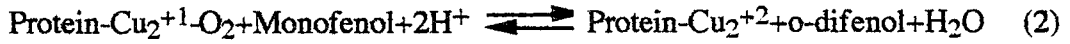
Hidroksilasyon reaksiyonu bakırın tek değerlikli formda olmasını gerektirir ve bu form dehidrogenasyon basamağı ile sağlanır. Bakırın iyon değışim kromotografisi gibi bir metodla uzaklaştırılması sonucu aktivite kaybolur ve bakırın ilavesi ile aktivite yeniden kazanılır (13).

Mason'un (36) enzimin katalitik kısmındaki bakır atomlarının valans durumu etkilidir teorisine göre, ortamda *o*-difenol

molekölü varlığında, enzimin yapısındaki iki bakır atomu Cu_2^{+2} halinden Cu_2^{+1} haline indirgenir. Bu teoriye göre, monofenolazın aktif bölgesinin katalitik kısmında proteine bağlı komşu iki Cu_2^{+1} vardır ve bir oksijen molekölü proteine bağlı Cu_2^{+1} 'le bir kompleks oluşturur (Reaksiyon 1).



Bir oksijen molekölünün monofenolün hidroksilasyonu sırasında bir atomu kullanılırken, diğer atomu da suya dönüştürülür (Reaksiyon 2).



Bunun için iki elektron ihtiyacı Cu_2^{+1} atomları tarafından sağlanır. Burada Cu_2^{+2} inaktif haldedir. Bakırın inaktif (Cu_2^{+2}) halden aktif (Cu_2^{+1}) hale geçmesi, dihidroksi fenolün kinona oksidasyonu yolu ile sağlanır (Reaksiyon 3).



Bu üç basamağında aynı ortamda oluştuğu varsayılırsa net reaksiyon denklemi (Reaksiyon 4);



1.3.3. Polifenol Oksidazın Bitkilerdeki Rolü

Polifenol oksidaz bitkilerde sınırlı miktarda olmakla birlikte önemli rollere sahiptir. Bunlardan birisi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direncinde rol oynamasıdır. Örneğin virüs enfeksiyonundan etkilenen dokular, sağlıklı dokulara oranla daha fazla PFO ihtiva etmekte ve enzimatik kararmaya karşı daha fazla hassas olmaktadır. Bu durumda enfeksiyon, sağlıklı dokularda mevcut olmayan yeni bir PFO bileşeninin oluşmasına neden olmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu ve aktivitesindeki artış çeşitli antibiyotiklerle inhibe edilmektedir(37). Mayer ve Harel (5) tarafından, PFO'nun fenolik substratları hızla kinonlara dönüştürüp, yaralı dokuda yenilenmeyle kallus dokusunun oluşumunda

rol aldığı ve oluşan kinonların hastalığı önleme veya azaltmada etkili olduğu savunulmuştur. Yaralı dokuda oluşan kinonların triptofan ile etkileşerek indol asetik asit oluşumuna katkıda buldukları ve böylece kallus dokusunun oluşumunda PFO'nun rol oynadığı görüşü Gordon ve Paleg (37) tarafından desteklenmiştir. Marbach ve Mayer (38) ise PFO'nun tohum kabuğunda su geçirgenliğini azalttığını rapor etmişlerdir. Bitki yapraklarında PFO'nun kloroplastlarda bulunması onun fotosentez olayı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (39). Yine Mayer (40), enzimin fotosentetik dokularda oksijen temizleyicisi olarak rol oynayabileceğini ileri sürmüştür. Ayrıca PFO aktivitesinin antosiyanin pigmentlerinin degradasyonuna neden olarak, bazı meyvelerin renk kaybından sorumlu olduğu da bildirilmiştir (41).

Bitkilerin enfeksiyona karşı direnci ile ilgili olarak, PFO'nun faaliyeti sonucu oluşan kinonlar, ikinci bir polimerizasyon reaksiyonuna uğrayarak koyu renkli, suda çözünmeyen polimerler oluşturmakta ve bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı tampon görevi yapmaktadır (42).

Polifenol oksidaz ayrıca bitkilere stres şartlarına karşı direnç ve dayanıklılık özelliği kazandırır. Örneğin kışa dayanıklı bitki dokuları, dayanıksız olanlara nazaran daha fazla PFO aktivitesine sahiptirler (42).

Ayrıca polifenol oksidazın faaliyeti sonucu oluşan kinonlar, sonuçta enzimatik olmayan kararmaya ve humuslaşmaya kadar giden reaksiyonlara iştirak edebilir. Böylece toprağın organik maddelerinin oluşmasına yardım ederler (42).

1.3.4. Polifenol Oksidazın Gıda İşletmeciliğindeki Rolü

Polifenol oksidazın neden olduğu enzimatik esmerleşme gıda teknologları için kontrolü güç bir uğraşı alanı olmuştur. PFO'nun gıda işletmeciliği bakımından önemi, enzimatik esmerleşmeye neden olmasından kaynaklanmaktadır. Meyvelerin işlenmesi sırasında arzu edilmeyen düzeyde renk bozulmalarını kontrol etme, azaltma veya önleme görevi gıda bilimci ve teknologlarını daima meşgul etmiştir. Enzimatik kararma elma, armut, şeftali ve muz gibi meyvelerde, patates ve yemeklik mantar gibi sebzelerde nispeten daha fazla görülür. Ancak, yeterli seviyede fenolik madde ve PFO içermeyen domates ve sunbeam çeşidi şeftali gibi meyvelerde, PFO ihtiva etmeyen ya da az miktarda bulunan PFO'yu yapılarındaki yüksek asit nedeniyle inaktifleştiren limon ve diğer turunçgil meyvelerinde, birçok

üzümsü meyvelerde ve çeşitli sebzelerde enzimatik kararın problem oluşturmaktadır. Kiraz, vişne ve patlıcanların antosiyaninlerden kaynaklanan güzel renklerinin enzimatik kararın ile oluşan kinonlarla bozulduğu, daha düşük yükseltgenme-indirgenme potansiyelinden dolayı askorbik asitin antosiyanin oksidasyonunu önlediği ve sonuçta kendisinin oksitlenerek vitamin değeri daha az olan veya hiç olmayan ürünlere dönüştüğü ve gıdaların bu vitamince zayıfladığı öne sürülmüştür (6). Diğer taraftan meyve suyu üretimi sırasında PFO'nun fenolik maddelere ve tanenlere etki etmesiyle meydana gelen polimerleşme sonucu durultma sağlanmakta ve fenolik maddelerden ileri gelen buruk tad giderilmektedir. Ayrıca siyah çay üretiminde enzimatik kararın istenen bir olaydır. Kinonlar, çaya içim tadı ve kalitesini kazandıran teaflavin ve tearübiğinlerin ön maddeleridir. Benzer şekilde tohumuz kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen güzel renkleri enzimatik esmerleşme sonucunda oluşur. Kakao ve kahvenin renk ve aromasında, siyah zeytinin renk ve lezzetinde enzimatik kararın rolü büyüktür (6).

1.3.5. Polifenol Oksidaz İzoenzimleri

Bitkilerde PFO'nun fizyolojik rolünü ortaya çıkarmak için kinetik özellikleri yanında elektroforetik özellikleri de araştırılmıştır. Polifenol oksidaz izoenzimleri bitki türüne göre farklılık göstermektedir. Örneğin şeftalilerde 3-6 (27, 43), armutlarda 3-8 (44), kiwide 8 (45), elmada 3 (46), çilekte 2 (31), kuşburnunda 2 (42) izoenzim ortaya çıkarılmıştır.

Diğer taraftan PFO izoenzimlerinin bitkilerde olgunlaşma ile değiştiği ve genellikle sayıca bir azalma gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin Hindistan'da Taneja ve Sachar (47), buğday gelişiminin başlangıcında PFO izoenzimlerinde artış, daha sonra ise azalmanın varlığını ispatlamışlardır. Ayrıca patatestede gelişimin başlangıcında olgunluk evresine göre, daha fazla sayıda PFO izoenzimi tespit edilmiştir (14). Yine PFO izoenzimlerinin substrat özellikleri patatestede araştırılmış ve farklı substratlara göre farklı izoenzim bandları elde edilmiştir. Bu bitkide en fazla izoenzim sayısı ve en yüksek aktivite dopa ile ortaya çıkarılmıştır (48).

Polifenol oksidaz izoenzimlerinin, bitki dokusuna (47) ve çeşidine göre (49) de farklılık gösterdiği kaydedilmiştir.

1.4. Fenolik Bileşikler

Meyve ve sebzeler oldukça fazla ve çeşitli fenolik bileşikler ihtiva etmelerine karşın, bunların sadece bir bölümü PFO substratı olarak iş görür. Değişik kaynaklı PFO'lar, farklı fenolik substratlarla değişik aktivite düzeyleri gösterirler. Polifenol oksidazın meyve ve sebzelerdeki en yaygın substratları, flavonoid tipi fenoller ile basit fenollerdir. Flavonoidler bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunurlar. Bitkilerdeki tabii olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, leukoantosiyanidinler, antosiyaninler, flavonoller ve sinnamik asit türevleri besinlerin önemli kısmını teşkil ederler. Özellikle bitkilere renk veren başlıca bileşikler flavonoidler, antosiyaninler ve flavonlardır.

Polifenol oksidazın etkileştiği substratlar, monohidroksi ve dihidroksifenoller olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Fenol ve tirozin monohidroksifenollerin, katekin, kafeik asit, katekol, dihidroksifenilalanin (dopa) ve klorojenik asit ise dihidroksifenolik substratların başlıcalarındandır (48). Bunların bitkilerdeki dağılımı farklılık göstermekle birlikte, bitkilerde dihidroksifenoller daha çok bulunur. Örneğin çayda en çok katekin ve türevleri ile az miktarda klorojenik asitin olduğu Mathew ve Parpia (13) tarafından belirtilmiştir. Elmada başlıca substratların katekin, klorojenik asit, leukoantosiyanidin ve flavanol olduğu saptanmış olup, armutta da elmadakine benzer substratların bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (44). Şeftalilerde ise en çok klorojenik asit ve bunun yanı sıra az miktarda katekin ve leukoantosiyanidinlerin yer aldığı belirlenmiştir (50).

Çeşitli meyvelerin gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca fenolik madde içeriklerindeki değişimler araştırılmıştır (9, 23, 27). Meyvelerde ağzı buruşturucu özellikte olan fenolik maddelerin olgunlaşma sırasında miktarlarında görülen azalma tipiktir. Olgunlaşma ile birlikte fenolik bileşiklerin konsantrasyonunun azalması, *o*-difenollerin sentezinin durması veya başka bileşiklere dönüşümlerinden dolayıdır (51). Örneğin, Kolesnik ve ark. (52) meyve olgunlaşması ve depolanması sırasında antosiyaninlerin ve flavonollerin (meyvelere renk veren fenolikler) konsantrasyonlarının arttığını ve katekinler ile leukoantosiyaninlerin ise azaldığını bulmuşlardır.

1.5. C Vitamini (Askorbik asit)

C vitamini suda çözünen, karbohidrat türevi bir vitamindir. Özellikle insanlar için çok önemli olan bu vitaminin başlıca kaynakları meyve ve sebzelerdir. Yapılan çalışmalarda meyvelerin, gelişmelerinin bütün safhalarında aynı miktarda C vitamini ihtiva etmedikleri, meyvenin gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca C vitamininin sabit olmadığı, meyvenin tür ve çeşidine göre farklılıklar gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Örneğin, Fuke ve Matsuoka (53) Japonya'da yaptıkları bir çalışmada, kiwi meyvesinin C vitamini içeriğinin meyve büyümesi ve gelişimiyle birlikte azaldığını tespit etmişlerdir. Bu konuyla ilgili başka bir çalışmada ise, guava (*Psidium guajava* L.) meyvelerindeki C vitamininin gelişme ve olgunlaşma dönemleri boyunca sürekli arttığı ve bu artışın gelişmenin ilk haftalarında yavaş, daha sonraki haftalarında ise oldukça hızlı olduğu tespit edilmiştir (54). Tropik kökenli bir bitki olan *Annona muricata* L.'nin meyvelerinde, olgunlaşmayla birlikte C vitamini düzeyinin azaldığı da yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (29).

Bitkilerde PFO'nun başlıca engelleyicisinin C vitamini (askorbik asit) olduğu da bilinmektedir. Askorbik asit oluşan kinonları tekrar fenolik substratlara indirgemekte ve kendisi yükseltgenmektedir. Ayrıca askorbik asit PFO'yu direkt olarak inaktif edebilmektedir (26).

1.6. Toplam Karbohidrat

Meyvelerin önemli bileşenlerinden biri de karbohidratlardır. Meyvelerin hangi dönemde daha çok karbohidrat içerdiklerinin bilinmesi onların daha verimli bir şekilde değerlendirilmesi için önemlidir. Sukroz, glukoz, fruktoz ve nişasta meyvelerde bulunan başlıca karbohidratlardır. Özellikle fruktoz ve glukoz olgun meyvelerin tatlılıklarına katkıda bulunmaktadır. Olgunlaşma sırasındaki hidrolitik değişimler genellikle şekerlerin oluşmasına ve tatlanmasına neden olur. Bu tatlanma, depo maddesi olan nişastanın çözünebilen şekerlere dönüşümüyle ortaya çıkmaktadır. Gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca karbohidrat miktarlarındaki değişimler çeşitli meyvelerde çalışılmıştır. Örneğin, incirde meyvelerin gelişmesi süresince sukroz, fruktoz ve glukoz konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir (55). Başka bir çalışmada ise, şeker içeriğinin guava meyvelerinin tadını etkileyen önemli bir faktör olduğu belirtilerek, gelişme ve olgunlaşma periyotlarındaki

şeker içeriklerinin nasıl bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçta guava meyvelerinin şeker içeriğinde sürekli bir artış olduğu ve en önemli artışın ise fruktoz içeriğinde görüldüğü belirtilmiştir (54). Benzer olarak hünnap (*Zizyphus spina-christi* L.) bitkisinde de toplam şekerlerin olgunlaşmayla birlikte arttığı kaydedilmiştir (56).

1.7. Meyve Olgunlaşmasının Genel Özellikleri

Meyve olgunlaşması ile ilgili değişimler çok sayıda ve komplekstir. Meyvelerde çok bariz olan olgunlaşma değişimleri şunlardır: Doku yumuşaması, depo bileşiklerinin hidrolizi, lezzet ve pigmentasyonda ve solunum hızındaki değişimler. Bitkisel bir hormon olan etilen meyve olgunlaşması sırasında, selülaz gibi hücre çeperi gevşetici enzimlerin sentezini ve salgılamasını uyararak doku yumuşamasına neden olmaktadır (57).

Meyveler tam boyutlarına ulaştıkları zaman meyve olgunlaşması başlar. Bu olay, dıştan meyvenin en dış tabakasındaki pigmentasyondaki değişimlerle, içten ise çözünen bileşik formlarında artış ve etilen üretiminin en yüksek seviyeye ulaşması ile anlaşılmaktadır (57).

Etilen üretimi ve solunum hızındaki artış meyvenin yumuşamasına yol açan bir seri bozulma olayının meydana gelmesini sağlar. Bu yumuşama prosesi bazı hücre hidrolazlarının (özellikle pektinaz ve selülaz) aktivitelerindeki artma ile başlatılmaktadır. Meyvenin etli tabaka hücrelerinde depolanan besin maddeleri yıkılır, özellikle nişasta ve hemiseluloz gibi yüksek moleküler ağırlıktaki bileşiklerin, düşük moleküler ağırlığına sahip basit şekerlere parçalanması tipiktir (57).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Meyvelerin Temini

Bu çalışmada morfolojik ve olgunlaşma zamanı bakımından farklı olan iki karayemiş kültüvarı kullanıldı. Meyveler, Karadeniz Teknik Üniversitesi kampüsü yakınındaki belirli bir istasyondaki ağaçlardan, çiçeklenmeden iki ay sonra toplanmaya başlandı ve olgunlaşma periyodunun sonuna kadar toplam 8 hafta süreyle toplama işlemine devam edildi. Bu bitkinin kültüvarlarının adlandırılması ile ilgili henüz kayıtlı bilgiler mevcut olmadığından, kullanılan meyveler I. kültüvar ve II. kültüvar olarak isimlendirildiler. Analizlere I. kültüvarın meyvelerinde 1 Haziran'da, II. kültüvarın meyvelerinde ise 27 Haziran'da başlandı. Birinci kültüvara ait meyveler 19 Temmuz'da, ikinci kültüvara ait olanlar ise 15 Ağustos'da tam olgun hale ulaştı. Her iki kültüvara ait meyveler, bu süreç boyunca gelişme ve olgunlaşma periyotlarında incelendi.

2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini

2.2.1. Enzim Özütünün Hazırlanması

Taze meyvelerden enzim ekstraksiyonu için Park ve Luh (45)'un metodu kısmen değiştirilerek kullanıldı. Meyvelerin havayla temas edip kararmasını önlemek için meyveler soğuk su içerisinde parçalandı. Polifenol oksidaz enzimi substrat olarak oksijen ve fenolik bileşikler kullandığı için bu iki bileşimin etkisinin mümkün olduğu kadar giderilmesi gerekmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon tamponuna katılan ve antioksidan bir madde olan askorbik asit, oksijeninin ilgisini üzerine çekerek kısmen oksijenin etkisini önlemektedir. Öte yandan, enzim ekstraksiyonu boyunca fenol oksidasyonunu ve polimerizasyonunu önlemenin en etkili yolu, çözünmeyen bir polimer materyaline substratı bağlayarak ortamdan uzaklaştırmaktır. Fenolik bileşikler bağlamada en çok tercih edilen polietilen glikol (PEG)'dur. Bu şekilde tampona bu iki bileşimin katılmasıyla muhtemel aktivite kayıpları önemli ölçüde önlenmiştir.

Bu amaçla 5 g meyve (etli kısım) 20 ml ekstraksiyon tamponunda (10 mM askorbik asit ve %0,5 PEG içeren 0,5 M sodyum fosfat tamponu, pH 7,3) homojenize edildi. Elde edilen homojenat soğutucuda iki kat tülbenkten süzüldü ve süzüntü kısmı +4 °C'de 20.000 x g'de 20 dk santrifüj edildi.

Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatantın bir kısmı protein tayini için kullanıldı. Geri kalan kısmı ise diyaliz torbalarına konularak 500 ml 0,005 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,3) içinde bir gece boyunca +4 °C'de diyaliz edilerek kısmi saflaştırma sağlandı. Enzim aktivitesinin tayini için bu enzim özütü kullanıldı.

2.2.2. Enzim Aktivitesi Tayini

Polifenol oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik metod esas alındı (58). Prensipte olarak enzim ve substrat tepkimeye sokulduğunda meydana gelen kinonlar, renkli bileşikler olduğundan bunların absorbanansı spektrofotometrede okunarak aktivite tayini yapıldı. Meyve ekstraktlarındaki PFO aktivitesini belirlemek için substrat olarak L-dopa (L-3,4- dihidroksifenilalanin), katekol ve kafeik asit kullanıldı. Tüm substrat çözeltileri 0,05 M (pH 6) fosfat tamponu içinde, 0,02 M olacak şekilde taze hazırlandı.

Aktivite tayini için, içerisinde 1 ml fosfat tamponu ve 1,5 ml substrat çözeltisi bulunan spektrofotometre küvetine hızlı bir şekilde yukarıda belirtilen enzim özütünden 1 ml ilave edildi. 420 nm'de absorbanstaki değişimler 3 dk boyunca bir Shimadzu UV-120-01 spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. 1 ml enzim ekstraktının 1 dakikada absorbansta meydana getirdiği 0,001'lik değişim 1 enzim ünitesi (EU) olarak ifade edildi.

2.2.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile PFO İzoenzimlerinin Belirlenmesi

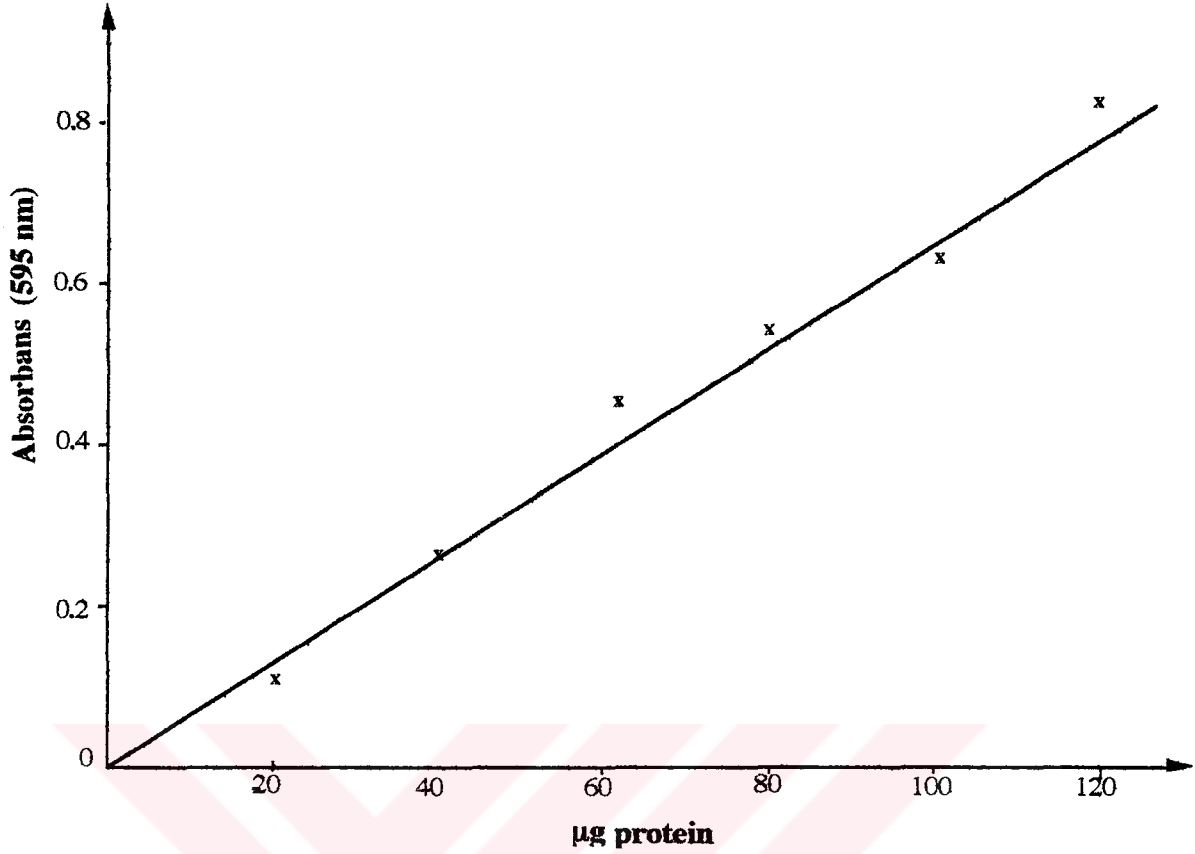
Poliakrilamid jel elektroforezi Constantinides ve Bedford (49) tarafından tanımlanan metod kullanılarak gerçekleştirildi. Yığma jel %3'lük ve ayırma jel %8'lik olarak hazırlandı. Yığma jelin hazırlanması için; 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'den 1 ml, %30'luk akrilamid ve %0,8'lik bis akrilamidden 1,3 ml, saf sudan 5,5 ml ve taze hazırlanmış %10'luk amonyum persülfattan 0,08 ml kullanıldı. En son olarak da TEMED'den (N,N,N'N'-tetrametiletilen diamin) 0,01 ml karıştırılarak jel hazırlandı. Ayırma jeli için ise; 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)'den 10 ml, %30'luk akrilamid ve %0,8'lik bis akrilamidden 10,7 ml, saf sudan 18,5 ml, taze hazırlanmış %10'luk amonyum persulfattan 0,4 ml kullanıldı ve bu karışımın üzerine son olarak 0,02 ml TEMED ilave edildi.

Elektroforez işlemi için, elektroforez plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendikten sonra, cam plakalar arası 0,75 mm olacak şekilde, kışkaçlarla tutularak jel hazırlama ünitesine konuldu. Taze olarak hazırlanan %8'lik ayırma jeli enjektör yardımıyla cam plakalar arasına yaklaşık 10 cm oluncaya kadar dolduruldu. Bu sırada jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Jelin polimerleşmesi için yarım saat kadar beklenildi. Katılaştıran ayırma jelinin üzerindeki su boşaltıldı. Daha sonra %3'lük yığılma jeli, ayırma jelinin üstüne, cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar ilave edildi ve üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Jelin katılaşması için 1 saat beklenildi. Sonra tarak dikkatlice çıkarılarak, jelde oluşan oyuklar önce saf su ile sonra yürütme tamponuyla yıkandı ve tekrar bu tamponla dolduruldu. Oyukların yerleri işaretlenerek cam plakalar arasındaki jel, elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmı elektrik devresini içine alacak şekilde yürütme tamponuyla dolduruldu.

Enzim numuneleri %50 gliserol ve %0,1'lik bromfenol boyası içinde 50 µg olacak şekilde Hamilton marka enjektörle jele uygulandı. Yürütme tamponu (14,4 g/l lt glisin ve 3 g/ 1lt tris; pH 8,3) kullanılarak +4 °C'deki soğuk odada 10 mA akımda 4-6 saat yürütme yapıldı. Daha sonra dikkatli bir şekilde çıkarılan jel, 15 mM L-dopa substratı içeren 0,1 M fosfat tamponuna (pH 6) daldırıldı ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. İzoenzim bantları belirginleşince, jel 1 mM askorbik asit çözeltisi içerisinde 5 dk çalkalandı. Sonra %30'luk etil alkol içinde bekletildi ve fotoğrafı çekildi.

2.3. Çözünabilir Protein Tayini

Karayemiş meyvesinde çözünabilir protein miktarının tayini için Bradford Metodu kullanıldı (59). Bu yöntem, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue (CBB G-250) reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması ve protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Ayrıca proteine boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşir (ortalama 2 dk). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Protein tayini için önce bir standart grafik hazırlandı (Şekil 1).



Şekil 1. Çözünebilir Protein Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik.

Bunun için 100 ml'sinde 0,01 g protein ihtiva eden standart BSA (Bovin Serum Albumin) çözeltisinden tüplere 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 ml alındı. 0,05 M fosfat tamponu (pH 6) ile tüm tüplerin hacimleri 2 ml'ye tamamlandı. 1,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırıldı, 2 dk sonra 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 2 ml tampon ve 1,5 ml boya çözeltisi içine konmuş olan tüp kullanıldı. 595 nm'de okunan absorbanslara karşılık gelen μg protein değerleri belirlendi.

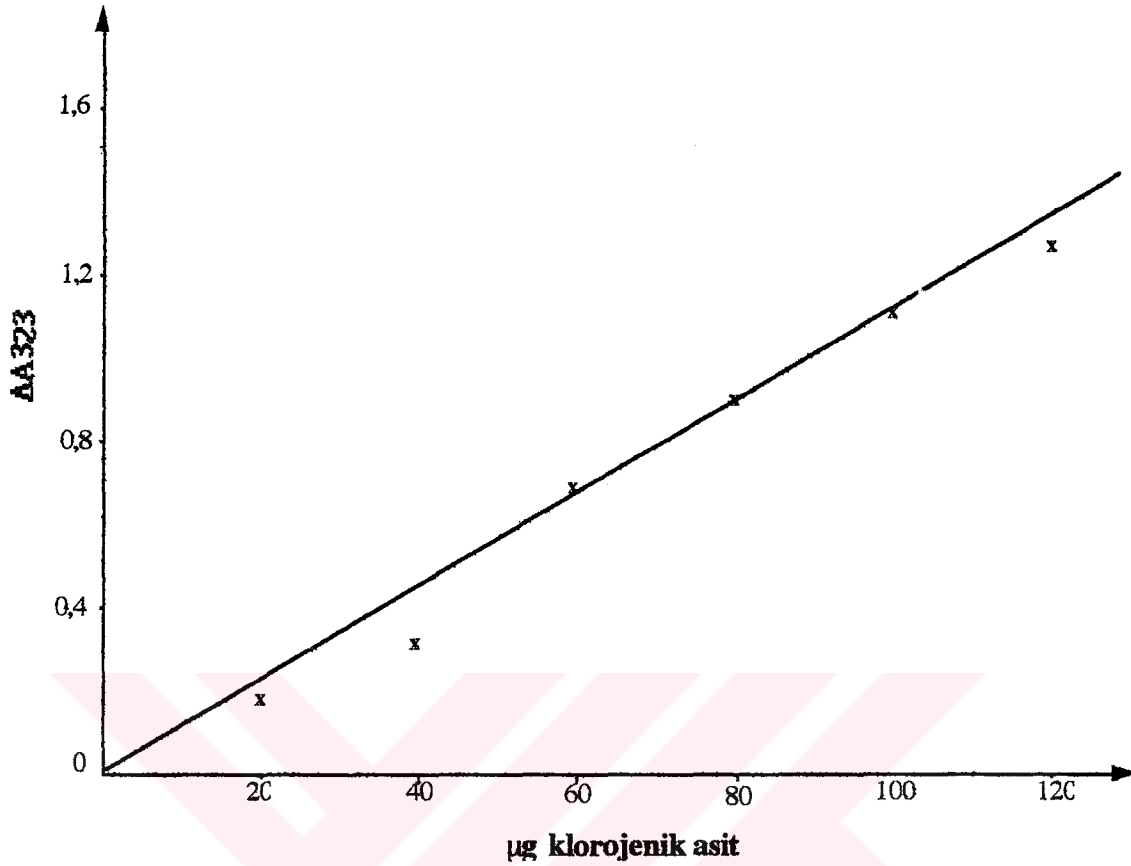
Numunedeki çözünebilir protein miktarını bulmak için, PFO aktivitesi için hazırlanan enzim çözeltisinden 0,3 ml alınarak üzerine 1,7 ml fosfat tamponu (0,05 M; pH 6) ilave edildi. Sonra 1,5 ml Coomassie reaktifi konularak vortekste karıştırıldı. 2 dk sonra 595 nm de absorbansları ölçüldü. Ortalama absorbansına karşılık gelen numunedeki protein miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak, "mg protein / g taze ağırlık" olarak belirlendi.

2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Bu tayin spektrofotometrede fenolik maddelerin 323 nm dalga boyundaki absorbanlarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (60). Standart grafiğin hazırlanmasında klorojenik asit kullanıldı. Bunun için önce bir seri standart klorojenik asit çözeltisi hazırlanarak bunların 323 nm'deki absorbanları ölçüldü ve standart grafik çizilerek, numunelerdeki fenolik madde miktarı belirlendi.

Standart eğrinin hazırlanması için, klorojenik asit stok çözeltisinden (1 mg/10 ml) 6 deney tüpüne sırasıyla 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 ml konulup hacimleri 0,1 M fosfat tamponu ile (pH 6,35) 3 ml' ye tamamlandı. Tüpler karıştırıldıktan sonra 323 nm dalga boyundaki absorbanları spektrofotometre yardımıyla okundu. Kör numune olarak 3 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,35) kullanıldı. Aynı şekilde 6 seri tüp daha hazırlanarak içlerine 0,03 g Dowex (klorid form) ilave edilip, bir çalkalayıcıda 20 dk süre ile çalkalandı. Sonra tüpler klinik santrifüjde 10 dk santrifüj edildi ve Dowex tarafından adsorbe edilen fenolik maddeler çöktürülüp üstte kalan sıvı kısım spektrofotometre tüplerine alınarak 323 nm'de absorbanları kaydedildi. Kaydedilen absorban değerlerinin sırasıyla farkı alınıp, grafik üzerinde dikey eksene bu farklar (ΔA_{323}), yatay eksene ise klorojenik asit miktarı (μg) yazılarak standart grafik çizildi (Şekil 2).

Meyvelerdeki fenolik madde miktarının belirlenmesi için, 2 g karayemiş meyvesi 20 ml %95'lik etanol içerisinde 2 dk süreyle bir parçalayıcıda homojenize edildi. Elde edilen homojenat karıştırılıp, bundan 3 ml alındı ve etüvde alkolü uçurularak 15 ml 0,1 M (pH 6,35) fosfat tamponu ile karıştırılıp süzüldü. İki ayrı tüpe 3 ml olmak üzere alta geçen süzüntüden aktarılıp, tüplerden birisine 0,03 g Dowex konulup 20 dk çalkalayıcıda sallandı ve 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra Dowex ile muamele edilen ve edilmeyen her iki tüpün 323 nm' deki absorban farkı (ΔA_{323}) alınarak, standart eğri üzerinden özütteki toplam fenolik madde miktarı bulundu. Bulunan bu değer daha sonra "mg fenolik madde/100 g taze ağırlık" olacak şekilde ifade edildi.



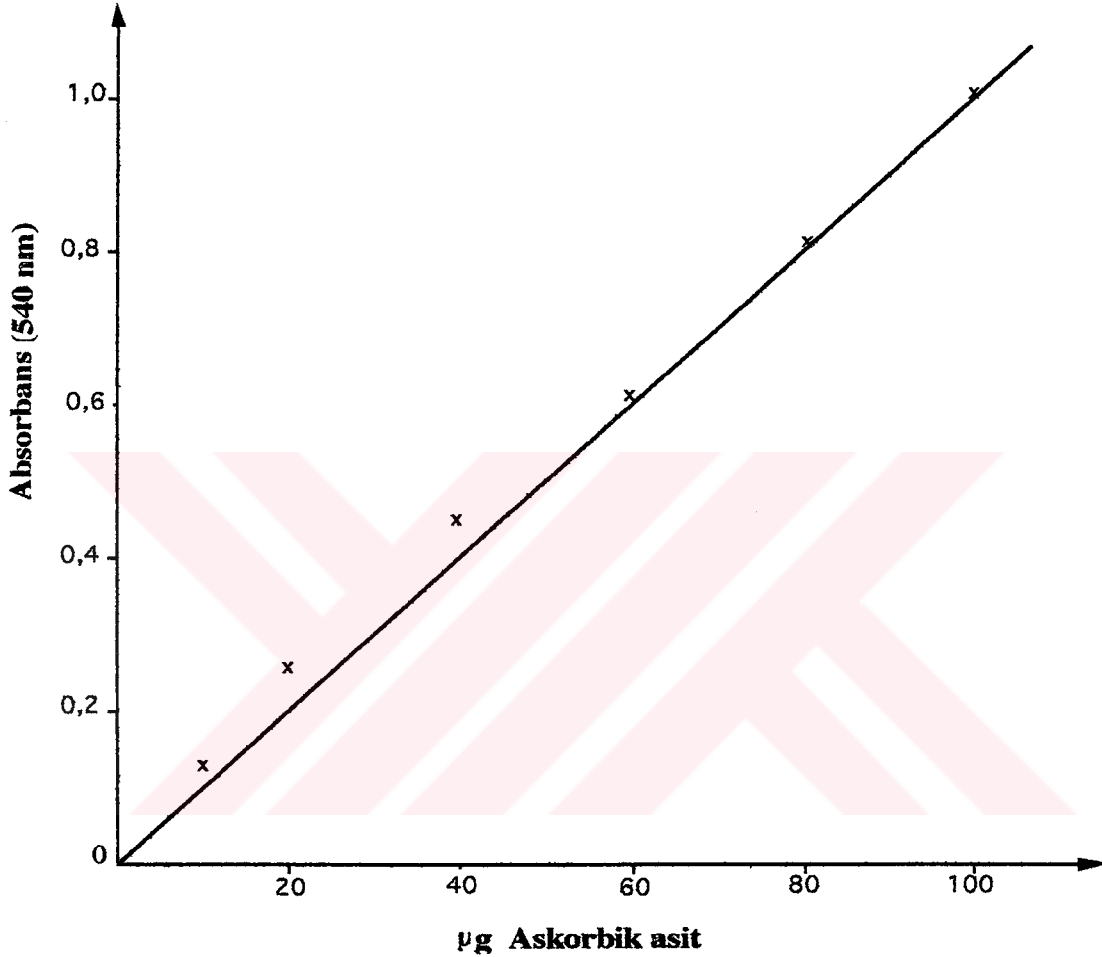
Şekil 2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik.

2.5. C Vitamini (Askorbik Asit) Tayini

Karayemiş meyvesindeki C vitamini tayini için spektrofotometrik bir yöntem kullanıldı. Shieh ve Sweet (61) tarafından geliştirilen bu metod bakır(II)-2,2'-biquinolin solusyonu [$\text{Cu}(\text{biq})_2^{2+}$] ile askorbik asit arasındaki redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan pembe-gülkurusu renk 540 nm'de ölçülmektedir. 2,2'-biquinolin (biq), spesifikliğı ve hassasiyeti yüzünden ayıraç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Bu yöntemle askorbik asit tayini için, öncelikle standart askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Sırasıyla 10 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg ve 100 µg askorbik asit içeren tüplere fosfat-sitrik asit tamponu (pH 3; 0,01 M) konuldu ve daha sonra toplam hacim 3 ml olacak şekilde, herbir tüpe $\text{Cu}(\text{biq})_2^{2+}$ solusyonu (2,4 ml) ilave edildi ($\text{Cu}(\text{biq})_2^{2+}$ solusyonu, 5 ml CuCl_2

çözeltisi ile 15 ml 2-2'biquinolin çözeltisi karıştırılarak 20 ml olacak şekilde taze hazırlandı). Hazırlanan tüpler vortekste karıştırılarak 540 nm'deki absorbansları belirlendi. Grafiğin yatay eksenine μg askorbik asit, dikey eksenine de absorbanslar yazılarak standart eğri çizildi (Şekil 3).



Şekil 3. C Vitamini Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik.

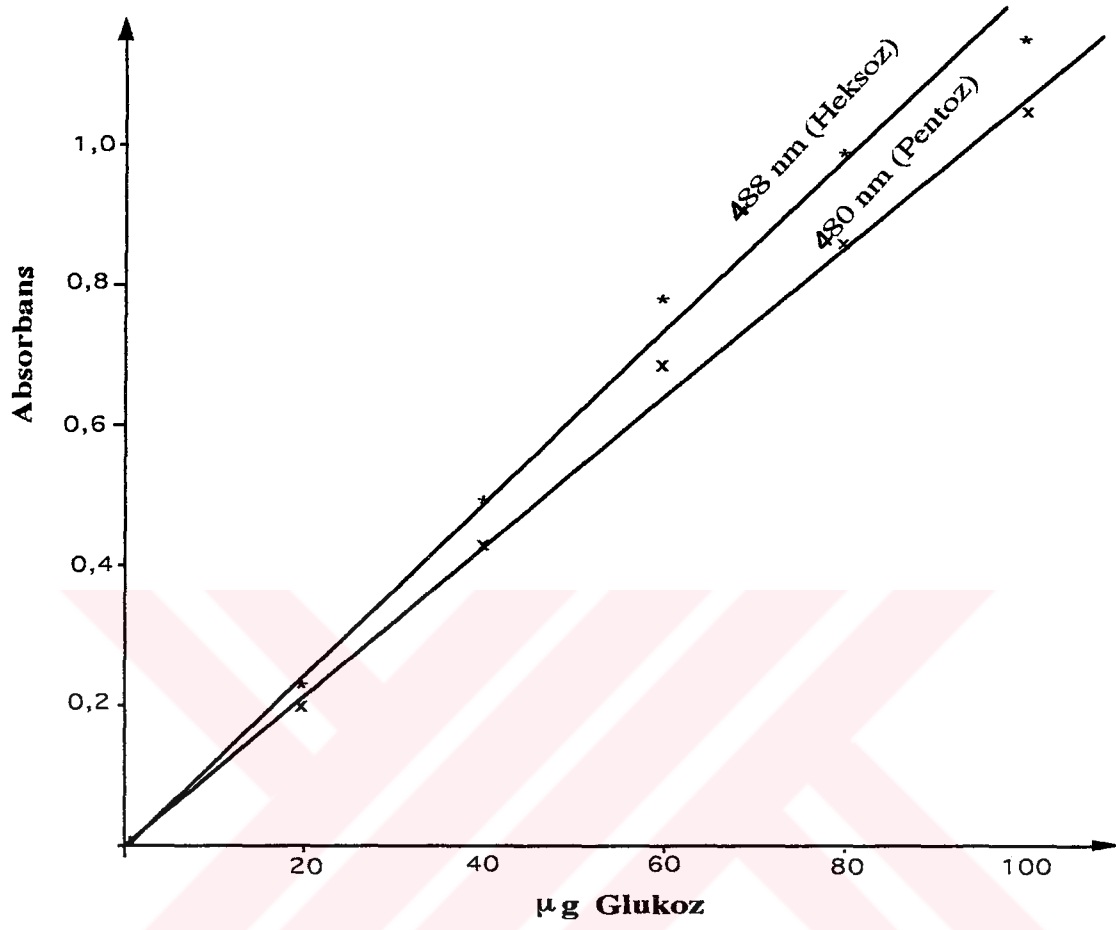
Meyvelerdeki C vitamini tayini için, 2 g karayemiş meyvesi 5 katı hacimdeki fosfat-sitrik asit tamponu içinde (pH 3, 0.01M) homojenize edilerek iki kat tülbentten süzüldü. Elde edilen süzüntü 5 dk 5000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı soğutucuya kondu. Daha sonra $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ solusyonu taze olarak hazırlandı. Soğutucudaki süpernatant çözeltisinden 0,1 ml alınarak 0,5 ml tampon ilave edildi ve 2,4 ml $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ solusyonundan da konularak toplam hacim 3 ml ye tamamlandı. Kör olarak 0,6 ml fosfat sitrik asit tamponu ve 2,4 ml $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ solusyonu ihtiva eden tüp kullanıldı ve 540 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Elde

edilen 540 nm'deki absorbanans değerleri standart grafikte yerine konularak, ekstraktaki askorbik asit miktarı bulundu ve bulunan bu değerler daha sonra "mg C vitamini (askorbik asit) / 100 g taze ağırlık" olacak şekilde ifade edildi.

2.6. Toplam Karbohidrat Tayini

Toplam karbohidrat tayini için Fenol-Sülfirik Metodu kullanıldı (62). Bunun için önce standart bir grafik çizildi (Şekil 4). Bu amaçla içerisinde 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g saf glukoz (0.01g/100 ml) ihtiva eden 1 ml'lik seri çözeltiler hazırlandı. Bütün tüplere 0,3 ml %5'lik fenol çözeltisinden katılarak karıştırıldı. Daha sonra aynı tüplere hızlıca 2 ml derişik sülfirik asit konulup, tüpler vortekslendi. Hazırlanan tüpler 15-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 480 nm'de pentozlar için, 488 nm'de heksozlar için spektrofotometrede ölçümler yapıldı. Apsise glukoz miktarları (μ g), ordinata da absorbanans değerleri yazılarak aynı grafik üzerinde 480 ve 488 nm'lere ait iki doğru çizildi.

Meyvelerden 2 g alınarak 10 ml saf su içerisinde bir havan yardımıyla ekstrakt çıkarıldı. İki kat tülbentten süzöldükten sonra, elde edilen süzöntü 3.000 rpm' de 5 dk. süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 0,01 ml alınıp, saf su ile hacim 1 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,3 ml %5'lik fenol çözeltisinden ve 2 ml derişik sülfirik asitten eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan tüpler 15-20 dk. bekletildi. Sonra tüplerin 480 ve 488 nm'lerde absorbanları okunarak, standart grafiğin ordinatına yazıldı. Standart grafikte bunların 480 ve 488 nm'lere ait doğruları kestiği yerlerden apsise indirildiğinde bulunan iki ayrı değer toplanarak ekstraktaki (0.01 ml) μ g toplam karbohidat miktarı hesaplandı. Bulunan bu değerler daha sonra "mg toplam karbohidrat / g taze ağırlık" olarak ifade edildi.



Şekil 4. Toplam Karbohidrat Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Karadeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren iki karayemiş kùltivarının (I. Kùltivar, II. Kùltivar) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşma periyodu boyunca PFO aktivitesindeki değışimler ile çözünebilir protein, C vitamini, fenolik madde, toplam karbohidrat miktarları araştırıldı. Ayrıca bu süreç içinde meyvelerdeki PFO izoenzimleri de belirlenmeye çalışıldı.

Yapılan gözlemler sonucu, iki kùltivardan birincisinin çiçeklenme döneminin Mart-Nisan ayları, ikinci kùltivarın çiçeklenme döneminin ise Nisan-Mayıs ayları olduğu tespit edildi. Aynı şekilde I. kùltivarda meyve olgunlaşma dönemi Temmuz ortası iken, II. kùltivarda Ağustos ortası olarak belirlendi. I. kùltivarın meyveleri olgunlukta koyu kırmızı iken, II. kùltivarın meyveleri ise olgunlukta morumsu siyah renktedir. Lezzet bakımından birincisi, ikincisine göre daha tatlı olup, ikincisi daha buruk bir tada sahiptir. Gelişme ve olgunlaşma dönemlerinde incelenen meyveler, 6. haftaya kadar gelişme dönemine dahil edilirken, bu hafta ile birlikte meyvelerde olgunlaşma safhası başladı. 5. haftanın sonlarında meyveler normal büyüklüklerine ulaştı ve olgunlaşma belirtisi olan meyve kabuğunda renklenme, etli kısımda yumuşama gibi özellikler, bu haftadan sonra görülmeye başlandı. Çalışmada kullanılan karayemiş kùltivarlarının meyvelerinde gelişme ve olgunlaşma dönemleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. İki Karayemiş Kùltivarının Gelişme ve Olgunlaşma Dönemleri.

Hafta	Gelişme Dönemi					Olgunlaşma Dönemi		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
I. Kùltivar	01.6.96	07.6.96	14.6.96	21.6.96	28.6.96	05.7.96	12.7.96	19.7.96
II.Kùltivar	27.6.96	04.7.96	11.7.96	18.7.96	25.7.96	01.8.96	08.8.96	15.8.96

3.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesindeki Değışimler

Genel bilgiler kısmında da belirtildiği gibi PFO genel bir enzim adı olup, etki ettiği fenolik substratlara göre farklı isimler almaktadır. Bu çalışmada aktivite tayini için substrat olarak L-dopa, katekol, kafeik asit kullanıldığından, bunlara etki eden enzimlerde sırasıyla dopa oksidaz, katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz olarak tanımlandı.

İki kültürde de gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca PFO aktivitelerine bakıldığında, en düşük aktivite değeri kafeik asit oksidazda, en yüksek aktivite değeri ise dopa oksidazda belirlendi. I. kültürün meyvelerinde (erken olgunlaşan form) dopa oksidaz aktivitesi ilk hafta 35,5 iken gelişme safhaları boyunca sürekli artarak, 5. haftada 87,3 ile en yüksek değerine ulaştı. Bu haftadan sonra aktivite değeri sürekli düşerek olgunlaşmanın son safhasında (8. hafta) 25,4 olarak tespit edildi (Tablo 3).

Katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz aktivitelerinin dopa oksidaz aktivitesine göre daha düşük değerlere sahip olduğu Tablo 3'de görülmektedir. Katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz aktiviteleri de ilk haftadan itibaren sürekli artarak, 6. haftada en yüksek değerlerine (sırasıyla 35,6 ve 14,3) ulaştı. Bu aktivite değerleri 6. haftadan sonra yine azalarak, olgunlaşmanın sonunda katekol oksidazın aktivitesi 12,7 ve kafeik asit oksidazın aktivitesi ise 1,7 olarak bulundu.

Tablo 3. I. Kültüvara Ait Karayemiş Meyvesinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca PFO Aktivitelerindeki Değişimler.

Enzimler	Enzim aktivitesi (EU/ml)							
	Gelişme ve olgunlaşma süreci (hafta)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dopa oksidaz	35,5 * (±4,6)	43,7 (±4,9)	50,6 (±5,6)	63,2 (±6,1)	87,3 (±8,2)	70,6 (±7,4)	40,7 (±3,8)	25,4 (±1,9)
Katekol oksidaz	12,0 (±2,1)	13,6 (±3,3)	15,0 (±4,1)	16,6 (±4,5)	28,5 (±4,8)	35,6 (±5,4)	23,4 (±4,6)	12,7 (±4,2)
Kafeik asit oksidaz	2,0 (±0,4)	2,6 (±0,5)	4,7 (±0,8)	5,6 (±0,9)	11,0 (±1,8)	14,3 (±2,7)	6,7 (±1,2)	1,7 (±0,4)

* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

İkinci kültüvara ait meyvelerin PFO aktivitelerinde de birinci kültüvara benzer değişimler tespit edildi. Aynı şekilde, ikinci karayemiş kültüründe de en yüksek aktivite değeri dopa oksidazda görülürken, en düşük aktivite değeri ise kafeik asit oksidazda tespit edildi (Tablo 4). Üç enzim aktivitesi de gelişme periyodunun son safhasına kadar (5.

hafta) sürekli artarken, olgunlaşma özelliklerinin başlamasıyla birlikte aktivite değerlerinde azalmalar kaydedildi. Bu azalma meyveler tamamen olgunlaşınca kadar devam etti. Örneğin, dopa oksidaz aktivitesi ilk hafta 23,7; 5. haftada 75,6 ve olgunlaşmanın son safhasında ise 29,6 olarak tespit edildi. Katekol oksidaz aktivitesi de ilk hafta 5,0; 5. haftada en yüksek değerine ulaşarak 45,5 ve son haftada ise 17,6 olarak bulundu. Aynı şekilde kafeik asit oksidaz aktivitesi de ilk hafta 1,7 iken 5. haftada 24,7; olgunlaşmanın son adımında ise 5,3 olarak tespit edildi.

Tablo 4. II. Kültivara Ait Karayemiş Meyvesinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca PFO Aktivitelerindeki Değişimler.

Enzim aktivitesi (EU/ml)								
Gelişme ve olgunlaşma süreci (hafta)								
Enzimler	1	2	3	4	5	6	7	8
Dopa oksidaz	23,7* (±3,85)	38,4 (±2,87)	42,5 (±4,68)	57,7 (±5,49)	75,6 (±7,82)	63,8 (±5,68)	35,3 (±4,28)	29,6 (±2,86)
Katekol oksidaz	5,0 (±0,82)	7,6 (±0,94)	9,0 (±0,85)	15,3 (±1,69)	45,5 (±3,49)	33,0 (±5,74)	21,0 (±4,7)	17,6 (±2,49)
Kafeik asit oksidaz	1,7 (±0,47)	2,0 (±0,52)	3,5 (±0,80)	13,2 (±1,82)	24,7 (±2,94)	20,0 (±3,2)	18,3 (±2,62)	5,3 (±1,21)

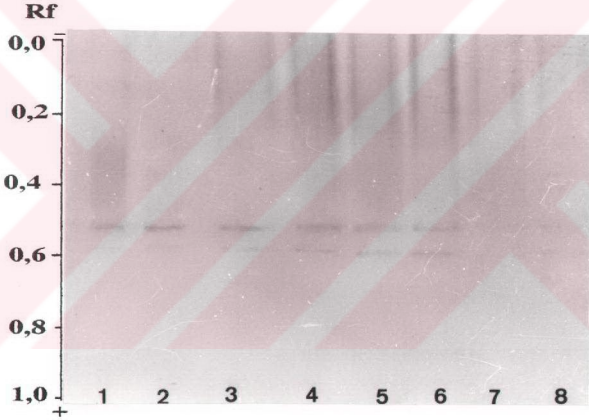
* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

Elde edilen bulgular, PFO aktivitesinin gelişme safhaları boyunca arttığını, olgunlaşma dönemlerinde ise azaldığını göstermiştir. Ayrıca I. kültürde dopa oksidaz aktivitesinin, II. kültüvare göre daha yüksek olduğu tespit edilirken, I. kültürde da kafeik asit oksidaz ve katekol oksidaz aktivitelerinin II. kültüvare göre daha düşük olduğu belirlendi.

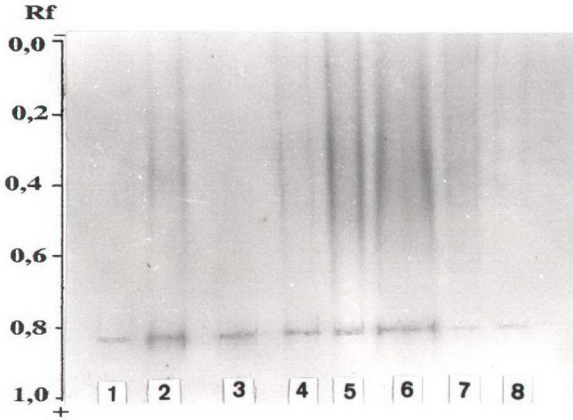
3.2. Polifenol Oksidaz İzoenzimlerindeki Değişimler

İzoenzim analizleri için yapılan elektroforez denemelerinde iki karayemiş kültüründen I. kültüvare ait meyvelerde gelişme ve olgunlaşma periyodu boyunca farklı aktivite gösteren iki izoenzim bandı ($R_f = 0,5 - 0,6$) (Şekil 5), II. kültüvare ait meyvelerde ise sadece bir izoenzim bandı ($R_f=0,8$) tespit edildi (Şekil 6). Her iki kültüvardaki izoenzim bandlarında en yüksek aktivite, 5. ve 6. haftalarda gözlemlendi. 6. haftadan sonra ise yani olgunlaşma safhaları süresince bu bandların aktiviteleri azaldı.

Ayrıca şekillerden de görülebileceği gibi II. kültüvarın meyveleri, I. kültüvarınkilere göre daha koyu renkli ve yüksek aktiviteli bandlar ihtiva etmektedir.



Şekil 5. I. Kültüvare Ait Karayemiş Meyvesinin PFO İzoenzimlerinin %8 'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezi. Şekil Üzerindeki Rakamlar Meyvelerin Gelişme ve Olgunlaşma Süreci İçindeki Haftalarını Göstermektedir.



Şekil 6. II. Kültüvara Ait Karayemiş Meyvesinin PFO İzoenzimlerinin %8 'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezi. Şekil Üzerindeki Rakamlar Meyvelerin Gelişme ve Olgunlaşma Süreci İçindeki Haftalarını Göstermektedir.

İki karayemiş kültürünün farklı R_f değerine sahip PFO (dopa oksidaz) izoenzimleri ihtiva etmesi, bu izoenzimlerin farklı molekül ağırlığa sahip olduğunu göstermektedir.

3.3. Çözünabilir Protein Miktarındaki Değişimler

Çözünabilir protein miktarında meyve gelişimi ve olgunlaşması süresince her iki kültürde de önemli değişimler görüldü. Tablo 5'den de görüleceği gibi bu değişim sürekli bir artış şeklindedir. Örneğin I. kültürde ilk hafta 0,140 mg/g olan protein miktarı, olgunlaşmanın sonunda önemli derecede artarak 0,928 mg/g'a kadar yükselmiştir.

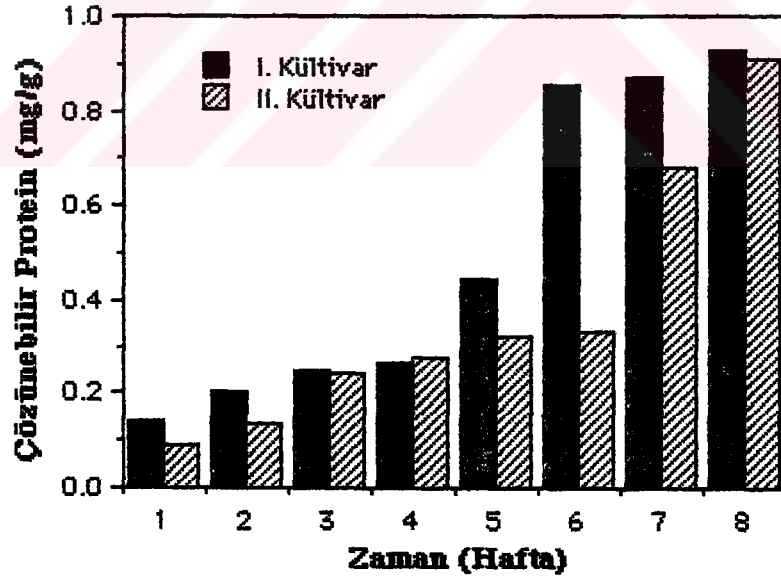
Aynı şekilde II. kültürün ilk hafta 0,091 mg/g olan protein içeriği son hafta 0,917 mg/g olarak tespit edildi (Tablo 5). I.kültürde bu süreç sonunda çözünabilir protein miktarında yaklaşık 6,6 kat'lık bir artış olduğu belirlendi. II. kültürde ise bu değer 10 katlık bir artışa karşılık gelmektedir.

Tablo 5. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Çözünabilir Protein Miktarındaki Değişimler.

Çözünabilir Protein Miktarı (mg/g)		
Gelişme ve Olgunlaşma Süreci (hafta)	I. Kültivar	II. Kültivar
1	0,140±0,02 *	0,091±0,01
2	0,200±0,02	0,133±0,02
3	0,246±0,06	0,239±0,02
4	0,264±0,04	0,273±0,04
5	0,446±0,09	0,319±0,06
6	0,852±0,18	0,333±0,06
7	0,871±0,22	0,678±0,12
8	0,928±0,16	0,917±0,17

* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

İki kültivarın meyvelerinin çözünabilir protein miktarları bakımından karşılaştırılması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Çözünabilir Protein İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.

3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler

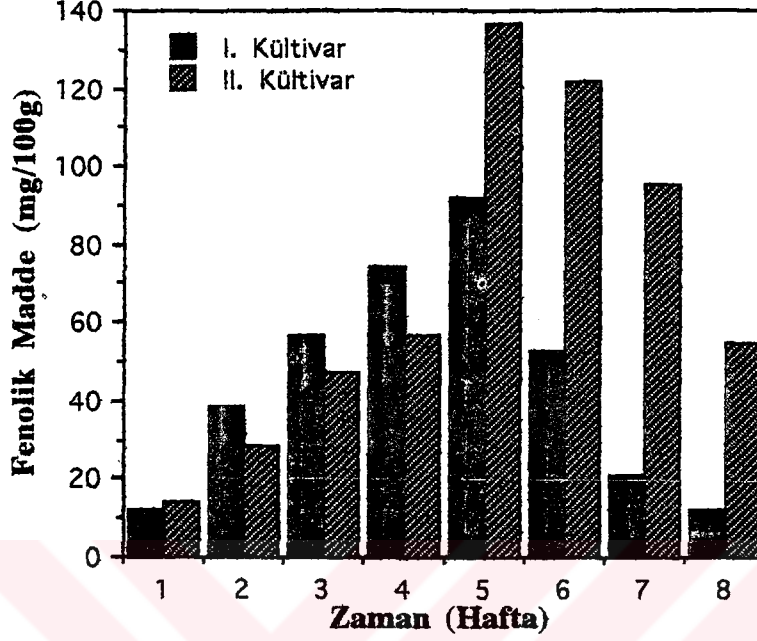
Karayemiş meyvesinde gelişme ve olgunlaşma safhaları boyunca toplam fenolik madde miktarında da önemli değişimler tespit edildi, İki karayemiş formunda da fenolik madde miktarı, meyve gelişimi boyunca artarken, olgunlaşma süresince azalmıştır. I. kültivarın meyvelerinde ilk hafta 12,3 mg/100 g olan fenolik madde miktarı, meyve gelişimi boyunca sürekli artarak, gelişmenin son safhasında (5. hafta) en yüksek değeri olan 92,0 mg/100g'a ulaştı. Bu haftadan sonra olgunlaşma safhaları boyunca sürekli azalarak son hafta 11,9 mg/100g olarak tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler.

Fenolik Madde Miktarı (mg/100 g)		
Gelişme ve Olgunlaşma Süreci (hafta)	I. Kültivar	II. Kültivar
1	12,3±1,25*	14,5±1,27
2	38,5±2,66	28,3±3,82
3	57,0±3,70	47,4±5,54
4	74,1±4,21	56,8±5,20
5	92,0±4,50	136,4±12,4
6	52,6±3,84	121,7±10,6
7	21,0±2,57	95,7±8,75
8	11,9±2,38	54,8±7,52

* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

Benzer olarak II. kültivarda ilk hafta 24,5 olan fenolik madde miktarı gelişmenin son safhasında 136,4 mg/100g'a yükseldi ve bu safhadan sonra sürekli azalarak olgunlaşmanın son haftasında ise 54,8 mg/100g olarak tespit edildi (Tablo 6). Fenolik madde miktarındaki bu değişimler PFO aktivitelerindeki değişimlerle paralellik arz etmektedir. Meyvelerin toplam fenolik madde içeriklerinin gelişme ve olgunlaşma dönemleri boyunca gösterdiği değişimlerin karşılaştırılması Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. İki Karayemiş Kùltivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Fenolik Madde İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.

3.5. C Vitamini Miktarındaki Değişimler

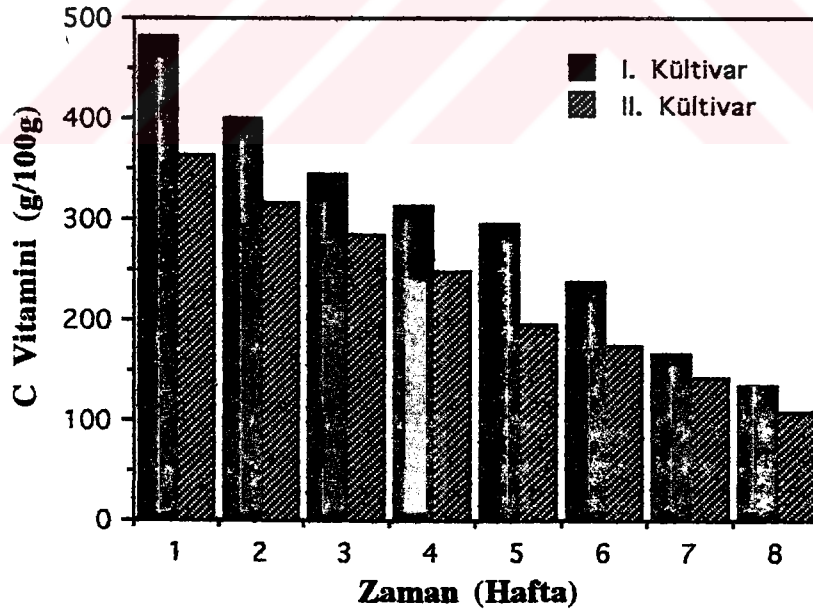
Yapılan analizler sonucunda gelişme ve olgunlaşma safhaları süresince iki karayemiş kùltivarının meyvelerin C vitamini içeriğinde sürekli bir azalma olduğu kaydedildi. Tablo 7'den de görüleceği gibi I. kùltivarda ilk hafta 481 mg/100g olan C vitamini içeriği, sürekli azalarak olgunlaşmanın sonunda 133 mg/100g'a düştü. II. kùltivarın meyvelerinde ise ilk hafta 363 mg/100g olan C vitamini miktarı, yine önemli derecede azalarak son haftada 108,6 mg/100g olarak tespit edildi. Bu 8 haftalık süreç sonunda C vitamini miktarında I. kùltivarın meyvelerinde %72, II. kùltivarın meyvelerinde ise %70 oranında bir azalış olduğu belirlendi.

Tablo 7. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca C Vitamini Miktarındaki Değişimler.

C vitamini Miktarı (mg/100 g)		
Gelişme ve Olgunlaşma Süreci (hafta)	I. Kültivar	II. Kültivar
1	481,0±13,8*	363,0±17,7
2	400,0±14,5	315,0±14,3
3	344,0±18,2	283,3±16,2
4	312,0±16,5	248,2±14,8
5	296,0±18,2	195,6±15,6
6	238,0±17,4	173,5±13,8
7	167,0±18,5	141,2±12,1
8	133,0±16,5	108,6±11,7

* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

Ayrıca I. kültivar meyvelerinin II. kültivar meyvelerine göre daha fazla C vitamini içerdiği Şekil 9'dan da anlaşılmaktadır.



Şekil 9. İki Karayemiş Kültivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca C Vitamini İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.

3.6. Toplam Karbohidrat Miktarındaki Değişimler

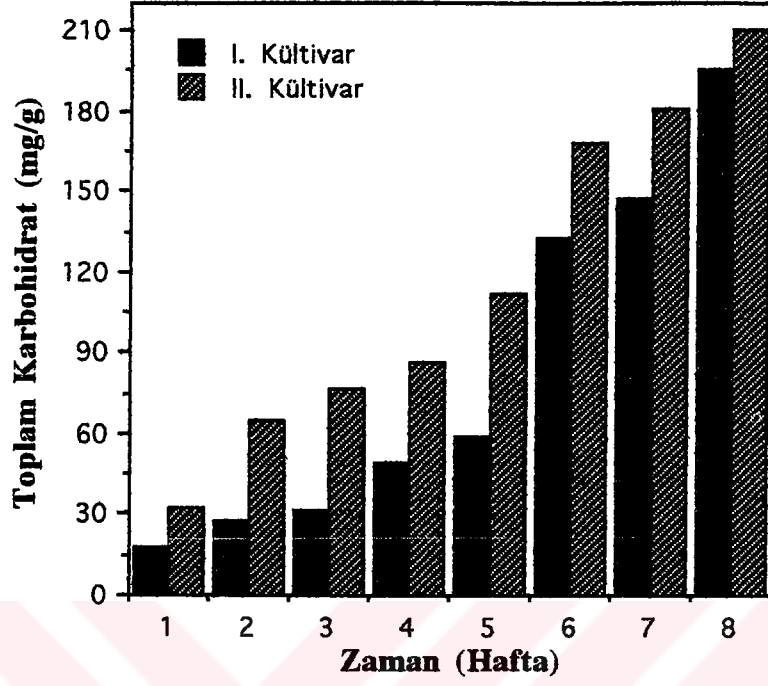
Tablo 8'de iki karayemiş kùltivarının meyvelerinin toplam karbohidrat miktarlarında, gelişme ve olgunlaşma periyodlarında meydana gelen değişimler görölmektedir. C vitaminin aksine meyvelerin karbohidrat miktarında bu periyodlar boyunca sürekli bir artış olduğu tespit edildi.

Tablo 8. Karayemiş Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Karbohidrat Miktarındaki Değişimler.

Gelişme ve Olgunlaşma Süreci (hafta)	Toplam Karbohidrat Miktarı (mg/g)	
	I. Kùltivar	II. Kùltivar
1	17,8±0,85*	32,5±4,41
2	27,3±2,25	65,2±3,68
3	31,8±0,73	76,5±5,12
4	49,5±1,08	89,6±8,53
5	59,2±2,78	112,0±10,5
6	132,5±11,5	167,5±15,8
7	147,4±14,2	180,3±12,7
8	195,7±15,1	210,0±10,9

* Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması.

Tablodan da görülebileceği gibi, I. kùltivarın meyvelerinde ilk hafta 17,8 mg/g olarak tespit edilen karbohidrat miktarı olgunlaşmanın sonunda önemli derecede artarak 195,7 mg/g'a yükseldi. Bu değer yaklaşık 11 katlık bir artışa karşılık gelmektedir. Aynı şekilde II. kùltivarda ilk hafta 32,5 mg/g olan karbohidrat miktarı son hafta 210 mg/g olarak belirlendi. Buradaki artışın yaklaşık 6,5 kat olduğu tespit edildi. Özellikle meyvelerin olgunlaşma özelliklerinin görölmeye başladığı 6. haftada karbohidrat miktarlarında önemli artışlar kaydedildi. Şekil 10'da ise her iki kùltivarın meyvelerinin gelişme ve olgunlaşma dönemleri boyunca toplam karbohidrat miktarları bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 10. İki Karayemiş Kùltivarının Meyvelerinde Gelişme ve Olgunlaşma Süreci Boyunca Toplam Karbohidrat İçeriğinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması.

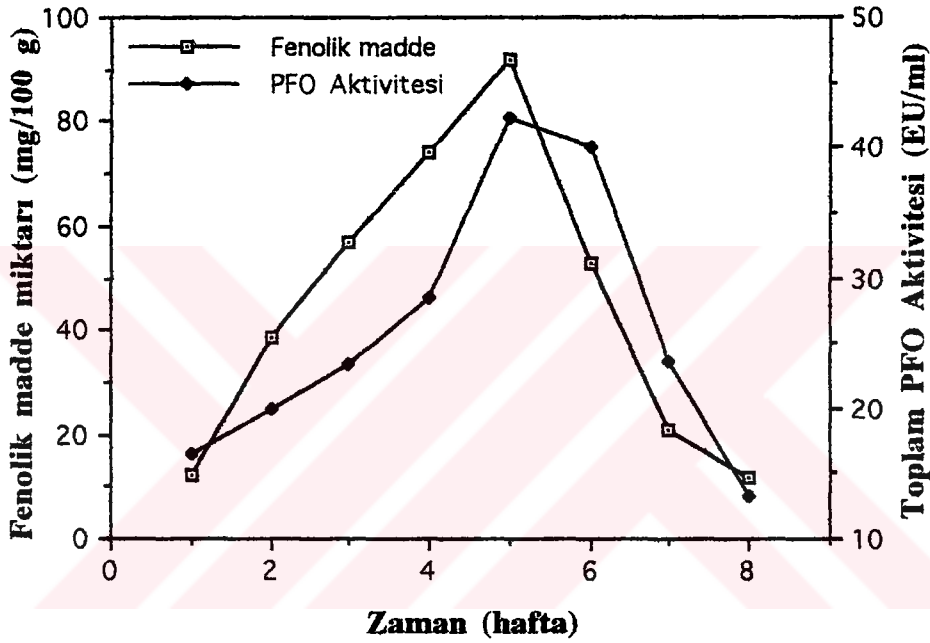
4. TARTIŞMA

Elde edilen bulgular karayemiş meyvesinin oldukça zengin bir kimyasal içeriğe sahip olduğunu göstermektedir. Polifenol oksidaz enziminin gelişme ve olgunlaşma periyodları boyunca bu meyvede gösterdiği aktivite değişimleri literatürdeki diğer meyvelerde yapılan çalışmalarla benzerlik teşkil etmektedir. İki kültürün meyvelerinden elde edilen sonuçlara göre PFO aktivitesi meyve gelişimi süresince devamlı artarken, olgunlaşma safhalarında aktivite değerlerinde sürekli bir azalma olmuştur. Kumar ve arkadaşlarının (8) iki elma kültüründe yaptıkları çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir. Bu çalışmada olgunlaşma öncesi ve olgunlaşma basamakları arasında elmada PFO aktivitesinde artış olduğu, olgunlaşmayla birlikte aktivitede azalma görüldüğü belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise, RI Greening ve Cortland elmalarında olgunlaşmanın erken safhalarında PFO aktivitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (9). Karayemiş meyvesinden elde edilen sonuçlar bu konuda diğer meyvelerden elde edilen çalışmalarla paralellik göstermektedir (27, 29).

Çalışmamızda iki karayemiş kültüründen birincisinde (erken olgunlaşan form) meyve gelişimine ve olgunlaşmasına bağlı olarak farklı aktivite gösteren iki izoenzim bandı belirlendi. II. kültürde (geç olgunlaşan form) ise bu süreç boyunca sadece tek bir izoenzim bandı görüldü. Bandların aktiviteleri, gelişmenin erken safhalarıyla olgunlaşma adımlarında (7. ve 8. hafta), diğer adımlardakinden çok daha düşük bulundu. Bu sonuç, Mayer ve Harel'in (5) meyvelerde gelişme sürecinin izoenzim aktivitesini etkilediği görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, PFO izoenzimlerinin sayısının da bitki türüne ve çeşidine göre farklılık gösterdiği de bilinmektedir (43, 44, 45). İki karayemiş kültürüne ait meyvelerde izoenzim sayısının ve R_f değerlerinin birbirinden farklı olması ise, izoenzim sayısının ve özelliklerinin meyve türüne, çeşidine ve hatta kültürüne bağlı olduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca karayemiş çeşitlerinde PFO izoenzimlerinin farklı olmasını, çeşitlerin genetik yapılarına bağlayabiliriz. Çünkü her bitki çeşidinin kendine özgü izoenzimler gösterdiği bilinmektedir (49). Bu durum kültürlerin birbirinden ayırılmasında taksonomik açıdan da yararlı bir yöntem olarak kullanılmasına imkan sağlayacaktır.

Polifenol oksidazın substratı olan fenolik bileşiklerin miktarı da PFO aktivitesindeki değişimlere benzer şekilde, iki kültürde da meyve gelişimi süresince artarken, olgunlaşma safhalarında ise azalmıştır. Polifenol

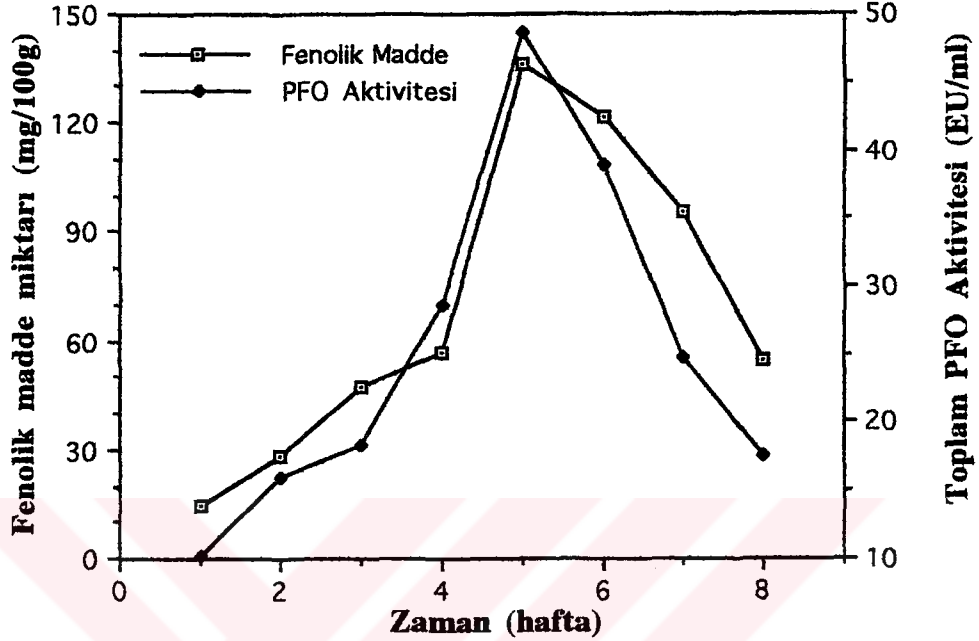
oksidaz aktivitesi ile fenolik madde miktarı arasında yüksek pozitif korelasyonlar kaydedilmiştir. Örneğin I. kültivarda fenolik madde miktarı ile toplam PFO aktivitesi arasında $r=+0,84$; II. kültivarda ise $r=+0,93$ gibi yüksek korelasyonlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar karayemiş meyvesinde PFO aktivitesi ile fenolik bileşikler arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. İki kültivarin gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca fenolik madde miktarı ile toplam PFO aktivitesindeki değişimleri arasındaki benzerlik Şekil 11 ve Şekil 12'de görülmektedir.



Şekil 11. I. Kùltivarin Meyvelerinde Toplam PFO Aktivitesi ile Fenolik Madde Miktarı Arasındaki İlişki.

Bu şekilde polifenol oksidazın etkileştiği substratlara bağılı olarak aktivite değişimi gösterdiği çeşitli araştırmalarla da ortaya konmuştur. Örneğin, Kumar (27) tarafından şeftalilerde yapılan bir çalışmada meyve gelişiminin ve büyümesinin başlangıç periyodları boyunca fenolik içerik ve PFO aktivitesinin arttığı, meyve normal büyüklüğüne ulaşıncaya kadar fenolik içeriğinin artmaya devam ettiği rapor edilmiştir. İsrail'de yapılan bir çalışmada, üzümün olgunlaşması sırasında hem PFO aktivitesinin hem de fenolik madde miktarının azaldığı belirlenmiştir (25). Vamos-Vigyazo ve ark. (63, 64) elmalarda ve kayısılarda yaptıkları araştırmalarda, PFO

aktivitesi ile fenolik madde miktarı arasında pozitif ilişkiler tespit etmişlerdir.



Şekil 12. II. Kültivarin Meyvelerinde Toplam PFO Aktivitesi İle Fenolik Madde Miktarı Arasındaki İlişki.

Yine patatesten yapılan bir çalışmada da fenolik madde miktarı ile PFO aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (14). Gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca PFO aktivitesinin fenolik madde miktarına paralel değişimler göstermesi şu şekilde açıklanabilir: Bilindiği gibi birçok meyvede ve karayemişte olgunlaşma öncesi meyvelerin ağzı burucu ve acı tadları vardır. Meyvelerin bu tadları ihtiva ettikleri fenolik bileşiklerden (dihidroksifenoller) kaynaklanmaktadır. Olgunlaşma ile birlikte fenolik bileşiklerin konsantrasyonunun azaldığı veya başka bileşiklere (antosiyantinler) dönüşümlerinin olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (51, 52). Karayemiş meyvelerinde de olgunlaşmayla birlikte fenolik madde içeriğinde azalma olmasını, bu araştırmacıların tespitlerine bağlayabiliriz. Fenolik bileşiklerin miktarında meydana gelen böyle bir azalma ise, bu bileşikleri substrat olarak kullanan polifenol oksidaz aktivitesinin de azalmasına neden olabilir.

Yapılan C vitamini analizleri sonucunda, iki karayemiş kùltivarında da gelişme ve olgunlaşma boyunca bu parametrenin miktarında sürekli bir azalma olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar çeşitli literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Örneğin, Fuke ve Matsuoka (53) kivi meyvesinin büyüme ve gelişme adımlarında C vitamininin azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca Japonya'da yapılan bir çalışmada ise hurma meyvelerinin askorbik asit içeriğinin meyve gelişmesi süresince sürekli azaldığı tespit edilmiştir (65). Öte yandan elde edilen sonuçlar karayemiş meyvesinin C vitamini yönünden bazı meyvelere göre daha zengin olduğunu da göstermektedir. Örneğin en çok tüketilen bazı meyvelerin C vitamini içerikleri şöyledir; elmada 3-25 mg/100g, muzda 10-15 mg/100g, mandalinada 30-32 mg/100g, portakalda 30-65 mg/100g, limonda 30-55 mg/100g, armutta 15 mg/100g, çilekte 50 mg/100g (65). Karayemiş meyvesinin ise 108,6-130 mg/100g C vitamini ihtiva ettiği bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir.

Çalışmamızın diğeri bir kısmında ise, karayemiş meyvelerinde gelişmenin başlangıcından olgunlaşmanın son adımına kadar toplam karbohidrat içeriklerinde sürekli bir artış olduğu belirlenmiştir. Meyvelerin olgunlaşma ile birlikte tatlanmasının, şeker içeriğinin artmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Literatürde çeşitli meyvelerin sukroz, fruktoz, glukoz, toplam şeker ve indirgen şeker içerikleriyle ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örneğin incir meyvelerinin gelişmesi boyunca sukroz, fruktoz, glukoz konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir (55). Yine tropik kökenli papaya (*Carica papaya* cv. Ranchi) meyvelerinin gelişme ve olgunlaşması sırasında önemli şekilde indirgen ve toplam şeker miktarlarının arttığı rapor edilmiştir (67). Meyvelerin olgunlaşma ile tatlanması ihtiva ettikleri çözünebilir şekerlerle ilişkilidir. Çünkü olgunlaşma belirtisi olan tatlanma depo maddesi olan nişastanın yıkıma uğrayarak, çözünebilir şekerlere dönüşümünden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda da toplam çözünebilir şeker miktarındaki artışın bu nişasta yıkımından dolayı olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Analizler sonucunda karayemiş meyvesinin yaklaşık %19,5 (I. kùltivar)-%21 (II. kùltivar) oranında toplam şeker içerdiği de tespit edilmiştir. Bu değerler özellikle karayemiş ile aynı familyadan olan bazı meyvelerle karşılaştırma yapma bakımından önemlidir. Örneğin elmada %9, kirazda %9, armutta %10 (66), kuşburnunda %16,2, böğürtlende %11,9 ve alıçta %14,7 (68) oranında toplam şeker olduğu bilinmektedir.

Görüldüğü gibi karayemiş meyveleri toplam şeker bakımından da çoğu meyveye göre daha zengindir. Bu sonuçlar karayemiş meyvelerinin gıda değeri bakımından önemli olduğunu göstermektedir.



5. SONUÇLAR

Sonuç olarak bu çalışmada;

1) İki karayemiş kùltivarının meyvelerindeki PFO aktivitesinin, literatür bilgileriyle uyumlu olarak, meyve büyümesi ve gelişmesi süresince arttığı, olgunlaşma safhalarında ise azaldığı tespit edilmiştir. Her iki kùltivarda da en yüksek aktivite dopa oksidazda, en düşük aktivite ise kafeik asit oksidazda kaydedilmiştir.

2) Yapılan izoenzim analizlerinde ise, iki kùltivarın meyvelerinin farklı özellikte ve sayıda PFO (dopa oksidaz) izoenzimi içerdiği tespit edilmiştir. I. kùltivarda iki, II. kùltivarda ise bir izoenzim bandı belirlenmiştir. İzoenzimlerin aktiviteleri de gelişme ve olgunlaşma periyodlarında farklılıklar göstermiştir.

3) Ayrıca meyvelerin çözünebilir protein ve toplam karbohidrat içeriklerinin gelişme ve olgunlaşma periyodları boyunca sürekli arttığı, toplam fenolik madde miktarının PFO aktivitesindeki değişimlerle benzerlik gösterdiği, meyvelerin C vitamini içeriklerinin ise sürekli olarak azaldığı tespit edilmiştir.

4) Yine yapılan tayinler sonucunda karayemiş meyvelerinin diğer meyvelere göre çok daha zengin C vitamini ve toplam karbohidrat içeriğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

6. ÖNERİLER

Daha öncede belirtildiği gibi, karayemiş Türkiye'nin çeşitli yerlerinde ve özellikle Karadeniz Bölgesi'nde kolayca yayılış gösteren bir bitkidir. Ancak ülkemizde yetişen karayemiş meyvelerinin gelişme ve olgunlaşma süreci boyunca kimyasal içeriğiyle ve polifenol oksidazın bu meyvedeki özellikleri ile ilgili herhangi bir bilgi mevcut olmadığından bu çalışma literatüre orjinal katkılar sağlama özelliğindedir. Yapılan bu çalışma sonucunda, iki karayemiş kültürünün meyvelerindeki PFO enziminin aktivite değişimleri ve izoenzimleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, hem diğer meyvelerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış hem de enzimle ilgili ileride yapılması düşünülen kinetik çalışmalara öncülük etmiştir. Karayemiş bitkisinin yabani ve kültür formlarının sistematigi ile ilgili çalışmalarda bu bilgilerin değerlendirilmesinin büyük faydalar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Yine bu çalışma ile karayemiş meyvesinin bazı organik madde içeriğinin belirlenmesiyle diğer meyvelerle karşılaştırma ve insanlara bilinçli olarak sunulabilme imkanı ortaya çıkarılmıştır. Bölgemizin ekolojik şartlarında yetiştirilmesi oldukça kolay olan bu bitkinin meyvelerine ait kimyasal içerik iyi bilinmediğinden, kültür formlarının artırılması ve yaygınlaştırılması konusunda önemli bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma ile, sözkonusu bitkinin daha da yaygınlaştırılması için, yeni projelere destek vereceği, bu meyvenin kültür formlarının artırılmasına yardımcı olacağı ve yetiştirilen bölgedeki insanlar için geçim kaynağı olacağı umulmaktadır.

Ayrıca daha sonraki çalışmalar için meyvelerin işlenmesi sırasında önemli bir problem olarak karşımıza çıkacak olan enzimatik esmerleşme reaksiyonunun kontrolü için çeşitli yöntemlerin kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bunlardan biri olan bitkisel hormonların kullanılmasıyla PFO enziminin aktivitesinde değişmeler sağlanarak, meyvenin ağızda meydana getirdiği burukluğun azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu şekilde meyvenin tadının iyileştirilmesiyle, daha geniş boyutlarda tüketilmesi sağlanmış olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Davis, P.H., Flora of Turkey, Vol. 4, Edinburg Univ. Press., Edinburg, 1972.
2. Gogolishvili, Z.M., Study of Sylvan Cherry Laurel Fruit, Trudy. Gruzinskii Nauchno Issledovatel'skii Institut., 5 (1971) 133-136.
3. Romeo Rodriguez, M.A., Vazquez Oderiz, M.L., Lopez Henandez, J. ve Simal-Lazano, J., Studies on Chemical Composition, Physical Characteristics and Maturity Indices of Cherry Laurel (*Prunus laurocerasus* L.) and Elderberries (*Sambucus nigra* L.), Indust. Alimentari, 31 (1992) 911-912.
4. Mikeladze, G.G. ve Kutateladze, L.L., Clarification of Fruit and Berry Juices by Enzymic Hidrolysis of Protein Compounds, Trudy. Gruzinskii Nauchno Issledovatel'skii Institut., 5 (1971) 207-210.
5. Mayer, A.M. ve Harel, E., Polyphenol Oxidases in Plants, Phytochemistry, 18 (1979) 193-215.
6. Vamos-Vigyazo, L., Polyphenol Oxidases and Peroxidase in Fruits and Vegetables, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 15 (1981) 49-127.
7. Flurkey, W.H. ve Jen, J.J., Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Developing Peaches, J. Food Sci., 43 (1978) 1826-1831.
8. Kumar, S., Sharma, T.R. ve Goswami, A.K., Changes in Total the Phenolic Content and in the Activities of Some Oxidoreductive and Hydrolytic enzymes in Relation to Development and Ripening of Apple, Proceedings of the National Symposium on Temperate Fruits, March 1984, Himachal, Himachal Paradesh Agricul.Univ., 247-250.
9. Coseteng, M.Y. ve Lee, C.Y., Changes in Apple Polyphenol Oxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning, J. Food Sci., 52 (1987) 985-988.
10. Alpınar, K. ve Yazıcıoğlu, E., Taflan "*Laurocerasus officinalis* Roemer" Meyveleri Üzerinde Farnosotik Botanik Yöntünden Bir Araştırma, 9. Bitkisel İlac Hammaddeleri Toplantısı, Mayıs 1991, Eskişehir, Bildiriler Kitabı, Cilt 1, 275-281.

11. Komarov, V.L., Flora of the U.S.S.R., Botanical Institute of the Academy of Science of the U.S.S.R., Moskova, 1941.

12. Ponting, J.D., The Control of Enzymatic Browning of Fruits. , Schultz, H.W., Ed. Avi. Publ., New York, 1960.

13. Mathew, A.G. ve Parpia, H.A.B., Food Browning as a Polyphenol Reaction, Adv. Food Res., 19 (1971) 75-145.

14. Kocaçalışkan, İ., Patateste Yumru Gelişim Sürecine Bağlı Olarak Bitki Hormonlarının Polifenol Oksidaz Enzimi ve Enzimatik Kararma Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, 1986.

15. Keleş, F., Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerinde Araştırmalar. I. Genel Özellikler, Doğa Tar. Or. Dergisi., 10 (1986) 224-234.

16. Keleş, F., Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerinde Araştırmalar. II. Substrat Spesifikliği, Doğa Tar. Or. Dergisi., 11 (1987) 1-6.

17. Sciancalepore, V. ve Longone, V., Polyphenol Oxidase Activity and Browning in Green Olives, J. Agric. Food Chem., 32 (1984) 320-321.

18. Tolbert, N.E., Activation of Polphenol Oxidase of Chloroplasts, Plant Physiol., 51 (1973) 234-244.

19. Hutcheson, S.W. ve Buchanon, B.B., Polyphenol Oxidation by Chloroplast Membranes, Plant Physiol., 66 (1980) 1150-1155.

20. Parish, R.W., The Intracellular Location of Polyphenol Oxidases and Peroxidase in Stems of Spinach Beet (*Beta vulgaris* L.), Z. Pflanzenphysiol., 66 (1972) 176-188.

21. Sidding, M., Sinha, N.K. ve Cash, J.N., Characterization of Polyphenol Oxidase from Stanley Plums, J. Food Sci., 57 (1992) 1177-1179.

22. Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C. ve Constantinides, S.M., Isolation, Purification and Physicochemical Characterization of Polyphenoloxidases (PPO) from a Dwarf Variety of Banana (*Musa cavendishii*, L.), J. Food Sci., 46 (1981) 150-155.

23. Van-Leylved, J.L., Gerrish, C. ve Dixon, R.A., Enzyme Activities and Polyphenols Related to Mesocarp Discoloration of Avocado Fruit, Phytochemistry, 23 (1984) 1531-1534.

24. Vamos-Vigyazo, L., Mihalyi, K., Gajzago, I., Hamori-Szabo, J. ve Sass, P., Changes in the Polyphenol-Polyphenol Oxidase Complex of During Ripening and Storage, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 9 (1985) 37-42.

25. Kidron, M., Harel, E. ve Mayer, A.M., Catechol Oxidase Activity in Grapes and Wine, Am. J. Enol. Vitic., 29 (1978) 30-35.

26. Weaver, C. ve Charley, H., Enzymatic Browning of Ripening Bananas, J. Food Sci. 39 (1974) 1200-1202.

27. Kumar, S., Changes in Phenolic Content and Polyphenol Oxidase Activity in Developing Peach (*Prunus persica* Batsch) Fruits, Plant Physiol. Biochem., 14 (1987) 131-135.

28. Cutting, J.G.M., Boer, J.P., Wolstenholme, B.N. ve Hofman, P.J., Changes in ABA, Polyphenol Oxidase, Phenolic Compounds and Polyamines and Their Relationship with Mesocarp Discolouration in Ripening Avocado (*Persea americana* Mill.) Fruit, J. Horticultural Sci., 65 (1990) 465-471.

29. Lima de Oliveira, S., Barbosa -Guerra, N., Sucupina-Macrel, M.I. ve Souza-Livera, A.V., Polyphenol Oxidase Activity, Polyphenol Concentration and Browning Intensity During Soursop (*Annona muricata* L.) Maturation, J. Food Sci., 59 (1994) 1050-1052.

30. Underhill, S.J.R. ve Critchley, C., The Physiology and Anatomy of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) Pericarp During Fruit Development, J. Horticultural Sci., 67 (1992) 437-444.

31. Wesche-Ebeling, P. ve Montgomery, M.W., Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization, J. Food Sci., 55 (1990) 1315-1319.

32. Murata, M., Kurokami, C. ve Homma, S., Purification and Some Properties of Chlorogenic Acid Oxidase from Apple (*Malus pumila*), Biosci. Biotech. Biochem., 56 (1992) 1705-1710.

33. Cheynier, V., Osse, C. ve Rigaud, J., Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions, J. Food Sci., 53 (1988) 1729-1732.

34. Mason, H.S., Comparative Biochemistry of the Phenolase Complex, Adv. Enzymol., 16 (1955) 105-184.

35. Whitaker, J.R., Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker Inc., New York, 1972 .

36. Mason, H.S., Structures and Functions of the Phenolase Complex, Nature, 177 (1956) 78-81.

37. Gordon, S.A. ve Paleg, L.G., Formation of Auxin from Tryptophan Through Action of Polyphenols, Plant Physiol., 36 (1961) 838-845.

38. Marbach, I. ve Mayer, A.M., Changes in Catechol Oxidase and Permeability to Water in Seed Coats of *Pisum elatius* During Seed Development and Maturation, Plant Physiol., 56 (1975) 93-96.

39. Bidwel, R.G.S., Plant Physiology, MacMillan Publishing Co., New York, 1979.

40. Mayer, A.M., Polyphenol Oxidases in Plants. Recent Progress, Phytochemistry, 26 (1987) 11-20.

41. Markakis, P., Anthocyanins and Their Stability in Foods, Crit. Rev. Food Technol., 4 (1974) 437-450.

42. Şakiroğlu, H., Kuşburnu Meyvesinden İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, 1994.

43. Wong, T.C., Luh, B.S. ve Whitaker, J.R., Effect of Phloroglucinol and Resorcinol on the Cilingstone Peach Polyphenol Oxidase-Catalysed Oxidation of 4-Methylcatechol, Plant Physiol., 48 (1970) 24-30.

44. Wisseman, K.W. ve Montgomery, M.W., Purification of d' Anjou Pear (*Pyrus communis* L.) Polyphenol Oxidase, Plant Physiol., 78 (1985) 256-262.

45. Park, E.Y. ve Luh, B.S., Polphenol Oxidase of Kiwifruit, J. Food Sci., 50 (1985) 678-684.

46. Oktay, M., Amasya Elmasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 1992.

47. Taneja, S.R. ve Sachar, R.C., Effect of Auxin on Multiple Forms of o-Diphenolase in Germinating Wheat Embryos, Phytochemistry, 16 (1977) 871-873.
48. Matheis, G. ve Belitz, H.M., Multiple Forms of Soluble Monophenol, Dihydroxyphenylalanine: Oxygen-Oxidoreductase (E.C.1.14.18.1) from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*), Z. Lebensm Unters Forsch., 157 (1975) 221-227.
49. Constantinides, S.M. ve Bedford, C.C., Multiple Forms of Phenol Oxidase, J. Food Sci., 32 (1967) 446-450.
50. Paulson, A.T., Vanderstoep, J. ve Eaton, G.W., Enzymatic Browning of Peaches: Effect of Gibberellic Acid and Ethephon on Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity, J. Food Sci., 45 (1980) 341-345.
51. Harel, E., Mayer, A.M. ve Shain, Y., Catechol Oxidases Endogenous Substrates and Browning in Developing Apples, J. Sci. Food Agric., 17 (1966) 389-393.
52. Kolesnik, A., Elizarova, L.G., Starodutsteva, T.V., Afanasyeva, V.S. ve Erokhina, T.S., Changes in Polyphenols During Storage of Fruits and Vegetables, Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 13 (1977) 333-336.
53. Fuke, Y. ve Matsuoka, H., Changes in Content of Pectic Substances, Ascorbic Acid and Polyphenols and Activity of Pectinesterase in Kiwi Fruit During Growth and Ripening After Harvest, J. Japanese Soci. Food Sci. Tech., 31 (1984) 31-37.
54. Salmah, Y. ve Suhaila, M., Physico-chemical Changes in Guava (*Psidium guajava* L.) During Development and Maturation, J. Sci. Food Agric., 38 (1987) 31-39.
55. Tsantili, E., Changes During Development of "Tsapela" Fig Fruits, Scientia Horticulturae, 44 (1990) 227-234.
56. Al-Niami, J.H., Saggar, R.A.M. ve Abbas, M.F., Ripening of Jujube Fruit (*Zizyphus spinochristi* (L.) Wild.), Scientia Horticulturae, 51 (1992) 303-308.
57. Kaufman, B.P., Plants: Their Biology and Importance, Harper, R., Publishers Inc., New York, 1989.

58. Ponting, D.J. ve Joslyn, M.A., Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extractly, Arch. Biochem., 19 (1948) 47-63.

59. Bradford, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.

60. Walter, W.M., Purcell, A.E. ve Collum, G.K.M., Evaluation Several Methods for Analysis of Sweet Potato Phenolics, J. Agric. Food Chem., 27 (1979) 942-945.

61. Shieh, H.H. ve Sweet, T.R., Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid, Anal. Biochem., 96 (1979) 1-5.

62. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem., 28 (1956) 350-356.

63. Vamos-Vigyazo, L. ve Gajzago, I., Substrate Specificity of the Enzymic Browning of Apples, Acta Alimentaria., 7 (1978) 79-90.

64. Vamos-Vigyazo, L., Gajzago, I. ve Nadudvari-Markus, V., Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities of Apricots (*Prunus armeniaca*) as Affected by Cultivars, Location and Year of Harvest, Qal. Plants Foods Hum. Nutr., 31 (1981) 45-50.

65. Inaba, A., Sobajina, Y. ve Ishida, M., Seasonal Changes in the Major Components of Kaki Fruits, Sci. Rep. Kyoto Prefectural Univ. Agricul., 23 (1971) 24-48.

66. Yagodin, B.A., Agricultural Chemistry, Mir Publishers, Moscow, 1984.

67. Ghantha, P.K., Physicochemical Changes in Papaya cv. Ranchi During Fruit Development and Maturity, South Indian Horticulture, 42 (1994) 231-235.

68. Güteryüz, M. ve Ercişli, S., Gümüşhane İlinde Yetiştirilen Bazı Yabani Meyve Türlerinin Besin İçeriği Bakımından Karşılaştırılması, Kuşburnu Sempozyumu, Eylül 1996, Gümüşhane, Bildiriler Kitabı, 301-307.

8. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1993 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve şu anda Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

