

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALDIRIK (*Trachystemon orientalis*) BİTKİSİNDEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN KISMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimyager Esmâ Hande ALICI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Mayıs 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALDIRIK (*Trachystemon orientalis*) BİTKİSİNDEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimyager Esmâ Hande ALICI

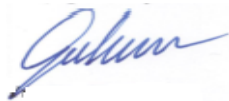
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 05/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet
KANDAZ
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Gülnur
ARABACI
Üye



Yrd. Doç. Dr. Hüseyin
AKSOY
Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman Hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya, çalışmalarım sırasında bölümün imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve anlayışını benden esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Ali Osman AYDIN'a, deneysel çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve desteğini gördüğüm sevgili çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

Hayatımın her anında bana güvenen, desteğini ve sevgisini her zaman derinden hissettiğim canım aileme şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
------------	---

BÖLÜM 2.

ENZİMLER ve POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ.....	8
2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	8
2.1.1. Enzimlerin spesifikliği.	9
2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması.....	9
2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri.....	11
2.1.4. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler.....	12
2.1.5. Enzim aktivite birimleri.....	14
2.1.6. Enzim kinetiği.....	15
2.1.6.1. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların kinetiği.....	15
2.1.7. Tek substratlı sistemlerde inhibisyon.....	18
2.1.7.1. Kompetitiv (Yarışmalı) inhibisyon.....	18
2.1.7.2. Nonkompetitiv (Yarışmasız) inhibisyon.....	20
2.1.7.3. Unkompetitiv (Yarıyarışmalı) inhibisyon.....	22
2.1.7.4. Lineer karışık tip inhibisyon.....	23

2.2. Kaldirik (<i>Trachystemon orientalis</i>).....	25
2.3. Esmerleşme Reaksiyonları.....	26
2.3.1. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları.....	26
2.3.1.1. Maillard reaksiyonunun oluşumu.....	27
2.3.2. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları.....	28
2.4. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	29
2.4.1. Doğada bulunuşu.....	29
2.4.2. Melanin ile ilişkisi.....	29
2.4.3. Substratları.....	32
2.4.4. İnhibitörleri.....	33
2.4.5. Bakır bölgeleri ve reaksiyon mekanizması.....	36
2.4.5.1. Monofenolaz aktivitesi.....	37
2.4.6. Doğadaki rolü.....	39
2.4.7. Uygulamaları.....	40

BÖLÜM 3.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	42
3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar.....	42
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	42
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	42
3.2. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu.....	43
3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması.....	43
3.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	43
3.2.3. Diyaliz.....	44
3.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi.....	44
3.2.5. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini.....	45
3.2.6. SDS jel elektroforezi.....	46
3.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu.....	47
3.3.1. PPO aktivite tayini.....	47
3.3.2. Substrat spesifikliğı.....	48
3.3.3. pH etkisi.....	48
3.3.4. Sıcaklığın etkisi.....	48
3.3.5. Enzim kinetiğı.....	49

3.3.6. Enzim aktivitesi üzerine madde etkisi.....	49
3.3.6.1. Bilinen inhibitörlerin etkisi.....	49
3.3.6.2. Metallerin etkisi.....	50
3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi.....	50
3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı.....	51
3.3.8. Termal inaktivasyon.....	51
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR ve SONUÇLAR.....	52
4.1. PPO'nun Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	52
4.2. SDS Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	53
4.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu.....	54
4.3.1. pH etkisi.....	54
4.3.2. Sıcaklığın etkisi.....	56
4.3.3. Enzim kinetiği.....	59
4.3.4. Bilinen inhibitörlerin etkisi.....	64
4.3.5. Metallerin etkisi.....	74
4.3.6. Amino asitlerin etkisi.....	75
4.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı.....	76
4.3.8. Termal inaktivasyon.....	78
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
DEAE	: Dietil amino etil
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOPA	: Dihidroksi fenilalanin
E	: Enzim
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	: Enzim ünitesi
FDA	: Food and Drug Administration
I	: İnhibitör
kDa	: Kilodalton
K_i	: İnhibisyon sabiti
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Molar
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
P	: Ürün
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POX	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
PVP	: Polivinil pirolidon
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Substrat

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: Tetra etil metilen diamin
TRİS	: Tris (hidroksimetil) amino metan
U	: Ünite aktivite
UV	: Ultraviyole
V_{\max}	: Enzimatik reaksiyonun ulaştığı maksimum hız

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Enzimlerin substratına spesifikliği.....	9
Şekil 2.2.	Optimum pH.....	13
Şekil 2.3.	Optimum sıcaklık.....	14
Şekil 2.4.	Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi.....	15
Şekil 2.5.	Lineweaver-Burk grafiği.....	17
Şekil 2.6.	Eadie-Hoftsee grafiği.....	18
Şekil 2.7.	Kompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması.....	19
Şekil 2.8.	Kompetitiv inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği.....	20
Şekil 2.9.	Nonkompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması.....	20
Şekil 2.10.	Nonkompetitiv inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği.....	21
Şekil 2.11.	Unkompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması.....	22
Şekil 2.12.	Unkompetitiv inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği.....	23
Şekil 2.13.	Karışık inhibisyon reaksiyon şeması.....	23
Şekil 2.14.	Karışık inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği.....	24
Şekil 2.15.	<i>Trachystemon orientalis</i> -Kaldirik.....	26
Şekil 2.16.	Melanin sentezi reaksiyon mekanizması.....	31
Şekil 2.17.	Polifenol oksidaz enziminin bazı substratları.....	33
Şekil 2.18.	Polifenol oksidaz enziminin bazı inhibitörleri.....	35
Şekil 2.19.	Polifenol oksidaz enziminin reaksiyon mekanizması.....	38
Şekil 3.1.	Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği.....	46
Şekil 4.1.	Kaldirik PPO enziminin jel filtrasyon kromatografisi aktivite ve protein miktarı grafiği.....	52
Şekil 4.2.	SDS jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel.....	53
Şekil 4.3.	4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği.....	54
Şekil 4.4.	Katekol substratı için optimum pH grafiği.....	55

Şekil 4.5.	Kafeik asit substratı için optimum pH grafiği.....	55
Şekil 4.6.	Pirogallol substratı için optimum pH grafiği.....	56
Şekil 4.7.	4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	57
Şekil 4.8.	Katekol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	57
Şekil 4.9.	Kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği.....	58
Şekil 4.10.	Pirogallol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	58
Şekil 4.11.	4-metil katekol substratı için substrat doyumluk eğrisi.....	60
Şekil 4.12.	4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 4.13.	Katekol substratı için substrat doyumluk eğrisi.....	61
Şekil 4.14.	Katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	62
Şekil 4.15.	Kafeik asit substratı için substrat doyumluk eğrisi.....	62
Şekil 4.16.	Kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 4.17.	Pirogallol substratı için substrat doyumluk eğrisi.....	63
Şekil 4.18.	Pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	64
Şekil 4.19.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit etkisi.....	65
Şekil 4.20.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında askorbik asit etkisi.....	65
Şekil 4.21.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum azid etkisi.....	66
Şekil 4.22.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum azid etkisi.....	66
Şekil 4.23.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum metabisülfid etkisi...	67
Şekil 4.24.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum metabisülfid etkisi.....	67
Şekil 4.25.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında L-sistein etkisi.....	68
Şekil 4.26.	Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında L-sistein etkisi.....	68
Şekil 4.27.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	69

Şekil 4.28.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	70
Şekil 4.29.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile sodyum azid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	70
Şekil 4.30.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile sodyum azid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	71
Şekil 4.31.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile sodyum metabisülfid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	71
Şekil 4.32.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile sodyum metabisülfid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	72
Şekil 4.33.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	72
Şekil 4.34.	Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	73
Şekil 4.35.	Kaldirik PPO enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	77
Şekil 4.36.	Kaldirik PPO enziminin 4°C'deki aktivitesinin zamanla değişimi	77
Şekil 4.37.	Kaldirik PPO enziminin -20°C'deki aktivitesinin zamanla değişimi.....	78
Şekil 4.38.	Kaldirik PPO enziminin ısıl kararlılığının zamanla değişimi.....	79

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Enzimlerin katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılması.....	11
Tablo 3.1.	Kaldirik Polifenol oksidaz enzimi ile yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar.....	42
Tablo 3.2.	SDS jel elektroforezi bileşenleri ve miktarları.....	47
Tablo 4.1.	Polifenol oksidaz enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan Optimum pH ve Optimum sıcaklık (°C) değerleri.....	59
Tablo 4.2.	Polifenol oksidaz enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan K_m ve V_{maks} değerleri.....	60
Tablo 4.3.	PPO enzimi üzerine etki eden bilinen inhibitörlerin 4-metil katekol ve pirogallol substratları varlığında I_{50} değerleri.....	69
Tablo 4.4.	PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i (mM) değerleri.....	74
Tablo 4.5.	PPO enzimi aktivitesine metal etkisi.....	75
Tablo 4.6.	PPO enzimi üzerine amino asitlerin inhibisyon etkisi.....	76

ÖZET

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, *Trachystemon orientalis*, kaldirik, jel filtrasyon kromatografisi, SDS-PAGE.

Bu çalışmada, *Trachystemon orientalis* (Kaldirik) bitkisinden ekstrakte edilen Polifenol oksidaz (PPO) enzimi jel filtrasyon kromatografisiyle kısmi olarak saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında ham enzim ekstraktı kullanılmıştır. Enzim monofenolaz aktivitesi göstermemekle birlikte difenolaz ve trifenolaz aktivitesine sahiptir. Katekol, 4-metil katekol, kafeik asit ve pirogallol substratlarına karşı aktivite gösteren enzimin kafeik asit substratına karşı etkinliği en fazladır. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin substrata göre farklı olduğu görülmüştür. Optimum pH değeri katekol ve pirogallol için 7,5; 4-metil katekol için 5,0; kafeik asit için ise 5,5'dur. Optimum sıcaklık değerleri ise katekol için 10°C, 4-metil katekol için 5°C, kafeik asit için 20°C ve pirogallol için 30°C'dir. Pekçok PPO enzimi üzerinde şiddetli inhibisyon etkisi yaratan kalay ve kurşun metallerine ve sodyum azid inhibitörüne karşı kaldirik PPO enziminin dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Asidik, bazik ve nötral aminoasitlerle gerçekleştirilen inhibisyon denemelerinde, denenen tüm aminoasitlerin enzimi inhibe ettiği ve en yüksek inhibisyon etkisini asidik aminoasitlerin yarattığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan termal inaktivasyon ve depolanma kararlılığı çalışmaları da enzimin diğer bitki kaynaklı PPO enzimlerine göre daha dayanıklı olduğunu göstermiştir.

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM BORAGE (*Trachystemon orientalis*) PLANT

SUMMARY

Key Words: Polyphenol oxidase, *Trachystemon orientalis*, borage, gel filtration column chromatography, SDS-PAGE.

In this study, the Polyphenol oxidase enzyme which was extracted from *Trachystemon orientalis* (Borage) was partially purified by using gel filtration column. The crude extract was used for the characterization studies of the enzyme. Whereas PPO enzyme did not show monophenolase activity, it had diphenolase and triphenolase activity. PPO enzyme that had activity toward catechol, 4-methylcatechol, caffeic acid and pyrogallol has the greatest activity toward caffeic acid. The enzyme showed different optimum pH and temperature values for different substrates. The optimum pH was at 7,5; 5,0; 5,5 for catechol and pyrogallol, 4-methyl catechol, caffeic acid, respectively. The enzyme had an optimum temperature at 10°C for catechol, 5°C for 4-methyl catechol, 20°C for caffeic acid and 30°C for pyrogallol. We detected that *Trachystemon orientalis* PPO was stable against tin and lead metals and sodium azide which could cause heavy inhibition effect on other PPOs. Inhibition assays with acidic, basic and neutral aminoacids showed that all tried aminoacids had inhibitory effect on enzyme and acidic aminoacids were the most effective ones. We also found that *Trachystemon orientalis* PPO is more stable than other herbal PPOs depending on heat inactivation and storage stability studies.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Hasat sonrası değişimler, dünya çapındaki, meyve ve sebzelerin kaybının %50'sinden fazlasının nedenini açıklar. Enzimatik esmerleşme bu kayıpların ana kaynağıdır. Polifenol oksidaz ise enzimatik esmerleşmede yer alan esas enzimdir [1].

Meyve ve sebzelerde görülen enzimatik esmerleşme, esas olarak, organizmada var olan fenolik bileşiklerin kinona dönüşmesi, kinonların polimerleşmesi ve bunun sonucunda kahverengi, kırmızı, siyah pigmentlerin oluşmasından kaynaklanır. Bu olaylardan sorumlu olan enzimler genellikle Polifenol oksidazlar [EC 1.14.18.1; difenol : oksijen oksidoredüktaz; polifenol oksidaz (PPO)] ismiyle bilinmelerinin yanında tirozinazlar, katekolazlar, krezolazlar ve fenolazlar olarak da isimlendirilir. Esmerleşme, fenolik substratlar, PPO enzimi ve oksijen; pH, sıcaklık ve su aktivitesi açısından uygun koşullar altında bir araya geldiklerinde meydana gelir. Pek çok meyve ve sebzenin kesilmesi, kabuğunun soyulması, parçalanması ya da hasar görmesi enzimatik esmerleşmenin gerçekleşmesini sağlar [2, 3]. Aşırı olgunlaşma ya da hastalıklar da enzimatik esmerleşmeye neden olabilir. İster taze ister işlenmiş meyve ve sebzeler için enzimatik esmerleşme istenmeyen renk ve tat kayıplarına neden olur. Meyve ve sebzelerin estetik kalitesinin kaybının yanısıra, enzimatik esmerleşme askorbik asit gibi bazı besin öğelerinin yıkımına neden olduğundan besin kalitesini de düşürür. Market değerindeki bu azalma ve beraberinde gelen ekonomik kayıplardan dolayı enzimatik esmerleşmenin kontrol edilmesi gıda imalat endüstrisinde oldukça önemlidir.

Enzimatik esmerleşmenin meyve sebzelerdeki istenmeyen etkisinden dolayı, esmerleşmenin elimine edilmesi ya da en azından geciktirilmesi için pek çok çalışma vakfedilmiştir [2].

Meyve ve sebzelerdeki PPO enziminin inhibisyonunu sağlamak için yakın zaman içerisinde pek çok metod denenmiştir. Termal uygulamalar, oksijenin uzaklaştırılması, esmerleşmeyi engelleyen ajanların kullanılması ve kimyasalların eklenmesi en etkili metodlar arasındadır. Gıda endüstrisinde PPO'nun termal yolla inhibisyonu sayesinde enzimatik esmerleşme engellenebilir fakat geleneksel ısı uygulamaları renk bozulmaları, tat hasarı, vitamin ve besin değeri kayıpları gibi kötü etkilere neden olabilir. Oksijen, meyve ve sebzelerin su, şurup ya da tuzlu suya daldırılması veya vakumlanması yoluyla reaksiyondan uzaklaştırılabilir. Ancak, bu tür uygulamalar kesin sonuç vermez çünkü vakumlanan paketler açıldığında oksijen tekrar içeri girer ve esmerleşme yeniden başlar. Enzimatik esmerleşmenin engellenmesinde genel bir yaklaşım, enzim üzerinde esasen etki gösteren veya enzimatik katalizdeki substrat ve/veya ürünlere reaksiyon veren ve bu şekilde pigment oluşumunu inhibe eden esmerleşme karşıtı ajanların kullanılmasıdır. Bununla birlikte gıda endüstrisinde bu ajanların kullanılması, tat, lezzet, renk, doku ve maliyet üzerine etkisi ve toksisite düşüncesiyle kısıtlanmaktadır.

Kimyasal katkı maddeleri (bisülfid, askorbik asit ve analogları, indirgeyici ajan olarak sistein) enzimatik esmerleşmeyi engellemek için kullanılabilir. Esmerleşmenin kontrolünde en genel yöntem herhangi bir formdaki sülfidlerin (kükürtdioksit, sodyum/potasyum metabisülfid, sodyum/potasyum bisülfid) kullanımınıdır. Bisülfidlerin kimyasal etkisi o-kinonlarla renksiz kompleks bileşikler oluşturur. Sülfidler eşsiz ve çok yönlü bileşiklerdir. Çünkü antimikrobiyal ajanlar, beyazlatma ajanları, indirgeyici ajanlar ve antioksidan ajanlar olarak fonksiyon göstererek hem enzimatik hem de enzimatik olmayan esmerleşmeyi kontrol edebilirler. Ancak sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı FDA, gerek müşterilere servis edilen gerekse ham halde satılan meyve ve sebzelerde kullanımını yasaklamıştır.

Asitlendiriciler (sitrik, malik ve fosforik asit), şelatlayıcılar (EDTA) ve indirgeyici ajanlar (askorbik asit ve kombinasyonları) gibi diğer kimyasal bileşikler de PPO'nun inhibisyonu için kullanılmaktadır. Bununla beraber, hayat tarzındaki yeni değişimler, gıda ve sağlık arasındaki ilişki konusundaki bilinçlenme, daha güvenli ve toksik etki

yaratmayan daha az kimyasal eklenmiş olan işlenmiş gıdalara talebi arttırmaktadır [2].

1.2. Polifenol Oksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Durum buğdayından (*Triticum durum* L.) PPO enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında, saflaştırma yöntemi olarak DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılmış ve işlem sonucunda enzim 26,33-kat saflaştırılmıştır. Ham ekstrakt için spesifik aktivite 0,081 U/mg protein, kısmi olarak saflaştırılan enzim için ise 12,81 U/mg protein olarak bulunmuştur. Substrat spesifitesi çalışmasında katekol, 4-metilkatekol, klorojenik asit, kafeik asit ve katekin substratları arasından en yüksek spesifite katekol substratına karşı gözlemlenmiştir. Katekol substratı için optimum sıcaklık değeri 40°C, optimum pH değeri ise 6,5 olarak bulunmuştur. Enzimin askorbik asit, sitrik asit, okzalik asit ve sistein tarafından inhibe edildiği ve bu inhibitörler arasında askorbik asidin en güçlü inhibisyon etkisini yarattığı belirtilmiştir [4].

Örümcek çiçeği (*Cleome gynandra* L.) PPO'ı ile yapılan çalışmada DEAE-sefaroze iyon değişim kromatografisi ve Sefadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi birlikte kullanılmıştır. Sonuçta enzim 37,8-kat saflaştırılmıştır. Yapılan SDS-PAGE elektroforezi ile enzimin 52,6 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik bir protein olduğu tespit edilmiştir. Substrat spesifitesi çalışmaları enzimin monofenol, difenol ve trifenollerin hepsiyle reaksiyon verdiğini, difenollere ilgisinin en yüksek olduğunu ve en iyi aktiviteyi L-Dopa ile verdiğini göstermiştir. Enzim pH 8,0'de ve 60°C'de optimum aktivite göstermiş, pH 3,0-9,0 arasında ve 60°C'nin altında kararlılığını korumuştur. Enzim aktivitesi Hg⁺² ve Pb⁺² tarafından yüksek oranda inhibe edilmiş, 1 mM askorbik asit, L-sistein, β-merkaptetanol, sodyum dietilditiyo karbamat, tiyüre ve 10 mM ditiyoeritrol, sodyum metabisülfid, sodyum sülfid tarafından tamamen inhibe edilmiştir [5].

Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) bitkisinden ekstraksiyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleriyle elde edilen PPO enzimi yapılan Native-PAGE analizi ile DL-Dopa substratıyla, 4 band vermiştir. Denenen substratlar içerisinde

katekole spesifitesi en yüksektir (K_m 14,3 mM). Yine denenen inhibitörler içerisinde ditiyoeritrol $1,86 \times 10^{-6}$ M K_i değeriyle en etkili nonkompetitiv inhibitördür. Biberiye PPO enzimi 80°C, 70°C ve 60°C'de sırasıyla 7, 14 ve 30 dk inkübe edildiğinde aktivitesini tamamen yitirmektedir. pH 6,0-8,0 arasında enzim stabilitesini korumaktadır [6].

Kırmızı pazı yaprağı (*Beta vulgaris subspecies cicla*) PPO'ı sefadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-sefaroze hızlı akış anyon değişim kromatografisiyle 39-kat saflaştırılmıştır. Enzim (L-Dopa substratı ile) pH 7,5 ve 45°C'de en yüksek aktiviteyi göstermektedir. Alkali koşulları tercih etmektedir. Monofenolaz, difenolaz ve hatta trifenolaz aktivitesine sahiptir. Substrat spesifitesinde en iyi sonucu L-Dopa göstermektedir. SDS-PAGE çalışmasıyla molekül ağırlığı 41 kDa olarak bulunmuştur (monomerik bir protein). K^+ , Na^+ , SDS enzimi aktive ederken Ca^{+2} ve Cu^{+2} gibi divalent katyonlar inhibe etmektedir. Saflaştırılan enzim sodyumdietilditiyokarbamat (SDDC)'a karşı son derecede hassastır. Öyle ki 1mM SDDC varlığında %90'dan fazla aktivite kaybı gözlenmektedir [7].

Yabani armut (*Pyrus elaeagnifolia*) dan sefaroze 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonu ile bir adımda 31,5-kat saflaştırılan PPO enziminin, SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 35 kDa olarak bulunmuştur. Katekol substratı kullanılarak enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri pH 6,0 ve 65°C olarak belirlenmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda en yüksek inhibisyon etkisini ditiyoeritrol göstermiştir (2×10^{-5} mM - kompetitiv inhibisyon) [8].

Aranda-'Christine 130' tropikal orkidesinin hava köklerinden jel filtrasyon kromatografisi, iyon-değişim ayrılması ve kromatofokuslama ile saflaştırılan PPO enziminin 4 izoformu gösterilmiştir. İzofomlardan ikisi, PPO_a ve PPO_d, N-terminal dizisi, triptik peptid haritası ve (+)-katekin için substrat afinitesi yönleriyle farklılaşmakta fakat denatüre edici koşullar altındaki molekül ağırlıkları, optimum pH'ları ve 4-metil katekol substratına karşı davranışları yönünden benzer özellikler sergilemektedir. Diğer iki izoform olan PPO_b ve PPO_c ise, N-terminal dizisi, substrat tercihi ve optimum pH yönünden PPO_a ve PPO_d ile benzerken, molekül kütleleri

yönünden farklıdır. Bu dört izoform, izoelektrik noktaları yönünden farklı özelliklere sahiptir [9].

Yeşil fasulyeyle (*Phaseolus vulgaris* L.) yapılan bir başka çalışmada da PPO enziminin 4 izoformu belirlenmiştir. İzoformların molekül ağırlıkları 39,0 kDa ve 57,5 kDa arasındadır. Tüm izoformların aktiviteleri pH 6,8-7,2 arasında stabildir ve hepsi en yüksek afiniteyi pirogallol substratına karşı gösterirler [10].

Yine *Hevea brasiliensis* denen tropikal bir ağacın lateksinden izole edilen PPO'nun iki izoformunun bulunduğu saptanmıştır. Bu izoformlardan biri 32 kDa, diğeri 34 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Her ikisinin de izoelektrik noktası 9,2, optimum pH'ı 7,0 ve optimum sıcaklığı 35°C - 45°C arasındadır. Fakat denen substratlar için elde edilen K_m değerleri farklılık göstermektedir [11].

Nane (*Mentha piperita*) yapraklarından izole edilen PPO için optimum pH değeri 7,0 ve optimum sıcaklık değeri ise 30°C'dir. Enzim ile değişik substratlarla elde edilen K_m değerleri $6,25 \times 10^{-3}$ M (katekol ile) ve $9,0 \times 10^{-3}$ M (L-Dopa ile) arasında farklıdır. Denenen inhibitörler içinde sodyum metabisüfit en yüksek inhibisyon etkisini yaratmıştır [12].

Mantar ve fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) PPO enzimleri üzerine glutamik asidin etkisinin incelendiği bir çalışmada glutamik asidin etkili bir esmerleşme inhibitörü olduğu görülmüştür. Çalışmada 4-metil katekol, katekol ve pirogallol substratları eşliğinde glutamik asidin etkisi incelenmiş ve substrat çeşidi ve enzim kaynağına göre inhibisyon türünün farklılığı belirlenmiştir [13].

Çakşır otu (*Ferula sp.*) PPO enzimi ile yapılan çalışmada enzim, bitkinin yaprak ve sap kısımlarından jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Yapraktan izole edilen (-)-epikatekin en iyi substrattır. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla katekol için $2,34 \times 10^{-3}$ M ve 8541 U/mL, (-)-epikatekin için $2,89 \times 10^{-3}$ M ve 5308 U/mL'dir [14].

Çeşitli meyvelerin özsularında yapılan bir çalışmada (mangostan, papaya, ağaç domatesi, mango, castilla böğürtleni, guava elması, lulo, çarkıfelek meyvesi ve çeşitleri), meyveler içinde mangostan ve lulo portakalı en yüksek PPO aktivitesini göstermiş ve meyvelerin sıkılmasından yaklaşık 90 dk sonra en yüksek renk değişimlerini yine bu meyvelerin suları vermiştir [15].

Brokoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) PPO enziminin molekül ağırlığının SDS-PAGE yöntemi ile 51,3 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile 57 kDa bulunması enzimin monomerik bir protein olduğunu göstermiştir. Saflaştırma işlemleri sonucunda enzim 47,4-kat saflaştırılmıştır. Enzim en iyi aktiviteyi katekol substratı ile göstermiştir ($K_m=12,34$ mM). Brokoli PPO'sunun katekol substratı için optimum pH'ı 5,7'dir. Denenen inhibitörler içerisinde en etkili olanı sodyum sülfattır [16].

Tropikal bir meyve olan mamey sapota (*Pouteria sapota*) meyvesinin iki izoformu bulunmaktadır. Bunlardan PPO₁'in molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 16,1 kDa, SDS-PAGE ile 18 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH'ı 7,0, en iyi aktivite gösterdiği substratlar ise pirogallol, 4-metilkatekol ve katekoldur. Askorbik asit ve sodyum metabisüfit ise en etkili inhibitörleridir [17].

Butter Lettuce (*Lactuca sativa var. capitata* L.) bitkisinden elde edilen PPO enziminin molekül ağırlığı 60 kDa, optimum sıcaklığı 35°C, katekol substratı için optimum pH'ı, 5,5 ve 4-metilkatekol substratı için ise 6,8'dir. Enzim 4-metilkatekol substratına karşı katekol substratına göre daha yüksek bir afinite göstermektedir [18].

1.3. Çalışmanın Amacı

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden; ekmek, peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmışlardır.

Enzimlerin katalitik potansiyeli ve tabiatı anlaşıldıktan sonra, endüstri bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanmaya başlamıştır. İzole edilmiş enzimler, kendilerini içeren mikroorganizmalara çoğu kez tercih edilmektedir. Çünkü, izole

enzimler daha spesifik olarak etki etmekte, potansiyelleri daha iyi standardize edilmekte, satış ve saklama için kolaylıklar sağlamaktadırlar.

Enzimlerin endüstride çeşitli alanlarda kullanılması sebebiyle, bugün pekçok enzimin farklı kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması ile sahip oldukları özellikleri karakterize edilerek endüstride kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır.

Endüstriyel açıdan, sadece birkaç oksidoredüktaz bazı uygulamalarda kullanılmaktadır. Polifenol oksidazların polimerleşmeye olan etkileri düşünüldüğünde de bu enzimler üzerine yapılan çalışmalar, elde edilebilecek yeni sonuçlar için önem arz etmektedir [19].

Bu çalışmanın amacı, insan beslenmesindeki biyoaktif polifenoller açısından zengin ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip bir bitki olan *Trachystemon orientalis* (Kaldirik) bitkisinden [20] PPO enziminin izolasyonu, kısmi saflaştırılması ve enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, depolanma kararlılığı, ısı ile inaktivasyonu, substrat spesifikliğı ve çeşitli kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesidir.

BÖLÜM 2. ENZİMLER ve POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ

2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

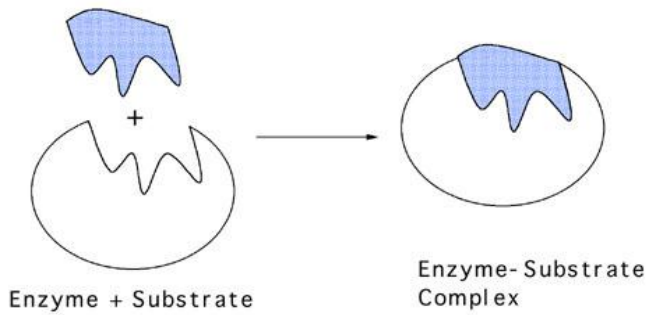
Canlıları oluşturan moleküller, yani, biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller, bir hücreyi diğerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır.

Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş birçok enzimin varlığını göstermektedir [21].

2.1.1. Enzimlerin spesifikliği

Enzimler, hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksek, hatta bazen mutlaktır.

Bir enzimin substratına spesifikliğinin ortaya çıkması için iki ayrı yapısal özelliğinin gerekli olduğu çalışmlar sonucu belirlenmiştir. Birincisi, substrat enzim tarafından etkilenebilecek bir kimyasal bağa sahip olmalıdır. İkincisi, substrat üzerinde enzimin yapışabileceği ve substratı katalitik bölgenin etkileyebileceği pozisyona getirebilecek gruplar bulunmalıdır. Bu grupların parçalanacak bağla spesifik bir geometrik ilişkisi de vardır (Şekil 2.1) [21].



Şekil 2.1. Enzimlerin substratına spesifikliği [22]

2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, önceleri katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri ve “substrat” adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, “az” eki getirilerek isimlendirilmiştir. Mesela, üreyi CO_2 ve NH_3 'e parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini katalizleyen enzimlere de fosfataz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirlerken, bu hususta hiçbir bilgi ifade etmeyen bazı enzim adları da biyokimyacılar tarafından kullanılmıştır. Mesela, pepsin, tripsin ve katalaz gibi. Zamanla, birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç duyuldu. Bunun

üzerine enzimler, uluslar arası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırmaya tabi tutuldu. Fakat, bugün, birçok biyokimyacı tarafından geleneksel isimler hala kullanılmakta, sistematik isimleri de genellikle parantez içinde verilmektedir.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri şunlardır:

- a. Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba bölünmüştür. Her bir grup kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır.
- b. Enzim adı iki kısımda verilir. İsmi ilk bölümü substrat veya substratlarıdır. İkincisi ise katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna “-az” eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.
- c. Reaksiyonun tabiatını açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonuna yazılabilir.
- d. Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. (Enzyme Code) harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamdan ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir. Mesela E.C.2.7.1.1 kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir [21]. Sözü edilen enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP: D-heksoz 6-fosfotransferaz enzimidir [21]. Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup, bazı örnekleriyle Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılması [19]

Katalitik fonksiyon	Grup adı
Oksidasyon-Redüksiyon	Oksidoredüktazlar
Grup transferi	Transferazlar
Hidroliz	Hidrolazlar
Grup ayırma	Liyazlar
İzomerleştirme	İzomerazlar
Moleküllerin birleştirilmesi	Ligazlar

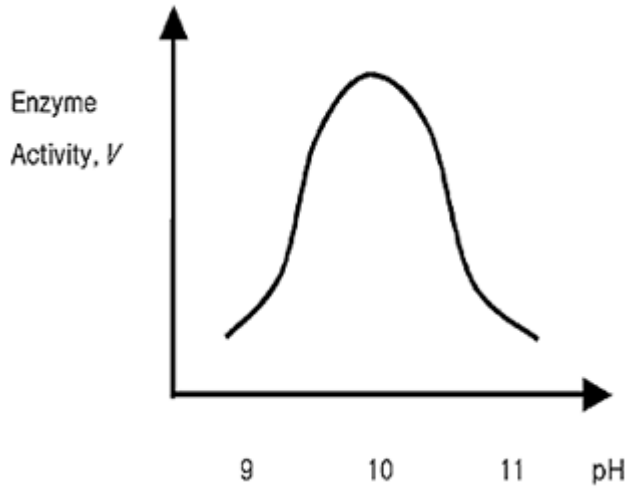
2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri

Diğer proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan “kofaktör” adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, “koenzim” denilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine apoprotein, enzime ise apoenzim denilir. Apoenzim, katalitik olarak inaktiftir. Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri vardır. Çok defa bu kofaktörler diyalizle uzaklaştırılabilir. Fakat bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere “prostetik-grup” adı verilir. Mesela “sitokrom c”deki “hem” grubu enzimin peptid zincirine kovalent bir bağla bağlıdır. Enzime gevşek olarak bağlanmış koenzimlerle enzim arasındaki etkileşimler enzim-substrat etkileşimlerine benzer. Reaksiyonlardan sonra enzimlerden ayrılarak bir başka metabolizma olayında yer alabilirler [21].

2.1.4. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler

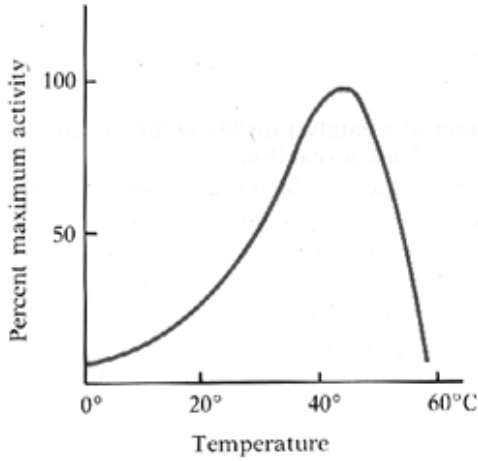
Enzim aktivitesine etki eden faktörler şunlardır:

- a. Substrat Konsantrasyonu: Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı, enzim konsantrasyonunun sabit olması koşuluyla, substrat konsantrasyonu arttıkça artar ve maksimum hız (V_{max}) değerine ulaşınca kadar artış devam eder. Ancak maksimum hıza ulaşıldığında substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın kataliz hızı artmaz.
- b. Enzim Miktarı: Hız enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Reaksiyon belli bir düzeye vardığında azalır.
- c. pH: Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla birlikte bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. Bir enzimin pH-aktivite ilişkisinde etkili olan faktörleri ele alalım. Bu faktörler şunlardır: 1- substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların pK' sı, 2- enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK' sı, 3- enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK' sı, 4- enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK' sı. pH-aktivite eğrileri, her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilir. Çünkü birçok enzimin K_m sabiti pH ile değişir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde, pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Hücrelerde her birisinin pH'ya karşı davranışı farklı yüzlerce enzim mevcuttur ve pH'nın karmaşık hücre içi kontrol ağında çok önemli bir yeri vardır [21]. Enzim aktivitesi ve pH ilişkisi Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Optimum pH [23]

d. Sıcaklık: Bütün kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artar. Enzimli reaksiyonlar bu genel kuraldan farklı bir davranış göstermez. Artan sıcaklıkla enzimatik reaksiyon hızı artar, fakat, 50-60°C üzerine çıkıldığında aktivitede düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanır (Şekil 2.3). Bir enzim için, 10°C'lık sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q10 değeriyle ifade edilir. Şöyle ki; mesela 20°C ve 30°C sıcaklıklarda belirli miktarda enzim için ölçülen aktivitelerden yüksek olanın, düşük olana bölünmesiyle elde edilen sayı o enzim için Q10 değerini oluşturur. Bütün enzimler için Q10 değeri 1,7 ile 2,5 arasında değişir. Bundan dolayı, belirli sıcaklıkta gerçekleştirilen laboratuvar ölçümlerinde 0,1°C'lık hassasiyetin korunması gerekir. Sıcaklık bir in vivo aktivite düzenleme aracı değildir. Çünkü, canlılar sıcaklığın nispeten sabit olduğu izotermal sistemlerdir [21].



Şekil 2.3. Optimum sıcaklık [24]

- e. İyonik Şiddet: Protein yapısında olan enzimlerin üzerinde yüklü grupların bulunduğunu hatırlayalım. Ortamda mevcut iyonlar bu gruplarla etkileşerek, bunların enzimin katalizleme fonksiyonuyla ilgili rollerine tesir edebilir. Bundan dolayı, enzim aktivitesinin maksimum olduğu bir optimum iyonik şiddet söz konusudur.
- f. Varsa kofaktör konsantrasyonu
- g. İnhibitör ve Aktivatör Konsantrasyonları

2.1.5. Enzim aktivite birimleri

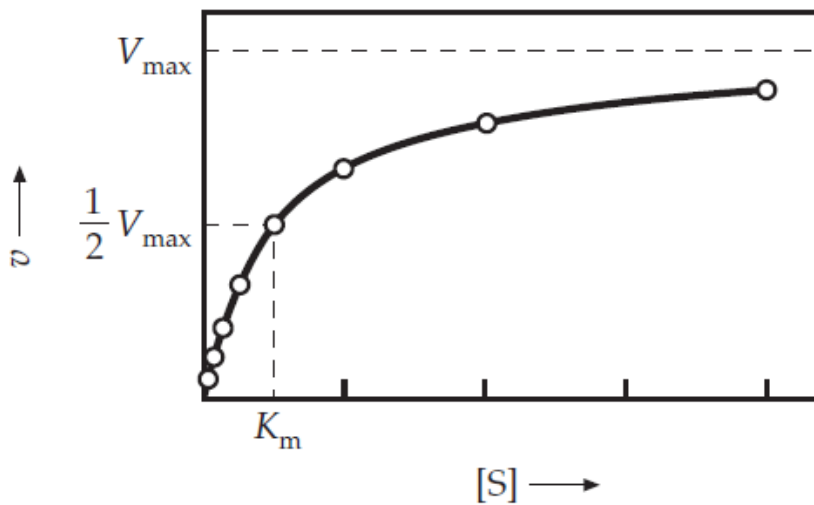
- a. Enzim ünitesi (U): 25°C'de 1 dk'da optimum şartlarda 1µmol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.
- b. Spesifik aktivite (U/mg protein): 1 mg protein başına enzim ünitesidir. Enzimin saflık derecesinin bir göstergesidir.
- c. Molar Aktivite: Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne çevrilen substrat molekülü sayısıdır. Dönüşüm sayısı olarak da adlandırılır.
- d. Katal: 1 saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokan enzim miktarıdır [21].

2.1.6. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur.

2.1.6.1. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların kinetiği

Kimyasal reaksiyonların kinetiği ile ilgili genel prensipler enzimli reaksiyonlarda da uygulanır. Bununla beraber bu reaksiyonlarda bazı farklı özellikler vardır. Bunların en önemlisi enzimlerin substratlarına “doyma” olayıdır. Şekil 2.4’de enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuyla değişimi gösterilmektedir. Düşük substrat konsantrasyonunda, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuyla orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonu artırıldığı zaman, reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfırıncı ile birinci mertebeler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat daha da artırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonuyla değişmez. Bu bölümde reaksiyon sıfırıncı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substratla birleşmiş, yani doymuş haldedir. Bütün enzimler sözü edilen doymunluk özelliğini gösterir. Ancak, her birisinin bu hale erişebilmeleri farklı substrat konsantrasyonlarında mümkün olur. Doymunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES halindedir, yani, $[E_T] = [ES]$ dir [21].



Şekil 2.4. Enzim olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi [25]

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, Şekil 2.4'deki eğriyi verecek bir model geliştirdiler. Bu model birçok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur. Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu



denklemleriyle gösterdiler.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

eşitliğine Michaelis-Menten denklemi adı verilir ve Şekil 2.4'deki eğrinin kinetik özelliklerini ifade eder. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_m \gg [S]$ olacağından, $[S]$ ihmal edilir ve

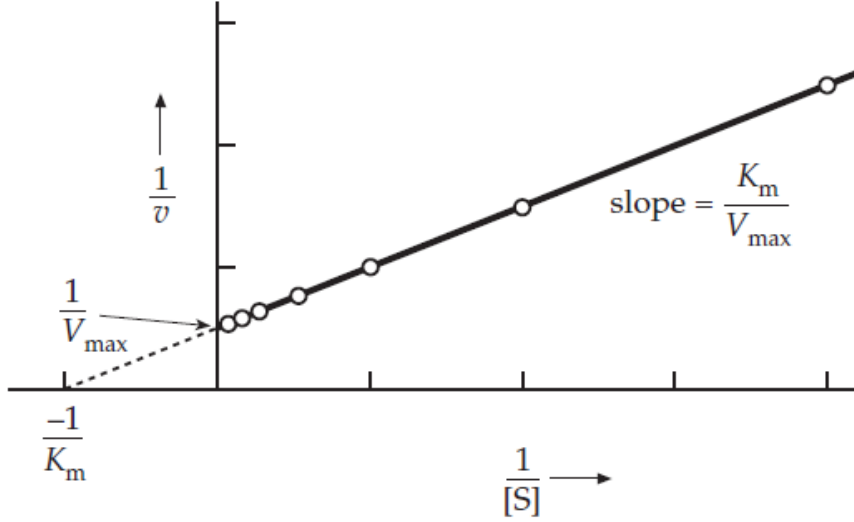
$$V = \left(\frac{V_{max}}{K_m} \right) \cdot [S] \quad (2.3)$$

doğru denklemi elde edilir.

$[S] \gg K_m$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda (2.1)'deki K_m ihmal edilir ve $v = V_{max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır. Hızın $V_{max}/2$ olduğu durumda, değerleri Michaelis-Menten eşitliğinde yerine koyarsak, $[S] = K_m$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_m sabitinin tanımını, “maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu” olarak çıkarabiliriz. Birimi de mol/L'dir [21].

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.4)$$

Denklem $y=mx+n$ doğru denkleminde benzerdir. Doğrunun çizildiği grafikte $x=1/[S]$, $y=1/v$, eğim $m=K_m/V_{max}$ ve y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$ olur.

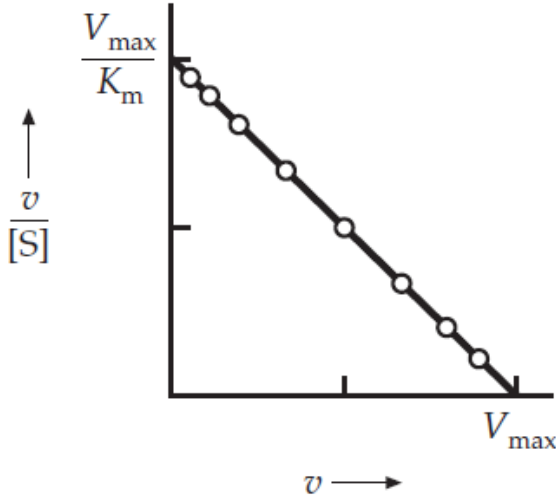


Şekil 2.5. Lineweaver-Burk grafiği [25]

Doğru x-eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_m$ 'yi verir. Görüldüğü gibi bu grafikten faydalanarak V_{max} ve K_m değerleri bulunabilir. K_m ve V_{max} tayininde Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 2.5) yerine Eadie-Hofstee grafiği (Şekil 2.6) de kullanılmaktadır. Grafiğe ait denklem

$$V = -K_m \cdot \frac{V}{[S]} + V_{max} \quad (2.5)$$

şeklindedir [21].



Şekil 2.6. Eadie-Hofstee grafiği [25]

2.1.7. Tek substratlı sistemlerde inhibisyon

Enzim katalizli reaksiyonun hızını azaltan maddelere inhibitör denir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu canlı hücrenin kullandığı en önemli düzenleyici yollardan ve enzimolojistlerin en önemli teşhis işlemlerinden biridir. İnhibisyon çalışmaları ekseriya enzim seçiciliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi verir.

2.1.7.1. Kompetitiv (Yarışmalı) inhibisyon

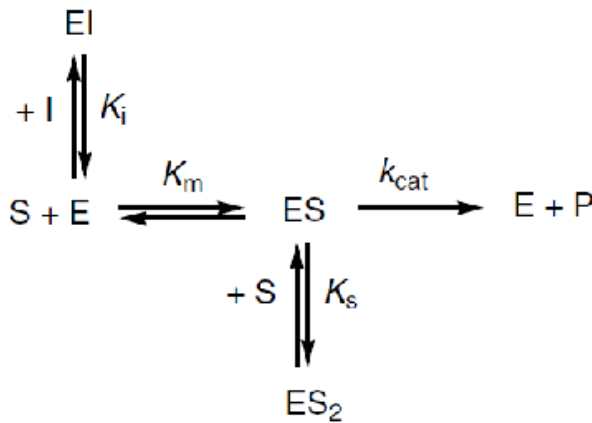
Kompetitiv inhibitör, substrat bağlanmasını engelleyecek bir tarzda serbest enzimle bağlanan bir maddedir. Gerçek substratın metabolize olmayan bir benzeri veya türevi, bir başka substrat veya reaksiyon ürünü olabilir. Kompetitiv inhibitörün etki şekli farklı şekillerde olabilir: Tek bir bağlanma merkezi için substratla yarışabilir, sterik bir etki yaratarak substrat bağlanmasını engelleyebilir, müşterek bir bağlanma merkezi için sterik etki veya rekabet yaratabilir, bağlanma merkezleri girişebilir, allosterik bir etki ile enzim konformasyonunda değişiklik yapabilir. Doğunluk, substrat konsantrasyonunda tüm enzim ES formundadır. Bunun sonucu olarak inhibitör varlığında V_{\max} inhibitörsüz reaksiyonla aynıdır. Fakat K_m büyür, çünkü

enzimin bir kısmı ürün oluşturmayan EI kompleksi şeklinde olduğundan $\frac{1}{2} V_{\max}$ 'a ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonu artar (Şekil 2.7). Hız eşitliği şeklinde tüketilirse:

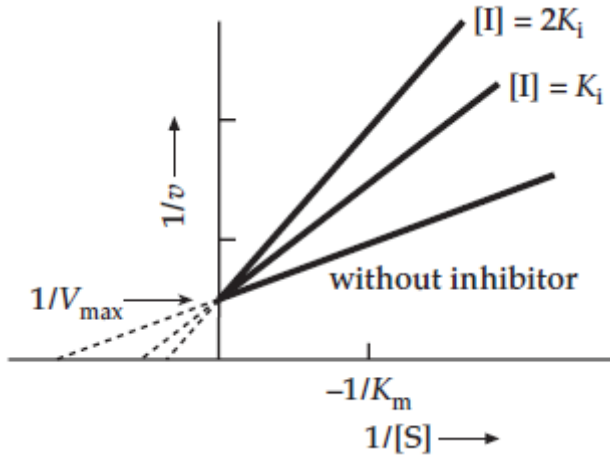
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2.6)$$

elde edilir. Bu eşitlik V_{\max} 'ın değişmediğini fakat K_m 'in $(1 + [I]/K_i)$ faktörü kadar büyüdüğünü gösterir. K_m değerinin artması EI kompleksinin substrata karşı ilgisinin daha düşük olmasından kaynaklanmaz. Çünkü EI her durumda substrata karşı ilgisizdir. E'nin ilgisi de değişmemiştir. K_m de gözlenen artış mevcut enzimin tam ilgili ve hiç ilgisiz enzim şekilleri arasında dağılımından kaynaklanır ve $[I]$ -bağımlı istatistiksel faktör $(1 + [I]/K_i)$ dir. Kinetik sabitler $(1/v, 1/[S])$ grafiği (Şekil 2.8) yoluyla bulunabilir [19].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.7)$$



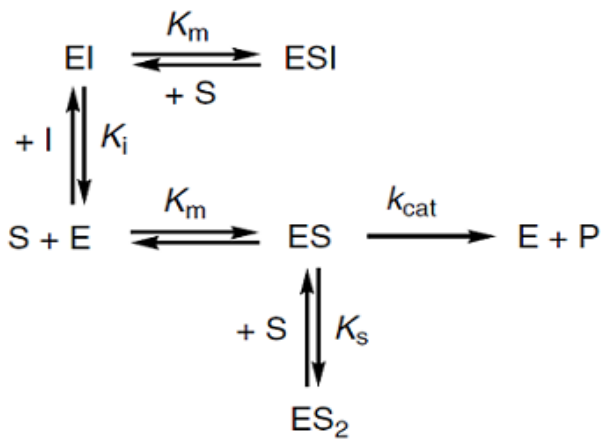
Şekil 2.7. Kompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması [26]



Şekil 2.8. Kompetitif inhibisyon Lineweaver-Burk garfiği [25]

2.1.7.2. Nonkompetitiv (Yarışmasız) inhibisyon

Klasik bir nonkompetitiv inhibisyonunda S ve I gelişigüzel bir tarzda, birbirlerinden bağımsız olarak ve tersinir bir şekilde farklı merkezlere bağlanırlar. Yani S hem EI'ye hem E hem de ES'e bağlanır (Şekil 2.9). Fakat oluşan ESI kompleksi katalitik olarak inaktiftir [19].

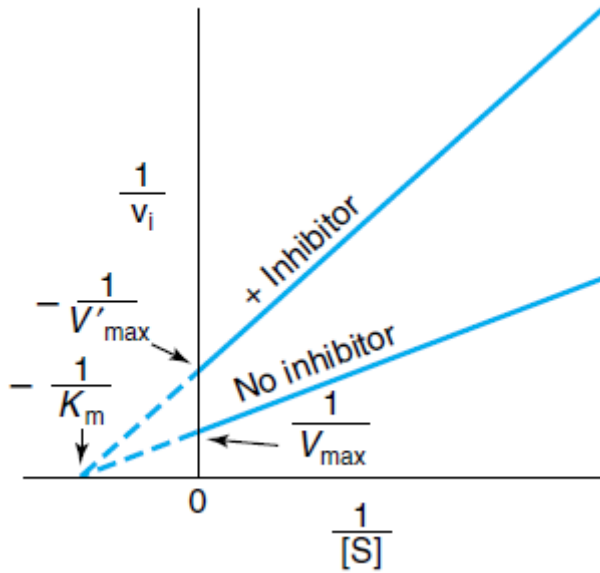


Şekil 2.9. Nonkompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması [26]

Reaksiyonun şeması incelendiğinde $[S]$ değeri çok yükseltirse de EI ve ESI oluşumunun engellenemeyeceği görülür. Yani enzimin tümü ES şekline dönüştürülemeyeceğinden inhibitörsüz reaksiyondaki maksimum hıza ulaşamaz. Buna karşılık S hem E hem de EI ile aynı ilgi ile birleştiğinden $K_{mgöz} = K_m$ olur (Şekil 2.10). O halde nonkompetitif bir inhibitör varlığında net etki daha düşük enzim konsantrasyonunda çalışma gibidir [19].

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2.8)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.9)$$

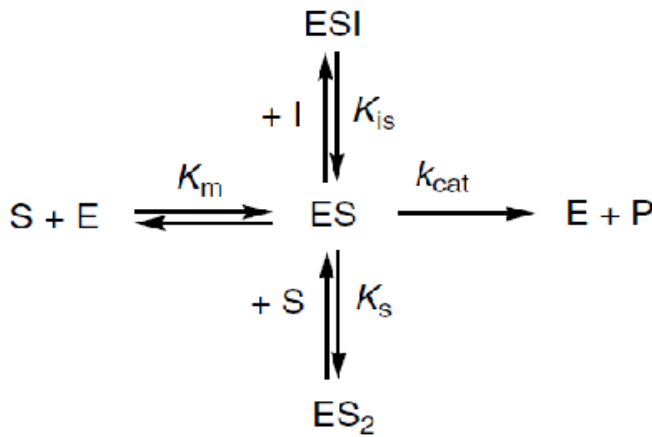


Şekil 2.10. Nonkompetitif inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği [27]

Enzimlerle dönüşümsüz olarak birleşen bir madde nonkompetitiv inhibitöre benzer; V_{max} 'ı azaltır K_m değişmeden kalır. Bu tip dönüşümsüz inhibisyonla klasik nonkompetitiv inhibisyon arasındaki ayırım I varlığında bir seri farklı enzim konsantrasyonunda çalışarak $V_{max}=f([E]_t)$ grafikleri yoluyla sağlanabilir.

2.1.7.3. Unkompetitiv (Yarıyarışmalı) inhibisyon

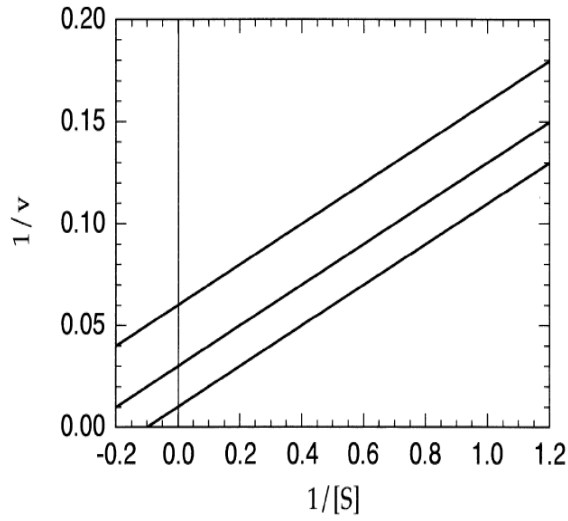
Klasik şekli ES ile dönüşümlü olarak bağlanan ve inaktif ESI kompleksini oluşturan maddedir. İnhibitör serbest enzime bağlanmadığından tek substratlı sistemlerde unkompetitiv inhibisyona seyrek olarak rastlanır. Daha çok substratlı enzimler için geçerlidir, çünkü tek substratlı sistemlerde ES kompleksi oluşumu ile enzim üzerindeki bağlanma merkezleri dolmuş olur. Buna rağmen düzenli bir sırada iki ligantın enzime bağlanmaları halinde en basit örneği oluşturması açısından önemli kabul edilir [19]. Reaksiyon şeması Şekil 2.11'deki gibidir.



Şekil 2.11. Unkompetitiv inhibisyon reaksiyon şeması [26]

ESI kompleksi daima var olacağından unkompetitiv inhibitör varlığında V_{max} azalır. Gözlenen K_m değeri de inhibitörsüz reaksiyonun K_m değerinden küçüktür (Şekil 2.12). Çünkü ESI oluşumu yoluyla ES sürekli ortamdaki çekildiğinden K_s dengesi daha çok sağa kayar.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

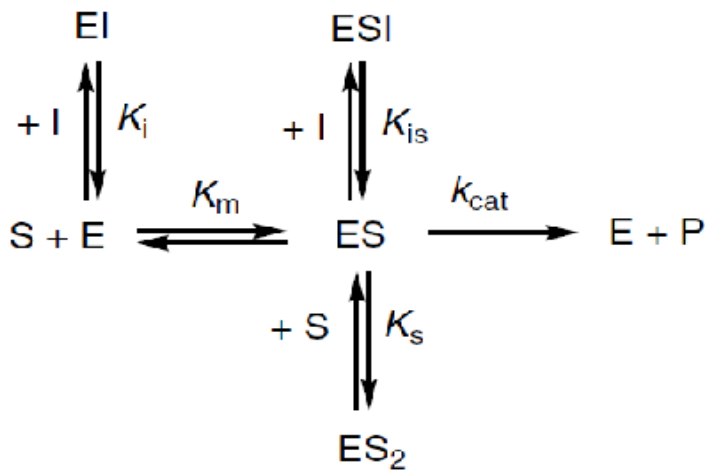


Şekil 2.12. Unkompetitiv inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği [28]

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (2.11)$$

2.1.7.4. Lineer karışık tip inhibisyon

Bu tür inhibisyon E, S ve I'ün bağlanma denge sabitlerinin farklılaştığı özel bir nonkompetitiv inhibisyon türüdür [19]. En basit şekline ait reaksiyon şeması Şekil 2.13'de verilmiştir.

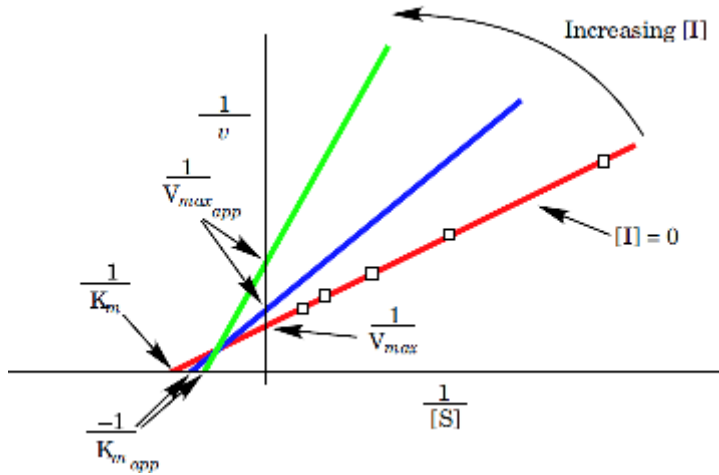


Şekil 2.13. Karışık inhibisyon reaksiyon şeması [26]

Hızlı denge yaklaşımı ile türetilmiş hız eşitliği:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.12)$$

bağlantısı ile verilir ve $1/v$, $1/[S]$ grafikleri Şekil 2.14'dedir.



Şekil 2.14. Karışık inhibisyon Lineweaver-Burk grafiği [29]

$1/v$, $1/[S]$ grafikleri $1/v$ ekseninin solunda kesişir. $\alpha > 1$ için bu kesim noktası $1/[S]$ ekseninin üzerindedir. Eğim ve $1/v$ eksenini kesim noktalarının $[I]$ 'na karşı tekrar grafiğe geçirilmesi ile K_i ve αK_i bulunabilir.

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır.

Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzim adı verilen enzimlerde, allosterik inhibisyon adı verilen bir başka çeşit inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka yere bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler [19].

2.2 Kaldirik (*Trachystemon orientalis*)

Trachystemon orientalis (L.) G. Don (*Boraginaceae*) türü (Şekil 35, 36) 30-40 cm yükseklikte, rizomlu, çok yıllık [30, 31] otsu bir bitkidir. Yaprakları sert tüylü, yürek biçiminde, her mevsim yeşildir [32] ve çiçekleri mavi renklidir. Türkiye’de Kuzey Anadolu bölgesinde, kayın ormanları altında [30] ve Karadeniz bölgesinin değişik habitatlarında, ayrıca doğu Bulgaristan ve Batı Kafkasya’da [31] dağılım gösterir.

Tanen, uçucu yağ, nitrat tuzları, müsilaj, saponin ve rezin taşımaktadır. İdrar arttırıcı, kan temizleyici, yumuşatıcı ve ateş düşürücü etkilere sahiptir. Dahilen infüzyon halinde kullanıldığı gibi ilkbaharda çiçek tomurcuklu ve yapraklı gövdeleri sebze olarak da tüketilmektedir [30, 31]. Ülkemizde halk arasında Balıkotu, Kaldırık, Hodan, Ispıt, Acı hodan, Doğu hodanı [30], Burğı, Tamara, Zılbit adlarıyla bilinmektedir [31]. Bulgaristan’da Lopoch, İngilizce’de Abraham-Isaac-Jacob, Almanca’da Rauling denmektedir. Bahar mevsiminin ilk aylarında hasat edilir [33]. Bu tür Avrupa-Sibirya floristik elementidir. *Trachystemon* D. Don cinsi Türkiye’de tek tür ile temsil edilmektedir. Rizom siyah ve 6-10 cm’dir. Gövde 20-60 cm ve diktir. Asıl boyuna ulaşması 2-3 yıl alır. Türkiye Florası kayıtlarına [34] göre 50-1000 m yükseklikte, gölgeli nehir kıyılarında, nemli bölgelerde yetişir. Düşük ışık şiddetine sahip bölgeleri sevdiği için yeterince tohum oluşturmaz [31, 32]. Arılar için iyi bir bitkidir. Süs bitkisi olmak için uygundur fakat bu amaçla pek yetiştirilmez [33].

Trachystemon orientalis pH değeri 6 (hafif asidik)’dan 8 (hafif bazik)’e değişen topraklarda yetişir. Kireçli, killi ve kumlu topraklara adapte olabilmıştır [32].

Trachystemon orientalis taksonunun bulunduğu iller; Sakarya, Bolu, Bursa, İstanbul, Kastamonu, Kırklareli, Rize, Samsun, Trabzon, Zonguldak’tır [35].



Şekil 2.15. *Trachystemon orientalis* L. - Kaldirik [36, 37]

2.3. Esmerleşme Reaksiyonları

Gıda endüstrisinde gıdaların esmerleşmesi önemli bir problemdir ve hasat sonrası ambalajlama ve gıdaların işlenmesi boyunca meydana gelen kalite kayıplarının temel sebebi olduğuna inanılmaktadır. Gıda ürünlerindeki esmerleşmenin mekanizması iyi bir şekilde karakterize edilmiştir ve enzimatik yolla ya da enzimatik olmayan yollarla gerçekleşebilir.

2.3.1. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları

Gıdalarda görülen başlıca enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları şunlardır;

- a. Askorbik asit degradasyonu
- b. Karamelizasyon
- c. Maillard reaksiyonu

Bunlardan en önemlisi ise Maillard reaksiyonudur. Daha çok ısı işleme tabi tutulan ve depolanan ürünlerde gözlenen Maillard reaksiyonu adını, glukoz ve lizin çözeltisinin birlikte ısıtılması sonucu çözelti renginin esmerleştiğini ilk kez belirleyen, Fransız bilim adamı Maillard'dan almaktadır. Bu reaksiyon, kahve, çay, ekmek ve bira gibi bazı gıdaların üretiminde renk ve aroma oluşumunda önemli bir rol oynamakta ve reaksiyon süresince oluşan birçok bileşik gıdalara karakteristik tat ve koku sağlamaktadır.

2.3.1.1. Maillard reaksiyonunun oluşumu

Maillard reaksiyonunun oluşumunda rol alan başlıca maddeler indirgen şekerler ve α -amino grubundaki azottur. Şekerlerin indirgen özellikte olması yani serbest aldehid ya da keton grupları içermesi, azotla kolayca tepkimeye girmesini sağlamaktadır.

Maillard reaksiyonunun geri dönüşlü olan ilk basamağında indirgen şekerdeki karbonil karbonu, proteinlerin amino grubundaki azot ile reaksiyona girmekte ve bu su kaybıyla beraber kapalı halka formundaki glikozilamin (Schiff bazı) oluşmaktadır. Reaksiyonun geri dönüşlü olması, glikozilaminin özellikle sulu çözeltilerde kolaylıkla hidroliz olmasına bağlanmaktadır.

Maillard reaksiyonunun ikinci basamağında, oluşan glikozilamin, 1-amino-1-deoksi-2-ketoza dönüşmektedir. Zayıf asidik koşulların katalizlediği bu dönüşüm Amadori dönüşümü olarak adlandırılmaktadır. Başlangıçta reaksiyona giren şeker ketoz ise aldozda olduğu gibi aynı mekanizmayla glikozilamin oluşmaktadır. Daha sonra ters Amadori (Heyns) dönüşümüne uğrayarak 2-aminoaldoz meydana gelmektedir. Reaksiyon ilerledikçe indirgen ve doymamış özellikte pekçok polikarbonil bileşiği meydana gelmektedir. Bu maddelerden α -dikarbonil bileşiklerinin aminoasitlerle reaksiyona girmesi sonucu aldehid ve keton oluşumu gözlenmektedir. Strecker degradasyonu olarak adlandırılan bu reaksiyonda karbondioksit ve amonyak da meydana gelmektedir [38].

Maillard reaksiyonunun son aşamasında şekerlerin dehidrasyonu yani zincir kopmasıyla furfural bileşikleri (5-hidroksimetil furfural, furfural) oluşmaktadır. Kompleks bir seri reaksiyonla aldol kondensasyonu ve polimerizasyonu sonucunda da koloidal, çözünmeyen nitelikte melanoidin bileşikleri meydana gelmektedir. Hidroksimetil furfural (HMF), Maillard reaksiyonunun yanısıra asit ortamda şekerlerin parçalanması yoluyla da oluşmaktadır. Malik, okzalik, tartarik ve süksinik asit gibi organik asitlerin şeker parçalanmasını katalizlediklerinden dolayı HMF oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir. HMF, gerek gıdaların proses aşamasında maruz kaldığı ısı işlem koşulları hakkında bilgi vermesi, gerekse polimerize olarak esmer renkli pigmentlerin oluşumuna neden olması açısından önem taşımaktadır. Sıcaklık, süre ve asitliğin artmasıyla HMF miktarının arttığı aktarılmaktadır. HMF oluşumunda früktozun ve sükrozun, glukozla kıyasla daha fazla etkili olduğu ve kalsiyum, potasyum, magnezyum gibi bazı minerallerle, alanin, aspartik asit, γ -aminobütirik asit gibi aminoasitlerin de HMF konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmektedir.

Maillard reaksiyonu üzerine etkili olan faktörler [38];

- a. su aktivitesi (a_w)
- b. pH
- c. sıcaklık ve süre
- d. metal iyonları

2.3.2. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları

Enzimatik esmerleşme esas olarak moleküler oksijen varlığında fenolik bileşikler üzerinde etki gösterebilen Polifenol oksidaz (PPO) enzimiyle ilgilidir. Enzimatik oksidasyondan sonra, oluşan o-kinonlar ileri aşamada, enzimatik olmayan yolla, yine o-kinonlarla ya da aminoasit ya da proteinlerle reaksiyona girerek melanin ya da melanin-proteinler denen esmer renkli pigmentleri verirler [39].

Elma, armut ve ananas gibi farklı türlerde yapılan bazı çalışmalar Peroksidaz (EC 1.11.1.7; POX) enzimlerinin de enzimatik esmerleşmeye katkıda bulunduğunu göstermiştir. Fakat yine de PPO enziminin doğal substratlarına karşı yüksek afinitesi

ve gıdalardaki düşük hidrojen peroksit (H₂O₂) seviyesinden dolayı bu katılımın ne düzeyde olduğu konusunda şüpheler devam etmektedir [1, 40, 41].

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları, bitkinin çeşidine, türüne, yetiştiği bölgeye ve meyvenin olgunluğuna göre değişim gösterir. Enzimatik esmerleşmenin olabilmesi için, PPO, bitki vakuollerinde bulunan ve PPO'nun etkilediği fenolik substratlar ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca, sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik esmerleşme, fenolik substratlar, moleküler oksijen ve PPO'dan birinin ortadan kaldırılması ile azaltılabilir veya durdurulabilir [42].

2.4. Polifenol Oksidaz Enzimi

2.4.1. Doğada bulunuşu

Polifenol oksidazlar (PPO) için ilk biyokimyasal araştırmalar *Russula nigricans* mantarı ile yapılmıştır. Mantarın kesilmiş parçaları önce kırmızıya daha sonra havaya maruz kalınca siyaha dönmüştür. Bu olayın sorumlusu daha sonra, ilkel yaşam formlarından yüksek yaşam formlarına kadar (örneğin bir toprak bakterisi olan *Streptomyces*'de, mantarların genelinde, insan melanositleri ya da malign melanoma hücrelerinde), filogenetik ölçek boyunca geniş yayılım gösteren, bakır içeren bir enzim olduğu bulunmuştur.

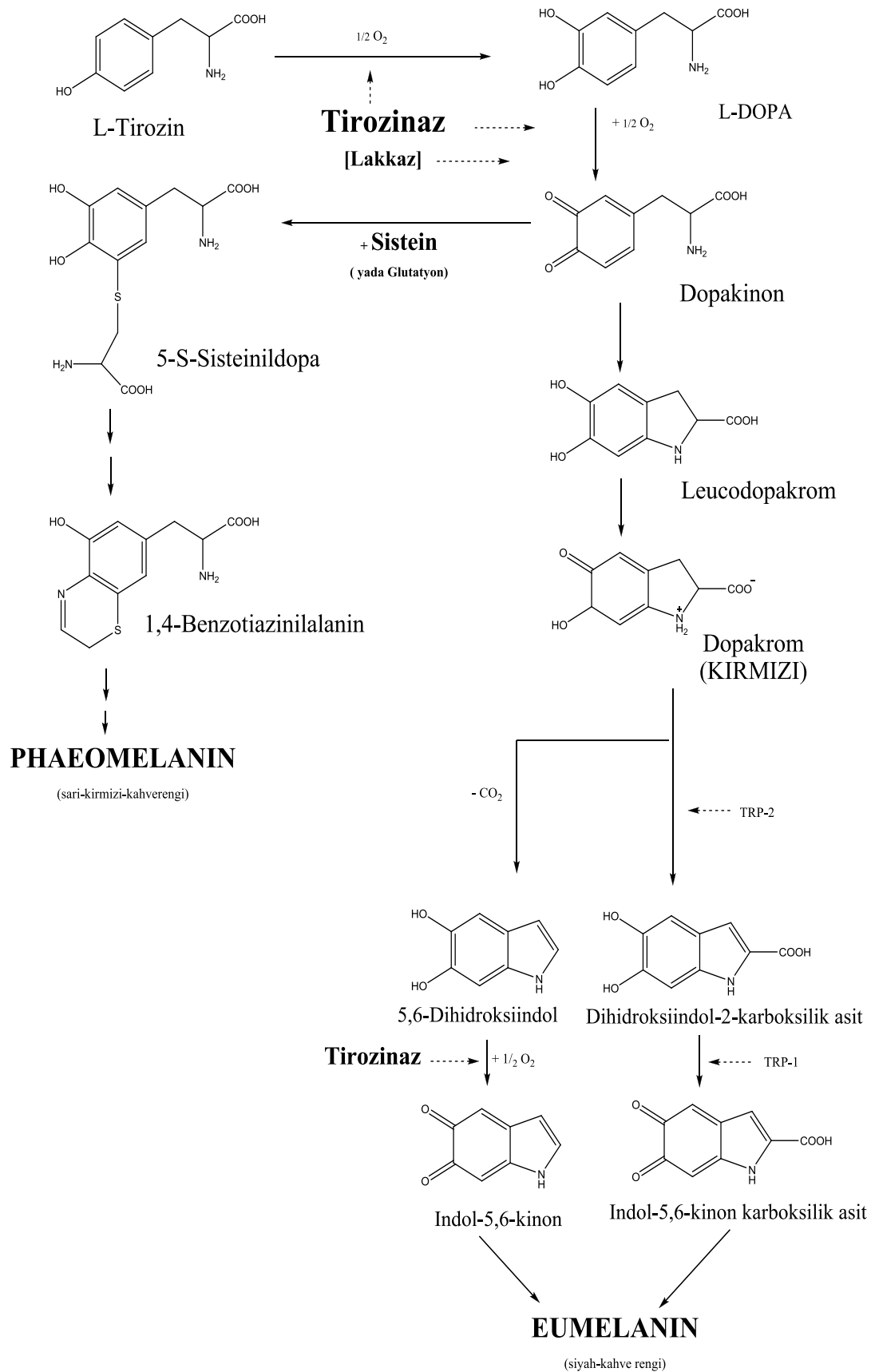
Yüksek bitkiler ve mantarlarda PPO'lar çeşitli olgunlaşmamış, olgun fakat aktivitesini henüz gösteremeyen ve aktif izoformlar şeklinde bulunur [43].

2.4.2. Melanin ile ilişkisi

Melaninler, bakteriden insana kadar değişen geniş bir dağılıma sahip farklı organizmalardaki polimerik pigmentlerin çeşitli gruplarıdır. Üç ana grup şu şekilde tanımlanır:

- a. Eumelaninler (siyah ve kahverengi) tirozinin o-dihidroksi fenilalanin (DOPA) ve dopakinona enzimatik oksidasyonu boyunca üretilir. Dopakinon kendiliğinden, PPO aktivitesinin fotometrik olarak belirlenmesi için kullanılan, kırmızı dopakroma dönüşür. Özellikle alkali koşullar altında, dopakrom dekarboksilasyona uğrar ve ileri aşamada enzimatik olmayan polimerizasyon reaksiyonlarıyla yüksek moleküllü eumelaninlere dönüşür.
- b. Pheomelaninler (sarı-kırmızı) başlangıçta eumelaninler gibi sentezlenir fakat sonra DOPA'ya sistein ya da glutatyon ilavesi gerçekleşir.
- c. Allomelaninler, pentaketid yolu üzerinden di- ya da tetrahidroksi naftalen'in oksidatif polimerizasyonundan oluşan polimerlerin heterojen gruplarıdır. Ökaryot ve prokaryotlarda melaninler fotokoruyuculuk, fotoiletkenlik, termoregülasyon, immün savunma ve metal iyonlarının şelatlanması gibi çeşitli fonksiyonları yerine getirir.

Dolayısıyla PPO enzimi (monofenol, o-difenol: oksijen oksidoredüktaz) eumelaninlerin üretiminde anahtar enzimdir (Şekil 2.16) [43].



Şekil 2.16. Melanin sentezi reaksiyon mekanizması [43]

2.4.3. Substratları

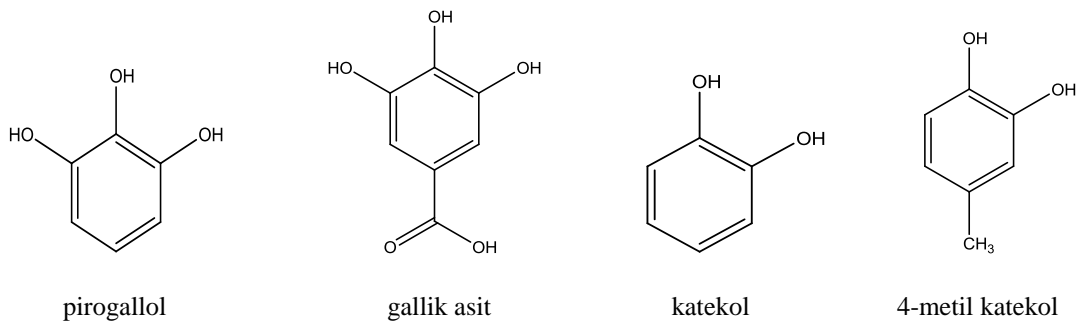
Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerin geniş bir karışımını içerirler. Ancak bunların çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olarak uygundur.

Meyve ve sebzeler, yapısında çeşitli fenolik bileşikler bulundurmaktadır. Bu substratlara başta katekol, 4-metil katekol, pirogalol, dopa olmak üzere gallik asit, tirozin, kafeik asit ve sinamik asit esterleri örnek verilebilir. Ayrıca L-adrenalin, D-adrenalin, L-noradrenalin ve D-noradrenalin PPO enziminin substratlarıdır [44].

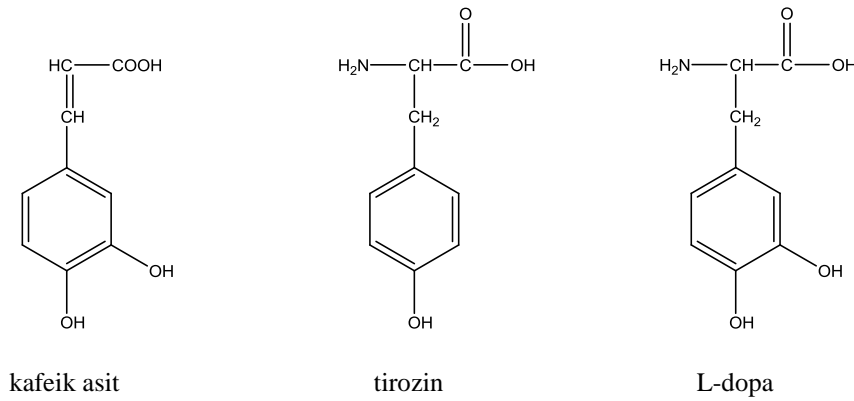
Sinamik asit türevlerinden klorojenik asit ve kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) PPO enziminin yaygın olarak kullanılan substratlarıdır. Katekol (o-dihidroksi fenol); enzimatik oksidasyon çalışmalarında model substrat olarak kullanılmaktadır. Dopa ve tirozin hemen hemen bütün bitki dokusunda bulunan aminoasitlerdir ve PPO'nun substratlarıdır.

Meyve ve sebzelerin çoğunda fenol konsantrasyonunun dış tabakalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Örneğin elma ve armudun kabuk kısmının fenol içeriği etli kısmına göre daha fazladır.

Bir kaynaktan elde edilen PPO enzimi için en iyi substratın yine aynı kaynaktan bulunan substrat olduğu görülmüştür [45].



Şekil 2.17. Polifenol oksidaz enziminin bazı substratları



Şekil 2.17. (Devamı) [44]

2.4.4. İnhibitörleri

Mantarların ve diğer besinlerin olgunlaşması, depolanması ve işlenmesi esnasında, enzimatik esmerleşmeden kaynaklanan ciddi ekonomik kayıplar meydana geldiği için, enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin işleme endüstrisinde oldukça önemli olup araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir. PPO katalizli esmerleşme, sadece enzimin inaktive edilmesiyle değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyon için gerekli olan O_2 veya fenolik substratın ikisinin ya da birinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla da önlenir. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke edilmesiyle ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumunun engellenmesiyle önlenir.

PPO'nun birçok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır.

Sülfidler çok kullanılan bir PPO inhibitörüdür ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda kullanımına izin verilmez. Sülfidler, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeleri önler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder, ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici

madde olarak rol oynar. Ancak bunların yanında sülfid kullanımının bazı dezavantajları vardır. Sülfidlerin, besinleri yıkıcı özelliği yanında bitki ve meyvelerde doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir. Yayınlanan birçok 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. Sülfid katılmış besinlerin sağlığa karşı etkileri ve müşterilerin taze ve doğal besinleri tercih etmelerindeki artış, sülfid ajanlarına alternatif başka etkili ajanların araştırılmasına neden olmuştur. Bir inhibitör olarak üzerinde en çok çalışılan madde askorbik asittir. Ayrıca sitrik asit, sitrik-askorbik asit ve benzoik-sorbik asit karışımlarının uygulanması da minimum düzeyde işlenmiş patateslerde etkili sonuçlar vermiştir.

Karides, elma ve patates için 4-heksilrezorsinol iyi bir enzimatik esmerleşme inhibitörüdür.

PPO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PPO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan o-kinonlarla sisteinin tiyol konjugatlarını oluşturmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca sistein, oluşan o-kinonları ilgili fenollerine indirgeyerek de inhibisyon sağlamış olur.

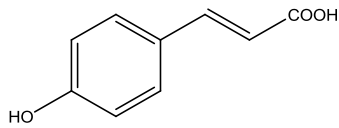
PPO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir.

Polifenoller, doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir ve 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 PPO inhibitörleri; kampferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir. Bu çalışmalara göre flavanoidlerin inhibisyon özelliği, aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir [42].

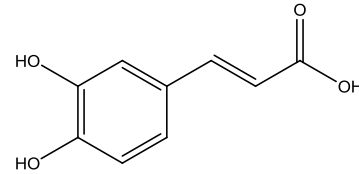
2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, kumik asit gibi çok sayıda aldehid ve türevlerinin, PPO için inhibitör madde olabilecekleri belirlenmiştir. Aldehid grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple inhibisyon etkisinin, enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı oluşturmasından ileri geldiği söylenmektedir.

Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PPO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkpto-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkptoimidazol)'dür [42].

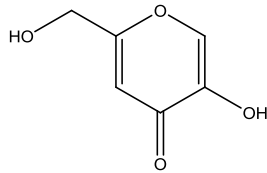
Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tiyoller ve aromatik karboksilik asitler gibi bir çok kimyasalın da inhibitör olarak PPO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir.



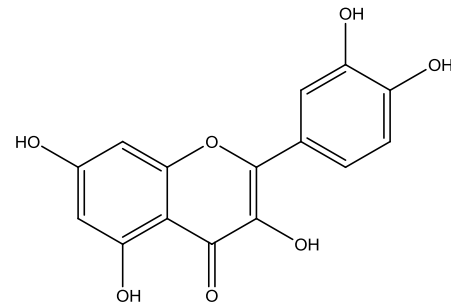
p-kumarik asit



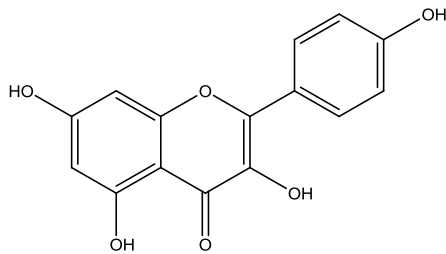
3,4-dihidroksisinnamik asit



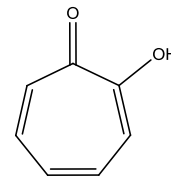
Kojik asit



Kuersetin



Kampferol



Tropolon

Şekil 2.18. Polifenol oksidaz enziminin bazı inhibitörleri [46]

2.4.5. Bakır bölgeleri ve reaksiyon mekanizması

PPO'ların bakır bağlanma bölgeleri, yumuşakçalar ve eklembacaklılardaki oksijen taşıyıcı proteinler gibi hemosiyaninlerle yüksek bir sekans benzerliği gösterir. PPO'ların genel özelliği "tip 3 bakır merkezi" denen bir diamanyetik spin-eşlenmiş bakır çiftidir. Pekçok prokaryot ve ökaryotlardaki PPO'ların sıra dizisi bakır bağlanma bölgelerinin yüksek derecede korunmuş olduğunu göstermektedir. Cu_A ve Cu_B işaretleri sırasıyla H-x(n)-H-x(8)-H ve H-x(3)-H-x(n)-H şeklindedir. Aktif bölgedeki bu Cu_A ve Cu_B metal atomlarının her ikisi de dörtlü α -heliks sarmalı içerisinde yerleşmiş üç korunmuş Histidin tarafından koordine edilir. Katalitik döngü boyunca tip 3 bakır merkezi farklı fonksiyonel formları hayata geçirebilir. Bunlar:

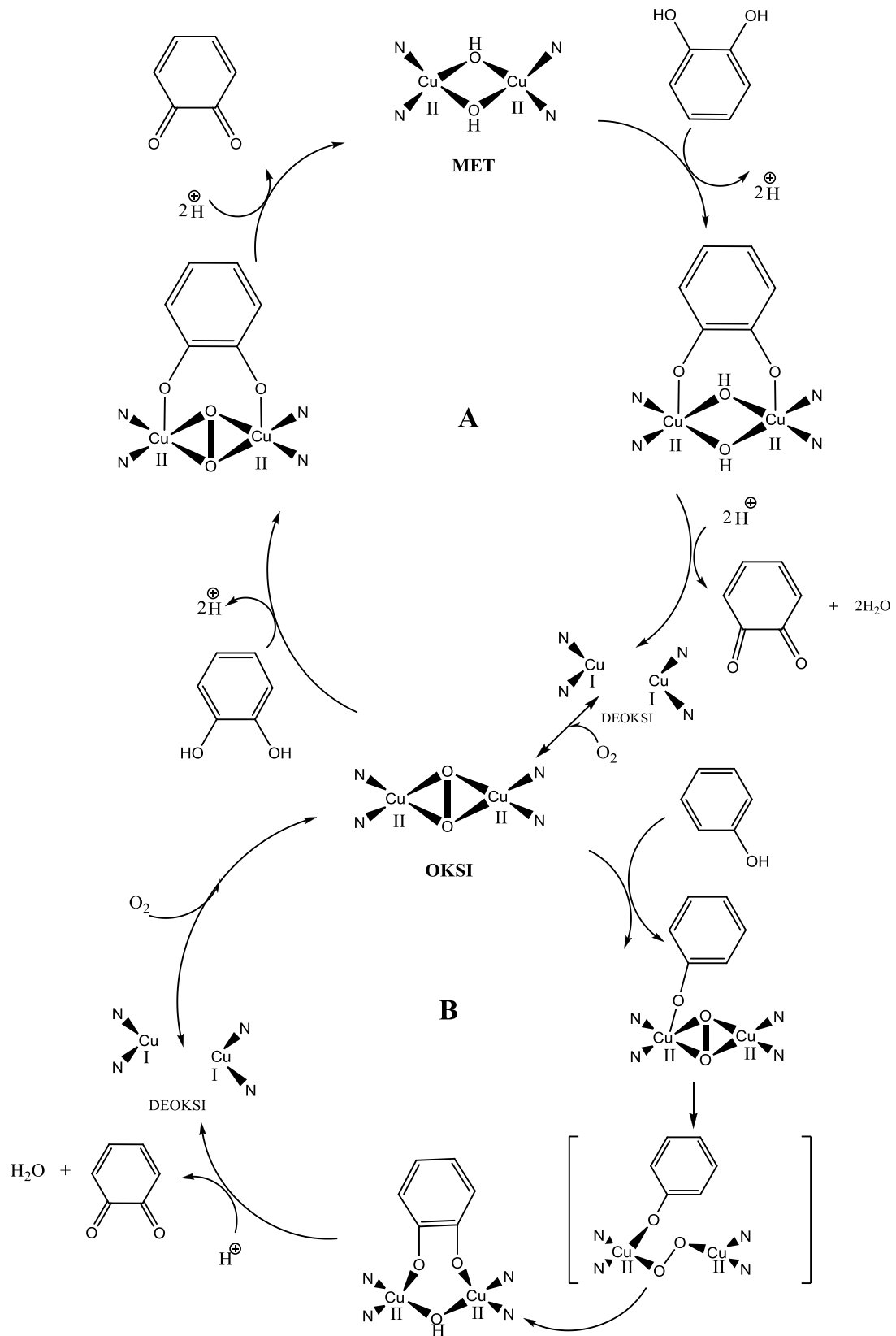
- a. Oksi-PPO [$Cu(II)-O_2^{-2}-Cu(II)$]
- b. Deoksi-PPO [$Cu(I) Cu(I)$]
- c. Yarı met-PPO [$Cu(I) Cu(II)$]
- d. Met-PPO [$Cu(II)-OH^- -Cu(II)$]

Son durumda, iki bakır atomu hidroksil iyonları köprüsüyle bağlanır. İki bakır atomunun valensi $Cu(I)$ 'den $Cu(II)$ 'ye spektroskopik olarak takip edilebilen bir değişim gösterir [34]. Oksidasyon sürecinde, difenolik bileşik (örneğin katekol) önce met-PPO'nun çift bakırlı merkezine bağlanır. İki bakırlı deoksi-PPO'ı meydana getirerek iki elektronu iki $Cu(II)$ merkezine transfer eder ve kendisi dikinona oksitlenir. Deoksi-PPO iki $Cu(I)$ merkezinde bir molekül oksijen ile birleşir. Metal merkezleri bir peroksit köprüsü oluşturarak iki elektronu O_2 molekülüne transfer eder ve iki bakırlı bölge oluşturur. Bu yapı oksı-PPO olarak adlandırılır. Elektronik spektrum 345 nm'de met-PPO'da bulunmayan belirgin bir band verir (moleküler oksijenden $Cu(II)$ 'ye yük transferi). Oksi-PPO'nun düşük sıcaklıktaki absorpsiyon spektrumu ~ 430 nm'de bir başka omuz verir. Oksi-PPO molekülü ileri aşamada başka bir difenol molekülüyle bağlanır. Difenol tarafından iki elektron O_2^{-2} 'ye

transfer edilir. Böylece kendisi dikinona oksitlenir, O_2^{-2} iki O^{-2} 'ye indirgenir. Böylece met-PPO ikinci döngü için rejenere edilmiş olur [47]. Oksi-PPO formunda moleküler oksijen iki bakır atomu arasında geri dönüşümlü olarak peroksit gibi bağlanmış olur (side-on konformasyonu içinde). Herhangi bir substrat yokluğunda, enzimin % 85'inden fazlası met-PPO formunda bulunur. Bu yüzden met formuna enzimin dinlenme formu gözüyle bakılır. Hem met- hem de oksi form difenolaz aktivitesi için uygunken, monohidroksilaz reaksiyonu için oksi-PPO formu gereklidir [43].

2.4.5.1. Monofenolaz aktivitesi

Oksi-PPO bir monofenolik substrat ile bir üçlü kompleks oluşturmak üzere bağlanır (enzim monofenole ve peroksit ligandlarına bağlanır). Peroksitteki O^- 'lerden biri elektron kaybeder ve monofenolik substratın monooksijenasyonu ile difenol oluşumunu sağlar. İkinci fenolik OH^- , üçlü ara ürün kompleksindeki monofenolik substrat ve peroksit koordinasyonundan kaynaklı olarak, mevcut OH^- 'a göre orto pozisyonuna yönlendirilir. Peroksitteki diğer O^- , ilk O^- 'den elektronu alır ve O^{-2} 'ye dönüşür. İki H^+ ile birleşerek su molekülü oluşturur. İşaretlenmiş O_2 kullanarak yapılan enzimatik aktivite çalışmaları, monofenoldeki ikinci oksijenin moleküler oksijenden edinildiğini göstermektedir [47].



Şekil 2.19. Polifenol oksidaz enziminin difenolaz (A) ve monofenolaz (B) reaksiyon mekanizması [48]

2.4.6. Doğadaki rolü

Memeli PPO'ları özelleşmiş melanositlerde lokalize olur ve saç, deri ve retinanın ışık-koruyucu pigmentasyonundan sorumludur. PPO katalizli melanin sentezindeki bozulmalar sadece bir estetik problemi değil aynı zamanda malign melanoma gibi iyi bilinen çeşitli cilt hastalıklarıyla da bağlantılıdır. Yine bu türde bir cilt hastalığı olan vitiligo, hipopigmentasyon ve epidermis bazal tabakasındaki total melanosit azalması ile karakterize edilir. Vitiligo üzerinde yapılan immünolojik çalışmalar, PPO enziminin otoantijen olarak rol oynadığını ve bu yüzden vitiligo için bir belirteç olarak kullanıldığını göstermektedir. Pigmentasyonun tamamen kaybı olan Albinizm, PPO aktivitesini doğrudan etkilemeyen fakat enzimin melanozomlara transportunu etkileyen farklı genetik hasarların bir sonucudur.

Bitki PPO'ları biyosentetik proseslerde ve otçullara karşı mücadelede yer alırlar. Esmerleşme reaksiyonları boyunca, hasar gören dokular mikrobiyal patojenlere karşı bir koruma yöntemi olarak bir melanin tabakası oluştururlar.

Süngerlerde ve pekçok omurgasızlarda PPO'lar yara iyileşmesinin ve primer immün cevap oluşumunun önemli bir parçasıdır. Eklem bacaklılarda yaralanmadan ya da deri değiştirmeden sonra kütikül tabakasının sertleşmesinde yer alırlar. Serin proteaz enzim kaskatı tarafından proenzim halinden aktifleşme sürecinden sonra böcek PPO'ları istilacı patojenleri ve parazitleri immobilize etmek ve öldürmek için sitotoksik kinonları ve diğer reaktif ara ürünleri üretirler. Bakteriye hücre duvarı bileşenleri bu sistemlerde etkili aktivatörlerdir.

Fungal PPO'lar genellikle spor pigmentasyonu, üretimi ve stabilitesi ayrıca melanin üretimiyle yara iyileşmesi ve savunma ile alakalıdır.

Bakteriyel PPO'ların biyolojik fonksiyonları bir hayli değişkenlik göstermektedir. Toprak ortamında ekstraselüler *Streptomyces* PPO'ları muhtemelen bitki fenolik bileşiklerinin polimerizasyonu ve detoksifikasyonu ile humik madde üretiminde rol oynamaktadır [43].

Papilionaceae bitkilerinin kök nodüllerinde yaşayan *Rhizobium* familyasından bakteriler simbiyozis için gerekli olan PPO genlerini plasmidlerinde taşırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki *Rhizobium etli* PPO'ı nodülasyon etkinliği ve simbiyozis-alakalı stres dayanıklılığında rol oynamaktadır. PPO muhtemelen simbiyotik mikroorganizmaları toprak ortamındaki toksik fenolik bileşiklere ve bitkiler tarafından üretilen fitoaleksinlere karşı korumaktadır. Aynı mekanizmanın bir diğer bitki ilişkili bakteri olan *Ralstonia solanacearum*'da da var olduğu düşünülmektedir.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıyla oluşan koyu renkli pigmentler hücre ve sporları UV radyasyonu, ısı, enzimatik hidroliz, antimikrobiyal bileşikler, ağır metaller ya da fagositoza karşı korur ve mikrobiyal patojenezde katkıda bulunur.

İlgi çekici bir teori, bakterinin farklı oksijen konsantrasyonlarına adapte olabilmek için bir redoks polimeri olarak melanini kullandığını ileri sürmektedir.

2.4.7. Uygulamaları

Polifenol oksidazların monofenol hidroksilaz ve difenol oksidaz aktiviteleri için substrat stereospesifiteleri pek çok endüstriyel uygulama için temel oluşturmaktadır:

- a. Fenollerin izlenmesinde biyosensör olarak
- b. Eczacılık endüstrisinde o-difenollerin üretiminde (örneğin Parkinson hastalığının tedavisi için L-DOPA ve dopamin)
- c. Biyopolimerlerin sentezinde

Sentetik melaninler radyasyon (UV, X ışınları, γ ışınları), katyon değiştiricileri, ilaç taşıyıcıları, antioksidanlar, antiviral ajanlar ve antijenlere karşı koruyucu ajanlar olarak uygulama alanı bulmaktadır.

Proteinleri çapraz bağlama yetenekleri PPO'lar için gıda endüstrisinde yeni bir uygulama pazarı başlatmıştır [43].

PPO'lar fenollerle kontamine olmuş bölgeler için bir çevresel detoksifikasyon aracı olarak düşünülmektedir. Bu yüzden çevre uygulamalarında yer bulmaktadır.

PPO'ların oksidatif aktiviteleri bazı fermentasyon ürünlerinin (çay, kahve, kakao, kuru üzüm) organoleptik özellikleri üzerinde pozitif bir etki yaratmaktadır. Fakat bu enzimler meyve ve sebzelerde istenmeyen esmerleşmenin sorumlusudur. Bu kararmalar gıdaların besinsel kalitesinde azalmalara ve satılmalarında zorluklara neden olmaktadır.

Esmerleşmenin engellenmesi için kullanılan güncel konvansiyonel teknikler, PPO'ın ısı ile inaktivasyonunu kapsar. Fakat bu prosesler besin kalitesinde istenmeyen azalmalara neden olduğundan PPO'ların çeşitli kimyasal ajanlarla inhibisyonu yoluna gidilmektedir. Halojenür tuzları, aromatik karboksilik asitler ve sülfid, sitrik asit, askorbik asit, sistein gibi indirgeyici bileşiklerin PPO'ları inhibe ettiği bilinmektedir. Askorbik asidin sağladığı fayda, tartışmaların odak noktası olmakta ve sülfidlerin kullanımı, sağlığa zararlı olma potansiyeli nedeniyle kısıtlanmaktadır.

PPO inhibitörleri, eczacılık ve kozmetik endüstrisinde de kullanım olanağı bulmuştur. Melaninin bir antioksidan olarak UV radyasyona karşı çok önemli bir koruyucu rolü olmasına karşın anormal melanin pigmentasyonu insanlarda önemli bir estetik problemdir. Bu yüzden PPO inhibitörleri cilt beyazlatıcı ve cilt koruyucu etkileri nedeniyle kozmetik endüstrisinde önemli bir yere sahiptir [43].

Biz de bu yüzden yaptığımız çalışmada enzimin karakteristik özelliklerini incelememizin yanı sıra bilinen çeşitli PPO inhibitörlerinin kaldirik (*Trachystemon orientalis*) PPO enzimi üzerine etkisini inceledik.

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kaldirik Polifenol oksidaz enzimi ile yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrofotometre	UV-2401 PC UV-VIS	Shimatzu
Soğutmalı santrifüj	NF 800 R	nüve
Santrifüj	NF 200	nüve
Manyetik Karıştırıcı	MSH-20D	WiseStir
Soğutucu kabin	Özel yapım	Özel yapım
pH metre	pH 211	HANNA
Protein elektroforezi	Owl P8DS	Thermo Scientific
Su banyosu	Nb20	nüve
Hassas terazi	XB 220A	Precisa
Otomatik pipetler	VVCS-200 ve 1000	Microlit
Derin dondurucu	UDD 100BK	Uğur

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Yaptığımız çalışmada ekstraksiyon ortamını hazırlarken polivinil pirolidon (PVP), triton X-100, askorbik asit ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojen fosfat kimyasalları kullanılmıştır. Tampon çözelti hazırlama işlemlerinde sitrik asit mono hidrat, sodyum sitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, tris amino metan hidroklorid ve trizma-base kimyasalları kullanılmıştır. Kinetik

çalışmalarda 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, guaiakol, gallik asit ve L-Tirozin substratları kullanılmıştır. L-Glutasyon, L-Sistein, N-feniltiyöüre, Tiyöüre, Tiyasetamid, 2-merkaptö etanol, 4,6-dihidroksi-2-merkaptö pirimidin, Glisin, L-Glutamik asit, L-Aşpartik asit, L-Fenil alanin ve L-Arginin kimyasalları enzim aktivitesi üzerine madde etkisi çalışmalarında kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich, Merck firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu

3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması

Dondurucuda depolanmış kaldirik bitkisinin iek, tomurcuk ve yaprak kısımlarından 10 gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 polivinil pirolidon, % 4 triton X-100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti ile blender kullanılarak 5 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen homojenat üç kat tülbentten süzölmüş ve 5000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant ham enzim ekstraktı olarak enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.2. Amonyum sülfat öktürmesi

Ham enzim ekstraktı sırasıyla %15, %40 ve %80'lik amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur. öktürme için gerekli katı amonyum sülfat miktarları hesaplandıktan sonra ham ekstrakt bir beher içerisinde soğuk kabine alınmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde %15 doygunluk için tartılan katı amonyum sülfat azar azar eklenmiştir. Daha sonra santrifüj işlemi gerçekleştirilip çökelek kısmı ayrılmış ve çökeleğin çözünebileceği en az tampon hacminde (pH 7,0 fosfat tamponu) özölmüştür. Süpernatant kısmına ise %40'lık doygunluk için tartılan katı amonyum sülfat yine azar azar eklenmiştir. Aynı işlemler tekrarlanıp en sonunda %15, %40 ve %80 amonyum sülfat doygunluğunda çöken proteinler böylece ayrılmıştır. öktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarı şu formülle tespit edilmiştir:

$$g[(NH_4)_2SO_4] = 533 \times (S_2 - S_1) / 100 - 0,3 S_2$$

S1 = mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.3. Diyaliz

Büyük proteinler için daha avantajlı olan diyaliz işleminde, kısmen saflaştırılmış özüt yarı geçirgen bir zardan yapılmış tüp veya torbaya konur. Bu torba uygun iyonik güçteki fazla miktarda tampon çözeltisine asıldığında zar, tuz ve tamponun yer değiştirmesine izin verirken, proteini geçirmez. Diyaliz işleminde büyük proteinler zaröz torba veya tüpün içinde kalırken, protein hazırlamada kullanılan diğer çözülmüş katıların derişimi zar dışındaki çözeltiyle dengeye gelinceye kadar değişir [49].

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen üç ayrı fraksiyona aktivite tayini yapılmıştır. %15 ve % 40'lık kısımların aktiviteleri birbirine yakın sonuç verirken %80'likte çok düşük bir aktivite görülmüştür. Bu yüzden %15 ve %40'lık fraksiyonlar diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirilip pH 7,0 fosfat tamponuna karşı diyalizlenmiştir. Bunun için diyaliz torbası, içinde pH 7,0 fosfat tamponu bulunan geniş bir behere yerleştirilerek 24 saat süreyle soğuk kabinde, 4°C'de, manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında tampon çözelti en az 3 - 4 defa değiştirilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işleminden sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

3.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi

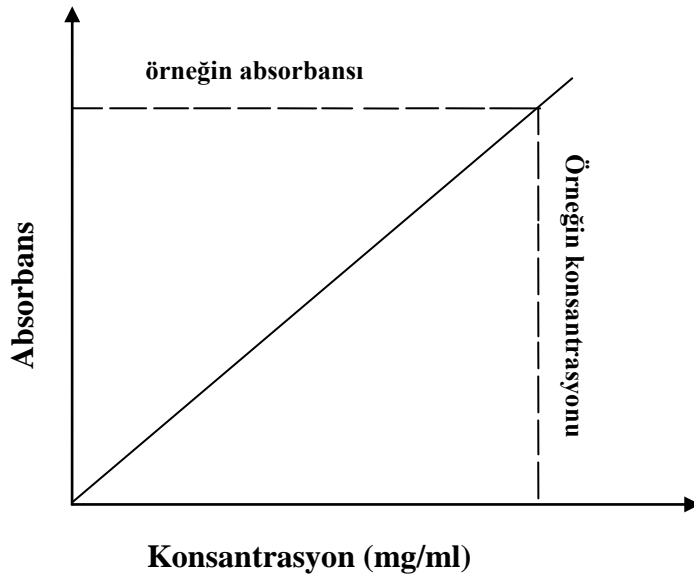
Kromatografinin bu türünde, moleküler elek olarak etkiyen bir polisakkarit jeli sürekli faz olarak kullanılır. Bu jelin partikülleri, içlerine küçük ve orta büyüklükte moleküllerin gireceği su dolu oyuklara sahiptirler. Çözgenlerle yıkandığında oyuklara girmiş moleküller yavaş yavaş tekrar dışarı çıkarlar. Uygun jel seçimi ve

ona göre ayarlanmış elüsyon sayesinde birçok protein çok iyi bir şekilde saflaştırılabilir. Yöntem molekül ağırlığı tayinine de uygundur [50].

1,5 gram Sefadex G-100, 50 ml 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) 3 gün bekletilerek jel boncuklarının oluşması sağlanmıştır. 1 cm çapında ve 50 cm boyundaki kuru cam bir kolonun dibine küçük bir pamuk parçası yerleştirilip pH 7,0 fosfat tamponuyla kolon yıkanmıştır. Daha sonra hazırlanan jel bir huni yardımı ile kolona verildikten sonra musluk açılarak jelin kolona homojen olarak yerleşmesi sağlanmıştır. Bunun için kolona jel yüklenir yüklenmez iç yüzeyinden yavaşça sızdırarak aynı tampon çözelti sürekli olarak ilave edilip jelin kurumadan paketlenmesi sağlanmıştır. Yaklaşık 150 mL tampon çözelti ile kolonun yıkanmasının ardından kolon tamamen tamponla doldurulup üstü parafilmle kapatılarak 24 saat 4°C'de bekletilmiştir. Paketleme işlemi bittikten sonra tamponla akış hızı 0,3 mL/dk olarak ayarlanıp, diyalizlenmiş çözelti yine yavaşça sızdırılarak kolona verilmiştir. Çözeltinin tamamı jele girdiğinde aynı tamponla yıkamaya devam edilmiştir. Elüatlar 1 mL'lik fraksiyonlar halinde eppendorf tüplere toplanmıştır. Eppendorf tüplerde toplanan enzim daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda depolanmıştır.

3.2.5. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini

Ham enzim ekstraktı, amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çözeltiler, diyalizat ve kolon elüatlarının protein tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır. Öncelikle bir standart protein grafiği hazırlanmıştır. Bunun için 1 mg/mL'lik BSA (sığır serum albümini) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltden 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl alınıp, hacim Bradford reaktifi ile 1 mL'ye tamamlanarak standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart protein grafiği elde edilen sonuçlara göre çizilmiştir. Örneklerin 595 nm'de absorbansı ölçülerek standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği [44]

3.2.6. SDS jel elektroforezi

Yapılan çalışmada %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. %12'lik ayırma jeli bileşenleri sırasıyla temiz bir beherde karıştırılıp temizlenen cam plakalar arasına önce ayırma jeli dökülmüştür. Jel donduktan sonra yükleme jeli hazırlanıp plakalar arasına dökülmüş ve üst kısmına tarak yerleştirilip donmaya bırakılmıştır. Hazırlanan jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilip tank yürütme tamponuyla doldurulmuştur. Standart proteinler ve örnekler 1'e 2 oranında numune tamponu ile karıştırılmış ve 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Denatüre edilen örnekler çıkartılan tarağın jelde açtığı kuyucuklara yüklendikten sonra tank kapatılıp sistem çalıştırılmıştır. Proteinler (jelde oluşan mavi renkli boya) yükleme jelinden çıkana kadar 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar 25 mA'de yürütülmüştür. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartılıp boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak yaklaşık 3,5 saat boyanmıştır. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise, boya giderme çözeltisiyle muamele edilmiştir. İşlem boya jelden tamamen uzaklaşana kadar, boya giderme çözeltisi birkaç saatte bir sürekli değiştirilerek, devam ettirilmiştir.

Tablo 3.2. SDS jel elektroforezi bileşenleri ve miktarları [42]

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl pH: 6,8)	---	1.25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl pH: 8,8)	2.5 mL	---
% 10 SDS	0.1 mL	0.1 mL
% 30 Akrlamid/Bisakrlamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf Su	3.3 mL	6.87 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

3.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu

Polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerinin araştırılmasında substrat spesifikliğı, optimum pH ve optimum sıcaklık tayini, depolanma kararlılığı, termal inaktivasyon ve çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. PPO aktivite tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi pH 7,0 fosfat tamponu, 4-metil katekol çözeltisi ve ham enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında, 420 nm'de 1dk süre ile absorbansdaki artış ölçülerek saptanmıştır. Toplam reaksiyon hacmi her ölçüm için 3 mL olarak sabit tutulmuştur. Zamana karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen grafiğin eğiminden ilk hız değerleri hesaplanmıştır. Diğer substratlar için de uygun pH değerlerinde aynı işlemler yapılmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.2. Substrat spesifikliği

Enzimin hangi substratları dönüşüme uğratabildiği ve hangisine karşı afinitesinin daha yüksek olduğunun tayin edilmesi amacıyla substrat spesifikliği çalışması yapılmıştır. Enziminin 8 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla guaiakol, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, L-Tirozin ve gallik asit substrat olarak kullanılmıştır. Her substrat için K_m değeri hesaplanmış ve kullanılan substratlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda enzim 4-metil katekol, katekol, kafeik asit, pirogallol substratlarına karşı aktivite gösterirken gallik asit, L-Tirozin ve guaiakol substratlarına karşı aktivite göstermemiştir.

3.3.3. pH etkisi

PPO enzimi aktivitesine pH etkisinin incelenmesi çalışmasında 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH larda hazırlanmış tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M Tris tamponu hazırlanmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) için optimum pH çalışması yapılmıştır. Enzim aktivite ölçümleri daha önce bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm'de absorbanstaki artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Sıcaklığın etkisi

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) için optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Her bir substrat 10 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.3.5. Enzim kinetiği

Enzimin maksimum hızının (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m) bulunması için kinetik çalışmalarda 0,05 mM ile 50 mM arasında değişen substrat çözeltileri kullanılmıştır. Enzimin maksimum hızı ve K_m değeri tayin edilirken spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Michaelis-Menten ($[S]$ 'a karşı V) ve Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/[S]$ 'ye karşı $1/V$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Enzim aktivitesi üzerine madde etkisi çalışmalarında substrat olarak 4-metil katekol kullanılmıştır.

3.3.6. Enzim aktivitesi üzerine madde etkisi

PPO enzim aktivitesi üzerine madde etkisinin incelenmesi çalışmasında, bilinen inhibitörlerin etkisi, çeşitli metallerin etkisi ve bazı amino asitlerin etkisi araştırılmıştır

3.3.6.1. Bilinen inhibitörlerin etkisi

Yapılan çalışmada PPO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit, sodyum metabisülfid, L-sistein ve sodyum azid inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir.

Her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu inhibitörlerin farklı konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen tayinler sonucunda hesaplanan aktivite değerleriyle Michaelis- Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve elde edilen grafiklerden inhibisyon tipi belirlenmiştir. Her inhibitör için K_i değeri hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek amacıyla önce her bir inhibitör için I_{50} değeri hesaplanmıştır. I_{50} değeri enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonudur. Bu değeri hesaplamak için substrat konsantrasyonu 5 mM'da sabit tutularak birkaç farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Sonra her bir inhibitör için $[I] - \%$

Bağıl Aktivite grafikleri çizilmiştir. Bu grafiğin denkleminde I_{50} değeri hesaplanmıştır. Çalışmada tüm inhibitörler için 4-metil katekol ve pirogallol olmak üzere 2 farklı substrat kullanılmıştır. Aktivite tayinleri bu substratlar eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra inhibitör madde kullanmaksızın, değişen substrat varlığında enzim aktivitesi ölçülerek Michaelis-Menten eğrisi elde edilmiştir ve aynı eğri bu kez reaksiyon ortamına sabit konsantrasyonda inhibitör eklenerek tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar her dafasında farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan inhibitör miktarlarının seçimi için I_{50} grafiğinden yararlanılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda $1/[S]$ 'ye karşılık $1/V$ grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler yardımıyla inhibisyon türü ve K_i değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan K_i değerlerinin ortalamaları alınarak da her bir inhibitör için ortalama K_i değerleri bulunmuştur.

3.3.6.2. Metallerin etkisi

Kaldirik PPO enzimine metal etkisinin incelenmesi amacıyla standart koşullarda aktivite ölçümü yapılmış yalnız farklı olarak ortama sabit konsantrasyonda metal çözeltilerinden eklenmiştir. Bu amaçla metallerin son konsantrasyonu 0,5 mM (bazıları için), 1 mM ve 5 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış enzim çözeltileri metallerle birlikte 4°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 4-metil katekol sabit konsantrasyonda reaksiyon ortamına eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Çalışmada Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+3} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} metallerinin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonun hızıyla mukayese edilmiştir.

3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi

Yapılan çalışmada L-Glutamik asit, L-Aspartik asit, L-Arginin, L-Lisin, L-Prolin, Glisin, L-Treonin, L-Fenilalanin amino asitlerinin etkisi incelenmiştir. Amino asit etkisi incelenirken 5 mM 4-metil katekol konsantrasyonunda çalışılmıştır ve her bir amino asitten farklı miktarlarda reaksiyon ortamına eklenerek her bir amino asit için I_{50} değeri hesaplanmıştır.

3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı

PPO enziminin depolanma kararlılığı çalışması -20°C , 4°C ve oda sıcaklığı (ortalama 25°C) olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiştir. Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek amacıyla oda sıcaklığında aktivitesindeki azalma saat başı 420 nm 'de 60 sn boyunca absorbans değişimi ölçülerek kaydedilmiştir. Burada substrat olarak 5 mM 4-metil katekol kullanılmıştır.

Enzimin -20°C 'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim -20°C 'de saklanarak haftada bir 420 nm 'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Yine substrat olarak 5 mM 4-metil katekol kullanılmıştır. 4°C 'deki kararlılığın ölçülmesi amacıyla ise aynı şekilde aktivite ölçülmüştür fakat ölçüm sıklığı 4-5 saatte bir olarak ayarlanmıştır.

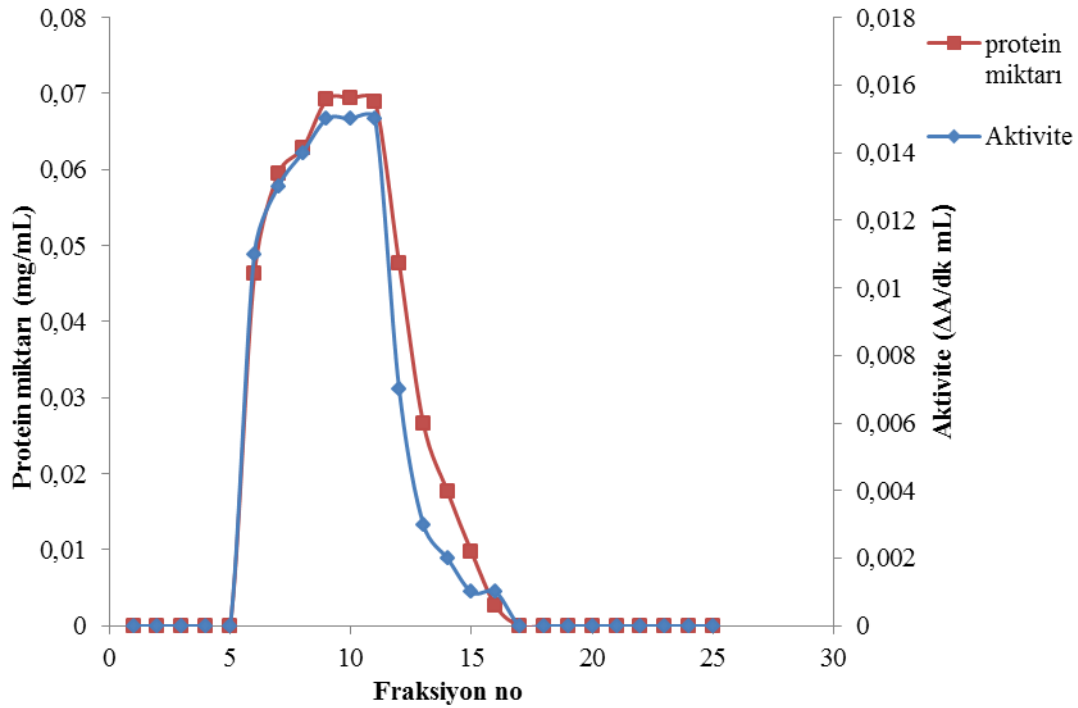
3.3.8. Termal inaktivasyon

PPO enzimi için termal inaktivasyon çalışması yapılırken 30°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C ve 80°C 'de inkübe edilen enzim ekstraktından 10 dk'da bir miktar alınıp buz banyosunda soğutulmuştur ve standart koşullar altında aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir sıcaklık değerinde enzim ekstraktı toplam 60 dk inkübe edilmiştir. Ölçümler sonunda % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır ve zaman - % kalan aktivite grafikleri çizilmiştir.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR ve SONUÇLAR

4.1. Polifenol Oksidazın Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Gerçekleştirilen jel filtrasyon kromatografisi sonucu toplanan elüatlardan oluşturulan fraksiyonlar için, 595 nm’de Bradford yöntemine göre protein miktarı tayini yapılmış ve 420 nm’de PPO aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.



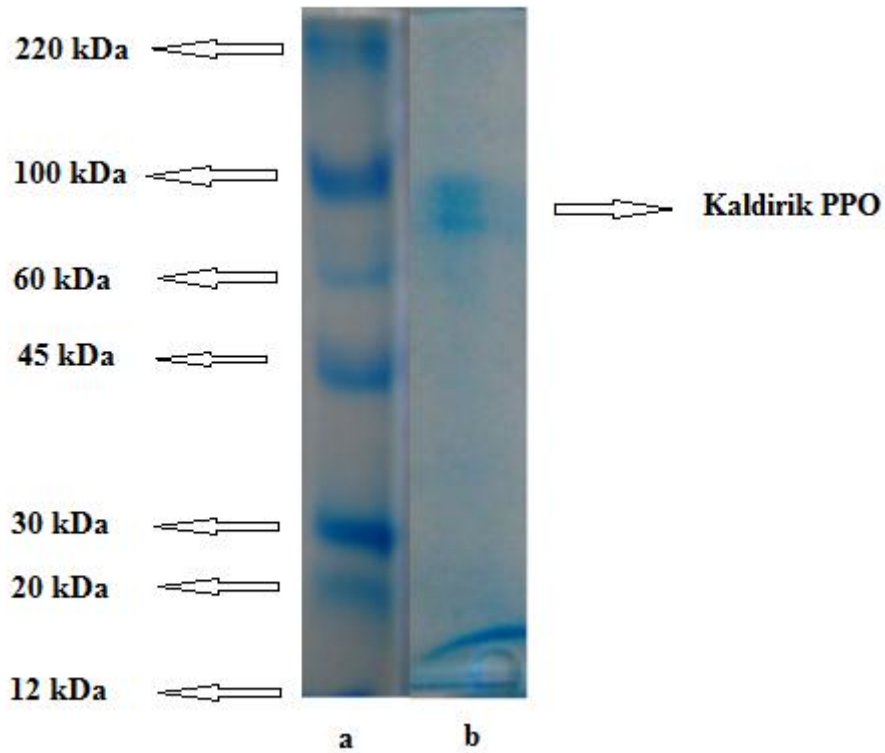
Şekil 4.1. Kaldirik PPO enziminin jel filtrasyon kromatografisi aktivite ve protein miktarı grafiği

Şekil 4.1’de 1’den 25’e kadar numaralandırılan tüpler içerisinde 5-17 arasındaki tüplerde aktivite gözlenmiştir ve protein tayini sonuçları da bunu desteklemektedir. Saflaştırılan PPO’ı içeren bu fraksiyonlar birleştirilerek Bradford yöntemiyle toplam protein tayini yapılmıştır ve ham enzim özütü için bulunan değerle karşılaştırılmıştır. Bu tayin sonucunda saf enzim elüatı protein miktarı, $y = 18,347x$ standart grafiği

denklemine göre hesaplanarak, 0,0437 mg/mL, ham enzim özütü protein miktarı ise 0,0701 mg/mL olarak bulunmuştur. Bulunan protein miktarları kullanılarak saf enzimin ve ham enzim özütünün spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

4.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi ile Enzim Saflığına Kontrolü

SDS eşliğinde gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektrofözezi işlemi sonucunda, Kaldirik PPO enzimi proteini tek bir band halinde jelda görüntülenmiştir. Marker protein karışımı ile yapılan kıyaslama sonucunda, enzimin moleköl ağırlığının 60-100 kDa arasında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2. SDS jel elektrofözezi sonucunda elde edilen jel

a: Marker proteinleri (12-220 kDa)

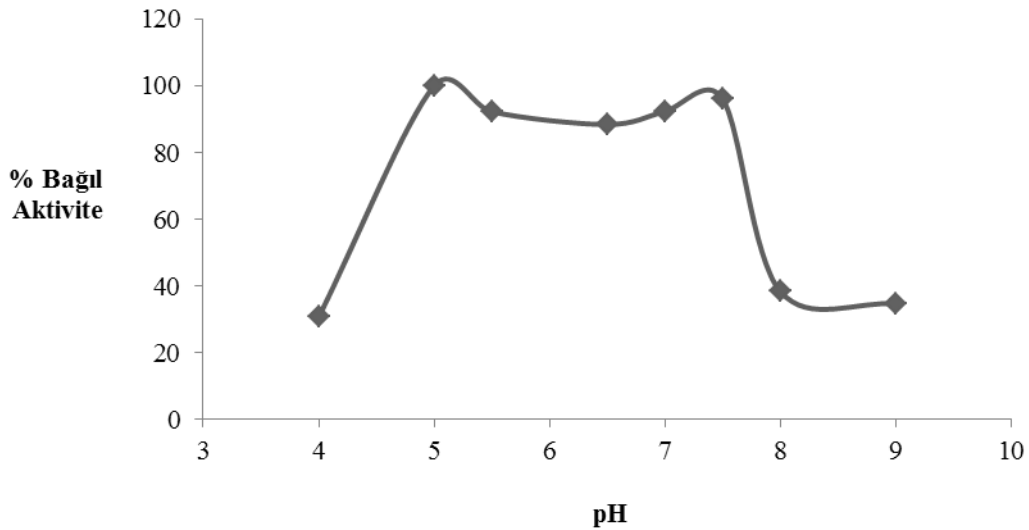
b: Saf enzim elüatı (Kaldirik PPO enzimi)

4.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu

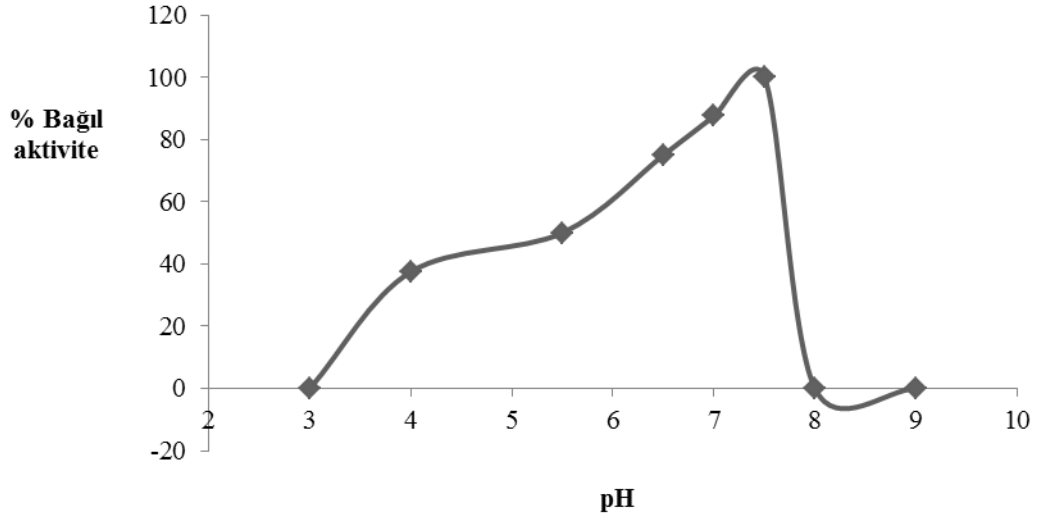
4.3.1. pH etkisi

PPO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada 4 farklı substrat için (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivite tayini 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm'de absorban artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

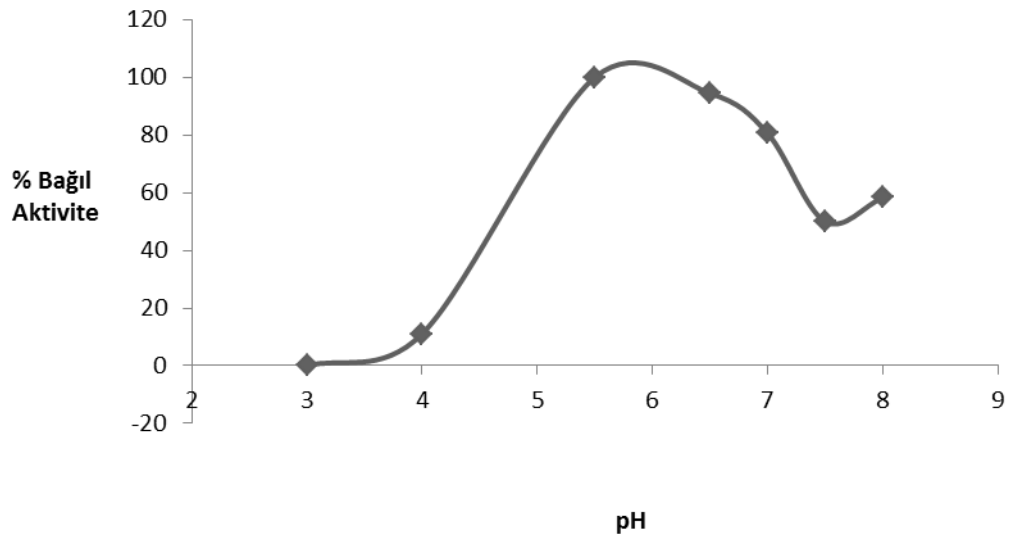
Yapılan pH çalışması sonucunda grafiklerden de görülebileceği gibi polifenol oksidaz enziminin denenen substratlara karşı optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 5,0, katekol ve pirogallol için 7,5, kafeik asit için ise 5,5 olarak bulunmuştur.



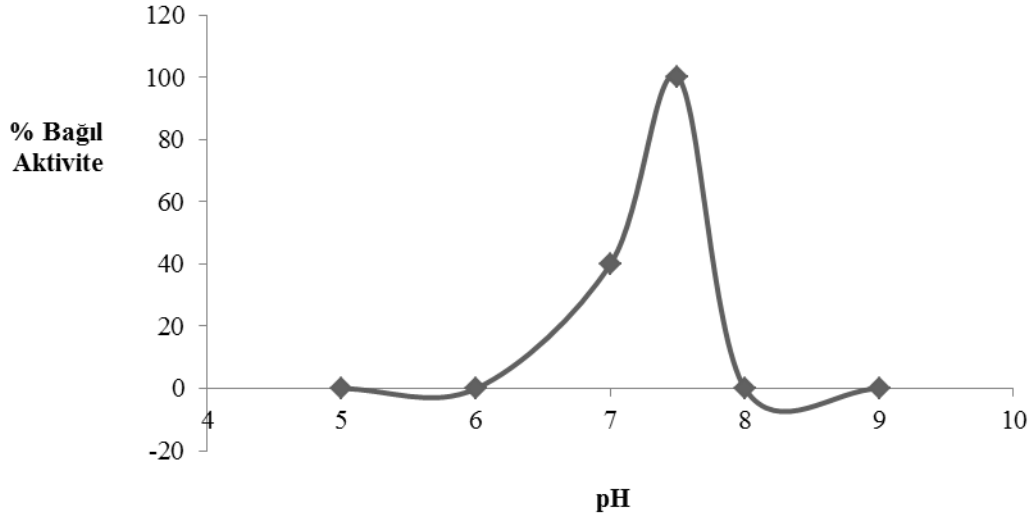
Şekil 4.3. 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



Şekil 4.4. Katekol substratı için optimum pH grafiği



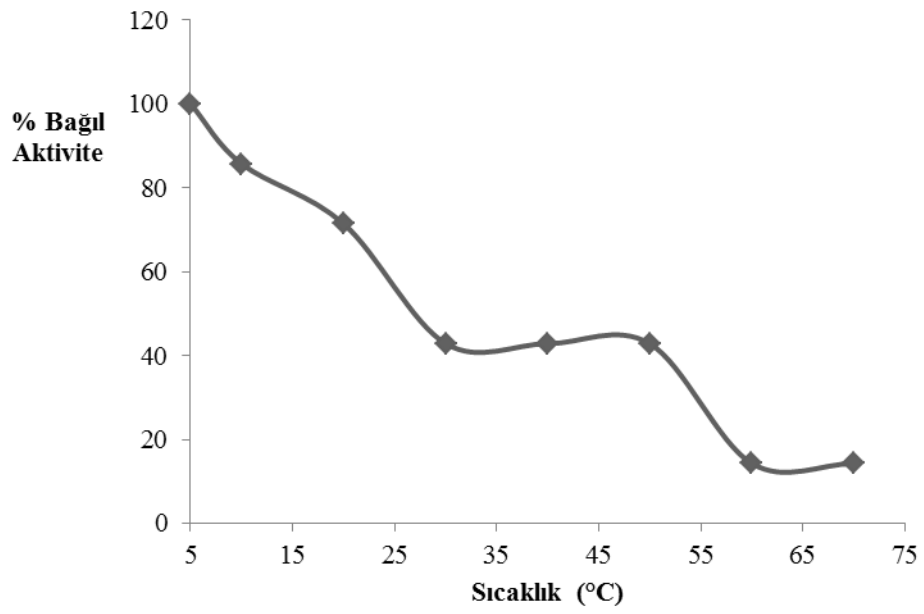
Şekil 4.5. Kafeik asit substratı için optimum pH grafiği



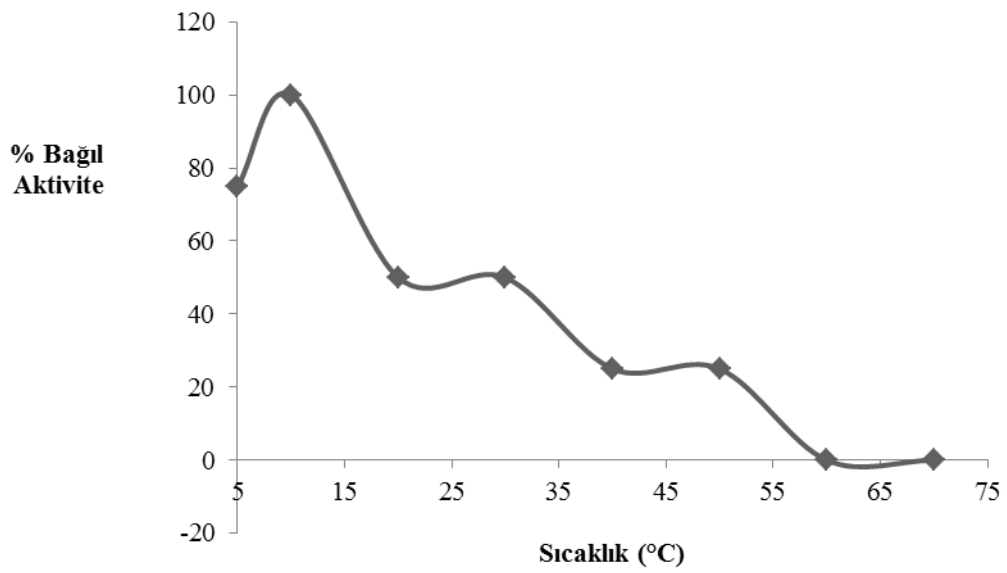
Şekil 4.6. Pirogallol substratı için optimum pH grafiği

4.3.2. Sıcaklığın etkisi

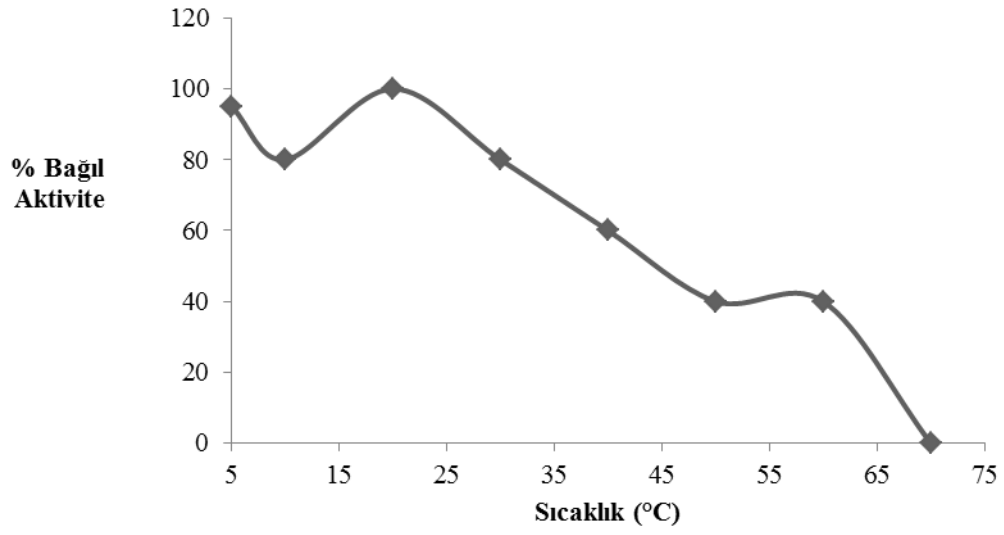
Bölüm 3.3.4.'de anlatıldığı gibi, 4-metil katekol, katekol, kafeik asit ve pirogallol substratları kullanılarak PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılan çalışmada, elde edilen grafikler incelendiğinde enzimin katekol için 10°C, 4-metil katekol için 5°C, kafeik asit için 20°C ve pirogallol substratı için ise 30°C optimum sıcaklık değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.



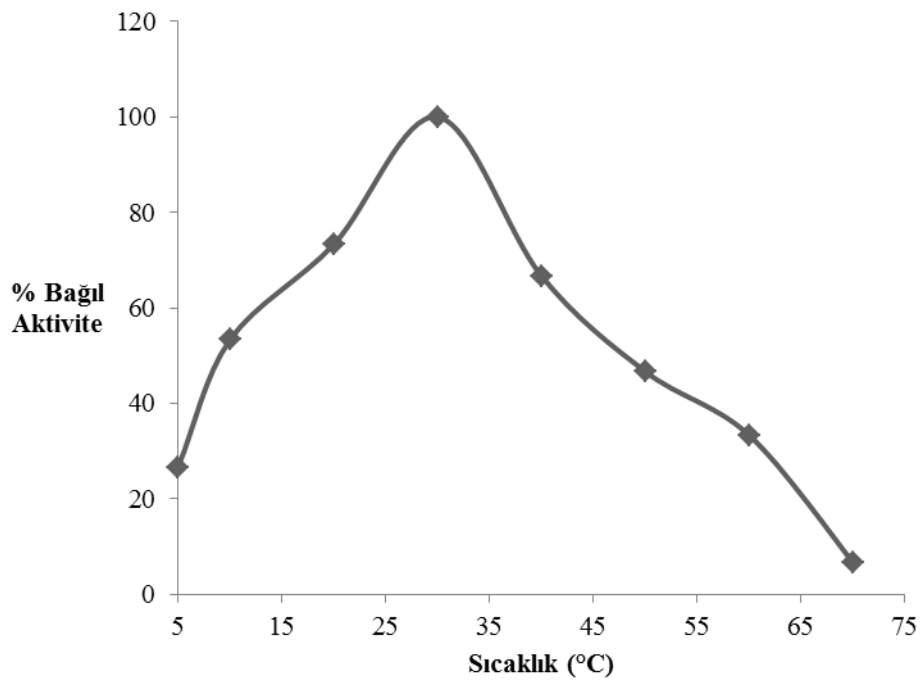
Şekil 4.7. 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.8. Katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.9. Kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.10. Pirogallol substratının optimum sıcaklık grafiği

Tablo 4.1 Polifenol oksidaz enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan Optimum pH ve Optimum sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) değerleri

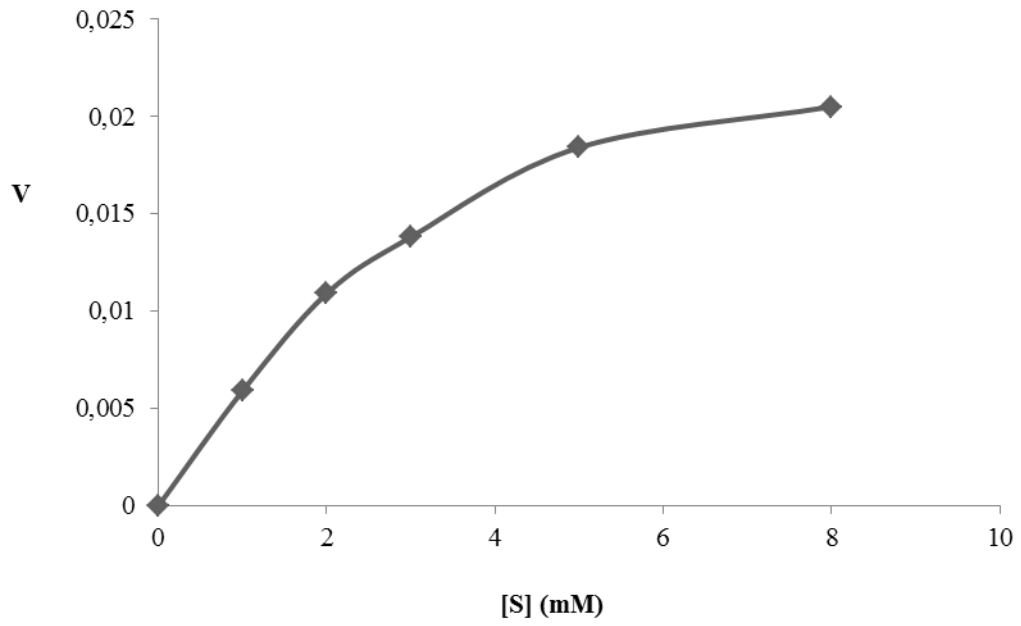
Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık
4-metil katekol	5,0	5
Katekol	7,5	10
Kafeik asit	5,5	20
Pirogallol	7,5	30

4.3.3. Enzim kinetiği

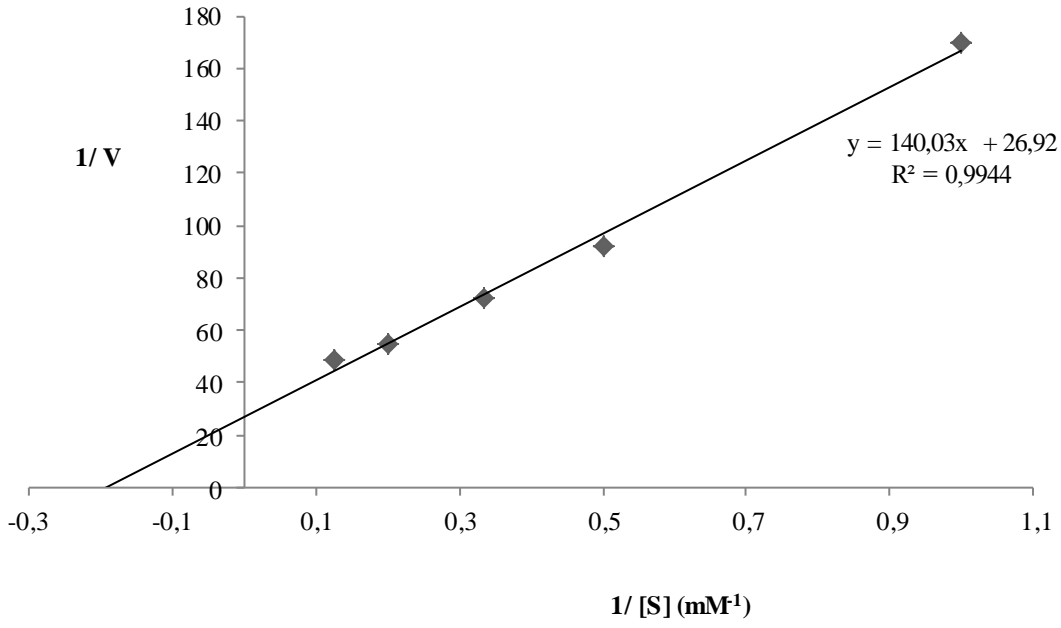
Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz için kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, guaiakol, gallik asit ve L-Tirozin substratları için yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin gallik asit, guaiakol ve L-Tirozin substratları ile reaksiyon vermediği görülmüştür. Diğer substratlarla gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik olarak, 0,1-20 mM aralığında değişen substrat varlığında, 420 nm'de yapılmıştır. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerlerinin tespiti için önce substrat doygunluk eğrileri (Michaelis-Menten eğrisi) çizilmiştir ve bu grafikten Lineweaver-Burk grafiğine geçilip grafik denklemlerinden sözkonusu değerler hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzimin en iyi aktivite gösterdiği substratın kafeik asit olduğu (K_m 0,51 mM) belirlenmiştir.

Tablo 4.2 Polifenol oksidaz enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan K_m ve V_{maks} değerleri

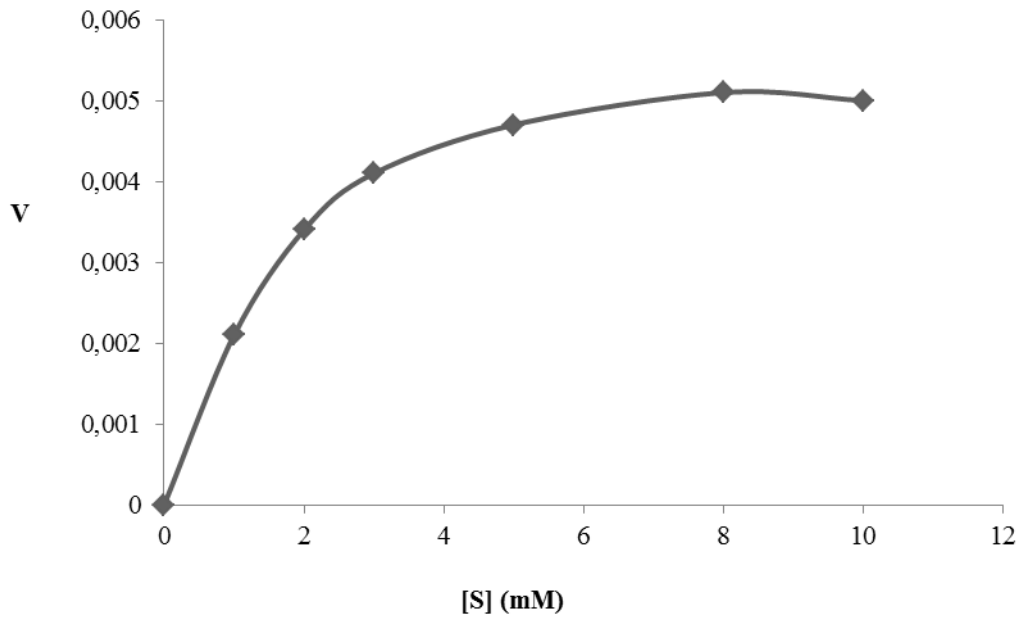
Substrat	K_m (mM)	V_{maks} (EÜ/mL)
4-metil katekol	4,55	0,0334
Katekol	2,24	0,0069
Kafeik asit	0,51	0,0194
Pirogallol	2,36	0,0037



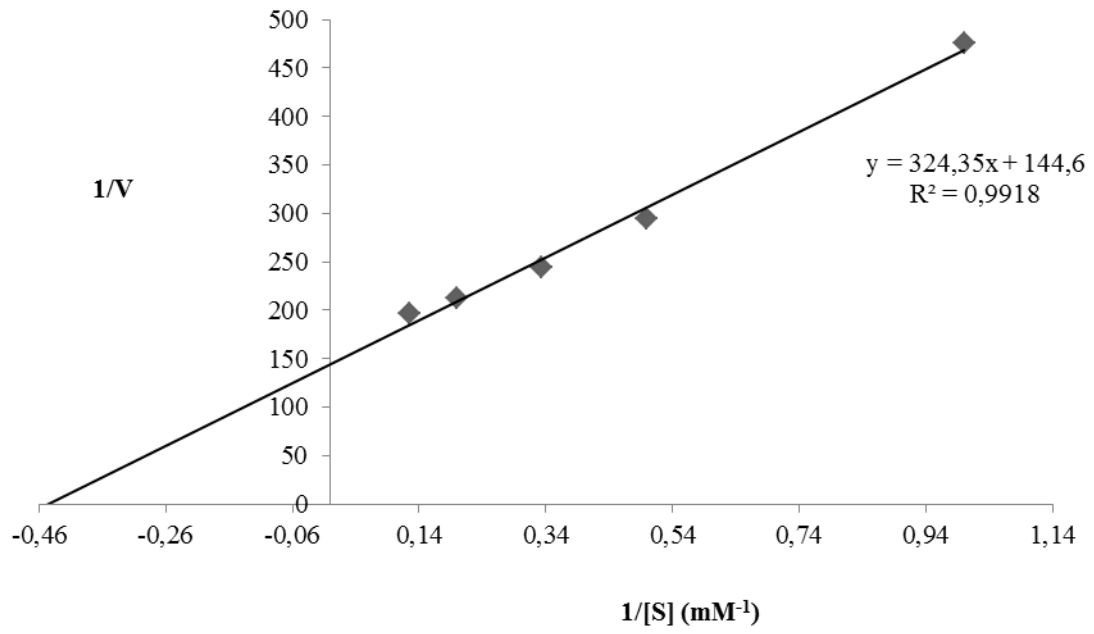
Şekil 4.11. 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



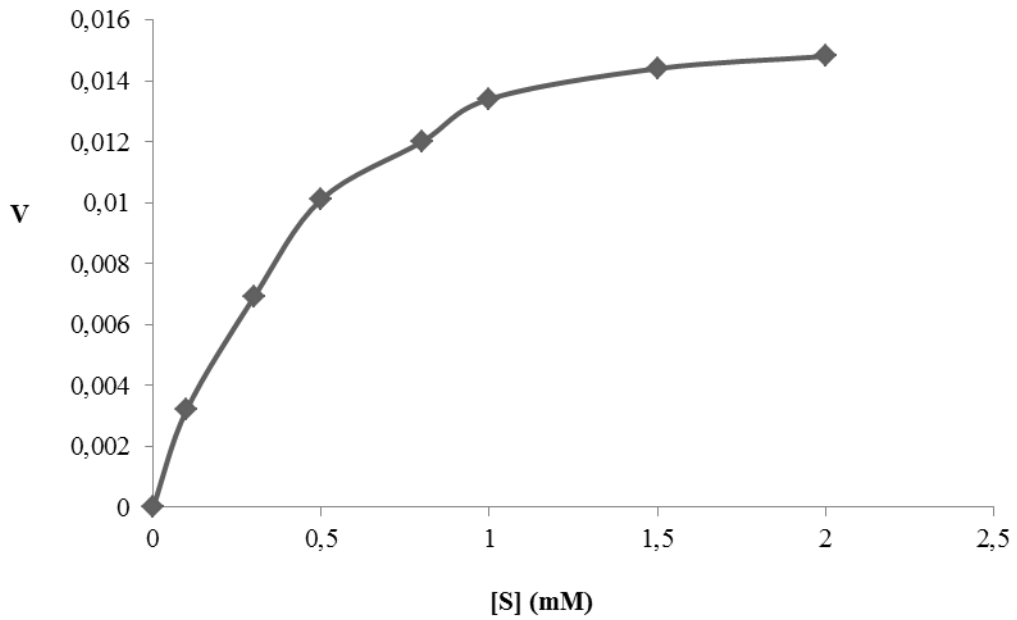
Şekil 4.12. 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



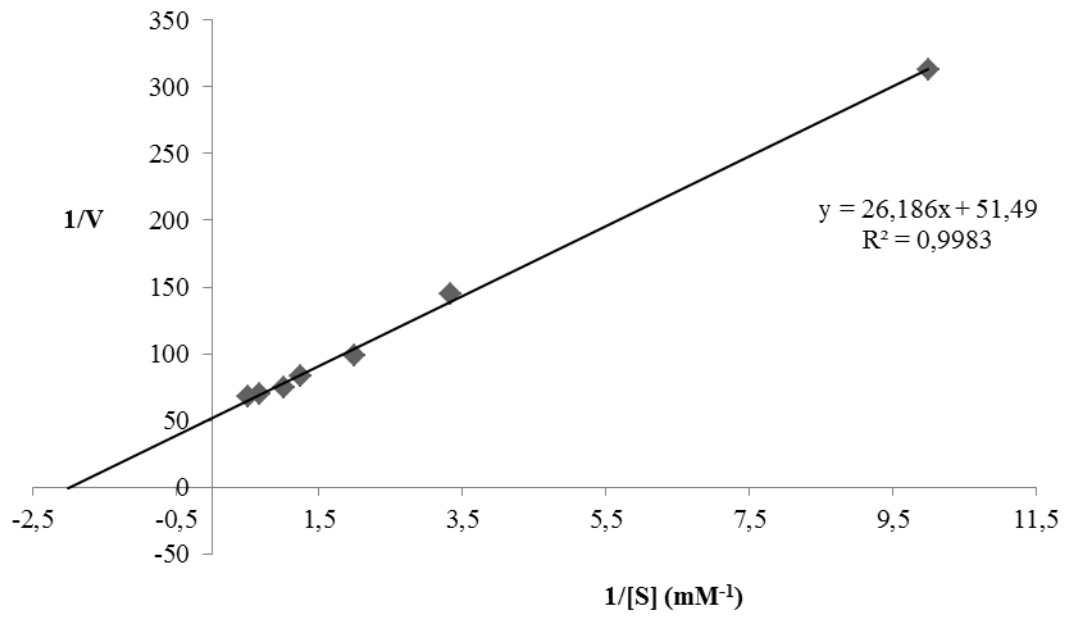
Şekil 4.13. Katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



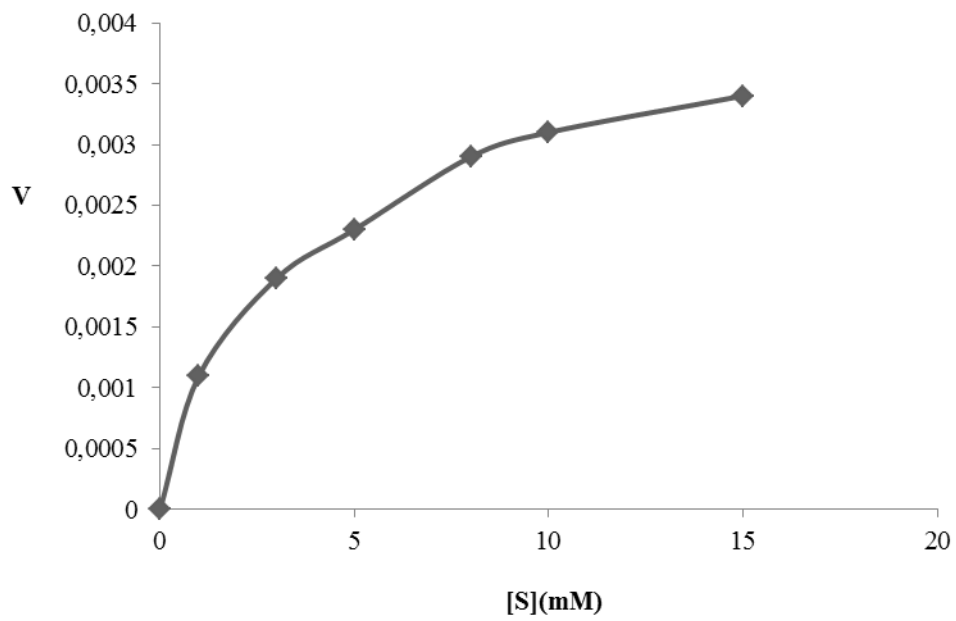
Şekil 4.14. Katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



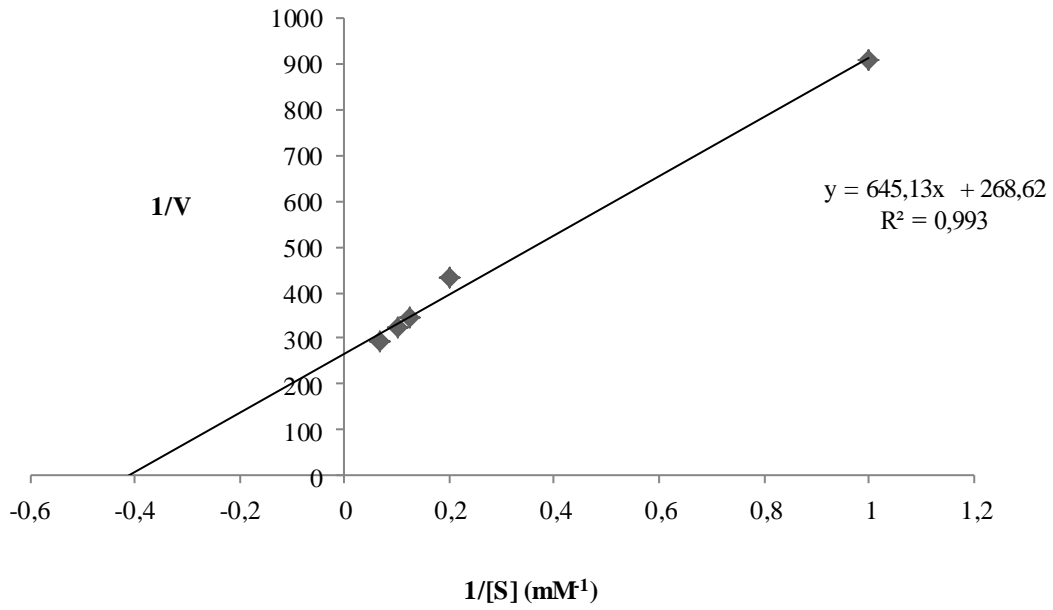
Şekil 4.15. Kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.16. Kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği



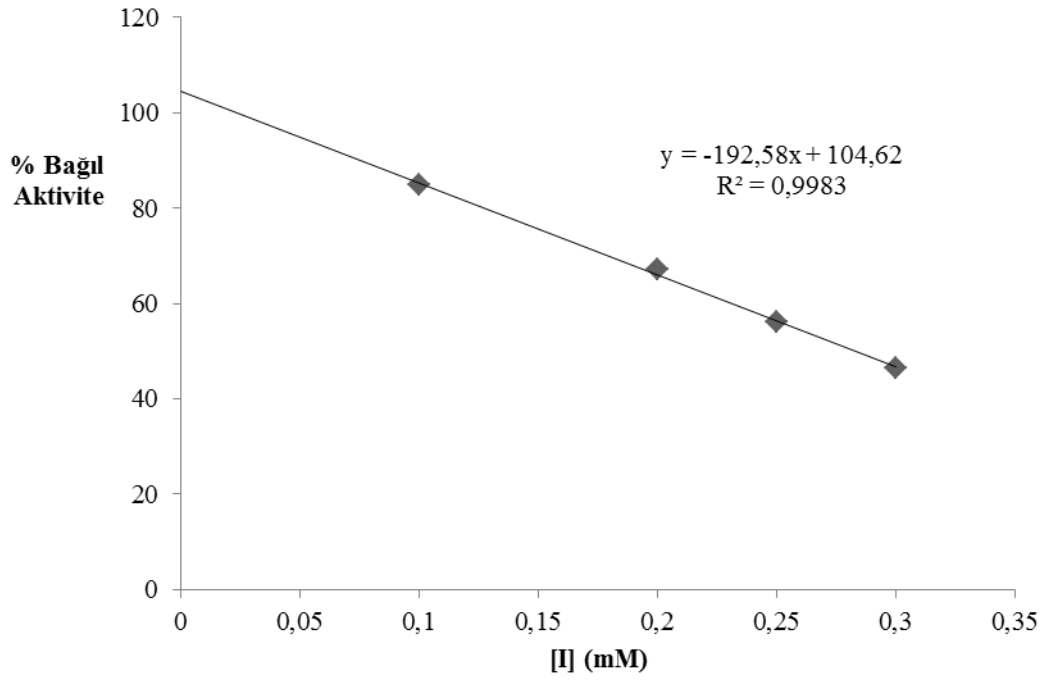
Şekil 4.17. Pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi



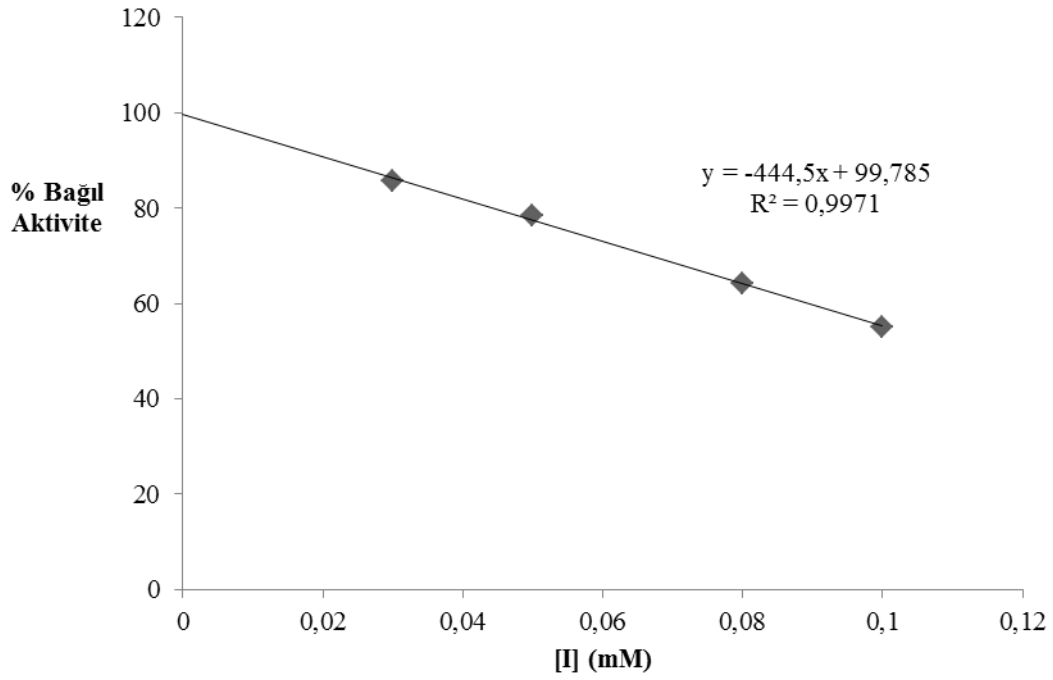
Şekil 4.18. Pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği

4.3.4. Bilinen İnhibitörlerin etkisi

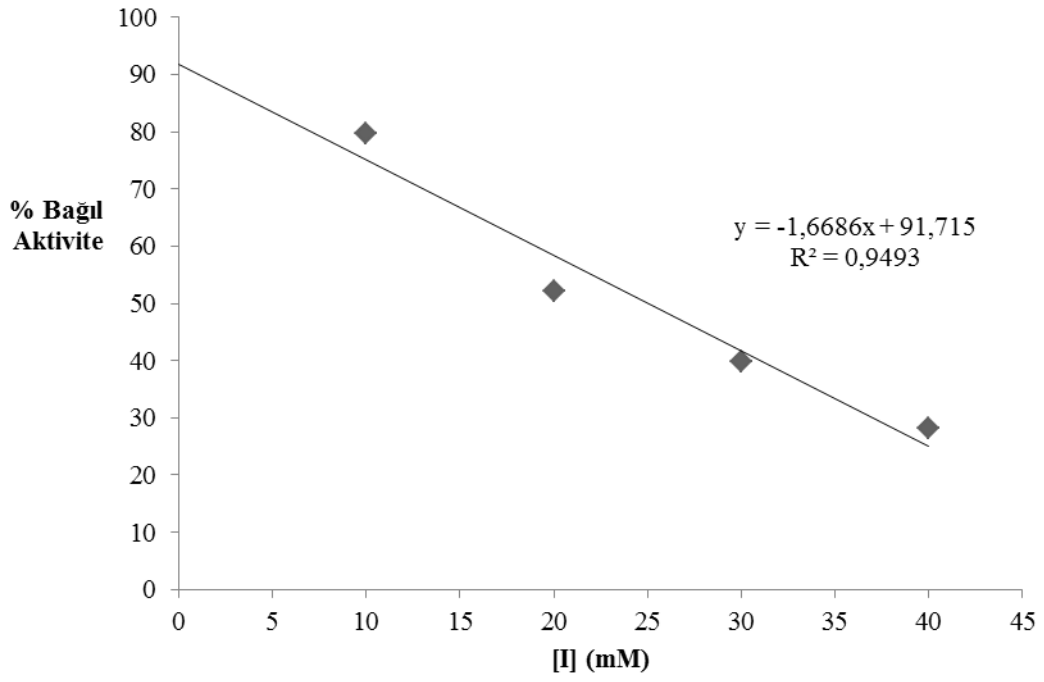
Yapılan çalışmada iki farklı substrat ile dört farklı inhibitör denenerek toplam 8 farklı inhibisyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen grafiklerden her bir inhibitör için I_{50} ve K_i değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler Şekil 4.19 – 4.34’de ve hesaplanan değerlere ait tablolar ise Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de verilmiştir.



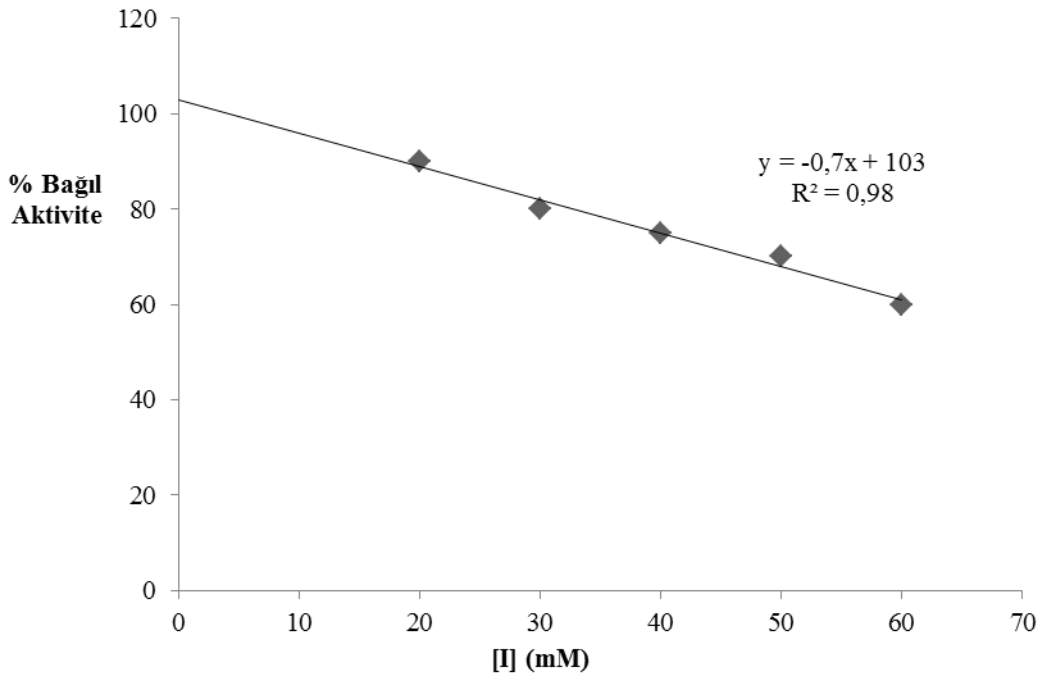
Şekil 4.19. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit etkisi



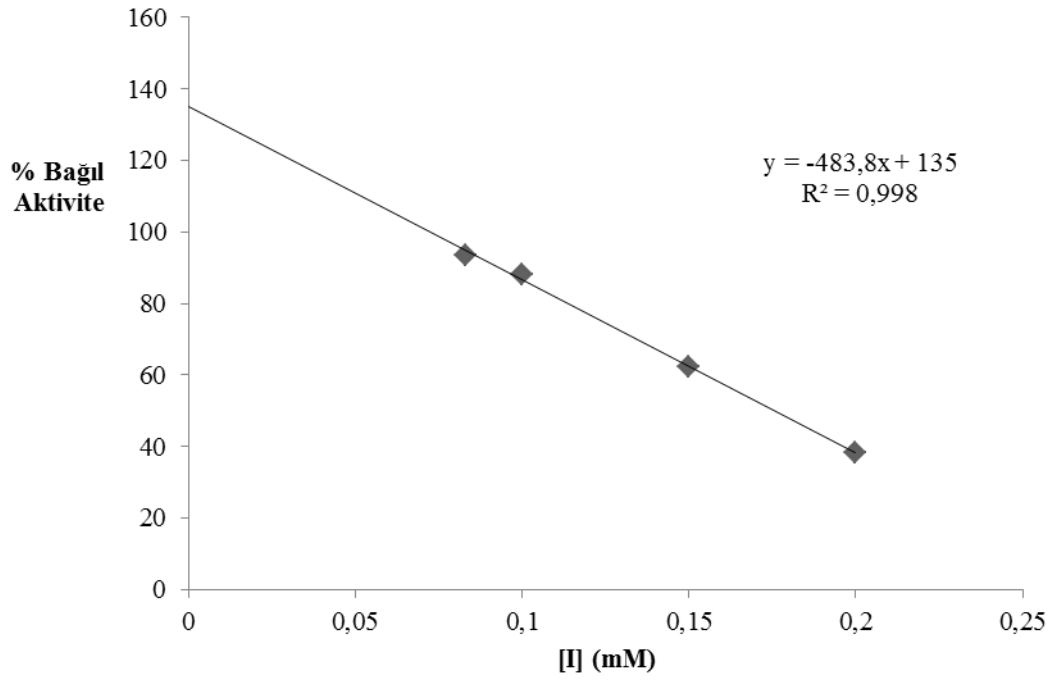
Şekil 4.20. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında askorbik asit etkisi



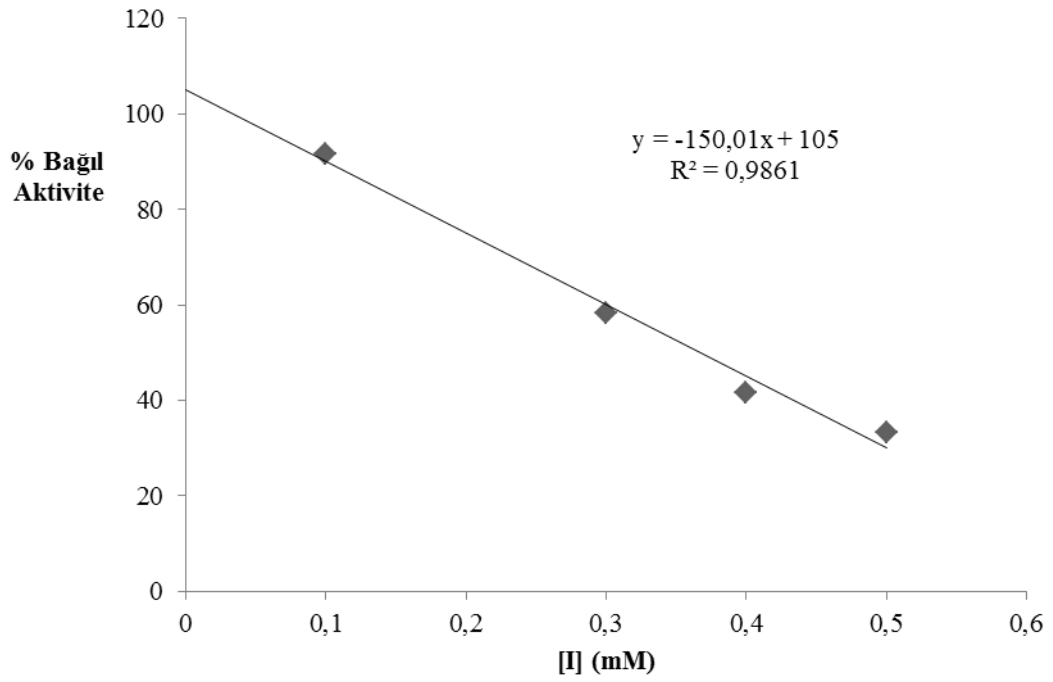
Şekil 4.21. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum azid etkisi



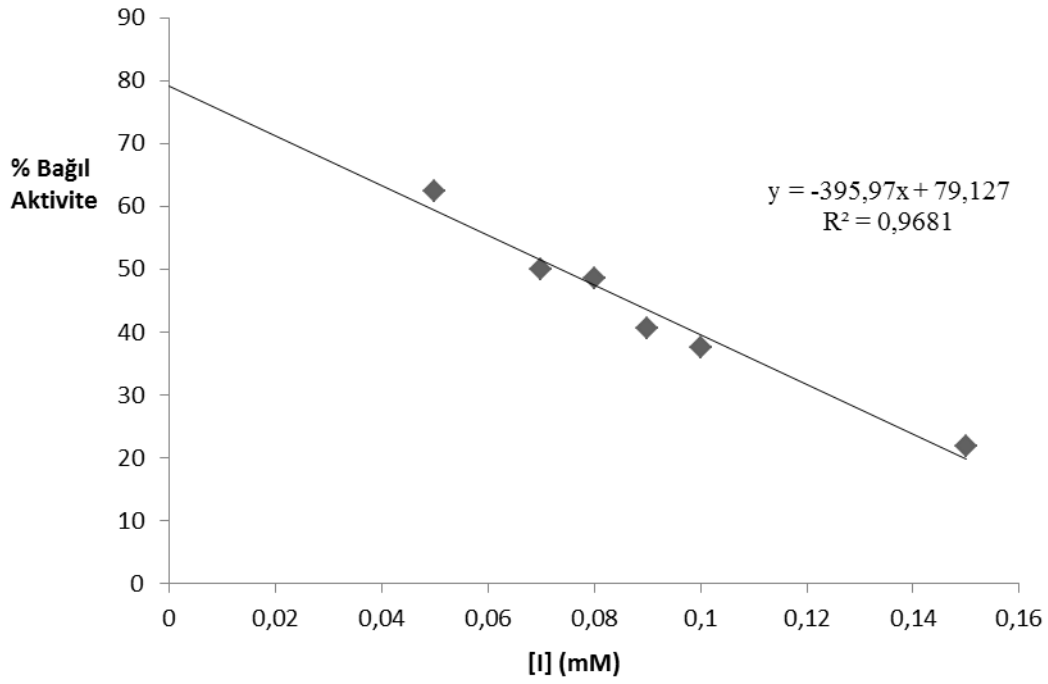
Şekil 4.22. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum azid etkisi



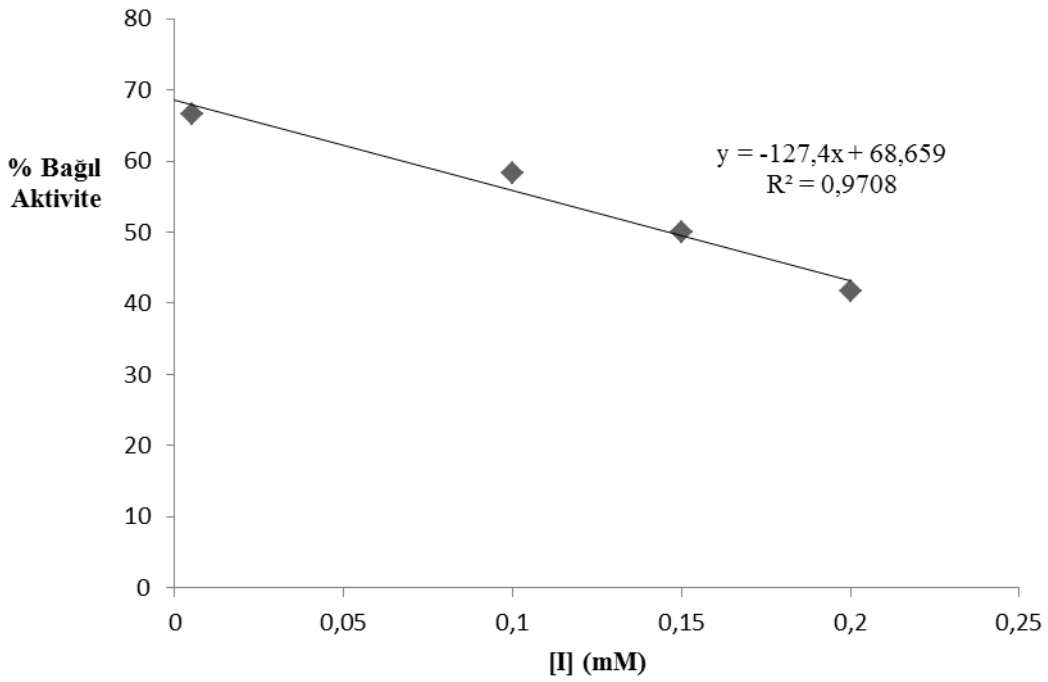
Şekil 4.23. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum metabisülfid etkisi



Şekil 4.24. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum metabisülfid etkisi



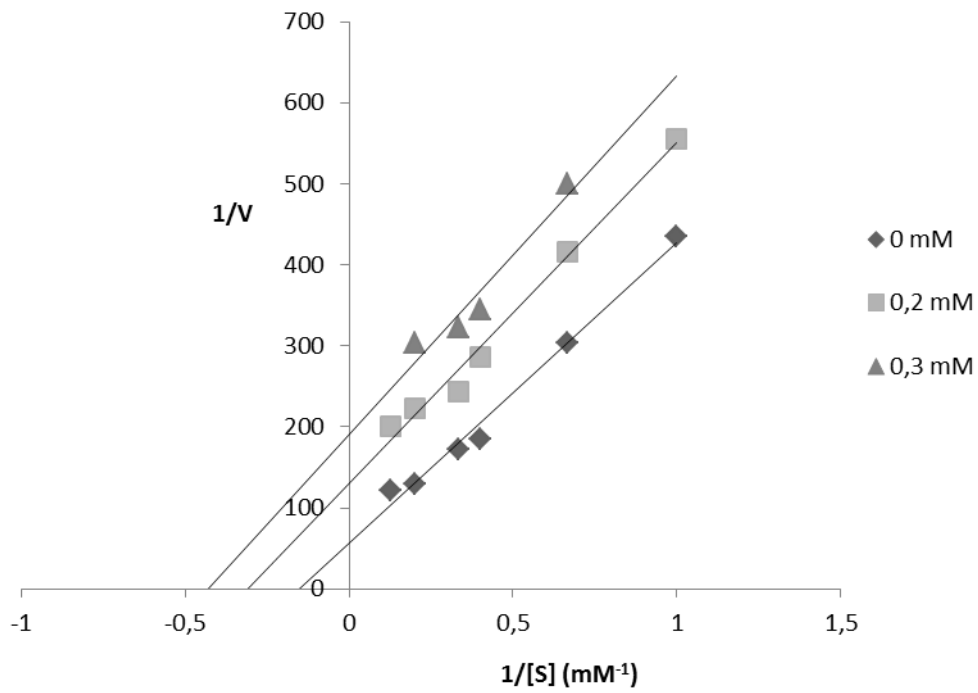
Şekil 4.25. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında L-sistein etkisi



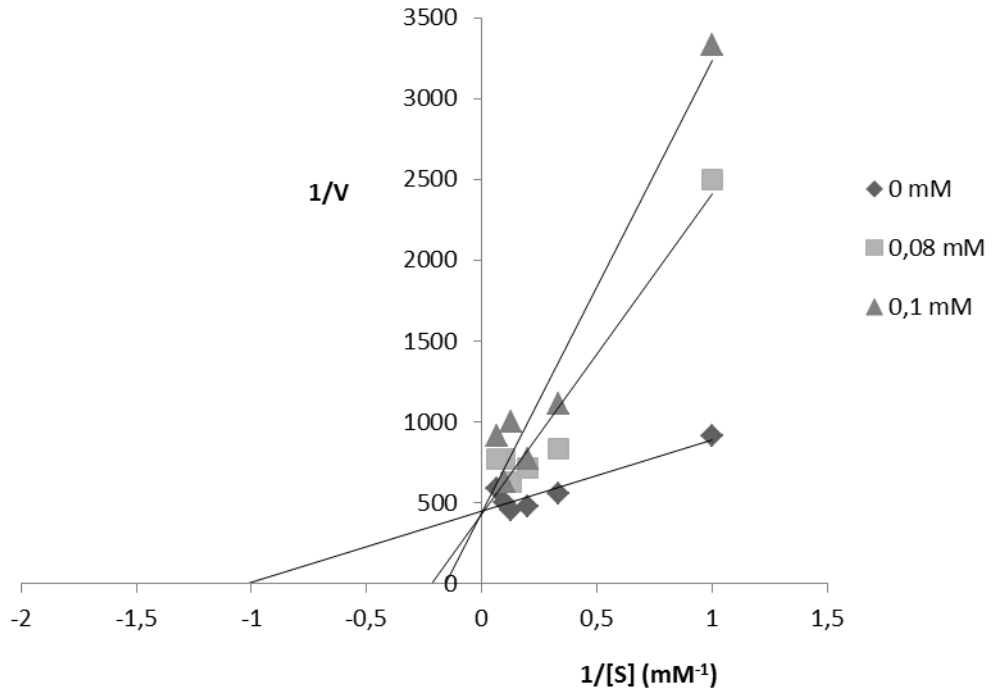
Şekil 4.26. Kaldirik bitkisinden elde edilen Polifenol oksidaz enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında L-sistein etkisi

Tablo 4.3. PPO enzimi üzerine etki eden bilinen inhibitörlerin 4-metil katekol ve pirogallol substratları varlığında I_{50} değerleri

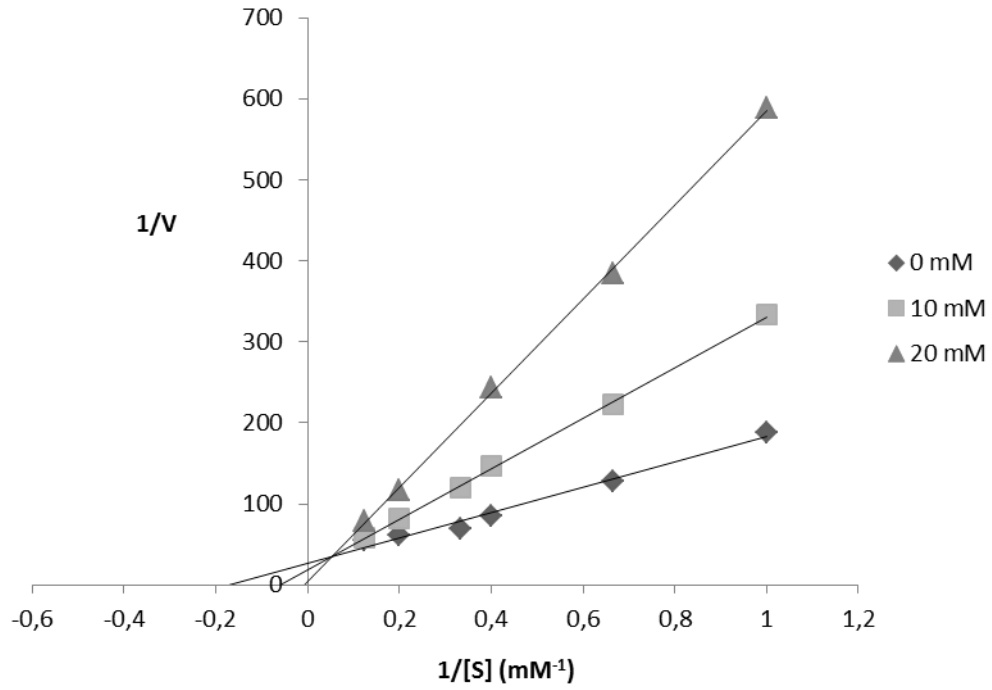
İnhibitör	4-metil katekol I_{50} (mM)	Pirogallol I_{50} (mM)
Askorbik asit	0,283	0,112
Sodyum metabisülfid	0,176	0,370
L-sistein	0,074	0,146
Sodyum azid	25,0	75,70



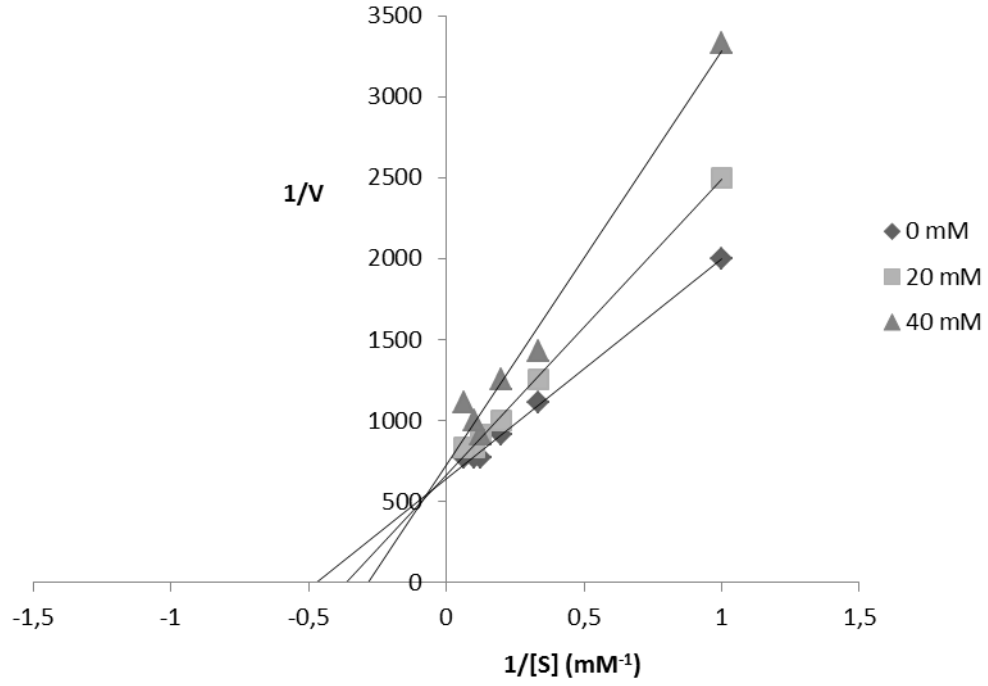
Şekil 4.27. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



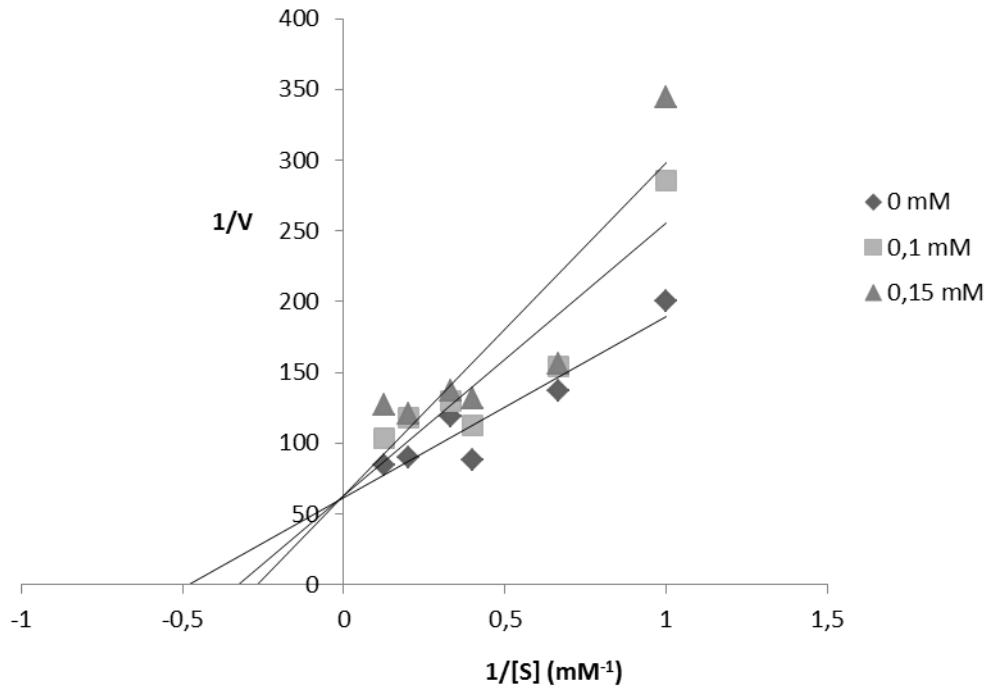
Şekil 4.28. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



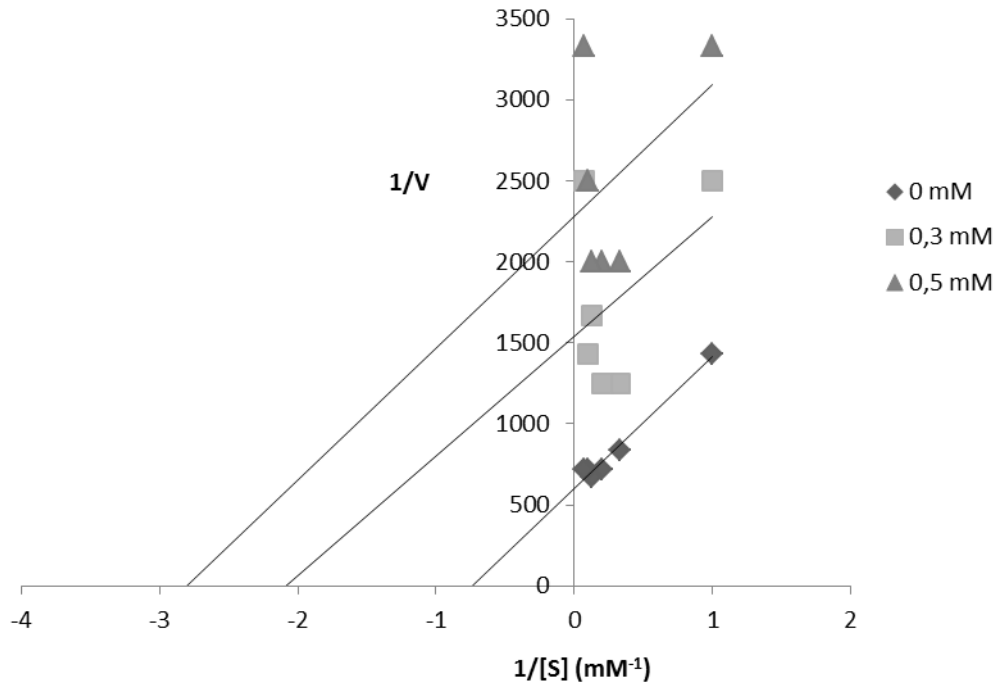
Şekil 4.29. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile sodyum azid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



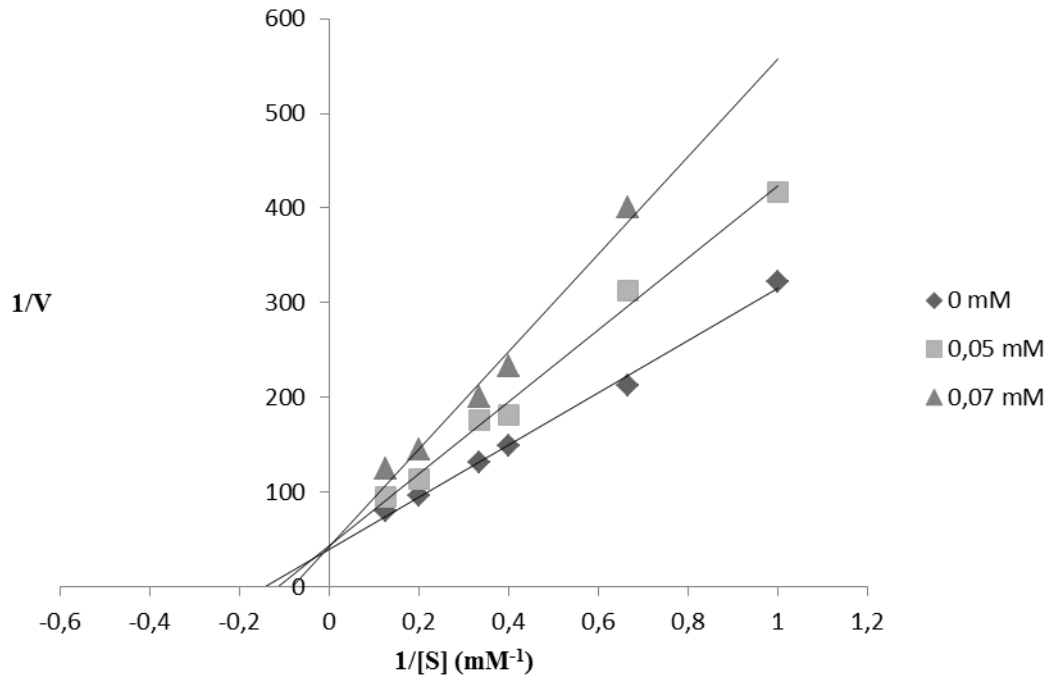
Şekil 4.30. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile sodyum azid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



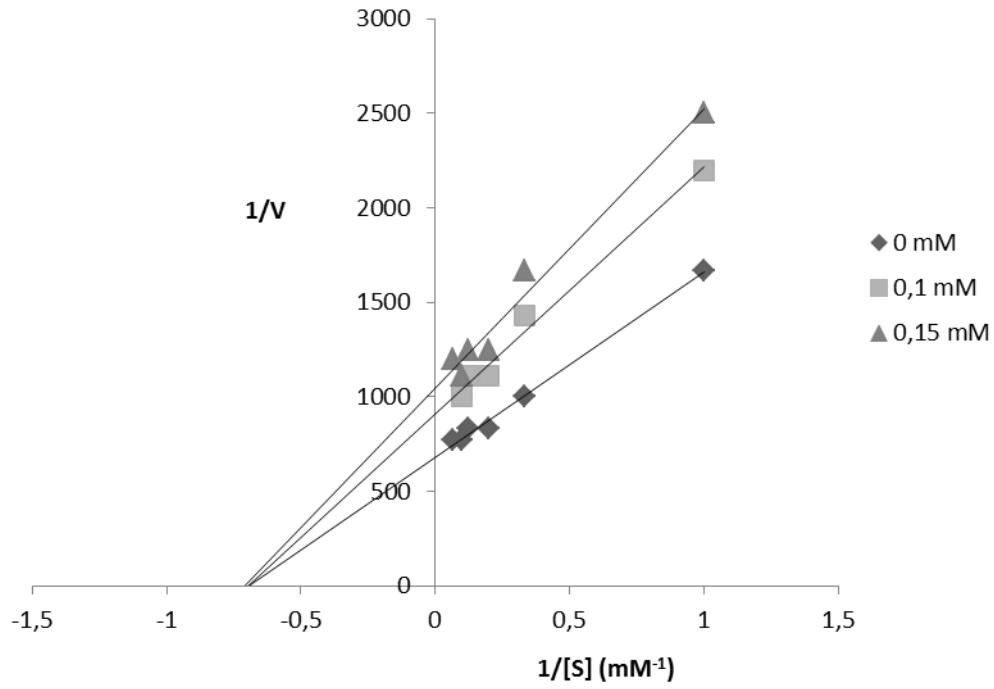
Şekil 4.31. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile sodyum metabisülfid varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.32. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile sodyum metabisülfit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.33. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.34. Kaldirik Polifenol oksidaz enziminin pirogallol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan bu çalışmalarda, Kaldirik PPO enzimi için substrat türüne göre inhibisyon türünün değiştiği tespit edilmiştir. Enzimin 4-metil katekol substratı varlığında sodyum metabisülfid ve L-sistein inhibitörleriyle kompetitif inhibisyona, askorbik asit varlığında unkompetitif inhibisyona ve sodyum azid varlığında pseudoinhibisyona uğradığı Lineweaver Burk grafikleri ile belirlenmiştir. Aynı şekilde enzimin pirogallol substratı ile reaksiyonunda askorbik asit varlığında kompetitif, sodyum azid varlığında karışık, sodyum metabisülfid varlığında unkompetitif ve L-sistein varlığında ise nonkompetitif inhibisyon gözlenmiştir.

Tablo 4.4. PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i (mM) değerleri

İnhibitör	substrat	
	4-metil katekol	Pirogallol
Askorbik asit	$K_i = 0,18$ mM Unkompetitif	$K_i = 0,02$ mM Kompetitif
Sodyum azid	$K_i = 5,1$ mM Pseudo	$K_i = 44,03$ mM Karışık
L-sistein	$K_i = 0,09$ mM Kompetitif	$K_i = 0,267$ mM Nonkompetitif
Sodyum metabisülfid	$K_i = 0,198$ mM Kompetitif	$K_i = 0,171$ mM Unkompetitif

4.3.5. Metallerin etkisi

Çeşitli metal iyonlarının Polifenol oksidaz aktivitesini nasıl etkilediğini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada toplam 14 farklı metal varlığında, bölüm 3.3.6.2’de anlatıldığı gibi, sabit substrat ve enzim konsantrasyonunda enzim aktivitesi incelenmiştir. Metal konsantrasyonu bazı metaller için 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM düzeyinde kullanılırken bazı metaller 1 mM ve 5 mM düzeyinde kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında kimi metaller enzim aktivitesini arttırmış kimi metaller ise azaltmıştır. Metal etkisi sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. PPO enzimi aktivitesine metal etkisi

Metal	PPO % Kalan Aktivite		
	Metal Son Konsantrasyonu (mM)		
	0,5 mM	1 mM	5 mM
Metalsiz	100	100	100
Ba⁺²	-	109,1	81,81
Fe⁺³	-	113,64	115,91
Hg⁺²	65	65	0
Mg⁺²	-	100	104,55
Mn⁺²	-	95,45	0
Pb⁺²	87,80	101,14	103,41
Sn⁺²	85,37	95,12	100
Zn⁺²	-	102,27	117,04
Ni⁺²	-	87,78	87,78
Al⁺³	-	105	97,5
K⁺¹	-	112,5	107,5
Na⁺¹	-	100	68,75
Cu⁺²	-	107,14	135,71
Ca⁺²	-	100	101,94

4.3.6. Amino asitlerin etkisi

Amino asit etkisi çalışmasında asidik (L-Glutamik asit, L-Aspartik asit), nötral (Glisin, L-Prolin, L-Treonin), bazik (L-Arginin, L-Lisin), aromatik (L-Fenilalanin) olmak üzere toplam 8 farklı amino asidin PPO aktivitesine etkisi incelenmiştir. Her bir amino asit için I_{50} değeri bulunmuştur. Tüm amino asitlerin PPO aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 3,38 mM'lık I_{50} değeriyle amino asitler içerisinde en fazla inhibisyonu L-Aspartik asit göstermiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. PPO enzimi üzerine amino asitlerin inhibisyon etkisi

Amino asit	I ₅₀ (mM)
L-Arginin	9,71
L-Lizin	15,37
L-Aspartik asit	3,38
L-Glutamik asit	4,15
Glisin	228,501
L-Treonin	235,014
L-Prolin	24,53
L-Fenilalanin	20,96

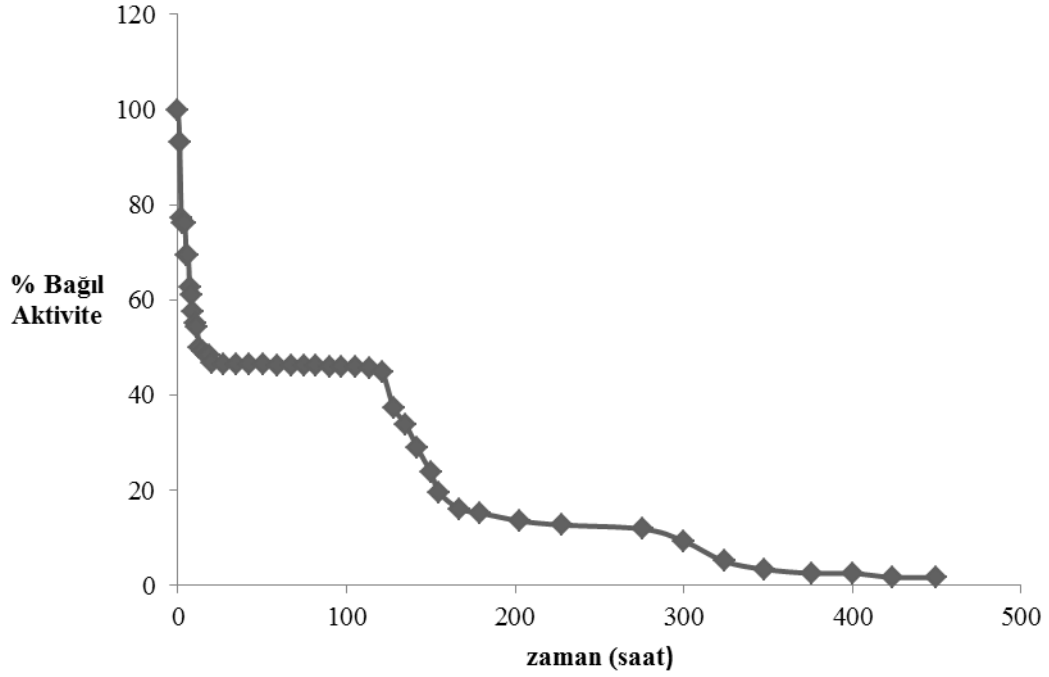
4.3.7. Enzim depolanma kararlılığı

Enzimin değişen sıcaklık koşullarında saklandığında aktivitesinde nasıl bir değişim olduğunun incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, bölüm 3.3.7.'de anlatıldığı gibi, enzim oda sıcaklığında, 4°C'de ve -20°C'de depolanmış ve belirli zaman periyotlarında aktivite ölçümü yapılmıştır. Oda sıcaklığında ve 4°C'de birkaç saatte bir ölçüm alınırken, -20°C'de haftada bir ölçüm alınmış ve enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

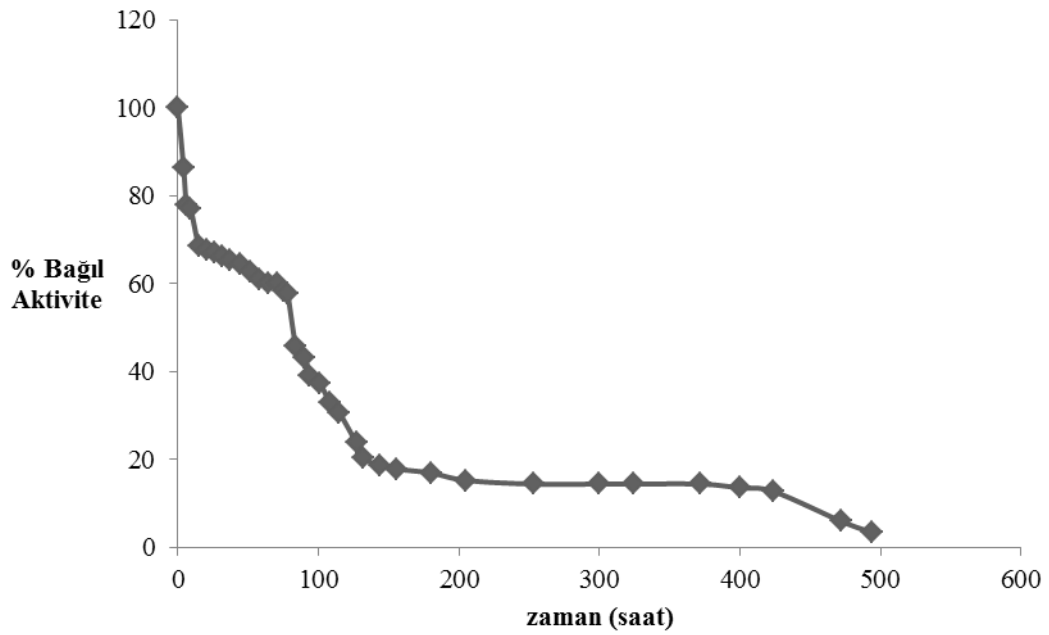
Oda sıcaklığında yapılan depolanma kararlılığı çalışması sonucunda, PPO enziminin aktivitesi ilk 19 saatte hızla azalarak yaklaşık yarısına inmiştir. Daha sonraki 102 saatte aktivite neredeyse sabit kalmıştır. 121. saatten sonra aktivite tekrar hızla azalmıştır ve 450 saatin sonunda enzim, aktivitesinin % 99'unu kaybetmiştir.

4°C'de ise PPO enziminin aktivitesi ilk 15 saatte oda sıcaklığında olduğu gibi hızla azalarak %68,64'e düşmüştür. Daha sonraki 60 saat boyunca aktivitedeki düşüş yavaşlamıştır ve 75 saat sonunda bağıl aktivite %58,47'dir. Bundan sonra aktivitedeki düşüş tekrar hızlanmıştır ve 494 saat sonunda enzim aktivitesinin %97'sini kaybetmiştir.

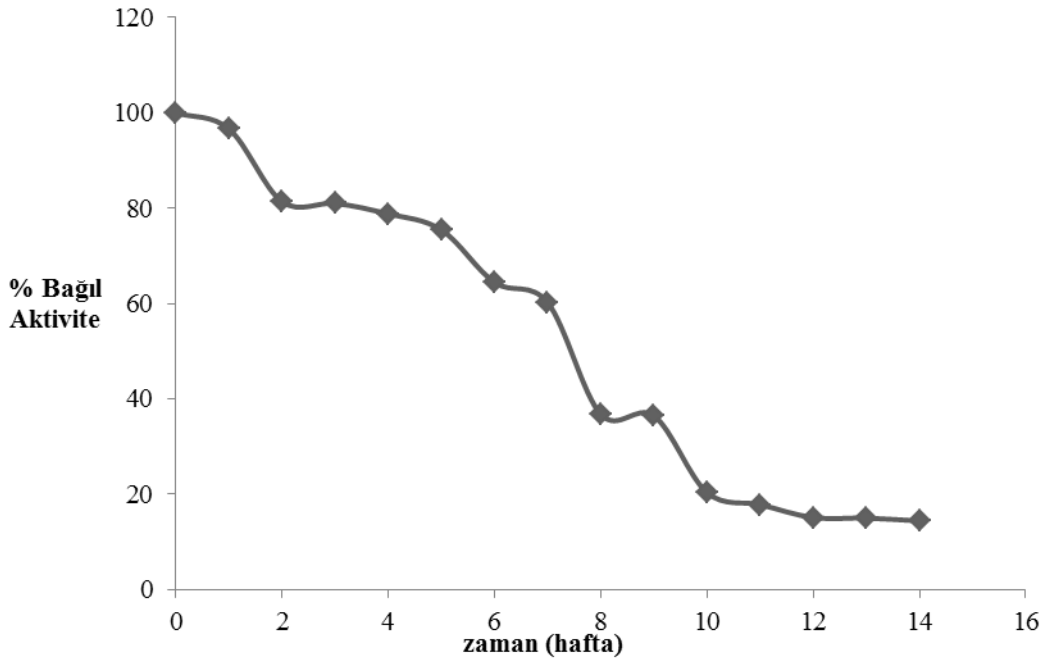
Enzim -20°C 'de depolandığında aktivitesinde daha düzenli ve yavaş bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Aktivite 3 hafta sonunda %81,7 haftanın sonunda %60,17 ve 14 hafta sonunda %14,4'e düşmüştür.



Şekil 4.35. Kaldirik PPO enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



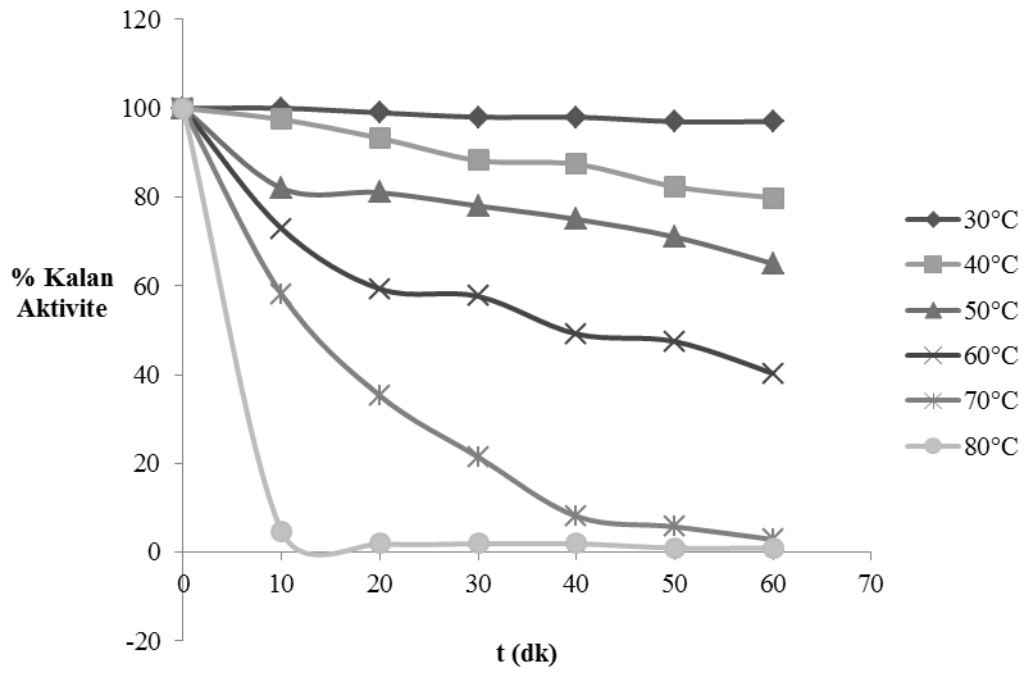
Şekil 4.36. Kaldirik PPO enziminin 4°C 'deki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.37. Kaldirik PPO enziminin -20°C 'deki aktivitesinin zamanla değişimi

4.3.8. Termal inaktivasyon

Yapılan çalışmada enzimin farklı sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmesiyle ısı kararlılığı incelenmiştir. Toplam süre boyunca 10 dakikada bir aktivite ölçümü yapıldığı için de enzimin her bir sıcaklıkta ne kadar süre boyunca mevcut aktivitesini yaklaşık olarak koruyabildiği tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim 30, 40 ve 50°C 'de son derece kararludur. 60°C 'de 30 dk inkübe edildiğinde halen standart koşullardaki aktivitesinin yarısından fazlasını koruduğu gözlenmiştir. Ancak 70°C 'de 20 dk inkübe edildiğinde aktivitesinin %65'ini kaybetmiştir. Enzim 80°C 'de diğer çoğu enzim gibi aktivitesinin büyük kısmını kaybetmektedir. 80°C 'de 10 dakika inkübe edildiğinde aktivitesi % 4,71'e düşmüştür.



Şekil 4.38. Kaldirik PPO enziminin ısı kararlılığının zamanla değişimi

BÖLÜM 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Kaldirik PPO enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi işlem basamakları ile saflaştırılmıştır ve enzimin saflığı SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edilmiştir. Kolon elüatı poliakrilamid jele yüklenip yürütüldüğünde, jelde tek bir band halinde görülmüştür. Bu ise enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığına kanıttır. Aynı jelde yürütülen molekül ağırlığı bilinen proteinler (marker) ve kaldirik PPO enzim proteinlerinin yürüme mesafeleri karşılaştırıldığında, enzime ait band, marker proteinlerinden 60 ve 100 kDa'luk proteinler arasında olduğundan, enzimin molekül ağırlığı bu aralıktadır.

Kaldirik PPO enziminin monofenolik, difenolik ve trifenolik substratlarla gerçekleştirilen substrat spesifitesi denemeleri sonucunda monofenolaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Enzim L-tirozin ve guaiakol substratları ile reaksiyon vermemiştir. Yapılan çalışmada bir trifenolik substrat olan pirogallol ile reaksiyon vermesine rağmen gallik asit substratına karşı ilgisiz kaldığı belirlenmiştir. Birçok bitki Polifenol oksidazı yüksek difenol afinitesine sahiptir [5, 7, 9, 41]. Örneğin hem zeytin meyvesi hem de yapraklarından izole edilen PPO difenolik substratlara karşı yüksek afiniteye sahiptir ve difenolik substratlar arasında en iyi katekolü dönüşüme uğratmıştır [51]. Kaldirik PPO enzimi de diğer birçok bitki Polifenol oksidazı gibi önemli düzeyde difenolaz aktivitesi göstermiştir.

Gerçekleştirilen optimum sıcaklık çalışmalarına göre Kaldirik PPO enzimi, 30°C ve altında daha iyi aktivite göstermektedir. Literatürde enzimin optimum sıcaklık değerinin 30-50°C olarak bildirildiği görülmektedir [4, 5, 7, 8, 44]. Bu yüzden Kaldirik PPO'nun optimum sıcaklık değerleri farklılık göstermektedir. Diğer yandan enzim yüksek sıcaklık değerlerinde stabilitesini uzun süre koruyabilmektedir. Gerçekleştirilen termal inaktivasyon çalışmasında enzimin 40°C ve 50°C'de stabil olduğu, diğer bazı PPO enzimlerinin aktivitesinin önemli bir kısmını kaybettiği

60°C'de [6, 8, 42] bir saat inkübe edilmesinden sonra bile standart koşullardaki aktivitesinin %40'ını koruduğu görülmektedir. Benzer şekilde dut meyvesinden izole edilen PPO'nun da 40°C ve 50°C'de stabil olduğu bildirilmiştir. Fakat dut (*Morus alba* L.) PPO'yu 50°C'de 50 dk inkübe edildiğinde aktivitesinin yarısını kaybederken [52] Kaldirik PPO aktivitesi %70 civarlarındadır.

Kaldirik PPO enzimi depolanma kararlılığı sonuçları da diğer PPO enzimlerinden farklılık göstermiştir. Enzim oda sıcaklığında inkübe edildiğinde 179 saatin sonunda bile aktivitesinin %15'ini korumaktadır. 4°C'de 156 saat sonunda aktivite %17,8 civarındadır. PPO enziminin 4°C'de ve -20°C'de aktivitesini tamamen yitirmesi için sırasıyla 494 saat ve 450 saat geçmesi gerekmektedir. Enzim aktivitesi -20°C'de 14 hafta sonunda %14,4'e düşmüştür yani -20°C'de uzun bir süre sonunda bile enzim, aktivitesini tamamen yitirmemiştir. Çoğu enzim oda sıcaklığında bırakıldığında bir iki günde aktivitesini tamamen yitirirken, -20°C'de depolandıklarında birkaç hafta sonunda aktivitesinin çoğunu kaybeder. Çağla (*Prunus dulcis*) PPO'yu oda sıcaklığında 16 saatte, -20°C'de 13 günde aktivitesinin tamamını yitirmiştir [44]. Bu açıdan Kaldirik PPO'yu oldukça dayanıklı bir enzimdir. Hatta kaldirik PPO enzimi herhangi bir koruyucu kimyasal kullanmadan bir yıl -20°C'de hiç çözündürülmeden depolandığında aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmektedir. Kaldirik PPO enziminin depolanma kararlılığı sonuçları açısından bu üç sıcaklık değeri kıyaslandığında, tahmin edildiği gibi -20°C, enzimin kararlılığını en iyi koruduğu sıcaklık değeridir. Oda sıcaklığında ve 4°C'de Kaldirik PPO enziminin kararlılık düzeyi benzerlik göstermektedir.

Optimum pH çalışmalarına göre enzim pH 4,0 ile 7,5 arasında kararlıdır, pH 8,0'de de rahatlıkla ölçülebilir bir aktivite gösteren enzim pH 9,0 ve üzerinde çok düşük bir dönüşüm hızı sergilemektedir. Pirogallol substratı ile yalnızca pH 7,0 ve 7,5'da aktivite gösterirken, 4-metil katekol substratı ile pH 5,0 ve pH 7,5'da iki pH optimumuna sahiptir. *Boletus erythropus* mantarı PPO enzimi ise 4-metil katekol substratı ile pH 8,0'de optimum aktivite göstermiştir [53]. Optimum pH değerleri enzim kaynağı ve substrat çeşidine göre farklılık göstermektedir.

Askorbik asit, sodyum azid, L-sistein ve sodyum metabisülfid gibi bilinen PPO inhibitörlerinin hepsi enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Genel olarak PPO enzimini şiddetle inhibe eden sodyum azid [2], denenen diğer üç inhibitörün aksine kaldirik PPO enzimi üzerinde önemsenecek bir etkiye sahip değildir. Vanilya tohumu (*Vanilla planifolia*) PPO enzimi ile yapılan bir çalışmada sodyum azid 1 mM düzeyinde kullanıldığında enzimi %50 inhibe ederken [54], Kaldirik PPO'nun sodyum azid için I_{50} değeri 4-metil katekol substratı ile 25 mM, pirogallol substratı ile 75,7 mM düzeyindedir. Denenen inhibitörler içerisinde enzim için en etkili inhibitör 0,02 mM'lık K_i değeriyle L-askorbik asit inhibitörüdür.

Metallerin PPO enzim aktivitesi üzerine etkisi enzim kaynağına göre çoğunlukla değişmektedir. Fakat Hg^{+2} , Sn^{+2} ve Pb^{+2} gibi metaller çoğu enzimin aktivitesini genellikle ciddi oranda azaltmaktadır [5, 6, 44]. Hg^{+2} 5 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini tamamen yok ederek beklenen bu inhibisyon etkisini kaldirik PPO üzerinde göstermiştir fakat enzim Sn^{+2} ve Pb^{+2} metallerine karşı şaşırtıcı derecede dayanıklıdır. Sn^{+2} ve Pb^{+2} metalleri 0,5 mM düzeyinde reaksiyon ortamında bulduklarında enzim aktivitesinde ~ % 15 gibi bir kayıp yaratmışlardır. Düzeyleri 1 ve 5 mM'a yükseldiğinde Sn^{+2} varlığında enzim yaklaşık olarak metalsiz ortamdaki aktivitesine ulaşmış, Pb^{+2} varlığında ise metalsiz ortamdaki aktivitesinin biraz üzerine çıkmıştır. Ni^{+2} düşük düzeyde bir inhibisyon etkisi yaratırken, Na^{+} 5 mM'lık konsantrasyonda aktiviteyi ~ %35 azaltmıştır. Mn^{+2} da 5 mM'da enzimi tamamen öldürmüştür. Muz (*Musa sapientum* L.) PPO enziminin ise 10 mM Mn^{+2} varlığında halen aktivitesinin % 94'ünü koruduğu görülmektedir [55].

Asidik, bazik ve nötral amino asitler de kaldirik PPO enzimini inhibe etmiştir. Bu inhibitörler içerisinde en fazla inhibisyon etkisini asidik amino asitler göstermiştir. Yarattıkları inhibisyonun şiddetine göre amino asitleri asidik > bazik > nötral şeklinde sıralayabiliriz. Nötral amino asitler kendi aralarında değerlendirilirse aromatik bir amino asit olan L-fenilalanin 20,96 mM'lık I_{50} değeriyle en etkili olandır. Glisin ve L-treonin amino asitlerinin ise inhibisyon etkisi oldukça düşük düzeydedir. Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) PPO'ı ile yapılan çalışmada ise aminoasitlerin inhibisyon etkilerinin, tamamen zıt yönde, bazik > nötral > asidik olduğu bildirilmektedir [6].

Sonuç olarak, Polifenol oksidaz enzimi Kaldirik bitkisinden başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve karakteristik özellikleri incelenmiştir. Polifenol oksidaz enzim kaynağı olarak Kaldirik bitkisi, ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Kaldirik bitkisi sofralarımızda kullanılan bir besin olduğundan ve Türkiye’de birçok bölgede tanınan bir bitki olduğundan, PPO enzim kaynağı olarak literatüre kazandırılması önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] MDLULI, K.M., Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323, 2005.
- [2] ARSLAN, O., DOĞAN, S., Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1499–1504, 2005.
- [3] QUEVEDO, R., DIAZ, O., RONCEROS, B., PEDRESCHI, F., AGUILERA, J.M., Description of the kinetic enzymatic browning in banana (*Musa cavendish*) slices using non-uniform color information from digital images. *Food Research International*, 42, 1309–1314, 2009.
- [4] ALTUNKAYA, A., GÖKMEN, V., Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from durum wheat (*Triticum durum* L.). *Journal of Cereal Science*, 30, 1-5, 2012.
- [5] GAO, Z.J., LIU, J.B., XIAO, X.G., Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Leaves of *Cleome gynandra* L. *Food Chemistry*, 129, 1012-1018, 2011.
- [6] AYDEMİR, T., Selected Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*, 13 (3), 475-485, 2010.
- [7] GAO, Z.J., HAN, X.H., XIAO, X.G., Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Red Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) Leaves. *Food Chemistry*, 117, 342-348, 2009.
- [8] YERLİTÜRK, F.Ü., ARSLAN, O., SİNAN, S., GENCER, N., ÖZENSOY, G.Ö., Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Pyrus elaeagnifolia*). *Journal of Food Biochemistry*, 32, 368–383, 2008.
- [9] HO, K-K., Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* ‘Christine 130’. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (11), 841–848, 1999.
- [10] GUO, L., MAA, Y., SHI, J., XUE, S., The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 117, 143–151, 2009.

- [11] WITITSUWANNAKULA, D., CHAREONTHIPHAKORNB, N., PACEC, M., WITITSUWANNAKULB, R., Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry*, 61, 115–121, 2002.
- [12] KAVRAYAN, D., AYDEMİR, T., Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*, 74, 147–154, 2001.
- [13] DOĞAN, S., TURAN, P., DOĞAN, M., ALKAN, M., ARSLAN, O., Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid. *European Food Research and Technology*, 225, 67–73, 2007.
- [14] ERAT, M., ŞAKİROĞLU, H., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp.* *Food Chemistry*, 95, 503–508, 2006.
- [15] FALGUERA, V., SÁNCHEZ-RIAÑO, A.M., QUINTERO-CERÓN, J.P., RIVERA-BARRERO, C.A., MÉNDEZ-ARTEAGA, J.J., IBARZ, A., Characterization of Polyphenol Oxidase activity in juices from 12 underutilized tropical fruits with high agroindustrial potential. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 2, 2011.
- [16] GAWLIK-DZIKI, U., SZYMANOWSKA, U., BARANIAK, B., Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 105, 1047–1053, 2007.
- [17] PALMA-OROZCO, G., ORTIZ-MORENO, A., DORANTES-ÁLVAREZ, L., SAMPEDRO, J.G., NÁJERA, H., Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry*, 72, 82–88, 2011.
- [18] GAWLIK-DZIKI, U., ZŁOTEK, U., ŚWIECA, M., Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata* L.). *Food Chemistry*, 107, 129–135, 2008.
- [19] TELEFONCU, A., Enzimoloji (enzimlerin endüstriyel uygulamaları). Ege Üniversitesi Basımevi, 249-307, İzmir, 1997.
- [20] ÖZEN, T., Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *Grasas y Aceites*, 61 (1), 86-94, 2010.
- [21] KEHA, E.E., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., *Biyokimya. Aktif yayınevi*, 92-139, Erzurum, 2004.
- [22] http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Catalysts (Erişim tarihi: Haziran 2012)

- [23] http://www.postech.ac.kr/class/ls302/exp2_body.html (Erişim tarihi: Haziran 2012)
- [24] <http://science.halleyhosting.com/sci/soph/enzyme/enzfactorstemp.htm> (Erişim tarihi: Haziran 2012)
- [25] METZLER, D.E., Biochemistry, The Chemical Reactions of Living Cells. Elsevier Academic Press, 459, USA, 2001.
- [26] KUZMIC, P., CREGAR, L., MILLIS, S.Z., GOLDMAN M., Mixed-type noncompetitive inhibition of anthrax lethal factor protease by aminoglycosides. The FEBS Journal, 273, 3054–3062, 2006.
- [27] MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W., Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Companies, 69, USA, 2003.
- [28] COPELAND, R.A., Enzymes- A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. WILEY-VCH, 281, USA, 2000.
- [29] <http://www.rose-hulman.edu/search> (Erişim tarihi: Mayıs 2012)
- [30] KARAGÖZ, A., CEVAHİR, G., ÖZCAN, T., SADIKOĞLU, N., YENTÜR, S., KURU, A., Bazı yüksek bitkilerden hazırlanan sulu ekstraktların antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 318-321, 2004.
- [31] AKÇİN, Ö-Y., KANDEMİR, N., A morphological and anatomical study on a medicinal and edible plant *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don (*Boraginaceae*) in the black sea region. Turkish Journal of Botany, 28, 435-442, 2004.
- [32] [http://www.plantdatabase.ie/Trachystemon orientalis](http://www.plantdatabase.ie/Trachystemon_orientalis); Plant Database Ltd., (Erişim tarihi: 2010 – 2012).
- [33] GLADIS, T., PISTRICK, K., *Chaerophyllum byzantinum* Boiss. and *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don — recently introduced from Turkish wild flora as new crop species among other interesting findings from immigrant gardens in western Germany. Genetic Resources and Crop Evolution, 58, 165–174, 2011.
- [34] DAVIS, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Vol. 6, 1965-1985.

- [35] [http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives/Trachystemon orientalis](http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives/Trachystemon_orientalis), TÜBİTAK, (Erişim tarihi: Mart 2012).
- [36] <http://jardimformoso.blogspot.com/trachystemon-orientalis.html>, (Erişim tarihi: Mayıs 2009).
- [37] <http://yabanicicek.com/trachystemon-orientalis.php> (Erişim tarihi: Mayıs 2012).
- [38] BURDURLU, H.S., KARADENİZ, F., Gıdalarda maillard reaksiyonu. *Gıda*, 27 (2), 77-83, 2002.
- [39] ROUX, E., BILLAUD, C., MARASCHIN, C., BRUN-MÉRIMÉE, S., NICOLAS, J., Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and maillard reaction product model systems on Polyphenol oxidase from apple-II. Kinetic study and mechanism of inhibition. *Food chemistry*, 81, 51-60, 2003.
- [40] VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES, R., USALL, J., LARRIGAUDIÈRE, C., Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 227–234, 2005.
- [41] DOĞAN, S., DİKEN, M.E., TURHAN, Y., ALAN, Ü., DOĞAN, M., ALKAN, M., Characterization and inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. polyphenoloxidase. *European Food Research and Technology*, 233, 293–301, 2011.
- [42] ÖZEL, A., *Boletus erythropus* mantarından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve sentetik kimyada katalitik etkinliğinin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2008, 10-11.
- [43] CLAUS, H., *Soil Heavy Metals*. 1 (19), Springer-Verlag, 281-313, Berlin, 2010.
- [44] GÜNGÖR, K., Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2008, 29-31.
- [45] ÇİMEN, Ç., Iğdır kayısısından (şalak) saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi üzerinde bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon kinetiğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 2007, 11-12.

- [46] KHAN, M.T.H., Heterocyclic compounds against the enzyme Tyrosinase essential for melanin production: Biochemical features of inhibition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 9, 119–138, Norway, 2007.
- [47] BHATTACHARYA, P.K., Metal Ions in Biochemistry. Alpha Science, 190-194, London, 2005.
- [48] YORUK, R., MARSHALL, M.R., Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase. Journal of Food Biochemistry, 27, 361-422, 2003.
- [49] NELSON, D.L., COX, M.M., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık, 130, Ankara, 2005.
- [50] KARLSON, P., Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya. Azmi Telefoncu, Arkadaş Tıp Kitapları, 58-59, Kırklareli, 1992.
- [51] ORTEGA-GARCIA, F., BLANCO, S., PEINADO, M.Á., PERAGÓN, J., Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, Polyphenol Oxidase and Oleuropein in Olives and their Changes During Olive Ripening. Elsevier Inc., 233-238, Spain, 2010.
- [52] ARSLAN, O., ERZENGİN, M., SİNAN, S., ÖZENSOY, Ö., Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. Food Chemistry, 88, 479–484, 2004.
- [53] ÖZEL, A., ÇOLAK, A., ARSLAN, O., YILDIRIM, M., Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. Food Chemistry, 119, 1044–1049, 2010.
- [54] WALISZEWSKI, K.N., MÁRQUEZ, O., PARDIO, V.T., Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. Food Chemistry, 117, 196–203, 2009.
- [55] YANG, C.P., FUJITA, S., ASHRAFUZZAMAN, M.D., NAKAMURA, N., HAYASHI, N., Purification and characterization of Polyphenol Oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2732-2735, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

Esmâ Hande ALICI 1984 yılında Sakarya’da doğdu. Ortaokul ve lise öğrenimini Hendek Atike Hanım Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2002 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nü kazandı. 2007 yılında lisans eğitimini bölüm üçüncülüğü ile tamamladı ve biyokimyager ünvanı ile mezun oldu. Takip eden iki yıl içerisinde Sakarya’da çeşitli ortaöğretim kurumlarında ücretli öğretmen olarak görev yaptı. 2009 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Aralık 2010’dan beri Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.