

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MUŞMULA (*Mespilus germanica* L.) MEYVELERİNİN
OLGUNLAŞMASI SIRASINDAKİ POLİFENOL OKSİDAZIN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Örenay DEMİR

AĞUSTOS 2006

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MUŞMULA (*Mespilus germanica* L.) MEYVELERİNİN
OLGUNLAŞMASI SIRASINDAKİ POLİFENOL OKSİDAZIN
KARAKTERİZASYONU

Biyolog Örenay DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Biyolog”
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29.06.2006
Tezin Savunma Tarihi : 15.08.2006

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Faik Ahmet AYAZ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Nuran DURMUŞ

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2006

ÖNSÖZ

Bu çalışma, muşmula (*Mespilus germanica* L.) bitkisinin meyvelerindeki polifenol oksidaz aktivitesinin karakterizasyonunu ve meyvelerin farklı olgunluk safhalarındaki polifenol oksidaz aktivitelerinin karşılaştırılmasını ihtiva etmektedir. Ayrıca bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fiziyojisi-Biyokimya Araştırma Laboratuvarında hazırlanmıştır. Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na, bana tez çalışması boyunca laboratuvar imkanlarını kullanmama imkan sağladığından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmada danışmanlığımı üstlenen ve manevi desteğini benden esirgemeyen hocam Doç. Dr. Faik Ahmet AYAZ'a, yine bilgi ve manevi desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu çalışma boyunca sürekli yardım ve desteğini gördüğüm Öğr. Gör. Yakup KOLCUOĞLU'na, Arş. Gör. Hülya TORUN'a ve yardımı dokunan herkese teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışma, KTÜ Araştırma Fonu (Proje no: 2004.111.004.6) ve kısmi olarak TÜBİTAK (Proje no: TBAG 2341 (103T152)) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Örenay DEMİR

Trabzon 2006

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Muşmula (<i>Mespilus germanica</i> L.) Hakkında Genel Bilgiler	2
1.3. Polifenol Oksidaz (PFO) ve Bulunduğu Organizmalar	4
1.4. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları	8
1.5. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları	11
1.6. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması	12
1.7. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi	14
1.8. PFO İnhibisyonu	15
1.9. Çalışmanın Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	19
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	19
2.3. Enzim Özütü Çözeltisi Hazırlama	20
2.4. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması	20
2.5. Protein Tayini	21
2.6. PFO Aktivitesi Tayini	22
2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	22
2.8. Substrat Özgünlüğü	22
2.9. Optimum pH	22
2.10. Optimum Sıcaklık	23

2.11. Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi	23
2.12. Optimum Substrat Konsantrasyonunun, V_{maks} ve K_m 'nin Belirlenmesi	23
2.13. İnhibitör Etkisi	24
3. BULGULAR	25
3.1. Substrat Özgünlüğü	25
3.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	26
3.3. Protein Tayini	27
3.4. Optimum pH	27
3.5. Optimum Sıcaklık	29
3.6. <i>M. germanica</i> Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi	30
3.7. Substrat Konsantrasyonunun <i>M. germanica</i> Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
3.8. <i>M. germanica</i> Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesine Metal İyonlarının ve Genel PFO İnhibitörlerinin Etkisi	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	40
5. ÖNERİLER	44
6. KAYNAKLAR	46

ÖZET

Bu çalışmada, muşmula (*Mespilus germanica* L.) bitkisinin, bitkinin tamamen çiçeklenmesinin ardından 193. gün (1.safha), 207. gün (2. safha) ve 214. gün (3. safha) olmak üzere üç ayrı olgunluk safhası meyvelerinden hazırlanan ekstraktlarda çeşitli biyokimyasal ve kinetik veriler yönünden polifenol oksidaz (PFO) aktivitesi detaylı bir şekilde incelenmiştir. mL'deki mg protein miktarı en yüksek olan meyveler, çiçeklenmeden itibaren 207. güne ait olan 2. safha meyveleri olarak tespit edilmiştir (3,897mg/mL). PHPPA(3-(4-hidroksifenil)-propionik asit), tirozin, 4-metil katekol, katekol ve L-DOPA (L-dihidroksifenilalanin) gibi fenolik substratların oksidasyonunu etkin bir şekilde katalizleyen muşmula PFO'ı her bir substrat ile spesifik pH ve sıcaklık değerlerinde etkileşim göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonunda enzimin katalitik aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla, 1. safha için pH 7.0 ve 30-40°C, 2.safha için pH 4.0 ve 10-20°C, 3. safha için de pH 5.0 ve 10-30°C olduğu tespit edilmiştir. Yapılan deneyler, optimum protein konsantrasyonunun her üç olgunluk safhasında da 0,1mg/mL olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda muşmula meyvesinin PFO'nın basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve en yüksek ilgiyi 4-metil katekol substratına karşı gösterdiği gözlenmiştir. Lineweaver-Burk eğrilerine bakıldığında 4-metil katekol varlığında V_{maks} ve K_m değerlerinin 1.safha için 476 μ M/dak. mg protein ve 26 mM, 2. safha için 256 μ M/dak. mg protein ve 12 mM ve 3. safha için de 222 μ M/dak. mg protein ve 8 mM olduğu tespit edilmiştir. Sodyum azid, sodyummetabisülfid, askorbik asit ve tiyoüre gibi PFO inhibitörleri enzim aktivitesini inhibe etmeyi başarmıştır. Ayrıca Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Ca^{2+} gibi monovalent, divalent ve trivalent metal iyonları da çoğunlukla enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının ise değişik olgunluk safhalarında aktivasyona neden olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, Muşmula (*Mespilus germanica* L.), PHPPA, Difenolaz

S U M M A R Y

Characterization of Polyphenol oxidase of Medlar (*Mespilus germanica* L.) Fruit Throughout Ripening

In this study, polyphenol oxidase (PFO) activity has been examined in details in respect of various biochemical and kinetic data in the extracts prepared out of fruits of medlar (*Mespilus germanica* L.) in three separate ripening maturity of Day 193 (Stage 1), Day 207 (Stage 2) and Day 214 (Stage 3) following completely blooming. It has been found that the fruits having the highest proportion of mg protein in mL are the fruits of Day 207 belonging to Stage 2 from blooming (3,897 mg/mL). PFO of medlar which actively catalyzes oxidization of phenolic substrates such as PHPPA (3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid), tirosine, 4-methyl catecol, catecol and *L*-DOPA (*L*-dehydroxyphenilalanyn) has effect on each substrate together with specific pH and temperature values. After the works made accordingly, it has been proved that optimum pH and temperature values for working of enzyme are respectively as follows: pH 7.0 and 30-40°C for Stage 1, pH 4.0 and 10-20°C for Stage 2 and pH 5.0 and 10-30°C for Stage 3. According to the experiments realized, it has been found out that optimum protein concentration is 0,1mg/mL on each three ripening stages. As the result of the kinetic works, it has been observed that medlar PFO is in accordance with the simple Michaelis-Menten kinetics and shows the highest interest against, 4-methyl catecol substrate. When we have a Lineweaver curves, it has been found that V_{maks} and K_m values, in the existence of 4-methyl catecol, are 476 $\mu\text{M}/\text{min. mg protein}$ and 26 mM for Stage 1, 256 $\mu\text{M}/\text{min. mg protein}$ and 12 mM for Stage 2 and 222 $\mu\text{M}/\text{min. mg protein}$ and 8 mM for Stage 3. PFO inhibitors such as sodium azyd, sodiummetabisulfite, ascorbic acid and thiourea have accomplished to inhibit enzyme activity. Also, monovalent, divalent and trivalent metal ions such as Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Ca^{2+} mostly inhibit enzyme activity. Observed that Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , caused activation in different ripening stages.

Key Words: Polyphenol oxidase, Medlar (*Mespilus germanica* L.), PHPPA, Diphenolase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Mespilus germanica</i> (muşmula) meyveleri	4
Şekil 2. Enzimatik olmayan esmerleşmeler için önerilen Maillard şeması	10
Şekil 3. PFO'nun bakır merkezleri	13
Şekil 4. <i>M. germanica</i> meyvesinin PFO izoenzimlerinin L-DOPA substratıyla boyanmış doğal poliakrilamid jel elektroforezi	26
Şekil 5. Protein tayininde kullanılan BSA kalibrasyon grafiği	27
Şekil 6. <i>M. germanica</i> meyvesinin difenolazının 1. safha için pH bağımlılık eğrisi	28
Şekil 7. <i>M. germanica</i> meyvesinin difenolazının 2. safha için pH bağımlılık eğrisi	28
Şekil 8. <i>M. germanica</i> meyvesinin difenolazının 3. safha için pH bağımlılık eğrisi	28
Şekil 9. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi	290
Şekil 10. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi ...	30
Şekil 11. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi ...	30
Şekil 12. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi	31
Şekil 13. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi	31
Şekil 14. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi	32
Şekil 15. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doyumluk eğrisi	33
Şekil 16. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doyumluk eğrisi	34
Şekil 17. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doyumluk eğrisi	34
Şekil 18. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi	35
Şekil 19. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi	35
Şekil 20. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi	36

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>M. germanica</i> meyve özütündeki PFO'ların monofenolik ve difenolik substratlar varlığında % Bağlı Aktivite değerleri	25
Tablo 2. PFO aktivitesine ilişkin bazı kinetik değerler	33
Tablo 3. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi.....	37
Tablo 4. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi.....	37
Tablo 5. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi.....	38
Tablo 6. 1. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi	38
Tablo 7. 2. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi	39
Tablo 8. 3. safhada hasat edilen <i>M. germanica</i> meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi	39

SEMBOLLERDİZİNİ

BSA	:Bovineserumalbümin
DMF	:Dimetilformamid
DOPA	:Dihidroksifenilalanin
EC	:Enzimkodnumarası
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
HPLC	:Yüksekperformanslısıvıkromatografisi
IUB	:UluslararasıBiyokimyaDerneği
MBTH	:3-metil-2-benzotiyozolinonhidrazon
PAGE	:Poliakrilamidjelelektroforezi
PHPPA	:3-(4-hidroksifenil)-propionikasit
PMSF	:Fenilmetilsülfonilflorür
PFO	:Polifenoloksidaz
SDS	:Sodyumdedosilsülfat
Tris	:Tris(hidroksimetil)aminometan

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Birçok sebze ve meyvede, esmerleşme olarak bilinen renk değişimleri fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu ile meydana gelen bir olaydır. Farklı meyve kültürleri arasında esmerleşme derecesinin fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz (PFO) adı verilen enzimin aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir ve böyle bir ilişkinin varlığı çeşitli meyve, sebze ve mantarlar için ortaya konulmuştur. Enzimatik olarak renk değişimi oksijen varlığında PFO'nun monofenolik ve difenolik maddeleri kinolik bileşiklere yükseltgemesinden kaynaklanır. Gerçekte, PFO'larla katalizlenen esmerleşme reaksiyonlarında oluşan kinonlar oldukça reaktif olup, esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşirler (Whitaker, 1972; Friedman, 1996; 1997).

Fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile oluşan kinonik ürünlerin ökaryotları, bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunmada rol oynadığı tahmin edilmekle birlikte, enzimle katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Ikehata vd., 2000; Thygesen, 1994).

Besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi esnasında bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan renk değişimleri çoğu kez istenilen seviyede durdurulamamaktadır. Bunun sonucunda besinlerin fiziksel görünüşlerinde ve besinsel değerlerinde değişimler meydana gelmektedir. Bu da besinin hem ekonomik ve besinsel değerini kaybetmesine hem de raf ömrünün azalmasına sebep olduğundan ciddi bir problem teşkil etmektedir. Ancak enzimatik esmerleşme her zaman istenmeyen bir durum değildir. Bu reaksiyonlar kuru üzüm, kuru erik, kakao, çay ve kahvede istenilen renk ve lezzetin kazanılmasında oldukça etkilidir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının tamamı bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin fizyolojik olgunluğuna göre değişim gösterirken, esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlıdır. Bunun yanında esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokularda mevcut bulunan oksijen miktarı ve aktif PFO konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir. Bunlardan birinin reaksiyon ortamında bulunmaması veya optimum değerinden uzak olması reaksiyonu durdurabilir veya hızını azaltabilir.

Gıdalarda, bu türden reaksiyon mekanizmalarının ortaya konması ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonu ile esmerleşme sonucu oluşan ürünlerin istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak mümkün olabilecektir.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkilerde iki şekilde ortaya çıkabilir (Friedman,1996;1997). Bunlardan birisi sebze ve meyvelerde bulunan polifenol bileşiklerinin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu işlemlerle oluşan kinonlar daha sonra polimerleşerek yapıları tam olarak bilinmeyen siyah renkli melanin pigmentlerini oluştururlar. Muz, armut, marul, patates ve meyve sularında klorojenik asidin böyle bir oksidasyonu ile oluşan kahverengi veya siyah lekeler bu tür pigmentlerin oluşumunu gösterir. Diğer bir enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise polifenol türevli kinonların serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır. Tüm enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitki tür ve çeşidine göre farklılık gösterir ve PFO'nun aktivitesi; fenolik substratlara ve O₂'e bağlıdır. Bu faktörlerden birinin ortadan kaldırılması ile enzimatik esmerleşme reaksiyonları durdurulabilir veya azaltılabilir.

1.2. Muşmula (*Mespilus germanica* L.) Hakkında Genel Bilgiler

Muşmula veya döngel (*Mespilus germanica* L., Fam: Rosaceae) bitkisi, gülgiller familyasından, yabani formları 2-3 m yüksekliğinde dikenli, kültür formları ise 6 m yüksekliğe kadar varabilen dikensiz çalılardır. Yapraklar basit, alt yüzü tüylü, tam veya dişli kenarlıdır. Kışın yapraklarını döker. Çiçekler erdişidir, beş parçalıdır ve beyaz ya da pembedir. Muşmula bitkisinin meyvesi, 1,5–3 cm çapında değişebilen, küremsi veya armut şeklinde ve baş kısmı yapraksı sepallerle çevrilidir (Browicz, 1972). Alt ovaryumdan türevlenen armut tipindeki meyve, genellikle, beş adet taşlaşmış tohuma sahiptir. Dış kısmın rengi kahverengi, bazen de kırmızımsıdır. Meyveleri olgunlaşınca kurşuni renkli olur(Şekil 1).

Muşmulanın Avrupa ve Asya'da, Dutsch (büyük meyveli), Common (orta boy meyveli), Royal (küçük meyveli), Nottingham (küçük meyveli ve lezzetli) ve Stoneless (muhtemelen en çok bilinen ve en iyisi) olmak üzere yaygın bulunan ve iyi bilinen birçok çeşidi vardır. Muşmulanın meyvesi genel olarak çiğ olarak tüketilir. Sonbaharın geç vakitlerinde, ağaçtan ham veya fizyolojik olarak olgunluğa erişmiş meyvelerin toplanması ve olgunlaşana kadar saman içinde depolanması günümüzde halen daha kullanılan

geleneksel yöntemlerdir. Ham meyvelerin etli kısmı tatlı ve hafif asidiktir. Reçel ve marmeladı da Avrupa'nın değişik ülkelerinde ve ülkemizin de bazı yörelerinde yapılmaktadır. Bu meyvenin buruk-ekşimsi bir tatta olması eski çağlardan beri bilinmektedir. Halk arasında, ham muşmula meyvesi veya ondan hazırlanan meyve şurubu bağırsak iltihaplarına karşı yaygın olarak eski çağlardan beri kullanılmaktadır (Bignami, 2000). Modern tıp ise onu kabızlığa, böbrek ve mesane taşlarına ve diüretik olarak kullanabileceğini yirminci yüzyılda fark etmiştir (Baytop, 1999).

Zaman zaman unutulmuş meyve olarak atfedilen muşmula son yıllarda büyük veya küçük birçok markette satılmakta ve önemli miktarlarda tüketilmektedir. Yine son yıllarda bu meyve üzerine olan talep, araştırmacılar tarafından, hasat öncesi ve sonrasında bu meyvanın kimyasal içeriğinin daha iyi araştırılmasına sebep olmuştur. Bu konuda hemen hemen ilk ve ciddi çalışmalardan biri İspanyol muşmulalarının, fiziksel (ağır, renk, dayanıklılık), fizikokimyasal (pH, çözülebilir katılar) ve kimyasal (nem, çözünebilir şekerler, nişasta, vs.) özelliklerinin olgunlaşma sırasında nasıl değiştiğini ortaya koyan bir çalışmayla Romero-Rodriguez vd. (2000), de Pascual-Teresa et al. (2000) ise muşmula meyvesinin flavanollerini hakkında ilk analizler rapor etmiştir. Türkiye'de Kuzey Anadolu'da yetişen muşmula bitkisinin meyvelerinin, meyve gelişimi ve olgunlaşması boyunca (ham-olgun-aşırı olgun) mineral içeriği, (Glew vd., 2002), yağ asitleri bileşimi (Ayaz vd., 2002a,b; Glew vd., 2003a,b), şeker organik asit ve amino asit içeriği (Glew vd., 2003a,b) rapor edilmiştir. Bu çalışmaların yanında, muşmulanın besleyici değeri ve bileşimi konusundaki bilgiler halen azdır. Gerek ağaç üzerinde ve gerekse hasat edildikten sonra muşmula meyveleri hızlı bir olgunlaşma sürecine maruz kalmaktadır. Enzimatik kararım olarak da bilinen bu esmerleşme sürecinde meyveler içerdiği besleyici maddeler bakımından büyük değişiklik sergilemektedir. Mezokarp kararırken tüketiciye farklı lezzet ve tat imkanı vermesi tamamen kimyasal içeriğinde enzimatik olarak meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda meyve hasatını dikkate aldığımız meyvenin üç olgunlaşma dönemi, hem ağaç üzerinde hem de marketlerdeki raf ömrü hemen hemen aynı kimyasal içerik değişikliğine maruz kalmaktadır (Glew vd., 2002; Ayaz vd., 2002a,b; Glew vd., 2003a,b).

Muşmula meyvesi, Türkiye'de de fazlaca tüketilmektedir. Meyveler Ekim'de hasat edilir ve olgunlaşması için soğukta, karanlıkta ve havalandırılmış yerlerde depo edilir. Meyvelerden kışın meze olarak kullanılmak üzere turşu da yapılmaktadır.



Şekil 1. *Mespilus germanica* (muşmula) meyveleri (URL-1, 2006; URL-2, 2006).

1.3. Polifenol Oksidaz (PFO) ve Bulunduğu Organizmalar

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında rol oynayan temel enzim polifenol oksidazdır (PFO) ve oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir (EC 1.14.18.1). PFO bakır içeren bir metaloenzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyon katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi), diğeri ise *o*-difenollerin *o*- kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi)dur. Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinonoid maddeler kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler şeklinde polimerleşirler (Whitaker, 1972;Friedman, 1996;1997). PFO memeliler, bakteriler, sebze, meyve, deniz ürünleri ve mantarlara kadar çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunurlar ve aynı organizmanın farklı organlarında farklı karakteristik özellikler gösterirler (Robb, 1984; van Gelder vd., 1997).

Polifenol oksidazların bitki ve mantarlardaki en önemli fonksiyonu, hastalıklara karşı koruma ve fenollerini kinonlara okside ederek bitkilerin proteinlerini ve besinsel değerlerini kısıtlamasıyla bitki yiyen böceklere karşı savunmada rol oynamasıdır. Bitkilerdeki fenolik substratlar vakuollerde bulunmasına karşılık bitki dokularının çoğunda PFO enzimi plastidlerde yerleşmişlerdir. Bu dokular kesildiğinde, zarar gördüğünde, hastalıklı dokular oluştuğunda ya da dokular böceklerin saldırısına uğradığında bu enzim aktif hale geçmektedir. Plastidlerde yerleşmiş olan bu enzim bir membran proteini olmasına karşın integral membran proteini değildir (Mazzafera ve Robinson, 2000; Vaughn vd., 1988).

Bitkilerde PFO'nun hücrelerdeki bulunuş yerleri farklılık gösterir ve genellikle bitki hücrelerinin plastitlerinde bulunur. Dolayısıyla, vakuollerde bulunan fenolik substratlarından fiziksel olarak ayrılır (Vaughn, 1988). Patateste PFO membrana bağlı bir

şekilde plastitlerde bulunur. Ispanak köklerinde ise PFO aktivitesi plastid membranlarında ve mitokondrilerde oldukça yüksektir. Buğday, yulaf, yonca ve şeker kamışı gibi bazı bitki türlerinde ise enzim kloroplastlarda lokalize olmuştur. Olgunlaşmış elmalarda ise PFO'ın daha çok kloroplastlarda ve mitokondrilerde aktif olduğu gözlenmiştir. Çeşitli muz türlerinde PFO aktivitesinin meyvenin dokularına göre değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı zeytin türlerinde enzim kloroplastlara sıkı sıkıya bağlıyken siyah zeytin türlerinde enzim çözünebilir bir formda bulunur (Vaughn, 1988).

Patateste PFO aktivitesi özellikle yumru, kök ve çiçeklerde oldukça yüksek olmasına rağmen yaprak ve saplarda daha düşük seviyelerde gözlenmiştir. Karakterize edilen PFO genlerinin pek çoğu fotosentetik dokulardan izole edilmiştir. Ancak bu enzimler fotosentetik olmayan dokularda da bulunmaktadır. PFO tarafından katalizlenen enzimatik esmerleşme özellikle *Solanum tuberosum* (patates) yumrularında ortaya çıkmıştır (Corsini, 1992). Patatesten izole edilen iki PFO geninin yaprak, çiçek ve köklerde ifade edildiği, yumrularda ise ekspresyon gözlenmediği bildirilmiştir (Hunt, 1993). Bununla birlikte, doku hasarını takiben yumrularda da PFO aktivitesinin yüksek düzeylere ulaşabildiği dolayısıyla enzimin bitki savunma sisteminde rol oynayabileceği bildirilmektedir (Thygesen, 1994).

Allium sp. den izole edilen PFO'ın aktivitesi çeşitli substratlarla incelenmiş ve enzimin en fazla katekole karşı spesifite gösterdiği gözlenmiştir. İzole edilen enzimin pH 7.5'te en iyi aktiviteye sahip olduğu ve 40 °C'nin üzerinde PFO aktivitesinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Bu bitkiden elde edilen PFO, askorbik asit, 2-merkaptoetanol ve sodyum metabisülfid gibi genel PFO inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu da bulunmuştur (Arslan, 1997).

Çeşitli meyve kültürleri arasında esmerleşme derecesinin fenolik içerik ve PFO aktivitesindeki farklılıklara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Şeftali meyvelerinin gelişimi sırasında tanin içeriğinin ve çeşitli fenolik substratların konsantrasyonunun düzenli bir şekilde azaldığı ve hasat dönemine kadar bu düzeylerde kaldığı tespit edilmiştir. Bu bitkide PFO aktivitesi de fenolik bileşiklerin içeriğine benzer bir değişim göstermiştir. Yüksek PFO aktivitesine sahip şeftali kültürlerinin yüksek derecede esmerleşme hızına sahip olduğu gözlenmiştir (Lee, 1990).

Elmadaki PFO'ın monofenolaz aktivitesi, difenolaz aktivitesi ve bu aktivitelere çeşitli inhibitörlerin etkisi detaylı bir şekilde çalışılmıştır (Nicolas, 1994). Monofenolaz aktivitesi, enzimin izolasyon işlemlerine duyarlı olmasından dolayı ekstraksiyonu sırasında çok düşük oranlarda ve NMR spektrokopisi ya da HPLC gibi oldukça pahalı teknikler

yardımıyla tespit edilebilmiştir. Ancak son yıllarda geliştirilen bir spektrofotometrik teknik yardımıyla elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağımlılığı izlenebilmiştir(Espin, 1995).

Monofenolaz aktivitesi, avokado bitkisinde tespit edilmiş olup, bu bitkideki PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980). Avokadoda monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan özütler kullanılarak tayin edilmiş ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. Triton X-114 kullanılarak kısmen izole edilen avokado PFO'yu 4-hidroksi anisol kullanılarak karakterize edilmiştir (Espin, 1997).

Muzda yapılan çalışmalarda meyvenin etli kısmında yüksek miktarda dopamine rastlanmış ve bu maddenin kısmen saf PFO tarafından oksidasyona uğratıldığı bildirilmiştir. Karakterizasyon ve saflaştırma esnasında yapılan işlemlerde oksidasyonun en hızlı gerçekleştiği dopaminin en iyi substrat olduğu anlaşılmıştır (Riggin vd., 1976).

Tropik bitkilerden biri olan papaya meyvelerinde de PFO'nun varlığı bilinmektedir (Cano, 1995). Bu meyvelerden kısmen izole edilen PFO'nun türlere göre değişimi incelenmiş ve toplam çözünebilir PFO aktivitesi dışı meyvelerde diğerlerine göre çok daha yüksek bulunmuş ve yeşil papaya meyvelerinde daha fazla PFO aktivitesine rastlanmıştır. Bu meyvelerden elde edilen enzimlerin elektroforetik karakterleri incelendiğinde hermafrodit meyvelerde 6 izoenzim varlığı gözlenmesine rağmen dışı meyvelerde 4 izoenzimin varlığını gösteren bandlar tespit edilmiştir (Cano, 1996).

Malatya kayısı (*Prunus armeniaca* L.) Türkiye'de yetiştirilen çeşitler içinde en iyisidir ancak depolama esnasında dış yüzeyi kararmaktadır ve bu ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında PFO'nun fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Augustin vd.,1985). Malatya kayısılarından elde edilen enzimin aktivitesinin pH 8.5'te maksimuma ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca enzimin monofenolaz aktivitesine sahip olmadığı, askorbik asit ve 2-merkaptolanın bu enzim için en iyi inhibitörler olduğu belirtilmiştir (Arslan vd.,1998).

Karayemiş bitkisinin (*Laurocerasus officinalis* Roem.) henüz olgunlaşmamış meyvelerinde yapılan incelemede 3-(3,4-dihidrosifenil)propionik asit (DHPPA) varlığında optimum pH'nın 5.0 olduğu ve alkali pH'larda enzimin %80 oranında aktivitesinin kaybolduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklığın 40 °C olduğu ve aktivitenin askorbat ve metabisülfite karşı hassas olduğu gözlenmiştir (Colak vd., 2005).

Gönen kaplıcalarından izole edilen ve termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4T bakterileri üzerinde yapılan incelemelerde difenolaz aktivitesine

rastlanmış ve bu aktivitenin 4-metil katekol substratına karşı oldukça yüksek ilgiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu mikroorganizmalardan hazırlanan hücre içi enzim özütünün sahip olduğu difenolaz aktivitesinin karakterizasyonu için yapılan çalışmalarda, 4-MK varlığında optimum pH'ın 9.5 optimum sıcaklık değerinin ise 70 °C ve 80 °C olduğu bulunmuştur (Yıldırım vd., 2004).

PFO'nun etkili olduğu canlı türlerinden birisi de mantarlardır. Endüstriyel olarak en az düzeyde işlenmiş mantarın raf ömrü saklama esnasındaki enzimatik esmerleşmeden dolayı birkaç gün ile sınırlıdır. Mantardaki esmerleşmeye sebep olabilecek enzimler olan PFO, lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri çeşitli mantarlarda çalışılmış ve PFO'nun mantar dokularındaki en bol enzim olduğu ve kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO'dan kaynaklandığı belirtilmiştir (Zhang, 1997; Ratcliffe, 1994).

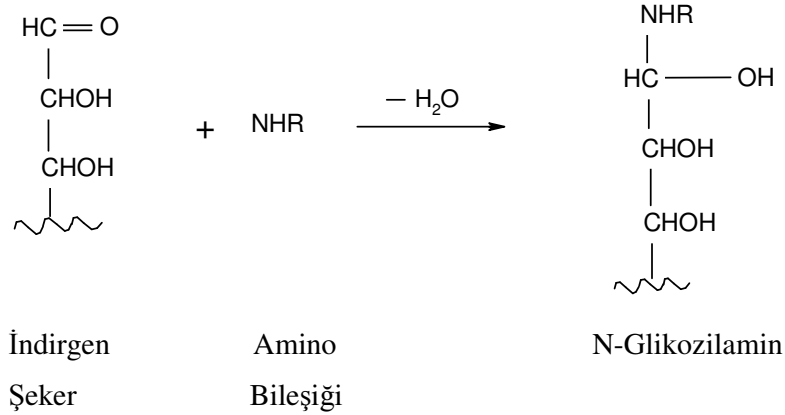
Çay bitkisinin (özellikle filizlerinin) PFO'ca oldukça zengin olduğu ve çayın fermantasyonunda PFO'nun anahtar enzim olduğu bilinmektedir. PFO bu bitkide flavanollerin, theaflavin ve thearubigin olarak tanımlanan siyah çayın bileşenlerine oksidasyonunda önemli bir rol oynar (Mayer, 1991). PFO çay bitkisinin hemen hemen tüm bölümlerinde bulunur ve çay kalitesi bu enzimin çay filizlerindeki içeriği ile doğrudan ilişkilidir (Biswas, 1971). Çay bitkisinin çeşitli organlarından hazırlanan enzim özütleri kullanılarak yapılan enzimatik deneyler, enzimin çözünür haldeki ve membran bağlı formlarının içeriklerinin bir tür içerisinde farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (Singh, 1994). Bitkiden hazırlanan PFO ve peroksidaz enzimleri ile yeşil çay yapraklarından izole edilen flavanoller *in vitro* muamele edilmiş, oluşan reaksiyon ve ürünleri HPLC ile izlenmiştir. Bu iki enzimin çayın fermentasyonuna ya da kararmasına etkisi araştırılmış ve PFO varlığında çayın kalitesinden sorumlu olan thaflavin ve thearubigin bileşenleri daha yüksek düzeylerde gözlenmiştir (Finger, 1994).

PFO, kahvenin (*Coffea arabica* L.) yapraklarından ve meyve endospermilerinden (PFO-E) ekstrakte edilerek karakterize edilmiş ve bir çok bitkide olduğu gibi erken gelişme safhasında yaprak ve endospermelerde yüksek olduğu gözlenmiştir (Ratjen ve Robinson, 1992; Dry ve Robinson, 1994). Kahvede, kahve kalitesiyle PFO arasındaki ilişki tam olarak bilinmemesine rağmen düşük kalitedeki kahvelerde düşük aktivitede PFO olduğu bilinmektedir. Yaprak ve endosperm için optimum PFO aktivitesinin pH 6.0-7.0'da ve optimum sıcaklığın 20-30 °C arasında olduğu gözlenmiştir.

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

1.4. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları genelde Maillard reaksiyonu olarak bilinmekle birlikte basit şekerlerin (karbonil gurupları) ve amino asitlerin (serbest amino gurupları) reaksiyonunu içerir.



(Reaksiyon 1, Maillard reaksiyonu)

Maillard reaksiyonunu etkileyen faktörler aşağıda belirtildiği gibidir:

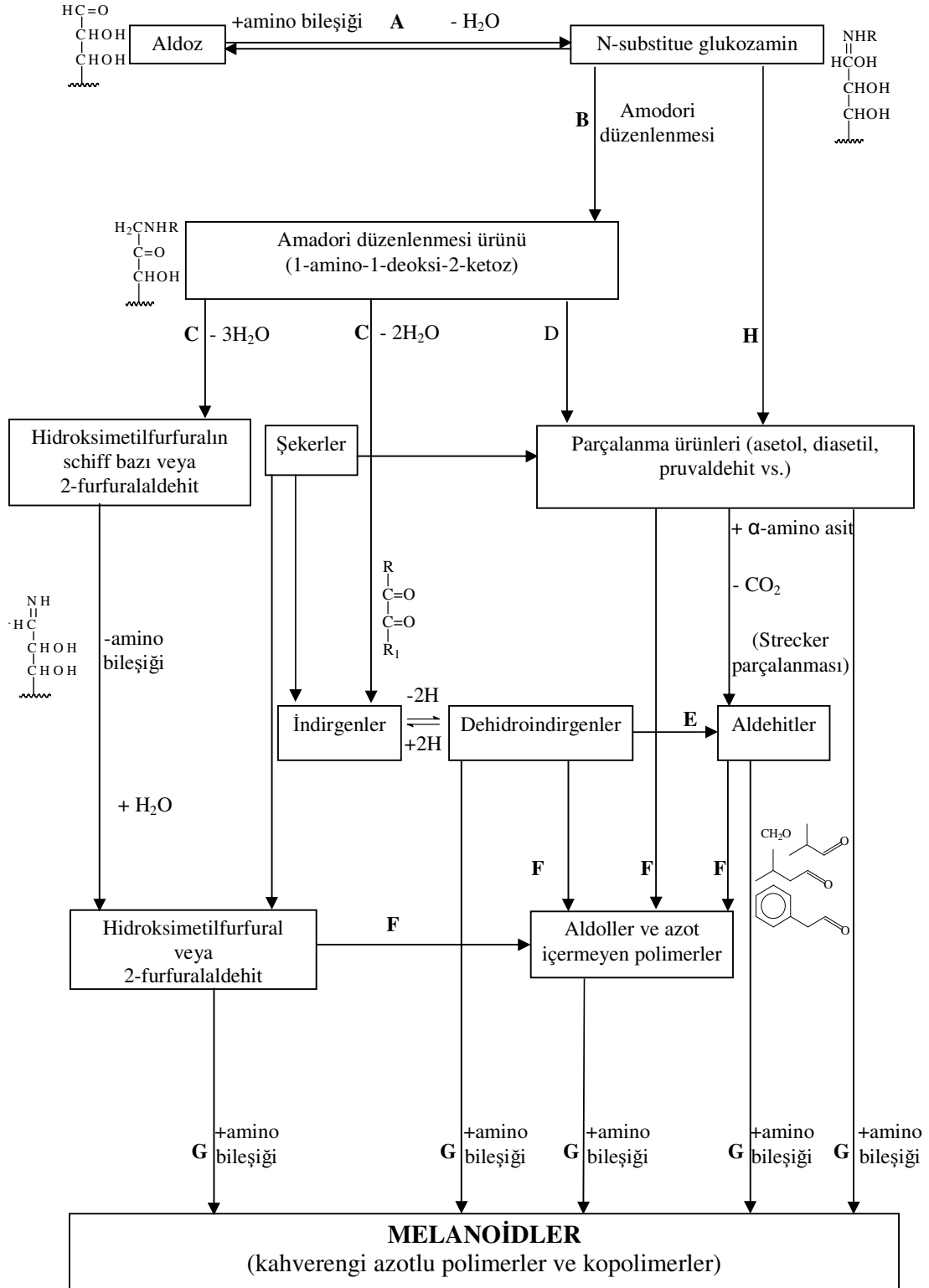
a) Zaman ve sıcaklık: Model sistem üzerinde yapılan çalışmalar, ısınma miktarının ve/veya zamanın artırılması sonucu görülen renk gelişimi, karbon-azot zincirinin varlığını, doymamışlığın ve kimyasal aromatikliğin arttığını göstermektedir

b) Sistemin bileşimi: Pentoz şekerleri (örn. Riboz) heksoslardan çok daha hızlı reaksiyon verir ki bu da disakkaritlerden (örn. laktoz) daha reaktiftir.

Lisin, ε-amino grubundan dolayı en hızlı renklenmeye neden olurken, sistein ise en az renklenmeye neden olur. Bu yüzden protein içeriği lisin birimince zengin olan besinler (örn. süt proteinleri) genelde hızlı bir şekilde esmerleşir.

Şeker-amino bileşiği zincirleri renkli ürünlerden oldukça etkilenir. Örneğin, %65 su içeren glukoz-glisin model sistemi 65 °C'de saklandığında glukoz-glisin zincirinin renk dönüşümünün hızlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

c) Su aktivitesi: Şekil 2'de suyun Maillard reaksiyonu esnasında oluştuğu görülmektedir. Bu yüzden kütle yasaları gereğince, yüksek su miktarı içeren bileşiklerde reaksiyon oldukça yavaş gerçekleşmektedir (URL-3, 2004).



Şekil 2. Enzimatik olmayan esmerleşmeler için önerilen Maillard Şeması

1.5. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

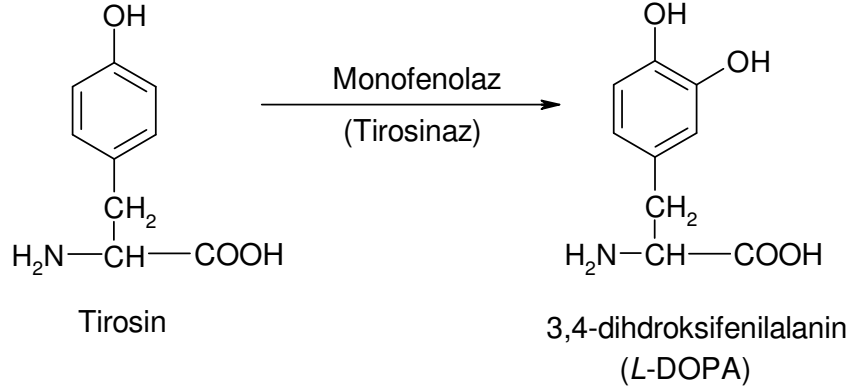
Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkilerde iki farklı şekilde gözlenebilir (Friedman 1996, 1997). Bunlardan birisi meyve ve sebzelerde bulunan fenol bileşiklerin PFO ile katalizlenerek kinonları verdiği oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan kinon yapılı bileşikler, daha sonra siyah melanin pigmentlerine polimerleşir. Meyve ve sebzeler soyulduğunda veya kesildiğinde enzim içeren bitki dokusu serbest hale gelir. Havadaki oksijen varlığında PFO enzimi hücre fenolik bileşiklerinin *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler. Oluşan bu kinonlar oldukça reaktif olup esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşir. Meyve paslı bir bıçakla kesildiğinde veya bakır bir kasede karıştırıldığında bu olay kolayca gözlenebilir. Armut, muz, patates, marul ve meyve sularında klorojenik asidin böyle oksidasyonu ile oluşan kahverengi ve siyah lekeler bu tür pigment oluşumunu gösterir.

Diğer enzimatik esmerleşme türü ise fenolik bileşiklerden türemiş kinonların serbest aminoasit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır. Patateste ve kazein içeren besinlerde okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları bu türden işlemlerdir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkinin çeşidine, türüne, yetiştiği bölgeye, meyvenin olgunluğuna göre değişim gösterir ve buna sebep olan başlıca faktörler bitki vakuollerinde bulunan fenolik substratlar, PFO enziminin aktivitesi ve bitki dokularında bulunan oksijendir. Bu faktörlerden birinin ortadan kaldırılmasıyla enzimatik esmerleşme reaksiyonları azaltılabilir veya durdurulabilir.

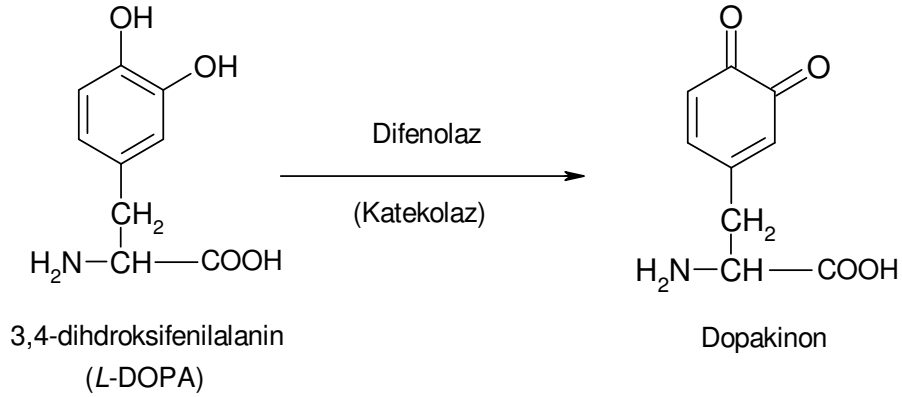
Bitkilerde meydana gelen enzimatik esmerleşme işlemlerinin en önemli enzimi PFO'dur. Bu türden bir işlemin meydana gelebilmesi için ortamda enzim, enzime bağlı bakır iyonları, fenolik substrat ve oksijen bulunmalıdır. En düşük düzeyde işlenmiş meyve ve sebzelerin hazırlanması, kabuklarının soyulması veya bunların kesilmesiyle hücre membranları parçalanır ve uygun substratlar yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyebilen bu tür bir enzimle etkileşir. Oksijen varlığında, fenollerin *o*-kinonlara enzimatik oksidasyonundan dolayı esmerleşme hızlı bir şekilde meydana gelir. (Laurila vd.,1998)

1.6. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması

Uluslararası Biyokimya Derneği (IUB) enzim komisyonuna göre PFO birbiriyle ilişkili yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını içeren üç çeşit aktiviteye sahiptir. Bunlar: katekoloksidaz veya *o*-difenol:oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.1); lakkaz veya *p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.2) ve kresolaz veya monofenol oksijenaz (EC 1.14.18.1) dır (Yelana vd.,1996). Bu bilgilere dayanarak enzimin iki farklı tür reaksiyonu katalizlediği sonucuna varılabilir. Bu reaksiyonlar; *o*-difenollerin olduğu monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (kresolaz/monofenolaz aktivitesi) ve bunu takiben *o*-difenollerin *o*-kinonlara (katekolaz/difenolaz aktivitesi) oksidasyonudur (Fenoll vd., 2000).

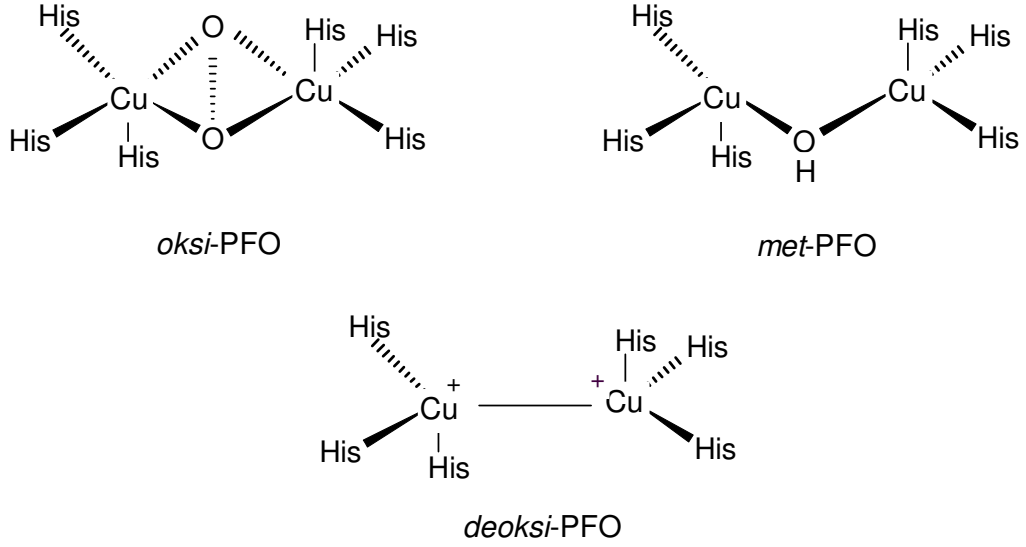


(Reaksiyon 2, Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi))



(Reaksiyon 3, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi))

PFO için yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aktif bölgenin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğunu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir (Şekil 3).



Şekil 3. PFO'nun bakır merkezleri

Oksijenlenmiş form (*oksi-PFO*), her biri iki kuvvetli ekvatoryal ve bir zayıf aksiyal NHis ligandlarıyla koordine olmuş iki tetragonal Cu(II) atomundan oluşmuştur. Eksojen oksijen molekülü peroksit olarak bağlanır ve iki bakır atomu arasında köprü oluşturur. *Met-PFO* formu *oksi-form* gibi endojen köprüyle antiferromagnetik şekilde çiftleşmiş iki tetragonal Cu(II) atomu içerir. *Deoksi-PFO* bikuprik yapıya sahiptir. [Cu(I)-Cu(I)] PFO'nun aktif bölgesindeki bakır içeren bu üç form monofenollerin *o*-hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyon mekanizması için bir modeldir. (Duran vd., 2002; Klabunde vd.,1998).

Fizyolojik fonksiyonları farklı olmasına rağmen PFO ve hemosiyanin aktif bölgesi birbirine benzerlik gösterir ve bu model sistemler üzerinde yapılan çalışmalar monofenollerin PFO ile katalizlenen dönüşümlerinin substratın enzimin *oksi-formuna* bağlanmasıyla başladığını ortaya koymaktadır (Decker ve Tuczek, 2000).

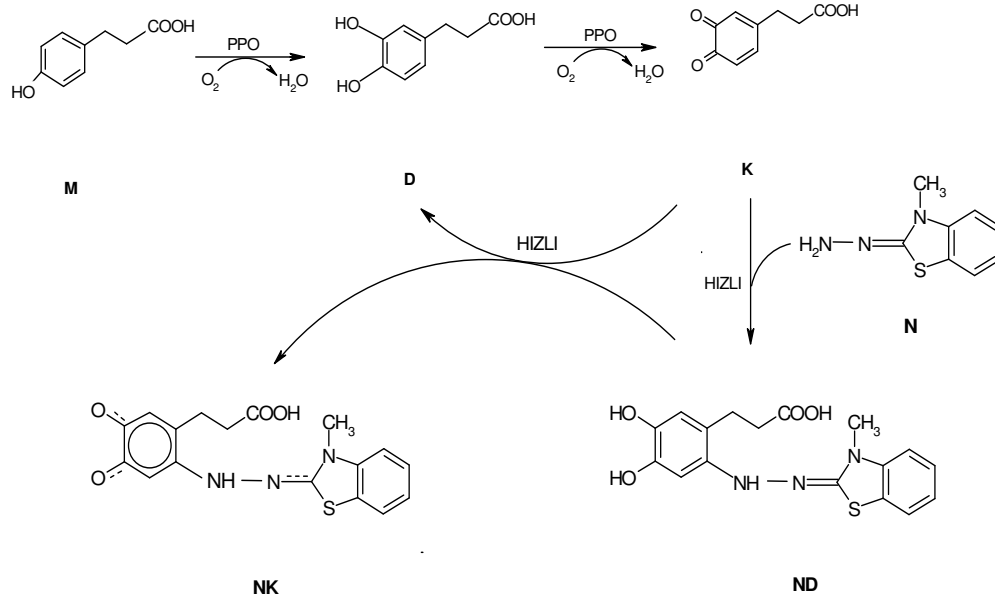
PFO'nun katalitik aktivite mekanizmasında *deoksi-formundaki* enzim bir oksijen molekülüyle birleşerek *oksi-PFO* formuna dönüşür. Monofenolaz aktivitesinin gerçekleşmesi için ortamda *oksi-formu* içeren enzim mutlaka bulunmalıdır (Sung-Yum

Seo, 2003). Daha sonra substratın 5 koordinasyonlu ara ürününün yeniden düzenlenmesiyle fenolün *o*-hidroksilasyonu sağlanır, su kaybı ile difenolik ürünün oluşumu gerçekleşmiş olur. Molekül içi elektron transferi sonucu *o*-benzokinon ürünü oluşurken *deoksi*-forma dönen enzimin aktif bölgesi yeni bir katalitik çevrime girmek için hazır hale gelir.

1.7. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve manometrik, palografik, kronometrik ve spektrofotometrik teknikler gibi çeşitli teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O₂, bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak ya da bir oksijen elektroduyla palografik olarak ölçülebilir. Kronometrik metotta ise askorbik asit varlığında reaksiyon sırasında rengin ilk görüldüğü an tespit edilir. Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızı ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972). Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen pahalı teçhizat gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmazlar.

PFO'nun monofenolaz aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil varlığında oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metot nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen *o*-kinonların enzimatik olmayan reaksiyonlarını esas alır. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşturulan *o*-kinon nükleofil ile renkli katılma ürünleri verirler ve bu katılma ürünleri 500 nm deki karakteristik absorpsiyonları ile belirlenirler (Reaksiyon 6). Bu metodun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuş olup (Rodrigez, 1994) elma ve avokado meyvelerindeki PFO aktivitelerinin tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Espin, 1995; 1997).



(Reaksiyon 4, Polifenol oksidazın kromojenik nükleofil (MTBH) 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))

1.8. PFO İnhibisyonu

Enzimatik esmerleşme meyvelerin ve diğer besinlerin olgunlaşması, depolanması veya işlenmesi esnasında ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Günümüzde esmerleşmeyi önlemek için inhibitörlere başvurulmaktadır. Kullanılan inhibitörler yiyeceklerde enzimsel esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan materyaller olmalıdır (Ferrar ve Walker, 1996). Bugün en sık başvuru olan inhibitör sülfittir. Bunun dışında O₂ ve fenolik substratların ikisinin veya birisinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla esmerleşme önlenir. Ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda sülfid kullanımına izin verilmez (FDA, 1996). Sülfidlerin, besinleri yıkıcı özelliği yanında bitki ve meyvelerde doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir. Yayınlanan bir çok rapora göre bazı insanların özellikle astım hastalarının sülfid bileşiklerine karşı hassas olabilecekleri belirtilmiş ve bu yüzden dünyada sülfid kullanımına ortak kısıtlama getirilmiş hatta birçok gelişmiş ülkede de yasaklanmıştır (Ding vd., 2002).

Yapılan araştırmalar sonucunda inhibitörleri doğal ve sentetik orijinli olarak iki ana grupta toplamak mümkündür. Doğal kaynaklı inhibitörler polifenoller ve aldehidler ve türevleri olarak iki alt grupta toplanabilir.

1. Doğal orijinli inhibitörler:

a. Polifenoller; doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir. Birçok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak ta bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kök, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze meyve, sebze ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel PFO inhibitörleri kompferol, kuersetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir (Kubo vd.,1992, 1999; Chen vd., 2002; Ha vd., 2001). Flavanoidlerin inhibisyon özelliği aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir.

b. Aldehidler ve türevleri; çok sayıda aldehid ve türevinin PFO için izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Örneğin trans sinnamaldehid, 2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, aris aldehid, kumik asid, 3,4-dihidroksi sinnamik asid gibi (Lee vd., 2000, 2002; Kubo vd., 1988, 1999). Aldehid grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple etkisinin enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı formasyonu oluşturmasından ileri geldiği söylenmektedir.

2. Sentetik orijinli inhibitörler:

şimdiye kadar çok çeşitli sentetik orijinli inhibitör rapor edilmiştir. Bunların bazıları ilaç, diğerleri ise basit kimyasallardır.

a. İlaçlar; Antidepresif olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkaptto-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitiroid ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkapttoimidazol) (Espin ve Wichers 2001; Andrawis ve Kahn, 1996).

b. Kimyasallar; hidrojen peroksit(H_2O_2), hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asidler gibi bir çok kimyasal inhibitör olarak PFO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahiptir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Kozmetik ve ilaç üretiminde enzimlere ve enzimler aracılığıyla sentezlenen ya da modifiye edilen ürünlere olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Enzim katalizsiz reaksiyonlarla sentezlenen ürünler pahalı olmalarının yanında reaksiyon sonucu oluşan ve istenmeyen yan ürünleri de taşımaktadır. Oluşan bu yan ürünler insan sağlığı açısından genelde sakıncalar doğurmaktadır.

Günümüzde besinlerin sağlıklı bir şekilde korunmasına ve raf ömürlerinin uzatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyeceklerin, sentetik yoldan elde edilmiş kimyasallarla ya da farklı yöntemlerle korunmaları sonucu gıdalarda lezzet ve besin değeri kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Bu türden oluşumlar da insan sağlığını tehdit ettiğinden bu konularda dünya çevre ve sağlık örgütleri hassasiyet göstermekte olup gelişmiş ülkelerde enzimlerle elde edilen yeni ürünlerin ya da bilinen ürünlerin yeniden modifiye edilmesi çalışmaları hız kazanmaktadır.

Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişebilen ve muşmula olarak bilinen *M. germanica* L., esmerleşme reaksiyonlarının oldukça hızlı olduğu bir bitkidir. Bu çalışmada, PFO'nun bu bitki meyvelerinde ve diğer bitkilerin PFO'lar ile benzerlikleri, katalizledikleri reaksiyonlar, aktivitesi ve reaksiyon kinetiği açısından izlenebilme kolaylığı sağlayacağı düşünülerek model bir sistem olarak düşünülmüştür. PFO'lar ile ilgili mevcut bilgilerin ışığında bu çalışmada gerçekleştirilmesi düşünülen amaçlar şu şekilde özetlenebilir:

- i) PFO'nun döngel bitkisi meyvelerinden ekstraksiyonu,
- ii) Enzim özütlerinin spektroskopik teknikler yardımıyla karakterize edilmesi,
- iii) Özütlerdeki aktivitenin sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve çeşitli inhibitörlerle değişimi,
- iii) Enzim ile katalizlenen reaksiyonun kinetiği ve çeşitli kinetik parametrelerin elde edilmesi, dolayısıyla spekülatif yapı-fonksiyon ilişkisinin ortaya konulması.

MBTH nükleofili yardımıyla çeşitli substratların varlığında PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Difenolaz aktivitesinin kinetikleri, pH etkisi yanında, enzim ve substrat konsantrasyonunun etkisi de incelenerek döngel bitkisi PFO'nun çeşitli substratlara karşı davranışı ortaya konabilir. Enzimin meyvenin farklı olgunluk safhalarındaki davranışları incelenerek en yüksek verimin alınabileceği olgunluk safhası hakkında bilgi edinilebilir.

Ayrıca besin olarak kullanımlarda ve özellikle de endüstriyel alandaki kullanımlarda maksimum fayda sağlamak için kullanım amacına göre tercih edilecek olan safha hakkında fikir elde edilebilir

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan, TritonX-114 (TX-114), fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), 4-metil katekol (4-MK), katekol, *L*-3,4-dihidroksifenilalanin (*L*-DOPA), tirozin, 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA), 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH), bovine serum albumin (BSA), sodyumdodesil sülfat (SDS) ve folin kimyasalları Sigma Chemical Co., St Louis (MO, USA) firmasından, tampon çözelti hazırlamada ve diğer işlemlerde kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, sodyum asetat, asetik asit, etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), magnezyum klorür, tris(hidroksimetil)amino metan (TRIS), dimetilformamid (DMF), askorbik asit, tiyoüre, sodyum metabisülfid, sodyum azid kimyasalları Merck A.G. (Darmstadt, Germany), glisin reaktifi KARE Kimya ve dış Tic. Ltd. Şti.' den sağlanmıştır.

Santrifüjleme işlemi, Sigma 2-16 K marka santrifüj cihazında, spektrofotometrik ölçümler, Thermo electron corporation Nicolet evolution e100 spektrofotometre cihazı, elektroforez işlemi Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA USA) elektroforez cihazı ile, doku homojenizasyonu Braun marka parçalayıcı, pH ölçümleri HANNA instruments pH 213 Microprocessor pH Meter marka pH-metre ile yapılmıştır.

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM glisin-HCl tamponu 3,7535 g glisinin 700 mL saf suda çözünmesiyle hazırlanan çözeltinin, 0,05 M'lık HCl çözeltisi ile pH 3.0 oluncaya kadar titre edilmesi ve daha sonra çözeltinin hacminin saf suyla 1L'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

50 mM asetat tamponu için 6,804 g sodyum asetat 700 mL saf suda çözüldükten sonra 50 mM asetik asit ile pH 4.0 ve 5.0 oluncaya kadar ayrı ayrı titre edildi ve çözelti saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

50 mM fosfat tamponu; 6,41 g KH_2PO_4 ve 0,51 g K_2HPO_4 'ün 700 mL saf suda çözünerek hazırlanan çözeltinin saf suyla 1L'ye tamamlanmasıyla pH 6.0 olarak hazırlandı. pH 7.0 olan 50 mM fosfat tamponu ise; 3,332 g K_2HPO_4 ve 4,21 g KH_2PO_4 'ün

700 mL saf suda çözünerek hazırlanan çözeltinin saf suyla 1L'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

50 mM Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris) tamponu 6,057g (0,05 mol) Trizma bazının 700 mL saf suda çözünmesinden sonra 0,05 M'lık HCl çözeltisi ile ayrı ayrı pH 8.0 ve 9.0 olacak şekilde titre edilmesi ve daha sonra da her bir çözeltinin hacminin 1L'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

2.3. Enzim Özütü Çözeltisi Hazırlama

80 mL asetat tamponu (pH 4.0) içerisinde nihai konsantrasyonları % 6 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF olacak şekilde belirtilen kimyasalların ilavesiyle oluşturulan çözeltinin hacminin aynı tamponla 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

2.4. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Muşmula (*Mespilus germanica* L., fam: Rosaceae) meyveleri, 2003 yılı sonbaharında Trabzon merkez köyleri ve civar İlçe'lerdeki doğal populasyonlarından (500-600 m) rastgele toplanmıştır. Bu meyveler için, meyve mezokarpı beyazımsı-hafif yumuşak (1. safha), kahverengimsi-tamamen yumuşak (2. safha) ve koyu kahverengi-tamamen yumuşak (3. safha) olduğu üç hasat dönemi esas alınmıştır. Bu olgunluktaki meyveler, bitkinin tamamen çiçeklendiği tarihten (8 Mayıs 2003) itibaren 193 (1.safha), 207 (2.safha) ve 214 (3.safha). günlerde hasat edilmiştir. Her populasyondan yaklaşık 1 kg meyve toplanmıştır. Sabah saatlerinde toplanan bu meyveler soğuk şartlarda (+4-6 °C) laboratuara ulaştırıldıktan hemen sonra tartımları alınarak sıvı azotla muamele edildikten sonra derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edildi.

Özüt hazırlama işlemi esnasında üç ayrı olgunluk safhasına ait meyvelerin her bir olgunluk safhasından (193, 207 ve 214 günlük) 5 g alınarak Dewar kabındaki sıvı azot içinde hücre membranlarının parçalanması için 10 dakika tutuldu. Meyveler 50 mM 10'ar mL farklı pH'lardaki (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) ham özüt hazırlama çözeltisi içinde parçalayıcı yardımıyla 10 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 °C'de tülbentte süzüldü. Elde edilen süzüntüler 4 °C'de 15000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Ayırma işlemi sonunda

oluşan sıvı kısımlarda protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Bu meyvelerden üç ayrı olgunluk safhasının her biri için 15 g alınıp, sıvı azot içinde 10 dakika bekletildikten sonra en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH'da (pH 7.0 olan 50 mM 30 mL fosfat tamponu kullanarak) enzim özütü hazırlandı. Hazırlanan ham enzim özütü 1mL'lik porsiyonlara ayrılarak ependorf tüplerde -20 °C'de çalışma süresi boyunca muhafaza edildi.

2.5. Protein Tayini

Hazırlanan muşmula özütlerinin protein içeriği Lowry (Lowry, 1951) metoduna göre tayin edildi. 10 µL özüt, % 0,1 sodyumdodesil sülfat içeren 490 µL 0,1 N NaOH çözelti ile 500 µL'ye seyreltilerek bazikleştirildi. Bu çözeltiye, eşdeğer oranlarda karıştırılmış % 0,2 Na₂CO₃'ün 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12,5 mL) ve % 2 sodyumpotasyum tartarat içeren % 1'lik CuSO₄ çözeltisinden (0,25 mL) 1 mL ilave edildi. 5-10 dakika çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µL ilave edildi ve 30 dakika olgunlaşmaya bırakıldıktan sonra 650 nm' deki absorbanları okundu. Kalibrasyon grafiği, aynı işlemlerin tekrarlandığı BSA standart protein çözeltileri kullanılarak hazırlandı ve bu grafikten yararlanılarak özütlerin protein içerikleri tayin edildi.

2.6. PFO Aktivitesi Tayini

PFO aktivitesi spektrofotometrik olarak 4-metil katekol için 494 nm'de diğer tüm substratlar için 500 nm'de absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin,1995). Belli hacimlerdeki substrat çözeltisi (100 mM stok substrat çözeltisi), aynı hacimde MBTH çözeltisi (stok 10 mM) ve % 2 (v/v) DMF içeren reaksiyon karışımı tampon çözeltiyle (pH 7.0 olan 50 mM fosfat tamponu) 950 µL' ye tamamlandıktan sonra bu karışıma 50 µL enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Oluşan üründen dolayı reaksiyon karışımının absorban değişimi belirtilen dalga boylarında ayrı ayrı izlendi ve aktivite hesabı yapıldı. Bir ünite (U) PFO aktivitesi, 1 mL reaksiyon karışımında 1 dakikada oluşan 1 µM ürün miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgün aktivite ise, hazırlanan enzim özütündeki 1 mg protein başına hesaplanan enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Kong vd., 2000).

2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Doğal PAGE Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA USA) elektrofrez cihazı ve % 10'luk poliakrilamid jel kullanılarak yapıldı. Ham özütteki proteinler 1:1 oranında aseton ile çöktürülerek Sigma 2-16 K marka santrifüjle 5 dakika santrifüjlendi. Katı kısım alınarak asetonun ortamdan uzaklaşması için 24 saat 4 °C' de bekletildikten sonra fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) çözüldü ve elektrofrez hazırlanmaya hazır hale getirildi. Elektrofrez işlemi için örnekler, 16 mA' lik bir akımda yaklaşık 3 saat boyunca yürütüldükten sonra çıkarılan jel 24 mM *L*-DOPA çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle boyandı ve bantların varlığı gözlemlendi.

2.8. Substrat Özgünlüğü

PFO aktivitesi, substrat olarak 4-MK, katekol, *L*-DOPA, tirozin ve PHPPA kullanılarak pH 7.0 olan tampon çözelti içinde MBTH ile maksimum absorpsiyonu verdikleri dalga boylarında absorbanstaki artış olarak belirlendi (Espin, 1997). En yüksek PFO aktivitesi 4-MK varlığında bulundu ve bundan sonraki denemelerde de bu substrat kullanıldı.

2.9. Optimum pH

Optimum pH çalışmasında; substrat olarak 4-metil katekol seçildiği için bu substrat kullanıldı ve 494 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

Bu çalışma; pH 3.0 için 50 mM Glisin-HCl tamponu, pH 4.0 ve pH 5.0 için 50 mM asetat tamponu, pH 6.0 ve pH 7.0 için 50 mM fosfat tamponu, pH 8.0 ve pH 9.0 için Tris-HCl tamponlarına MBTH ve DMF ile birlikte 4-metilkatekol substratının ilavesiyle çözeltilerde enzimin gösterdiği aktivitelerin spektrofotometrik olarak ölçülmesi şeklinde yapıldı.

Belirlenen optimum pH değeri, optimum substrat konsantrasyonunun, protein miktarının aktivite üzerine etkisinin ve diğer parametrelerin belirlenmesinde kullanıldı.

2.10. Optimum Sıcaklık

Muşmuladan hazırlanan enzim özütündeki aktivitelerin optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10-70 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde bir su banyosu yardımıyla ölçüldü. Tampon (pH 7.0 olan 50 mM fosfat tamponu) ve 4-metil katekol substrat çözeltisine MBTH ve DMF ilave edilerek yukarıda belirtilen sıcaklık aralığında bir su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Karışımın küvete boşaltılması esnasında meydana gelebilecek sıcaklık değişimini önlemek amacıyla küvetler birkaç dakika su banyosunda bekletildi. Karışıma enzim özütü ilave edilerek ölçümler mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde yapıldı. Ölçümler 494 nm’de yapıldı.

2.11. Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim özütündeki PFO aktivitesinin maksimum absorbans verdiği optimum protein miktarını belirlemek için substratın (4-metil katekol) optimum pH’da sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarındaki (1. safha için 0,001-0,1 mg/mL, 2 ve 3. safha için 0,005-0,2 mg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirilerek enzimin doyumluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu.

2.12. Optimum Substrat Konsantrasyonunun, V_{maks} ve K_m ‘nin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için daha önce belirlenen optimum şartlarda (protein miktarı, pH ve sıcaklık) özütlerin sahip olduğu difenolaz aktivitesi için substratın değişen konsantrasyonlarına (0,5-50 mM) karşı ölçülen hız değerleri grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan substrat doyumluk eğrisinden enzim aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi. Kinetik verilerin eldesi için ise yukarıda bahsedilen deney sonuçları kullanılarak Lineweaver-Burk eğirileri hazırlandı ve bu eğrilerden yararlanılarak yine her bir enzim aktivitesi için V_{maks} ve K_m değerleri belirlendi.

2.13. İnhibitör Etkisi

M. germanica'dan hazırlanan enzim özütünün sahip olduğu difenolaz aktivitesinin, 4-MK varlığında, 1. safha için sodyum azid (1-60 mM), sodyummetabisülfid (0,01-5 mM), askorbik asit (0,01-5 mM) ve tiyoüre (0,01-5 mM); 2. safha için sodyum azid (5-60 mM), sodyummetabisülfid (0,01-5 mM), askorbik asit (0,01-5 mM) ve tiyoüre (0,01-2 mM); 3. safha için sodyum azid (1-40 mM), sodyummetabisülfid (0,01-1 mM), askorbik asit (0,01-1 mM) ve tiyoüre (0,01-2 mM) gibi genel PFO inhibitörlerinin belirtilen konsantrasyonlardaki varlığında, ayrıca nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Ca^{2+} gibi monovalent, divalent ve trivalent metal iyonlarının mevcudiyetinde değişimi izlendi. İnhibitör konsantrasyonunun % kalan aktiviteye karşı grafiğe geçirilmesinin ardından %50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu, I_{50} değeri olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Substrat Özgünlüğü

Karakterizasyon çalışması için *Mespilus germanica* meyvesinin 3 farklı safhasından hazırlanan ham özütlerde bulunan polifenol oksidaz enzimi (PFO) için substrat olarak 4-metil katekol (4-MK), katekol, *L*-3,4-dihidrosifenilalanin (*L*-DOPA), tirosin ve 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA) kullanılmıştır (Tablo 1).

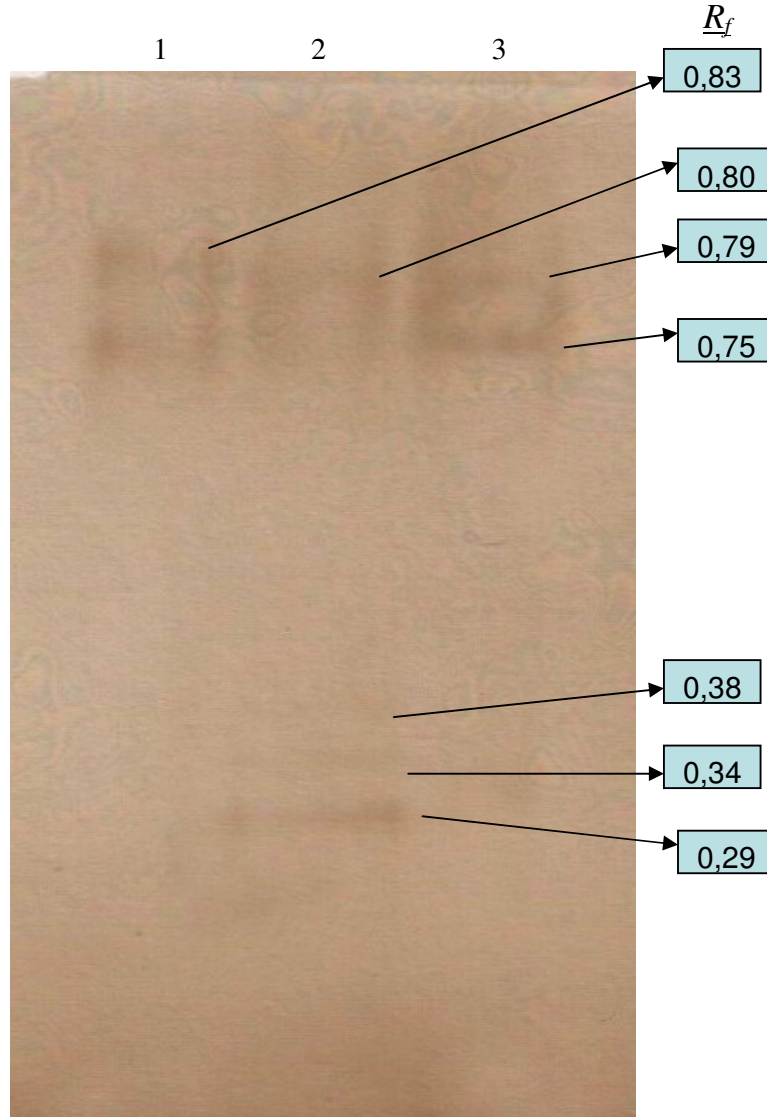
Tablo 1. *M. germanica* meyve özütündeki PFO'ların monofenolik ve difenolik substratlar varlığında % Bağıl Aktivite değerleri

	Bağıl Aktivite (%)		
	1. Safha	2. Safha	3. Safha
<i>Monofenolik substratlar</i>			
PHPPA	42,5	13,3	6,5
Tirosin	100	17,5	10,1
<i>Difenolik substratlar</i>			
4-MK	83,5	100	69,4
Katekol	38,1	72,1	100
<i>L</i> - DOPA	10,5	24,8	28,8

Elde edilen bu sonuçlar neticesinde enzimin meyvenin olgunlaşması esnasında bir değişime uğrayıp uğramadığını belirlemek için her bir safhada aktivite kararlılığı gösteren 4-MK substrat olarak seçilmiştir. Seçilen bu substrat bundan sonraki çalışmalarda *M. germanica* 'nın sahip olduğu difenolaz aktivitesinin karakterizasyonunda substrat olarak kullanılmıştır.

3.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi

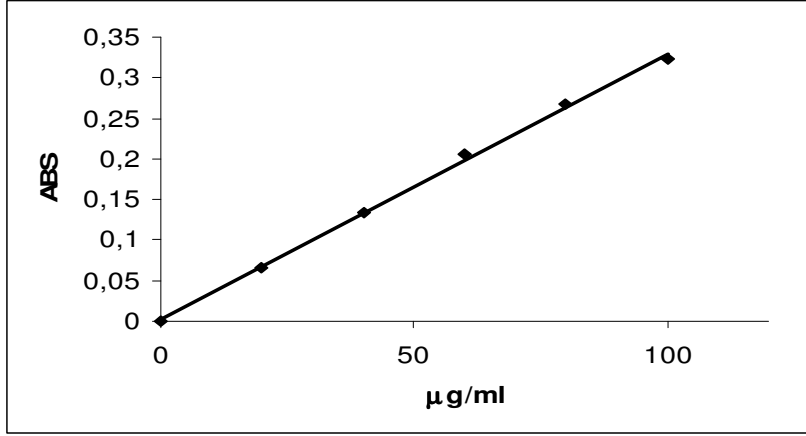
M. germanica meyvelerinden hazırlanan enzim özütü için doğal protein elektroforezi uygulandıktan sonra elektroforez jelinin 24 mM *L*-DOPA ile boyanması sonucunda elde edilen diyagramda R_f değerleri sırasıyla 0.83, 0.80, 0.79, 0.75, 0.38, 0.34 ve 0.29 olan birbirinden farklı bandların varlığı gözlenmiştir. 1. safhada gözlenen bandın R_f değeri 0.83; 2. safhadaki bandların R_f değerleri 0.80, 0.38, 0.34 ve 0.29; 3. safhadaki bandların R_f değerleri ise 0.79 ve 0.75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *Mespilus germanica* meyvesinin PFO izoenzimlerinin *L*-DOPA substratıyla boyanmış doğal poliakrilamid jel elektroforezi (1: 1. safha; 2: 2. safha; 3: 3. safha)

3.3. Protein Tayini

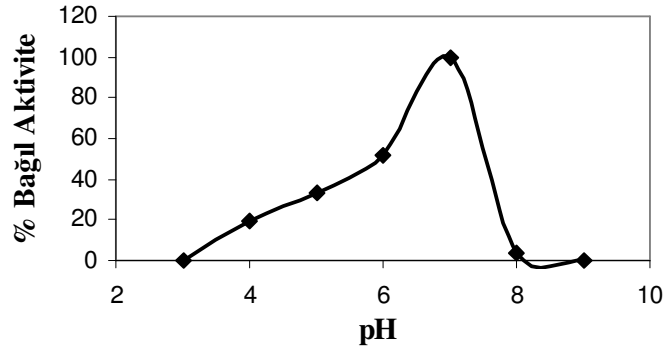
Muşmula meyvesinin üç ayrı olgunluk safhasından hazırlanan özütlerin protein içeriği Lowry (Lowry, 1951) yöntemine göre tayin edildi ve BSA standartları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden (Şekil 5) ham özütlerdeki protein miktarı 1. safha için 3,552 mg/mL, 2. safha için 3,897mg/mL, 3. safha için 2,052 mg/mL olarak bulundu.



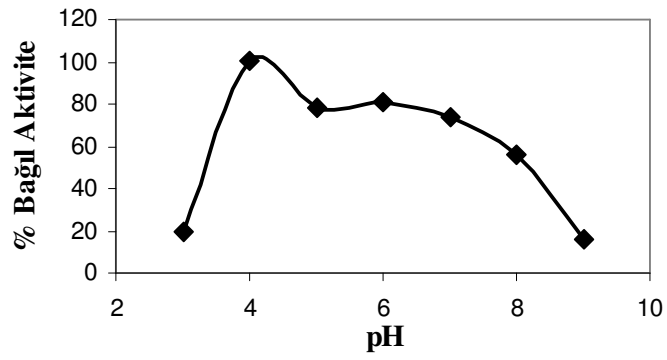
Şekil 5. Protein tayininde kullanılan BSA kalibrasyon grafiği

3.4. Optimum pH

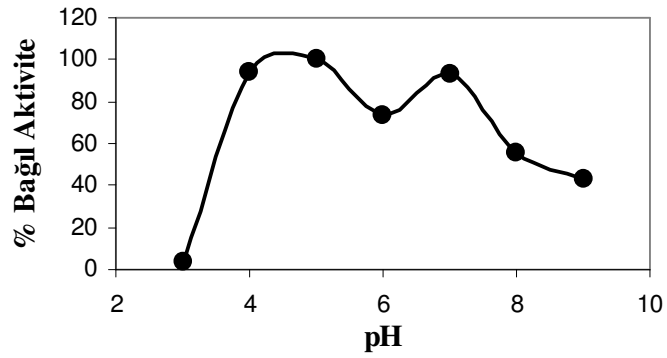
M. germanica'nın sahip olduğu difenolaz aktivitesinin üç farklı safhadaki optimum pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, 4-MK substratı varlığında (pH 3.0-9.0 aralığında) pH- % Bağlı Aktivite eğrileri hazırlandı. Buna göre, ham enzim özütündeki difenolaz aktivitesi için optimum pH değeri 1. safhada 7.0, 2. safhada 4.0 ve 3. safhada 5.0 olarak bulunmuştur. 3 safhada pH 7.0 da ikinci bir pik gözlenmiştir. Bu ikinci pik oluşumunun sebebi izoenzim varlığıyla veya benzer reaksiyon veren başka bir enzim varlığıyla ilişkilendirilebilir. Enzimin her üç safhada gösterebileceği farklılıkları tespit edebilmek için şartların aynı olması açısından bundan sonraki çalışmalarda her bir safha için optimum pH değeri 7.0 olarak kullanılmıştır (Şekil 6,7,8).



Şekil 6. *M. germanica* meyvesinin difenolazininin 1. safha için pH bağımlılık eğrisi



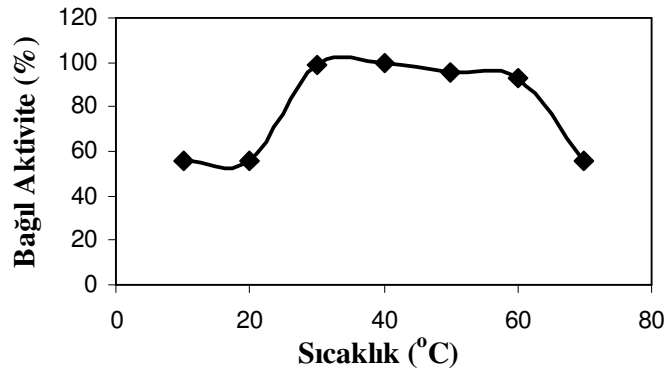
Şekil 7. *M. germanica* meyvesinin difenolazininin 2. safha için pH bağımlılık eğrisi



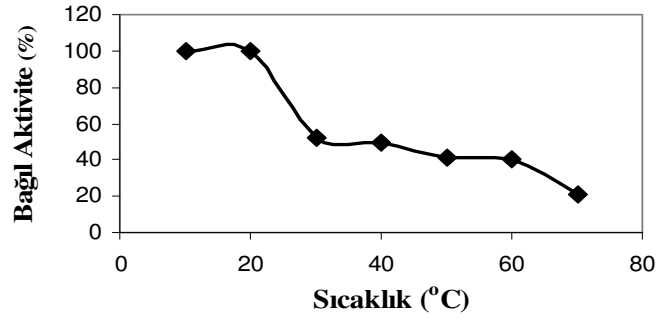
Şekil 8. *M. germanica* meyvesinin difenolazininin 3. safha için pH bağımlılık eğrisi

3.5. Optimum Sıcaklık

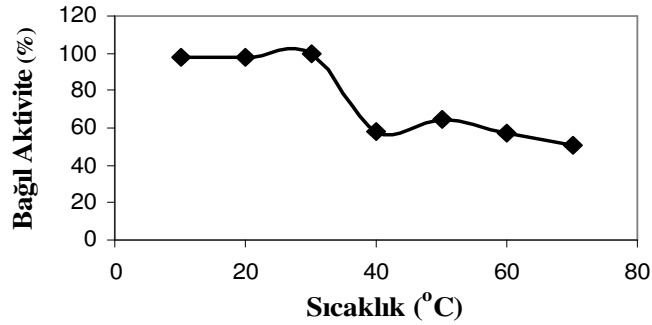
M. germanica meyvesindeki üç farklı safhada difenolaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 10-70°C arasında denenmiş Sıcaklık- %Bağıl Aktivite grafikleri Şekil 9, 10 ve 11’de gösterilmiştir. Buna göre 1. safha difenolaz aktivitesi için optimum sıcaklık değerinin elde edildiği eğri, 30 °C’ye kadar hızla arttığı ve daha sonra 40 °C’de aktivitenin maksimum değerine ulaştığı gözlenmiştir. Enzimin sahip olduğu difenolaz aktivitesini 60 °C’de %90 oranında, 70 °C’de ise %40 oranında muhafaza ettiği tespit edilmiştir. *M. germanica* meyve difenolazının 2. safha Sıcaklık - % Bağıl Aktivite grafiği incelendiğinde ise 20 °C’ye kadar aktivitenin optimum değerinde olduğu 30 °C’de aktivitenin %52 seviyelerine gerilediği ve 70 °C’de ise bağlı aktivitesini yaklaşık %10 oranında koruyabildiği gözlenmiştir. 3. safhada ise 10 °C ve 20 °C’de %98 gibi yüksek bir aktivitenin ardından 30 °C’de maksimum aktivite değerine ulaştığı ve 70 °C’de bağlı aktivitesini %51 gibi minimum bir oranda koruyabildiği tespit edilmiştir.



Şekil 9. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi



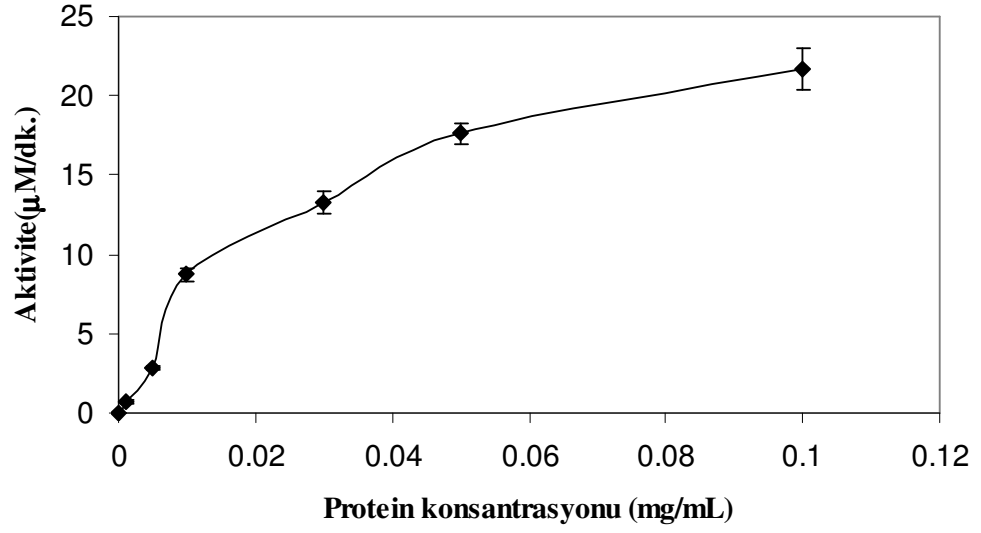
Şekil 10. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi



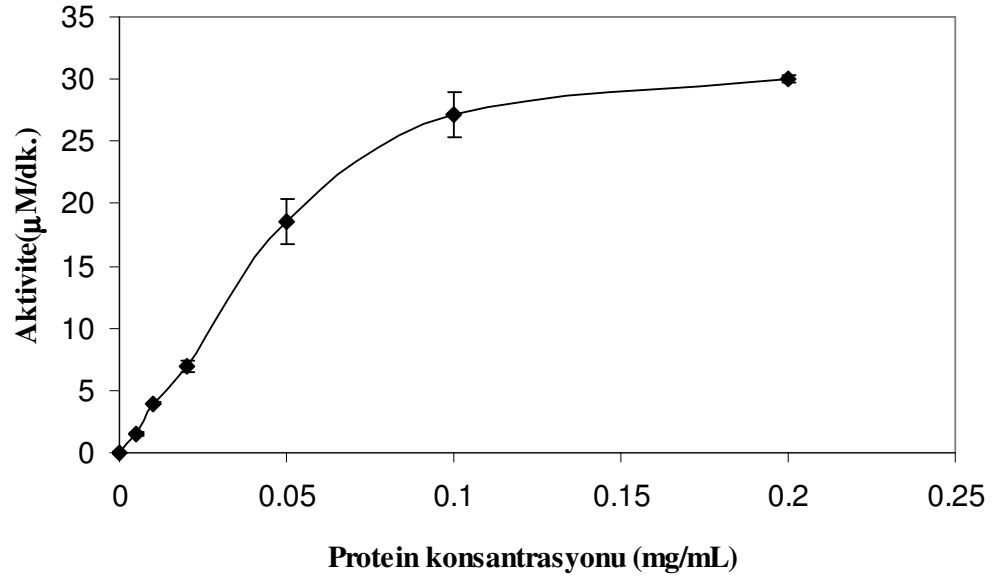
Şekil 11. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin sıcaklık bağımlılık eğrisi

3.6. *M. germanica* Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi

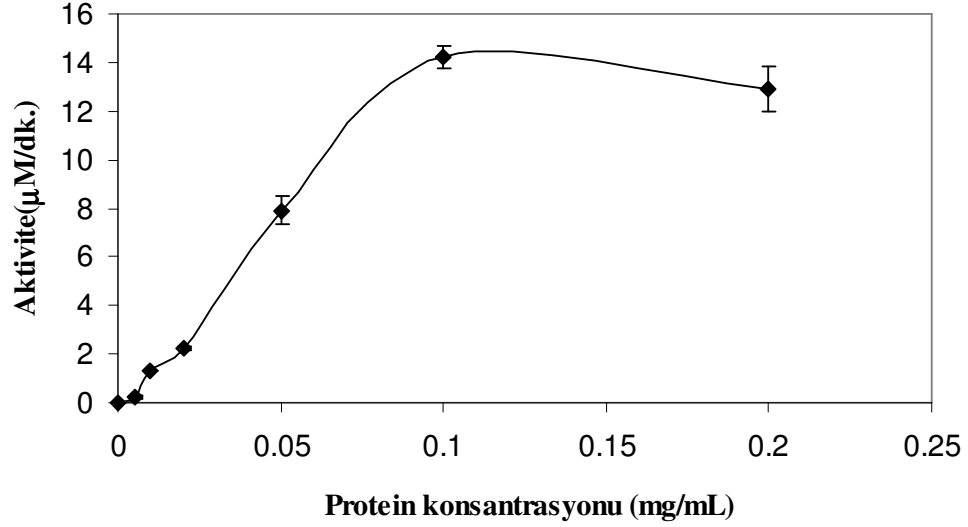
M. germanica'dan hazırlanan ham enzim özütlerinin sahip olduğu difenolaz aktivitesinin, her bir özüt için önceden belirlenen optimum şartlarda ve uygun bir substratın sabit bir konsantrasyonunda reaksiyon karışımındaki protein miktarına bağlı olarak değişimi incelendi. Elde edilen hiperbolik eğrilerden difenolaz aktivitesi için optimum protein miktarları 1. safha için 0,001-0,1mM, 2. ve 3. safha için 0,005-0,2mM aralığında taranarak her bir safha için optimum protein konsantrasyonları 1. 2. ve 3. safhada 0,1 mg/mL olarak belirlendi (Şekil 12, 13 ve 14). Difenolaz aktivitesinin daha sonraki ayrıntılı karakterizasyonu için gerekli olan çalışmalarda reaksiyon karışımları, nihai konsantrasyonları belirtilen miktarlarda protein içerecek şekilde hazırlandı.



Şekil 12. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi



Şekil 13. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi



Şekil 14. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

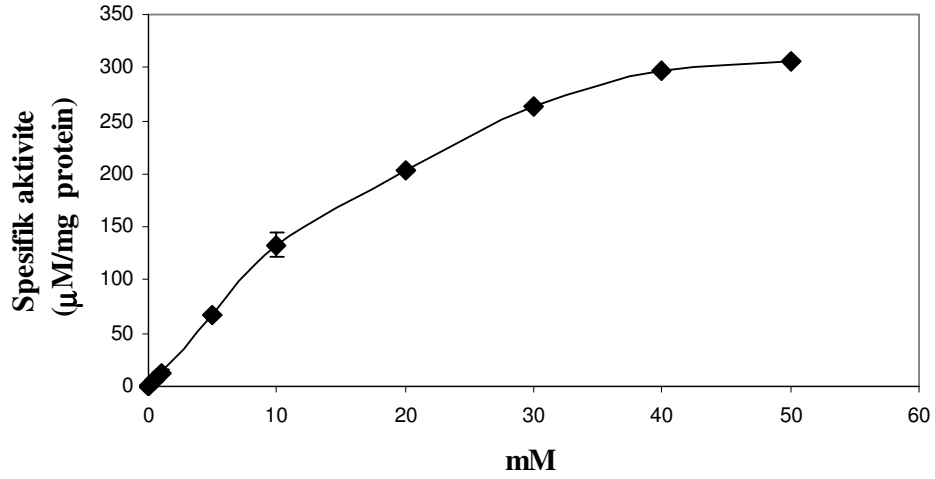
3.7. Substrat Konsantrasyonunun *M. germanica* Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, *M. germanica* meyvesinin sahip olduğu difenolazın çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacıyla reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonu 0,5-50 mM olacak şekilde 4-MK substratı kullanılarak oluşan oksidasyonun ürünlerinin oluşum hızları belirlendi. Her bir safhanın sahip olduğu difenolaz aktivitesinin optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için substrat doygunluk eğrileri (Şekil 15, 16, 17), kinetik veriler için ise Lineweaver-Burk eğrileri çizildi (Şekil 18, 19, 20). Substrat doygunluk eğrilerinden enzim aktivitesinin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu, etkili bir aktivitenin gözlenmesi için 1. safha, 2. safha ve 3. safhada enzimin aktivitesinin maksimum hızına ulaşabilmesi için gerekli substrat konsantrasyonunun 40 mM olduğu belirlendi. Lineweaver-Burk eğrilerinden difenolaz aktivitesi için 4-MK substratı varlığında V_{maks} değeri 1. safha için 476 ($\mu\text{M}/\text{dak}$ mg protein), 2. safha için 256 ($\mu\text{M}/\text{dak}$ mg protein) ve 3. safha için de 222 ($\mu\text{M}/\text{dak}$ mg protein) olarak tespit edildi ve K_m değeri de 1. safha için 26 mM, 2. safha için 12 mM ve 3.

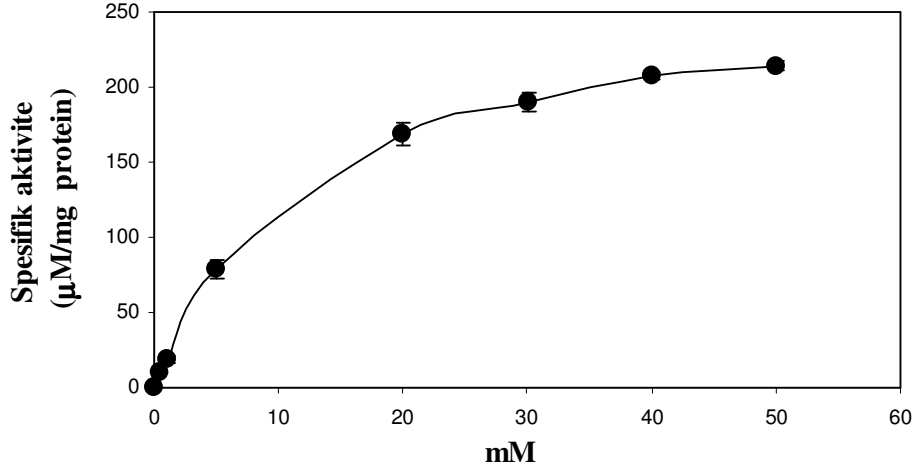
safha için de 8 mM olarak tespit edildi. Bu kinetik veriler toplu bir şekilde Tablo 2'te verilmektedir.

Tablo 2. PFO aktivitesine ilişkin bazı kinetik değerler

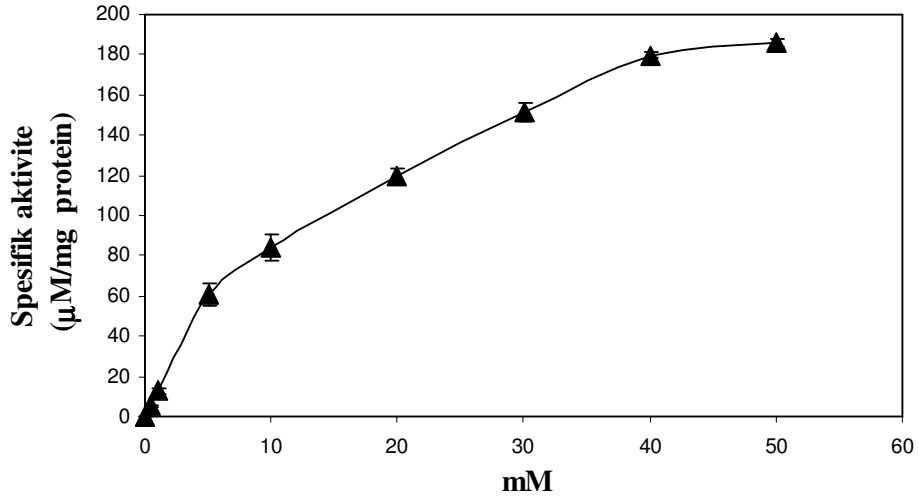
Olgunluk Safhası	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak. mg protein}$)	K_m (mM)	$V_{maks}/K_m(\text{dk}^{-1})$
1. safha (193. gün)	476	26	0,018
2. safha (207. gün)	256	12	0,021
3. safha (214. gün)	222	8	0,028



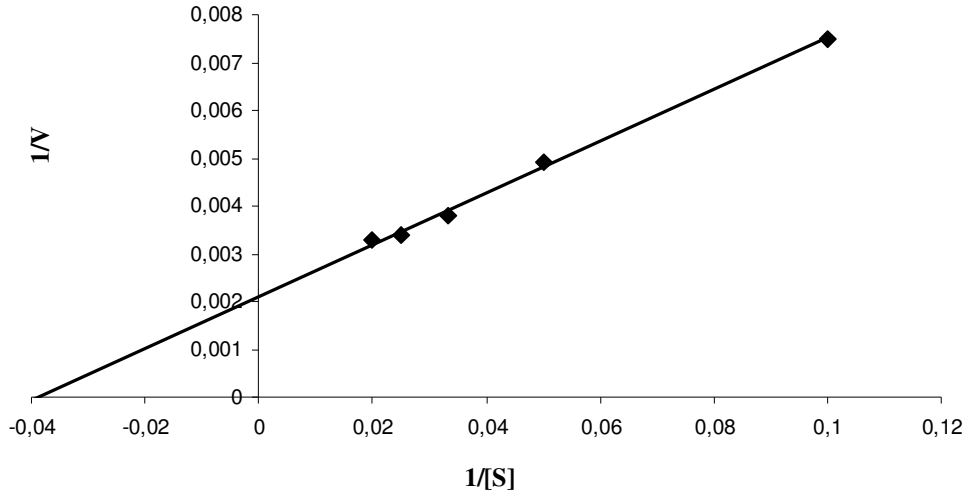
Şekil 15. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi



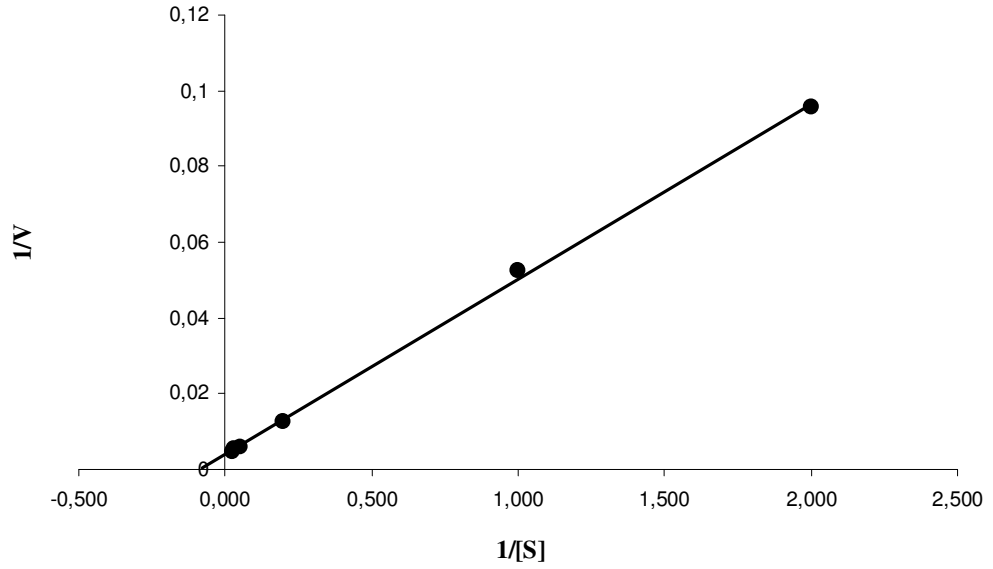
Şekil 16. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi



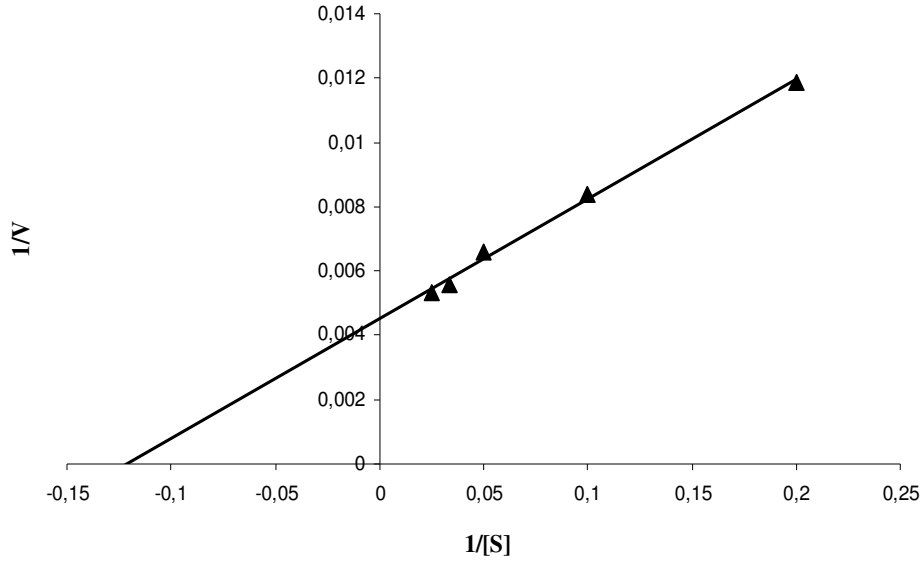
Şekil 17. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 18. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 19. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 20. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

3.8. *M. germanica* Meyvesindeki Difenolaz Aktivitesine Metal İyonlarının ve Genel PFO İnhibitörlerinin Etkisi

M. germanica meyvesinin difenolaz aktivitesine 1. safha için 1-60 mM konsantrasyon aralığında sodyum azid, 0,01-5 mM konsantrasyon aralığında sodyummetabisülfid, askorbik asit ve tiyoüre; 2. safha için 5-60 mM konsantrasyon aralığında sodyum azid, 0,01-5 mM konsantrasyon aralığında sodyummetabisülfid ve askorbik asit, 0,01-2 mM konsantrasyon aralığında tiyoüre; 3. safha için 1-40 mM konsantrasyon aralığında sodyum azid, 0,01- 1 mM konsantrasyon aralığında sodyummetabisülfid ve askorbik asit ve 0,01- 2 mM konsantrasyon aralığında tiyoüre gibi bazı genel PFO inhibitörlerinin etkisi incelendi. Bundan başka nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Ca^{2+} gibi monovalent, divalent ve trivalent metal iyonlarının da *M. germanica* meyvesinin difenolaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. I_{50} değerleri incelendiğinde 1. safha için sodyummetabisülfid ve askorbik asidin etkili birer inhibitör olduğu fakat sodyum azid uygulamasında difenolaz aktivitesinin zayıf inhibisyonunun sözkonusu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). 2. safha için askorbik asidin en etkili inhibitör olduğu, sodyum azid

uygulamasında ise aktivitenin zayıf inhibisyonunun söz konusu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). 3. safha için de 1. safhada olduğu gibi sodyummetabisülfid ve askorbik asidin etkili birer inhibitör olduğu, sodyum azid uygulamasında ise zayıf inhibisyon olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5). *M. germanica* meyve difenolazının aktivitesine metallerin etkisine bakıldığında 1. safha için en yüksek inhibisyonun %86'nın üzerindeki bir oranla Cu^{2+} ve Al^{3+} uygulamasında söz konusu olduğu, Mn^{2+} ve Zn^{2+} uygulamasında ise aktivasyon gözlemlendiği ve en yüksek aktivasyonun yaklaşık %14 gibi bir değerle Zn^{2+} uygulamasında söz konusu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6). 2. safha için en yüksek inhibisyonu yaklaşık %96 ve %93 oranında sırasıyla Hg^{2+} ve Cu^{2+} 'nin gösterdiği, Al^{3+} , Ni^{2+} ve Fe^{3+} uygulamalarında ise inhibisyon gözlenmeyip aktivasyon gözlemlendiği ve en yüksek aktivasyonu yaklaşık %22 ile Ni^{2+} 'nin gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 7). 3. safha için aktiviteye Cu^{2+} ve Hg^{2+} 'nin yaklaşık %100 inhibisyonla etki ederken Zn^{2+} 'nin sadece %1 inhibisyonla etki ederek en düşük inhibisyonu gösterdiği ve aktivasyonun gözlenmediği tespit edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 3. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon	I_{50} (mM)
Soyum azid	5.00	42.79	23.80
Sodyummetabisülfid	0.50	86.86	0.06
Askorbik asit	1.00	91.15	0.09
Tiyoüre	2.00	54.21	1.50

Tablo 4. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon	I_{50} (mM)
Soyum azid	5.00	2.07	41.00
Sodyummetabisülfid	0.50	45.49	0.60
Askorbik asit	1.00	78.54	0.10
Tiyoüre	2.00	55.97	1.73

Tablo 5. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon	I₅₀ (mM)
Soyum azid	5.00	42.43	9.00
Sodyummetabisülfid	0.50	97.52	0.05
Askorbik asit	1.00	93.25	0.08
Tiyüire	2.00	58.35	1.49

Tablo 6. 1. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	İnhibisyon (%)	Aktivasyon (%)
Cu ²⁺	87.09	Yok
Hg ²⁺	61.26	Yok
Mn ²⁺	Yok	8.41
Zn ²⁺	Yok	13.71
Al ³⁺	86.58	Yok
Ni ²⁺	32.93	Yok
Cd ²⁺	26.83	Yok
Fe ³⁺	25.53	Yok
K ⁺	22.32	Yok
Ca ²⁺	5.21	Yok

Tablo 7. 2. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	İnhibisyon (%)	Aktivasyon (%)
Cu ²⁺	93.33	Yok
Hg ²⁺	96.49	Yok
Mn ²⁺	8.29	Yok
Zn ²⁺	7.65	Yok
Al ³⁺	Yok	3.72
Ni ²⁺	Yok	22.19
Cd ²⁺	8.71	Yok
Fe ³⁺	Yok	17.56
K ⁺	11.38	Yok
Ca ²⁺	11.73	Yok

Tablo 8. 3. safhada hasat edilen *M. germanica* meyvelerinin difenolaz aktivitesine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	İnhibisyon (%)	Aktivasyon (%)
Cu ²⁺	99.42	Yok
Hg ²⁺	96.60	Yok
Mn ²⁺	29.49	Yok
Zn ²⁺	1.15	Yok
Al ³⁺	43.65	Yok
Ni ²⁺	36.45	Yok
Cd ²⁺	12.14	Yok
Fe ³⁺	35.77	Yok
K ⁺	14.23	Yok
Ca ²⁺	41.03	Yok

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bitkilerde, Polifenoloksidaz (PFO) hücrelerin sağlam kısımlarında baskın olarak plastit ve kloroplastlarda bulunur. Ham meyve hücrelerinde membran bağımlı olarak plastitlerde, olgunlaşma ve depolama sürecinde çözünmüş veya parçalanmış olarak bulunabilir. Bu sebeple PFO bitki hücrelerinde aynı anda her iki formda da bulunabilir (Concellon vd., 2004). Oksidoredüktaz sınıfı enzimler, protein yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle çok fazla çalışılmamış ancak PFO enzimi son 30 yıl içerisinde birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Seo vd., 2003). Bitkilerde meyvenin ham veya olgun olması bu enzimin katalizlediği reaksiyonu etkileyen bir unsurdur. Enzim özütü birçok izoenzim kombinasyonunu ve enzim olmayan protein karışımlarını içerebilir. Bu durum yiyecek endüstrisinde oldukça tercih edilen bir durumdur (Duangmal, 1999).

Bu çalışmada kullanılan *Mespilus germanica* L. meyvesinde oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO enziminin difenolaz aktivitesinin varlığı, biyokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler bilinen diğer organizmalardaki PFO'lar ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan doğal poliakrilamid jel elektroforezinde *M. germanica* meyvesine ait Rf değerleri 1. ve 3. safha için 2 bant, 2. safha için ise 5 bandın varlığı gözlenmiştir. Bu sebeple söz konusu meyveden hazırlanan ham enzim özütlerinin PFO aktivitesi gösteren farklı izoenzimlerin varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4). Daha önce farklı organizmalarda yapılan çalışmalar sonucu ikiden fazla PFO izoenziminin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları; kiraz (Pifferi ve Culterera, 1974), karayemiş (Colak vd.,2005), döngel (Dincer vd., 2002), *A. kestanbolensis* K1ve K4^T (Yildirim vd., 2004), *Macrolepiota mastoidea* mantarıdır (Kolcuoğlu vd., 2006).

Yapılan ön çalışmalar sonucunda PFO aktivitesine sahip olması ve birçok ülkede önemli ölçüde tüketiliyor olması nedeniyle *M. germanica* tercih sebebi olmuştur. Ayrıca bu çalışmada denenen bütün difenolik ve monofenolik substratlar olan katekol, 4-metil katekol (4-MK), *L*-3,4-dihidroksifenilalanin (*L*-DOPA), tirosin ve (3-(4-hidroksifenil) propionik asit) (PHPPA) *M. germanica*'da bulunan PFO enzimi tarafından yükseltgendiği görülmüştür. Her üç safhada da ortak olarak en yüksek aktivite 4-MK varlığında gözlenmiştir (Tablo 1). Bu denemeler sonucu elde edilen verilerden enzim aktivitesi diğer

bitki kaynaklarına benzer olarak difenolaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Yemenicioğlu ve Cemeroglu, 2003; Colak vd., 2005; Concellon vd., 2004; Rocha ve Morais, 2001; Dogan ve Dogan, 2004).

Döngel meyvesinde her bir aşama için optimum pH değerini belirlemek amacıyla yapılan denemelerde, 4-MK substratı varlığında 1. safha için pH 7.0'da tek pik, 2. safha için pH 4.0'da ve bir omuz şeklinde 7.0'da iki pik, 3. safha için pH 5.0'da ve ayrıca 7.0'da ikinci bir pik gözlenmiştir (Şekil 6,7,8). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda enzimin her bir safhadaki aktivitesinin değişiminin incelenebilmesi amacıyla diğer çalışmalar pH 7.0'da gerçekleştirilmiştir. Değişik organizmalardan hazırlanan ham özüt veya saf enzimlerin sahip olduğu difenolaz aktivitesi için önceden yapılan çalışmalarda, optimum pH değerinin *Macrolepiota mastoidea* mantarı için 4.0 (Kolcuoğlu vd., 2006), taro ve patates için optimum pH değerinin 4,6 ve 6,8 (Duangmal vd., 1999), elma için 5.0-7.5 (Rocha vd., 2001), kayısı için 7.0-8.5 (Arslan vd., 1998), şeker pancarı için 7.0 (Gürel ve Wren, 1994), kivi için 6.0-7.0 (Park and Luh, 1985), elma için 6.0-7.0 (Murata vd.,1992) ve kiraz için 4.0-5.0 (Fraignier vd., 1995) olduğu kaydedilmiştir. Buna göre, *M. germanica* difenolazı önceden bildirilen difenolazlarla optimum pH açısından uygunluk göstermektedir.

M. germanica meyvesindeki PFO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda optimum sıcaklığın difenolaz aktivitesi için 1. safhada 30 °C, 2.safha için 20 °C, 3. safha için 30 °C olarak bulunmuştur (Şekil 9,10,11). Farklı bitki türlerinde PFO enziminin optimum sıcaklıkları *M. germanica* ile benzerlik göstermektedir. Bu hususta literatürde; *M. mastoidea*'da 20 °C (Kolcuoğlu vd., 2006), erikte 37 °C (Siddiq vd., 1992), döngel meyvesinde 35 °C (Dincer vd., 2002), taro ve patateste 25-30 °C (Duangmal vd., 1999), şeftalide 20°C (Jen vd., 1974) ve üzümde 25 °C (Cash vd., 1976) olarak belirtilmektedir.

Difenolik substrat olan 4-MK'ün her bir safha için çizilen substrat-doygunluk eğrilerinden *M. germanica* difenolazının basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça gözlenmiştir (Şekil 15,16,17). 4-MK substratı varlığında döngel meyvesinin 1., 2. ve 3. safhalarında difenolaz aktivitesi için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinden (Şekil 18,19,20) bulunan enzimin substrata ilgisini açıklayan K_m ve katalitik etkinliği ortaya koyan (V_{maks}/K_m) değerleri dikkate alındığında veya literatürle karşılaştırıldığında seçilen substratın difenolaz aktivitesi için uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, difenolazlar için 4-MK gibi küçük molekül ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar oldukları daha önce

yapılan çalışmalarda da belirtilmektedir (Perez-Gilabert vd., 2000; Palmer,1995; Walker,1995; Duangmal vd., 1999; Dincer vd., 2002; Yildirim vd., 2004).

Bitkilerin olgunlaşması ve depolanması esnasında meydana gelen enzimatik esmerleşme gıda endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bunu önlemek amacıyla en sık başvurulan yol inhibitörlerin kullanımudur. Bu amaçla inhibitör olarak en çok kullanılan SO₂ insan sağlığını olumsuz yönde etkilediğinden dolayı tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Yapılan çalışmada bir çok bitki PFO'ı için inhibitör olarak denenilen sodyummetabisülfid, sodyum azid, askorbik asid ve tiyoüre, *M. germanica*'dan elde edilen farklı safhalardaki PFO enzimi için de denenmiş ve her bir inhibitör için I₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3,4,5). En yüksek bağlanma ilgisi, 4-MK substratı varlığında her üç safha için de sodyummetabisülfid ve bunu takiben de askorbik asit olarak gözlenmiştir. (Duangmal vd., 1999; Ding vd., 1998; Zhang vd., 1997; Yang vd., 2000; Ros vd., 1993; Sapers vd., 1987; Hsu vd., 1988; Dudley vd., 1989). Askorbik asit ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden enzim aktivitesini kısıtlayabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Ayrıca askorbat difenolaz enzimi 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). Sülfhidril grubu içeren bileşiklerin inhibisyon mekanizmasının uzun süredir devam eden tartışmaların ardından iki şekilde olabileceğine karar verilmiştir. Bunlardan birincisi kinon bileşikleri ve sülfhidril grupları arasında konjugat meydana gelerek bu bileşiklerin çökmesi ve dolayısıyla melanin pigmentlerinin oluşmamasıdır. İkinci görüş ise bu bileşiklerin içerdiği kükürdün yüksek bir ilgiyle enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır atomuna ve histidin birimlerine dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla inhibisyonun gerçekleşmesidir (Ding vd., 2002). Bu çalışmada, önceden de denenerek çeşitli PFO aktiviteleri üzerine etkisi bildirilen, bazı metal iyonlarının *M. germanica* difenolaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve benzer sonuçlar tespit edildi (Kong vd., 2000; Kolcuoğlu vd., 2006). Döngel meyvesinden elde edilen PFO enziminin difenolaz aktivitesinde 1. safhada Cu²⁺, Hg²⁺ ve Al³⁺, 2. safhada Cu²⁺ ve Hg²⁺ ve 3. safhada Cu²⁺, Hg²⁺, Al³⁺ ve Ca²⁺ yüksek inhibisyona sebep olurken; 1. safhada Mn²⁺ ve Zn²⁺, 2. safhada Al³⁺, Ni²⁺ ve Fe³⁺ iyonları aktivasyona sebep olurken 3. safhada herhangi bir aktivasyon gözlenmemiştir (Tablo 6,7,8). Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip

olabilirler. Bu yüzden proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler. Buna ilave olarak aktivasyona ve inhibisyona sebep olma gibi farklı durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu enzim yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabilir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001).

5. ÖNERİLER

Çok çeşitli bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarla, PFO'nun meyve ve sebzelerde esmerleşmeye sebep olduğu ve dolayısıyla hem bitkinin özelliklerinde istenmeyen bazı değişimlere sebep olduğu, hem de ekonomik açıdan kayıplara yol açtığı ortaya konulmuştur. Bu esmerleşmenin farklı meyve ve sebze kültürlerindeki fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz aktivitesine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. PFO ile katalizlenen bu reaksiyonlar sonucu oluşan kinonlar oldukça reaktif ürünlerdir ve polimerleşerek esmer pigmentin oluşumuna sebep olurlar. Bu polimerik kahverengi pigmentin oluşumu bitkinin besinsel özelliklerinde bazı değişimlere sebep olur. Böylece ürünün hem besinsel hem de ekonomik değeri azalır. Bu nedenle bu esmerleşme olayı gıda endüstrileri açısından ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bundan dolayı, farklı bitki türlerinde esmerleşmeyi sağlayan PFO aktivitelerinin detaylı karakterizasyonu hem bu aktivitenin önlenmesi ve hem de ekonomik kayıpların önlenmesi için önemli bilgiler sağlayacaktır.

Çalışmaya başlamadan önce yapılan fizibilite aşmasında PFO aktivitesi diğer bir çok bitki türünde tespit edilen değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Muşmula bitkisi çok fazla endüstriyel önem taşımamasına rağmen aktivitenin yüksek olması nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. 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 oluşturur. Ayrıca, esmerleşmenin besinsel, kimyasal, biyokimyasal ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin önlenmesine 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. Bu çalışma ile, bitkinin farklı olgunluk safhasındaki farklı PFO aktivitelerinin ortaya konması besin endüstrisi açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Yine bu bilgiler ışığında tıp ve ilaç endüstrisinde bitkinin değişik olgunluk dönemindeki PFO aktiviteleri hakkında bilgi sahibi olmak bu endüstri alanlarındaki kullanım açısından faydalar sağlayacaktır.

Muşmula meyvesinin tüketilmesi hemen hasat sonrası, mezokarpın beyaz, takip eden olgunlaşma dönemlerinde ise mezokarpın orta derecede kararmış ve tam kararmış olduğu dönemleri kapsamaktadır. Bu üç olgunlaşma döneminde muşmula meyvesi karışık olarak tüketilmektedir. Özellikle enzimatik kararmadan dolayı, muşmula meyvesi ikinci ve üçüncü olgunlaşma safhalarında tüketilmektedir. Uygun depolama şartları veya enzimatik kararmayı en azından ikinci olgunlaşma döneminde yavaşlatabilecek inhibitörler seçildiği takdirde meyvenin bu dönemdeki raf ömrü uzatılmış olacaktır. Çünkü üçüncü olgunlaşma döneminde belli bir zamandan sonra meyve bozulmaya başladığından meyveden gelen karakteristik koku insanları bu dönemdeki meyveyi tüketmekten alıkoymaktadır. Bizim sonuçlarımız *M. germanica* (muşmula) meyvesinin mezokarpının kahverengimsi ve tamamen yumuşak olduğu 2. safha dönemi etrafında tüketilmesinin bu meyvenin besin içeriğinden yararlanma bakımından daha uygun olacağını önermektedir.

Üreticilerin en azından bu dönemi (Kasım sonuna doğru) dikkate almaları meyvenin tüketilmesi ve pazarlanması açısından avantaj sağlayacaktır. Benzer çalışmalar, diğer mevcut *M. germanica* genotiplerinde ve kültürlerinde de yapılması ile bu meyvenin hasat zamanı ve market ömrü açısından bir envanteri çıkmış olacaktır. Bunun ise üreticiye ve tüketiciye, hatta pazarlamacıya ihracat açısından bir rehber bilgi sağlayacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Andrawis, A. ve Kahn, V., 1996. Effect of methimazole in the activity of mushroom tyrosinase. Biochem. J., 235, 91-96.
- Anosike, E.O. ve Ikediobi, C.O., 1985. The biochemistry of the browning of yam tubers. In: *Advances in Yam Research* (1st edn), ed. Osuji G., Biochemical Society of Nigeria, Nigeria, 145-160 pp.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, İ., 1997. Polyphenol oxidase from *Allium sp.*, J. Agric. Food Chem., 45, 2681-2683
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, I., 1998. Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) J. Agric. Food Chem., 46, 1239-1241.
- Augustin, N.A., Hasanah, M.G. ve Hasimah, H., 1985. Polyphenoloxidase from guava (*Psidium guajava* L.). J. Sci. Food Agric., 36, 1259-1265.
- Ayaz F.A., Glew R.H., Huang H.S., Chuang L.T. ve VanderJagt D.J., 2002a. Strnad M. Evolution of fatty acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) mesocarp at different stages of ripening. Grasas y Aceites., 53, 352-356.
- Ayaz F.A., Huang H.S., Chuang L.T., VanderJagt D.J. ve Glew R.H., 2002b. The fatty acid composition of medlar (*Mespilus germanica*) fruit at different stages of development. Italian J. Food Sci., 14, 439-445.
- Baytop, T., 1999. Curing with plants in Turkey, in the past and today (Türkiye’de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün), (2nd ed.). Nobel Medical Boks, Capa, İstanbul, 299 p.
- Bignami, C., 2000. Il nespolo comune. L’Informace Agrario, 25, 43-46.
- Biswas, A.K. ve Sarkar, A.R., 1971. Biological and chemical factors affecting the valuation of North East Indian plains teas. J. Sci. Food Agric., 22,196-204.
- Bock, W. C., Katz,A.G., Markham, G. D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparasion of the divalent ions. J. American Chem. Soc., 121, 7360-7372.
- Browicz, K., 1972. *Mespilus* L. In: Davis P.H.(Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh, 128-129 pp.

- Cano, M. P., de Ancos, B. ve Lobo, G., 1995. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in papaya during postharvest ripening and after freezing-thawing, J. Food Sci., 60, 815-820
- Cano, M. P., Lobo, M.G., de Ancos, B. ve Galeazzi, M.A.M., 1996. Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits, J. Agric Food Chem., 44, 3075-3079
- Cash, J.N., Sistrunk, W.A. ve Stutte, C.A., 1976. Characteristics of Concord grape polyphenol oxidase involved in juice color loss. J. Food Sci., 41, 1398-1402.
- Chen, Q.X. ve Kubo, I., 2002. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. J.Agric. Food Chem., 50, 4108-4112.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, F. A., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis Roem.*) fruits at an early stage of maturation. Food Chem., 90, 801-807.
- Concellon, A., Anon , M. C. ve Chaves, A. R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena L.*) during storage at low temperature. Food Chem., 88, 17-24.
- Corsini, D.L., Pavek, J.J. ve Deab, B., 1992. Difference in free and protein-bound tyrosine among potato geotypes and their relationship to internal blackspot resistance, Am. Pot. J. 69, 423-434
- Decker, H. ve Tuczek, F., 2000. Tyrosinase / catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. J. Biol. Chem., 25, 392-397.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenol oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica L.* Roseceae). Food Chem., 77, 1-7.
- Ding, C.-K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Imahori, Y., 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. J.of Agric. Food Chem., 46, 4144-4149.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Wang, C.Y., 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. Food Chem., 76, 213-218.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of metal ion binding. I. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubadii* var. *chaubardii*). Food Chem., 88, 69-77.

- Dry, I. B. ve Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. Plant Molecular Biology, 26,495-502.
- Duangmal, K. ve Owusu Apenten, R.K., 1999. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). Food Chem., 64, 351-359.
- Dudley, E. D. ve Hotchkiss, J. H., 1989. Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase. J. Food Biochem., 13, 65-75.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A. ve Granfreda, L., 2002. Applications of laccase and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Tech., 31, 907-931.
- 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 of mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 45, 1084-1090.
- Espin, J.C. ve Wichers, H.J., 2001. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. Biochem. Biophys. Acta., 1554, 289-300.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenol, G.L., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, A.P., Varon, R. ve Garcia-Canovas, F., 2000. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. Eur. J. Biochem., 267, 5865-5878.
- Ferrari, P.H. ve Walker, J.R.L., 1996. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study. J. Food Biochem., 20, 15-30.
- Finger, A., 1994. *In-vitro* studies on effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation polyphenolic black tea constituents. J. Sci. Food Agric., 66, 293-305.
- Fraignier, M.P., Marques, L., Fleuriert, A., ve Macheix, J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. J. Agric. Food Chem., 43, 2375-2380
- Friedman, M., 1996. Food Browning and Its Prevention, J. Agric. Food Chem., 44, 631-653

- Friedman, M., 1997. Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, J. Agric. Food Chem., 45, 1523-1540
- Glew R.H., Ayaz F.A., VanderJagt D.J., Millson M., Dris R. ve Niskanen R., 2002. Mineral composition of medlar (*Mespilus germanica*) fruit at different stages of maturity. Journal of Food Quality, 26, 441-447.
- Glew R.H., Ayaz F.A., Sanz C., VanderJagt D.J., Huang H.S., Chuang L.T. ve Strnad M., 2003a. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development. Food Chem., 83, 363-369.
- Glew R.H., Ayaz F.A., Sanz C., VanderJagt D.J., Huang H.S., Chuang L.T. ve Strnad M., 2003b. Effect of postharvest period on sugar, organic acid and fatty acid compositions in commercially sold medlar (*Mespilus germanica* 'Dutch') fruit. Eur. Food Sci. and Technol., 216, 390-394.
- Gürel, E. ve Wren, M.J., 1995. Measuring Polyphenol Oxidase Activity in Small Leaf Discs of Sugar Beet (*Beta vulgaris*). J. Botany, 19, 497-502.
- Ha, T.J., Yang, M.S., Jang, D.S., Choi, S.U. ve Park, K.H., 2001. Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophore flarescens* for melanogenesis. Bull. Korean Chem. Soc., 22, 97-99.
- Hsu, A. F., Shieh, J. J., Bills, D.D. ve White, K., 1988. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. J. Food Sci., 53, 765-767.
- 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 Mol. Biol., 21, 59-68
- Ikehata, K. ve Nicel, J.A., 2000. Characteriation of Tyrosinase for the Treatment of Aqueous Phenols. Bio. Tech., 74, 191-199.
- Jen, J.J., ve Kahler, K.R., 1974. Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the Southeast. Hortscience, 9, 590-591.
- Kertesz, D. ve Zito, R., 1962. Phenolase. In: Oxygenases (O. Hayaichi, ed) Academic Press, New York, 307 p.
- Khan, V. ve Pomerantz, S.H., 1980. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase, Phytochemistry, 19, 379-385
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. ve Krebs, B., 1998. Crystal structure of plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nature Structural Biology, 5-12.
- Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidae*). Food Chem., In Press

- Kong, K.H., Hong, M.P., Choi, S.S., Kim, Y.T. ve Cho, S.H., 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. Biotechnol. Appl. Biochem., 31, 113-118.
- Kubo, I. ve Yokokawa, Y., 1992. Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from *Buddleia coriacea*. Phytochemistry, 31, 1075-1077.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1998. Tyrosinase inhibitors from cumin. J. Agric. Food Chem., 46, 5338-5341.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1999. Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. J. Agric. Food Chem., 47, 4121-4125.
- Laurila, E., Hurme, E. ve Ahvenainen, R., 1998. The shelf-life of sliced raw potatoes of various cultivar varieties-substitution of bisulphites. J. Food Protec., 9, 53-66.
- 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, J. Agric. Food Chem., 38, 99-101
- 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 Sci. Biotechnol., 9, 330-333.
- Lee, H.S., 2002. Tyrosinase inhibitors of from *Pulsatilla cernua* root-derived materials. J. Agric. Food Chem., 50, 1400-1403.
- Lowry, O.H., Rosebraugh, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Bio. Chem., 193, 265-275.
- Martinez, M. ve Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science and Technology, 6, 195-200.
- Mayer, A.M. ve Harel, E., 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: Food Enzymology (Vol 1) ed. Fox PF, Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, 373-398 pp.
- Mazzafera, P. ve Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry, 55, 285-296.
- Murata, M., Kurokami, C. ve Homma, S., 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1705-1710
- Nicolas, 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. Rv. Food Sci. Nutr., 34, 109-157

- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), 1989. Nomenclature of electron-transfer proteins, Eur. J. Biochem., 200, 599-611
- Omidiji, O. ve Okpuzor, J., 1996. Time course of PFO-related browning of yams, J. Sci. Food Agric., 70, 190-196
- Palmer, T., 1995. Kinetics of single-substrate enzyme catalysed reactions. *In Understanding Enzymes*, 4th edn. Prentice Hall / Ellis Harwood, Hertfordshire, 107-127 pp.
- Park, E.Y. ve Luh, B.S., 1985. Polyphenol oxidase of kiwifruit. J. Food Sci., 50, 679-684
- de Pascual T.S., Santos-Buelga C. ve Rivas-Gonzalo J.C., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J. Agric. Food Chem., 48, 5331.
- Perez-Gilabert, M. ve Garcia-Carmona, F., 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 48, 695-700.
- Pifferi, P.G. ve Cuterera, R., 1974. Enzymatic degradation of anthocyanines: the role of sweet cherry polyphenol oxidase. J. Food Sci., 39, 786-791.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J. ve Dawley, R., 1994. Tyrosinase, Laccase, and Peroxidase in mushroom. J. Food Sci., 59-4.
- Rathjen, A.H. ve Robinson, S.P., 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a varietal grapevine mutant. Plant Physiology., 99, 1619-1625.
- Riggin, R.M., McCarthy, M.J. ve Kissinger, P.T., 1976. Identification of salsolinol as a major dopamine metabolite in the banana. J. Agric. Food Chem., 24, 189-191.
- Robb, D.A., 1984. Tyrosinase In R. Lontie (Ed.) Copper proteins and copper enzymes. Boca Raton, FL: LRC Press., 2, 207-241.
- 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., Escibano, J. ve Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, Anal. Biochem., 184, 205-212.
- Romero-Rodriguez, A., Simal-Lozano, J., Vazquez-Oderiz, L., Lopez-Hernandez, J. ve Gonzalez-Castro, M.J., 2000. Physical, physicochemical and chemical changes during maturation of medlars and persimmons. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, 142-145.

- Ros, J.R., Rodriguez-Lopez, J.N. ve Garcia-Canovas, F., 1993. Effect of l-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase . Biochem. J., 295, 309-312.
- Sapers, G.M., 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. Food Technol., 47, 75-81.
- Sapers, G.M. ve Ziolkowski, M.A., 1987. Comprasion of erythorbic acid and ascorbic acid as inhibitors of enzymatic browninig in apple. J. Food Sci., 52, 1732-1733.
- Siddiq, M., Sinha, K. ve Cash, J.N., 1992. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. J. Food Sci., 57, 1177-1179.
- Singh, H.P. ve Ravindranath, S.D., 1994. Occurence and distribution of PPO activity in floral organs of some standard and local cultivars of tea. J. Sci. Food Agric., 64, 117-120.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. J. Agric. Food Chem., 51, 2837-2853.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B. ve Robinson, S.P., 1994. Polyphenol oxidase in potato tubers. In W.R. Belknap, M.E. Vayda, W.D. Park, eds., *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, Ed 2. CAB International, Wallingford, UK, 151-159 pp.
- URL-1, www.zoomedia.it Antichi Frutti Cercas. 20.06.2006
- URL-2, www.hobbygarten.com Der Garten im Herbst. 20.06.2006
- URL-3, www.agsci.ubc.ca Food Colourants. 25.10.2004
- 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.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. ve Duke, S.O., 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. Physiol Plant., 72, 659-665
- Walker, J.R.L., 1995. Enzymatic browning in fruits: Its biochemistry and control. *In Enzymatic Browning and Prevention*, ed. Y.L. Chang and J.R. Whitaker, 8-22 pp. ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC.
- Whitaker, J.R., 1972. Polyphenol oxidase. In: *Principles of enzymology for the food sciences*, (Fennema, O.R., Ed.) Marcel Dekker, Inc. New York, 571-582 pp.
- Yelana, G., Sheptovitsky ve Brudving, G. V., 1996. Isolation and characterization of spinach phossystem II membrane –associated catalase and polyphenol oxidase, Biochem.,35, 16255-16263.

- Yemenicioğlu, A. ve Cemerogđlu, B., 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armenica* L.): Evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. J. Agric. Food Chem., 1, 2371-2379.
- Yang, C.D., Shuji, F., Ashrafuzzman, M.D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. J. Agric. Chem., 48, 2732-2735.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dölger, S. ve Beldüz, A.O., 2004. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* strains K1 and K4^T. World J. Microbiol. Biotech., In Pres
- Zhang, X. ve Flurkey, W.H., 1997. Phenoloxidase in *Portabella* mushrooms, J.Food Sci., 62, 97-100
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. ve Eskin, N.A.M., 1991. Polyphenol oxidase. In D.S. Robinson ve N.A.M. Eskin. *Oxidative Enzymes in Foods*, London: Elsevier, 217-273 pp.

ÖZGEÇMİŞ

05.02.1981 tarihinde Trabzon ili Çarşıbaşı ilçesine bağlı Őahinli Köyünde doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilçede tamamladıktan sonra 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2002 yılında bu fakülteden 'Biyolog'  nvanı ile mezun oldu ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.