

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇAĞLA BADEM (*Prunus dulcis*) BİTKİSİNDEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Kadriye GÜNGÖR

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Mayıs 2008

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


**ÇAĞLA BADEM (*Prunus dulcis*) BİTKİSİNDEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**


YÜKSEK LİSANS TEZİ

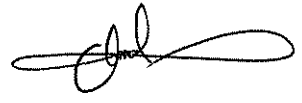
Kimyager Kadriye GÜNGÖR

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 27 / 05 /2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç.Dr.
Gülner Arabacı
Jüri Başkanı


Doç.Dr. Mehmet Kandaz
Üye


Yrd. Doç.Dr.
A.Şükran Demirkıran
Üye

TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışma konumun belirlenmesi, planlanması ve tez haline getirilmesinde en büyük paya sahip olan; danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya,

Yüksek lisans dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığımız başta araştırma görevlisi Hülya DURMUŞ DEMİRHAN olmak üzere tüm öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine,

Tezimin deneysel çalışmalarına büyük katkısı olan doktora öğrencisi Ayşe USLUOĞLU'na,

Ayrıca eğitimim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve hep destekçim olan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER.....	3
2.1. Enzimler hakkında genel bilgi.....	3
2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	8
2.1.2. Enzim aktif birimleri	9
2.1.3. Enzim kinetiği.....	10
2.1.4. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler.....	13
2.1.4.1. Ortam pH'ı.....	13
2.1.4.2. Sıcaklık.....	13
2.1.4.3. Enzim konsantrasyonu.....	14
2.1.4.4. Substrat konsantrasyon.....	14
2.1.4.5. Zamanın etkisi.....	15
2.1.4.6. İnhibitör.....	15
2.1.5. Enzim inhibisyonu.....	16
2.1.5.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif inhibisyon).....	17

2.1.5.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif inhibisyon).....	18
2.1.5.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Unkompetitif inhibisyon).....	20
BÖLÜM 3.	22
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ.....	22
3.1. Doğada Bulunuşu.....	23
3.2. PPO Enziminin Doğada ve Yiyeceklerin İşlenmesindeki Rolü.....	24
3.3. Molekül Yapısı.....	25
3.4. PPO Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar.....	26
3.5. Mekanizma	29
3.6. PPO Enziminin Substratları.....	32
3.7. PPO Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	32
3.7.1. pH'ın etkisi.....	33
3.7.2. Sıcaklığın etkisi.....	34
3.7.3. Basıncın etkisi.....	34
3.8. PPO Enziminin İnhibitörleri.....	37
3.9. PPO Enziminin Aktivatörleri.....	38
3.10. Enziminin Tıptaki Kullanım Alanları.....	39
3.11. Atık Sularda PPO Enzimi ile Fenol Tayini.....	
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	41
4.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler.....	41
4.2. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu.....	42
4.2.1 Amonyum sülfat çöktürmesi.....	42
4.2.2 Diyaliz işlemi.....	42
4.2.3. Jel filtrasyon kromatografisi.....	44
4.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu.....	45
4.3.1. Substrat spesifikliğı.....	45
4.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu.....	46
4.3.4. pH'ın etkisi	46
4.3.4. Sıcaklığın etkisi	47
4.3.5. Enzim kinetiğı.....	48

4.3.6. İnhibitör etkisi.....	48
4.3.7. Metallerin etkisi.....	48
4.3.8. Enzimin depolanma kararlılığı.....	49
4.3.9. Bradford metodu.....	49
4.3.9.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini.....	49
4.3.10. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE).....	50
4.3.10.1. Native jel elektroforezi (ND-PAGE).....	52
BÖLÜM 5.	
DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR.....	54
5.1. Plifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması...	54
5.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	54
5.2.1. pH etkisi.....	54
5.2.2. Sıcaklığın etkisi.....	57
5.2.3. Enzim kinetiği.....	58
5.2.4. İnhibitörün etkisi.....	62
5.2.5. Metallerin etkisi.....	66
5.2.6. Enzimin depolanma kararlılığı.....	68
5.2.7. Protein tayini.....	69
5.2.8. Native jel elektroforezi (ND-PAGE).....	70
BÖLÜM 6.	
TARTIŞMALAR VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovine Serum Albümin
DOPA	: Dihidroksi Fenil Alanin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ND-PAGE	: Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
PPO	: Polifenol Oksidaz
PVP	: Polivinil Prolidon
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TEMED	: Tetra Etil Metilen Diamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) Amino Metan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aktif merkezin substrata uygunluğu.....	4
Şekil 2.2.	Katalizörlü ve katalizörsüz reaksiyon için reaksiyon profili	5
Şekil 2.3.	Anahtar-kilit (a) ve indüksiyonla oluşmuş uygunluk modeli (b) modellerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.4.	Enzimlerin sınıflandırılması.....	9
Şekil 2.5.	Michaelis- Menten grafiği.....	11
Şekil 2.6.	Lineweaver-Burk grafiği.....	12
Şekil 2.7.	Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	14
Şekil 2.8.	Yarışmalı (Kompetitif) inhibitör varlığında reaksiyon şeması.....	17
Şekil 2.9.	Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon.....	18
Şekil 2.10.	Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibitor varlığında reaksiyon şeması.....	19
Şekil 2.11.	Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon.....	19
Şekil 2.12.	Yarı yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması.....	20
Şekil 2.13.	Yarı yarışmalı inhibisyon.....	21
Şekil 3.1.	PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar.....	25
Şekil 3.2.	PPO'ın bakır merkezleri.....	26
Şekil 3.3.	Tirozin aktivitesi ile katekol mekanizmasının düzenlenmesi (A) ve krezol (B).....	27
Şekil 3.4.	Melanin pigmentlerinin oluşum mekanizması.....	28
Şekil 3.5.	PPO enzimi için substrat bileşikleri.....	30
Şekil 4.1.	Genel diyalizin uygulanış şekli a.Diyaliz tüpünün bağlanması, b.Diyaliz tüpünün doldurulması, c.Tuzlarınuzaklaştırılması.....	43

Şekil 4.2.	Jel filtrasyon kromatografisi.....	45
Şekil 4.3.	Bradford yönteminin standart grafiği.....	50
Şekil 5.1.	Katekol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	55
Şekil 5.2.	4-metil katekol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.	55
Şekil 5.3.	Kafeik asit substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	56
Şekil 5.4.	Pirogallol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	56
Şekil 5.5.	PPO enziminin sıcaklığa etkisi.....	58
Şekil 5.6.	PPO enziminin katekol substratına karşı Michaelis-Menten grafiği.....	59
Şekil 5.7.	PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	59
Şekil 5.8.	PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Michaelis-Menten grafiği.....	60
Şekil 5.9.	PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 5.10.	PPO enziminin kafeik asit substratına karşı Michaelis-Menten grafiği.....	61
Şekil 5.11.	PPO enziminin kafeik asit substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 5.12.	Tiyüre kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 5.13.	Sodyum azid kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği...	63
Şekil 5.14.	Benzoik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği....	64
Şekil 5.15.	Sitrik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	64
Şekil 5.16.	L-askorbik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	65
Şekil 5.17.	Oda sıcaklığında depolama şartlarında enzim aktivitesinin zamanla değişim.....	68
Şekil 5.18.	-20 °C'de depolama şartlarında enzim aktivitesinin zamanla değişim.....	68
Şekil 5.19.	Bradford yöntemiyle protein tayin grafiği.....	69
Şekil 5.20.	Ham enzim ekstraktının katekol substratı ile elde edilen Native-PAGE band profili.....	70

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Kaynaklardan izole edilen PPO enzimini ve alt birimleri.....	24
Tablo 3.2.	Bazı kaynaklardan izole edilen enzimin fenolik substratları.....	31
Tablo 3.3.	Optimum pH değerleri.....	33
Tablo 4.1.	0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması.....	47
Tablo 4.2.	0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	47
Tablo 4.3.	% 7,5' luk ayırma jelinin içeriği.....	52
Tablo 4.4.	% 4,5' lik yoğunlaştırma jelinin içeriği.....	53
Tablo 5.1.	PPO enziminin substrat spesifikliği.....	62
Tablo 5.2.	PPO enziminin inhibisyon türleri, I_{50} ve K_i sabitleri.....	66
Tablo 5.3.	PPO enzimine ağır metallerin etkisi.....	67

ÖZET

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, badem ağla, *Prunus dulcis*, enzim saflaştırma

Polifenol oksidaz (PPO) enzimi badem ağladan (*Prunus dulcis*) ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemlerinden elde edilen rnek, PPO enziminin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla, optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı substrat kullanılarak belirlenmiştir. PPO enziminin en iyi substratın 4-metil katekol olduğu bulunmuştur. Bu substrat için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,5 ve 35 °C olarak belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri 1,71 mM ve 99,0 $\Delta A \text{ dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada yedi adet inhibitör ile çalışılmış ve etkili olanların yarışmalı inhibitör olarak sodyum azid, benzoik asit, sitrik asit, L-askorbik asit ve tiyoüre olduğu bulunmuştur. Metallerin PPO enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} , Pb^{+2} metallerinin enzim aktivitesini artırırken Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Sn^{+2} , K^{+1} metallerinin enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM UNRIPE ALMOND (*Prunus dulcis*) PLANT

SUMMARY

Key Words: Polyphenol oxidase, unripe almond, *Prunus dulcis*, enzyme purification

Polyphenol oxidase (PPO) of unripe almond (*Prunus dulcis*) fruit was extracted and purified through $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, dialysis, gel filtration. The sample obtained from ammonium sulfate precipitation and dialysis was used for characterization of the PPO. For this aim, optimum conditions, i.e. pH, temperature were determined with different substrates. The best substrate of the PPO was found to be 4-methyl catechol. Optimum pH and temperature were found 6,5 and 35°C for this substrate. K_m and V_{max} values were 1,71 mM and 99,0 $\Delta A \text{ dak}^{-1}$ with 4-methyl catechol, respectively. Seven inhibitors were tested in the study and the effective ones were found to be sodium azide, benzoic acid, citric acid, L-ascorbic acid and thiourea as competitive inhibitors. The enzyme activity was also tested against some metals. Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} , and Pb^{+2} ions act as enzyme activator however Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Sn^{+2} , K^{+1} and Sn^{+2} , metals act as enzyme inhibitors.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir. Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişimlerine "esmerleşme" denir. Bir çok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişimleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Enzimatik esmerleşme denilen bu reaksiyon, hem polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi, hem de fenolik madde konsantrasyonu ile ilgilidir. PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler, ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir [1].

Enzimler canlı organizmalar için yürüyen reaksiyonlarda düzenleyici görev aldıklarından, yüksek ve büyük bir seçicilikle katalizlediklerinden bazen istenmeyen durumlarda organizmaya negatif etki ederek bozukluklara sebep olmaktadır. Bu sebeplerin ortadan kaldırılması ancak o enzimleri karakterize ederek mekanizmalarını belirlemek ve onlara uygun inhibitörlerin belirlenmesi ile mümkün olmaktadır. Son yıllarda in vitro çalışmalarda enzimlerden yararlanma çalışmaları hızla artmaktadır. Günümüzde yapı ve mekanizması bilinen birçok enzim tıp, biyoteknoloji, gıda gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

Polifenol oksidazlar, bir çok sebze ve meyvelerde kesilme veya parçalanmaları sırasında oksidatif esmerleşmeye sebep olarak renkte karar ve bozulmalara sebep olur. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında meydana gelen enzimatik esmerleşme gıda ve tarım sektörünü hem ürünlerin bozulması hem de ekonomik açıdan olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca yiyeceklerde fenolik bileşiklerin miktarının artması antioksidant özellik taşıdıklarından dolayı insan sağlığı açısından da oldukça önem teşkil etmektedir. Bu yüzden bu esmerleşmeye sebep olan enzimler üzerinde yapılan çalışmalar bu alanda yarar sağlayacaktır.

Polifenol oksidaz enzimleri iki tür reaksiyonu katalizler. Bunlardan birincisi moleküler oksijen kullanarak monofenolik bileşiklerin difenollere hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi) ve ikincisi o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) dir. Oluşan o-kinonlar sulu ortamda, karar reaksiyonlarına yol açan koyu renkli polimerik maddelere dönüşürler.

Son yıllarda kimyacılar ve besin teknologlarının bu enzime olan ilgileri artmış ve çeşitli kaynaklardan enzimin izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Son on yıldan bu yana fenolik substratların oksidasyonları, enzimin aktivasyonu ve inhibisyon yöntemleri araştırılmıştır [2].

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla, PPO enziminin bir çok sebze ve meyveden (kiraz, mango yapraklarından, muz, nane, maltaeriği, şeftaliden, Trabzon hurmasından, dut, ayva, vb). Özellikle taro yumruları, çilek, kırmızı böğürtlen, marul bitkilerinden PPO enzimi saflaştırılıp aktivitesi belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin Sakarya bölgesinde yetiştirilen çağladan saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Bu amaçla çağladan izole edilen enzim daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile çöktürülen ham PPO enzimi diyaliz ile kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri, optimum pH ve sıcaklık şartları, depolanma kararlılığı, inhibitör çalışmaları, metallerin enzim üzerine etkisi kısmen saf enzim ile yapılmıştır. Daha sonraki saflaştırma aşamaları jel filtrasyon kromatografisi ve native jel elektroforezi ile yapılmıştır.

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimler hakkında genel bilgi

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşüren substratın ürünler yönünde ilerlemesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir [2].

Canlı organizmada gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları etkileyen enzimler protein yapısındadırlar. Fakat öbür proteinlerden en büyük farkı, hücre içinde veya kimi vücut sıvılarında geçen biyolojik reaksiyonları katalizleyebilmesidir [3].

Enzim kelimesi mayada bulunan anlamına gelir. Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar 1897 de E. Buncher'in maya ekstratı kullanarak fermantasyonla alkol elde etmesi ile başlamıştır. 1926 yılında Sumner üreaz enzimini fasulyeden izole ederek kristallendirmeyi başarmıştır. Enzimlerin protein yapısında oldukları 1930-36 yılları arasında Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini saflaştırıp kristal halde elde etmesi ile kesinlik kazanmıştır. Bu gün çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış 2000 dolayında enzim bulunmaktadır. Bunlardan en az 200 tanesi kristal haldedir.

Enzimlerle ilgili pek çok konu aydınlatılmış olmakla birlikte, hala yeni enzimlerin saflaştırılması, özelliklerinin ve kataliz mekanizmalarının aydınlatılması için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Enzimlerle ilgili biyokimya dalına enzimoloji denir

Enzimler mol kütlesi 10^4 - 10^6 akb arasında değişen büyük moleküllerdir [4].

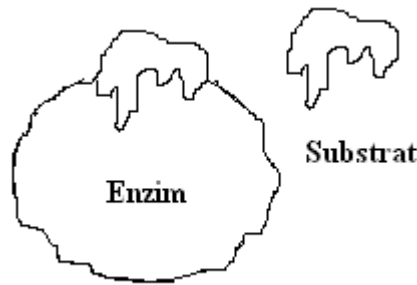
Enzimlerin, diğer biyokimyasal katalizlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} , ye kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^4 kadar arttırabilmektedir [2].

Biyokimyasal reaksiyonlarda organizma için gerekli moleküllerin yeterli bir hızla sentezlenmesi enzimlerin bu derece etkin katalizör olması ile mümkündür. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH ve canlıların vücut sıcaklığı gibi ılıman koşullarda meydana gelirler [4].

Enzimler oldukça spesifik maddelerdir. Birbirlerine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereozomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere substrat denir [1, 2, 3].

Substratlar enzimlerde aktif bölge denilen özel bölgeye bağlanır. Çoğunlukla asimetrik bit oyuk veya cep şeklinde olan aktif merkezin geometrik yapısı, içerdiği girinti ve çıkıntılar Şekil 2.1’de görüleceği gibi substrat molekülünün şekline ve onun bu bölgeye bağlanmasına uygundur.



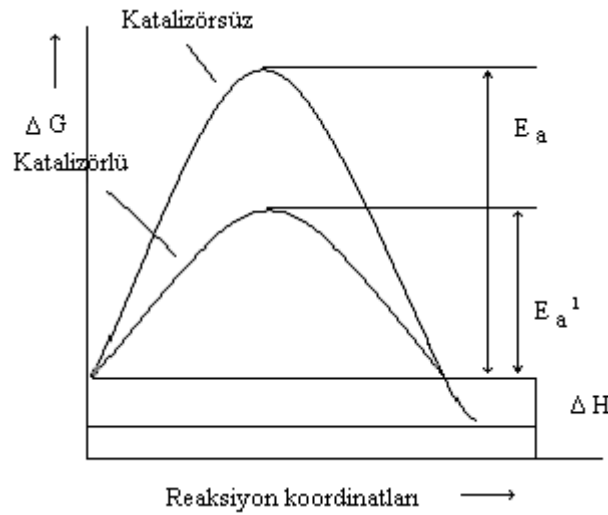
Şekil 2.1. Aktif merkezin substrata uygunluğu

Fiziksel yapı uygunluğunun yanı sıra, aktif bölge polarlık ve elektiriksel yük bakımından da substrat molekülünün kolayca bağlanmasını sağlayacak özelliktedir. Substrat molekülündeki yüklü kısımlar aktif merkezdeki zıt yüklü bölgelerle elektrostatik etkileşimler yaparlar. Apolar gruplar arasında hidrofobik etkileşimler -OH, =NH, =N vb gibi gruplar arasında ise H-bağları meydana gelir [3].

Enzimlerin katalitik aktiviteleri çeşitli şekillerde düzenlenebilir. Bir enzimatik reaksiyonun hep aynı hızda meydana gelmesi organizmaya ihtiyacı olan esnekliği sağlar. Öncelikle hücredeki enzim miktarı sabit olmayıp ihtiyaca göre artar veya

azalır. Bu durum enzimlerin sentez ve yıkım hızlarının ayarlanması ile gerçekleşir. Hücrenin ihtiyacı kalmadığı anda bir enzimin sentezi sona erebileceği gibi, ihtiyaç olduğunda yeni bir enzim sentezlenmeye başlayabilir.

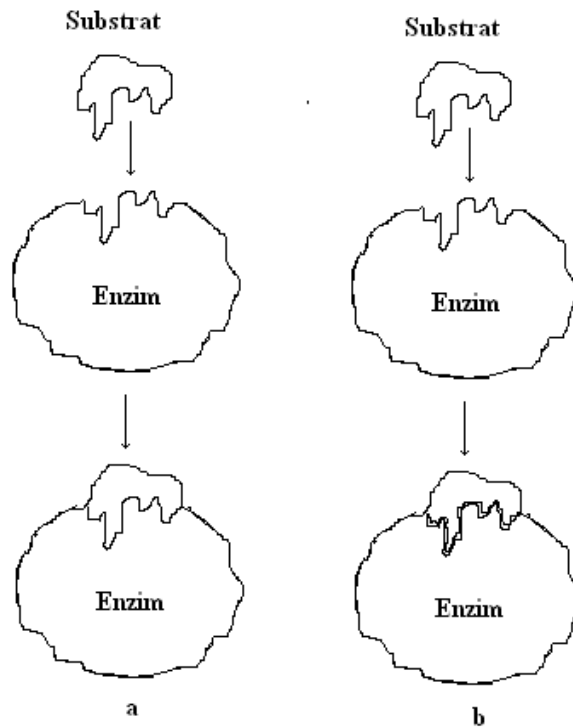
Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda denge konumunu ve denge sabitini değiştirmez, sadece dengeye daha çabuk erişilmesini sağlarlar. Hızının artması, kimyasal katalizörlerde olduğu gibi, mekanizmanın değişmesi sonucu aktivasyon enerjisinin küçülmesinden ileri gelir. Şekil 2.2.'de katalizörlü ve katalizörsüz bir reaksiyon için reaksiyon profili görülmektedir.



Şekil 2.2. Katalizörlü ve katalizörsüz reaksiyon için reaksiyon profili

Reaktif ve ürünü ayıran enerji bariyerinin tepe noktası aktif kompleksi gösterir. Reaktiflerin ürüne dönüşmesi için önce aktif kompleksin oluşması gerekir. Bir mol substrat molekülünü aktif kompleks haline geçirmek için gereken enerji aktivasyon enerjisi (E_a) denir. Aktivasyon enerjisi reaksiyonun oluşması için, aşılması gereken bir enerji bariyeridir. Bu bariyeri aşıp aktif kompleksin oluşturan substrat molekülleri ürüne dönüşebilir. Aktivasyon enerjisine sahip moleküllerin sayısını artırmak yani reaksiyonu hızlandırmak için iki yol vardır. Birincisi sıcaklığı yükseltmek, diğeri katalizör ilave etmektir. Biyokimyasal reaksiyonlarda sıcaklığın yükselmesi mümkün olmadığına göre, reaksiyon hızı ancak enzim katalizörlüğü ile artırılabilir. Şekil 2.2.'den görüldüğü gibi katalizörlü bir reaksiyon için aktivasyon enerjisi (E_a) daha küçüktür. Dolayısıyla reaksiyon hızlanmış olur.

Substrat enzim üzerindeki aktif merkeze bağlanır ve böylece aktif kompleks karşı gelen enzim substrat kompleksi oluşur. Bu komplekslerin meydana geldiği; kinetik analizler, X-ışınları kristalografisi ve inhibisyon çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Emil Fischer 1894 de enzim substrat ilişkisini anahtar kilit modeli ile açıklamıştır. Daha sonraki çalışmalar bu görüşü biraz değiştirmiştir. Enzim aktif bölgesi substrat bağlanmasına uygun ise de, bağlanma sırasında da, hem enzim konformasyonu, hem de substratın şekli biraz değişikliğe uğrayarak aktif kompleksi oluşturur (Şekil 2.3.). Bu modele indüksiyonla oluşmuş uygunluk (induced fit) modeli denir.



Şekil 2.3. Anahtar-kilit (a) ve indüksiyonla oluşmuş uygunluk modeli, (b) modellerinin şematik gösterimi

Bazı enzimler tek başlarına katalizör olarak etki edebildikleri halde bazılarının proteinlerden farklı yapıda maddelere ihtiyaç duyarlar enzimlerin aktivitesini gösterebilmesi için gereken bu maddelere kofaktör denir. Kofaktörler bir metal iyonu olabileceği gibi koenzim adı verilen bir organik molekül de olabilir. Bazı enzimler her ikisini birlikte kullanır. Enzim kofaktör kompleksine holoenzim denir. Kofaktör ayrılınca kendi başına biyolojik aktiflik gösteremeyen protein kısmını ise apoenzim adı verilir. Bazı kofaktörler enzime gevşek bağlanır ve diyalizle ayrılabilirler;

bazıları ise enzimle kovalent bağlar yapar ve enzimden kolayca ayrılamazlar. Bu tip kofaktörlere prostetik grup denir [4, 5].

Apoenzimler protein yapısındaki türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık gösterir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimidir. Apoenzim, enzimin dializ edilemeyen ve ısıya dayanıklı kısmıdır [2, 4].

Apoenzimler tek başlarına aktivite gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanır. Metal iyonları Lewis asidi olarak davrandıklarından elektron çifti alıcısıdır. Biyolojik açıdan önemli olan Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , ve Fe^{+2} gibi metal iyonları Lewis bazı gibi davranan gruplara bağlandıklarında koordinasyon kompleksi oluştururlar. Bu tip katalize örnek olarak karboksipeptitaz A enzimi verilebilir. Bu enzim, proteinlerin peptid bağlarını karboksil ucundan hidrolizler. Enzimin aktivite göstermesi için parçalayacağı protein karboksil grubu, enzim aktif bölgesini oluşturan histidin 69,196 ve glutamat 72 ile bir koenzim olan Zn^{+2} arasında koordinasyon kompleksi oluşturması gerekmektedir. Metal iyonu ile oluşan bu koordinasyon kompleksinin konformasyonu sonucu optimum kataliz gerçekleşir.

Koenzim olarak kullanılan önemli maddelerden biriside vitaminler veya onların türevleridir. Bu amaçla genellikle B vitamini kullanılır. Bu maddeler, yerdeğiştirme tepkimelerinde çok, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinde daha az oranda kullanılırlar. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^{+}), bir çok yükseltgenme-indirgenme tepkimesinde yer alan bir koenzimdir. Nikotinamid halkası, adenin halkası ve iki riboz halkasının birleşmesinden oluşmuştur. Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu nikotinamid halkasındaki amid üzerinden yürür. Nikotinik asit diğer adı B grubu vitaminlerinden birisi olan niasindir. B_6 vitaminleri olan piridoksal, piridoksamin ve piridoksin de amino gruplarının bir molekülünden diğerine transferinde görev alırlar [1, 2].

Kofaktör olarak rol oynayan metal iyonlarının fonksiyonu üç şekilde açıklanmaktadır.

—Metal iyonu birinci derecede kataliz merkezi olabilir.

—Enzim substratla koordinasyon kompleksi şeklinde bağlayan bir köprü ödevi yapabilir.

—Enzimin, katalitik aktivitesini gösterebileceği bir konformasyonda, kararlı olmasını sağlayabilir.

2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Uluslar arası enzim komisyonu toplanarak enzimleri 6 sınıfa ayırmış ve bu sınıflara sistematik adlar verilmiştir. Bu sınıflar Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.

—Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu sınıftandır.

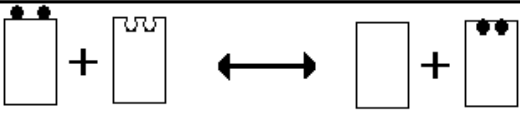

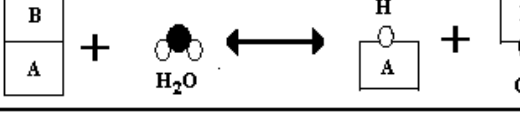
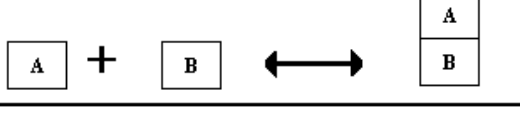
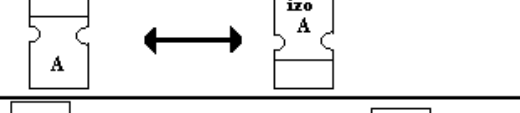
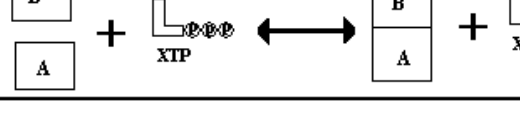
—Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden, enzimlerdir.

—Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir.

—Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağların hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler.

—İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerirasyon reaksiyonlarını katalize ederler.

—Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler [4, 6, 7].

1. Oksidoredüktazlar	
2. Transferazlar	
3. Hidrolazlar	
4. Liyazlar	
5. İzomerazlar	
6. Ligazlar (Sentetazlar)	

Şekil 2.4. Enzimlerin sınıflandırılması

2.1.2. Enzim aktif birimleri

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktar ölçümleri yerine aktivite ölçümleri yapılmaktadır.

Enzim aktivitesi o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir.

Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

Bu en çok kullanılan enzim aktivite birimi, IU'dir. 1 IU enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 dakikada 1µmol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki buda 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılıktır.

Enzim aktivitesi, bazen katal olarak ifade edilir. 1 katal enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki buda $6,10^7$ IU enzim aktivitesine denktir. 1 katal $6,10^7$ IU; 1 nonokatal 10^{-9} katal 0,006 IU.

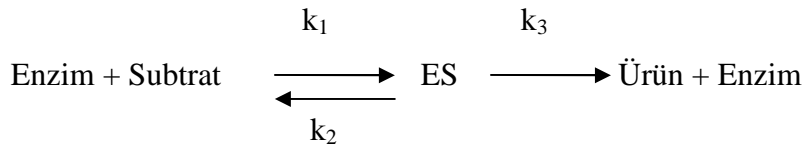
Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak ta ifade edilir. Bir enzim için spesifik aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısıdır. Aktivite tayini yapılan biyolojik örneklerdeki enzim saflığı arttıkça spesifik aktivite de yüksek olur.

Çeşitli enzimler için özel aktivite birimleri de tanımlanmıştır. Bodansky ünitesi 37 °C'de 8,6 pH ortamında 100 ml serumda sodyum gliserofosfattan 1 saatte 1 mg fosfor oluşumunu katalize eden fosfotaz enzimi aktivitesidir. King-Armstrong ünitesi 37 °C 100 ml serumda fenilfosfattan 15 dakikada 1 mg fenol oluşumunu kataliz eden fosfataz enzim aktivitesidir [1, 6].

2.1.3. Enzim kinetiği

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

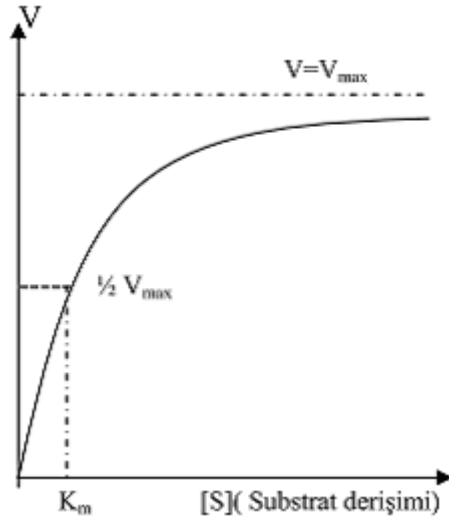
Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir.



Burada ES kompleksi, E ve S'dan k_1 hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca ‘‘Kararlı Durum İlkesine’’ göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim

derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.5.). Bunun özümü ile de Eşitlik 2.1.'deki Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



Şekil 2.5. Michaelis- Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı Şu Şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Burada V_{max} ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

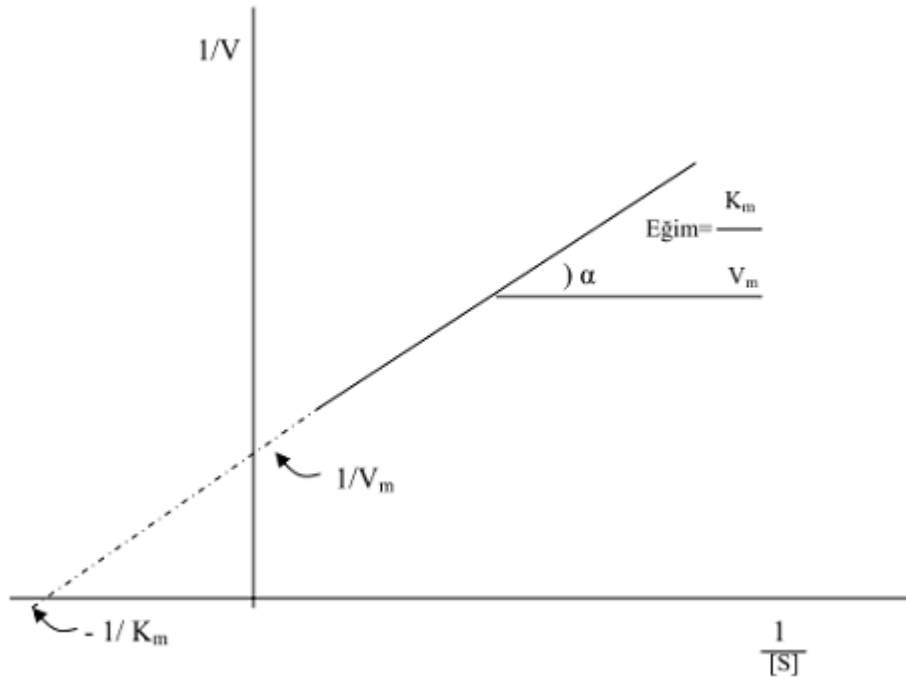
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluŐmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karıŐık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V = V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir.

Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Eşitlik 2.2.'deki Lineweaver-Burk denklemdir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.2)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{\max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{\max} 'dır (Şekil 2.6.) [8, 9].



Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği

2.1.4. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şunlardır:

- Ortam pH'ı
- Sıcaklık
- Enzim konsantrasyonu
- Substrat konsantrasyonu
- Zaman
- İnhibitör

2.1.4.1. Ortam pH'ı

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asit ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'ı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'ı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

2.1.4.2. Sıcaklık

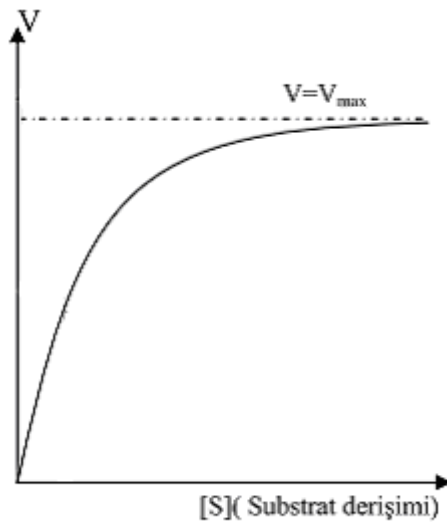
Sıcaklık enzimatik reaksiyonları da diğer reaksiyonlarda olduğu gibi hızlandırır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

2.1.4.3. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır.

2.1.4.4. Substrat konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonu reaksiyon hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder (şekil 2.7.). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{max} ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçüktür.



şekil 2.7. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

2.1.4.5. Zamanın etkisi

Bir enzim reaksiyonunun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir.

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

2.1.4.6. İnhibitör

İnhibitörler, enzimatik, tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler [5].

Diğer kimyasal maddeler ve suyun etkisi; Birçok kimyasal madde enzimleri etkisiz hale getirir; örneğin, siyanit, solunumda önemli rol oynayan sitokrom oksidaz enzimini etkileyerek inhibe eder. Ölüm meydana gelebilir. Florit, glikozu laktik aside çeviren enzim kademelerine etki eder. Hatta enzimin bizzat kendisi zehir etkisi yapabilir; örneğin, 1 mg kristal tripsin, farenin damarına enjekte edilirse ölüm meydana gelir. Bazı yılan, arı ve akrep zehirleri de enzimatik etki göstererek kan hücrelerini ya da diğer dokuları tahrip ederler [10].

Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden, suyun miktarı da enzim işlevinde etken bir koşuldur. Genellikle % 15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler. Bu faktör önemlidir. Sulandırılan reçelin, balın ya da pekmezin vs.nin mayalanması ve ekşimesi bu yüzdendir. Hatta tahıl alımlarında su oranının % 5'in altında istenmesi de bu nedene dayanır [11].

2.1.5. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin hem in vivo, hem de in vitro aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılmasına veya tamamen yok edilmesine enzim inhibisyonu denir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle düşük molekül ağırlığına sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan oldukça önemlidir. İnhibisyon araştırmaları ile enzimatik reaksiyonların mekanizmaları, aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar, aktif merkezin yapısı ve enzimin substrat spesifikliği açıklanabilir. Ayrıca ilaçların ve toksik maddelerin etkisi de bu yolla incelenebilir.

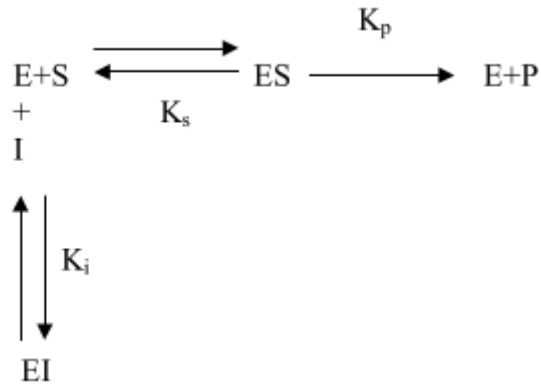
İki tip inhibisyon vardır, birincisi tersinir (geri dönüşlü) inhibisyon, ikincisi tersinmez (geri dönüşsüz) inhibisyonudur. Tersinmez inhibisyon'da, inhibitör aktif merkeze kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktive eder. Tersinmez inhibisyonlara örnek olarak, aktif merkezlerinde serin bulunan enzimlerin di-izopropilflorofosfat tarafından inaktivasyonları verilebilir. Tersinir inhibisyonda ise inhibitör enzimle veya enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır. Üç çeşit tersinir inhibisyon türü vardır.

Bunlar;

- Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif İnhibisyon)
- Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif İnhibisyon)
- Yarı Yarışmalı inhibisyon (Unkompetitif İnhibisyon)

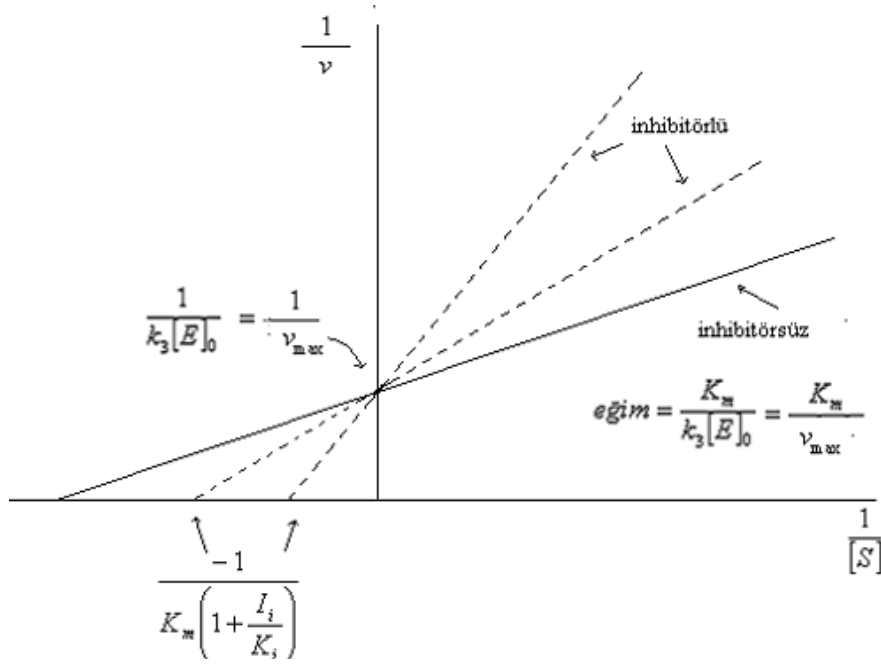
2.1.5.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif inhibisyon)

Bu tür inhibisyon, yapı bakımından substrata benzeyen maddeler tarafından yapılır. İnhibitör aktif merkeze bağlanarak enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. Bu kompleks ürüne dönüşmeyeceğinden inhibitör bağlanmış olan enzim molekülleri boşa harcanmış olur. Fakat substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{\max} değeri değişmezken, K_m değeri artar. Yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması Şekil 2.8.'de verilmektedir.



Şekil 2.8. Yarışmalı (Kompetitif) inhibitör varlığında reaksiyon şeması

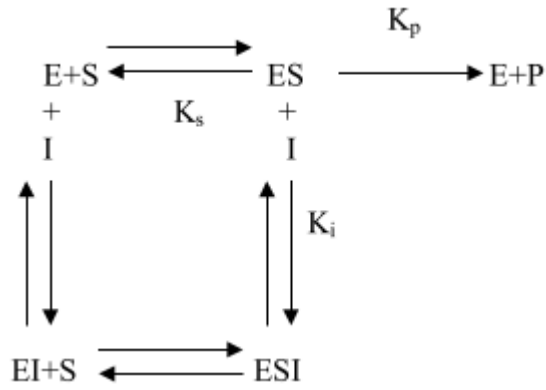
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2.3)$$



Şekil 2.9. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon

2.1.5.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif inhibisyon)

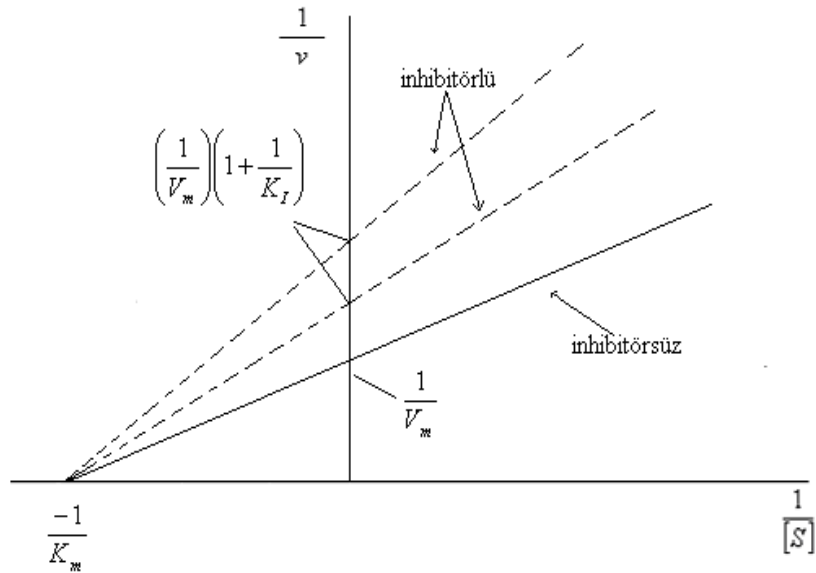
Yarışmasız inhibisyonda inhibitör ya serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine aktif merkez dışındaki bir bölgeden bağlanır ve iki farklı kompleks meydana gelir. İnhibitörün bağlanması enzimi deforme edeceğinden ES oluşması ve ayrışması normal hızlar ile yürümez. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılamaz. Bu tür inhibisyonda substrat ve inhibitör gelişi güzel bir tarzda birbirinden bağımsız ve tersinir olarak aynı anda farklı merkezlere bağlanarak ES ve EI komplekslerini oluştururlar. Ayrıca ES, I ile EI, S ile birleşerek ESI üçlü kompleksini meydana getirir. Yarışmasız inhibitör etkisini, katalitik aktivitesini düşürerek gösterir.



Şekil 2.10. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibitör varlığında reaksiyon şeması

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (2.4)$$

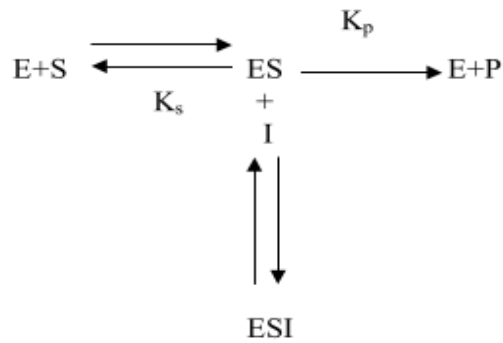
Farklı inhibitör konsantrasyonları için aşağıda çizilen Şekil 2.11.'de $1/V-1/S$ doğrularının eğimi şekilden de görüldüğü gibi farklıdır, fakat hepsi x eksenini aynı noktada keserler. Bu nedenle K_m değerleri aynıdır. Maksimum hız ise inhibisyonun dolaylı azalmıştır.



Şekil 2.11. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon

2.1.5.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Unkompetitif inhibisyon)

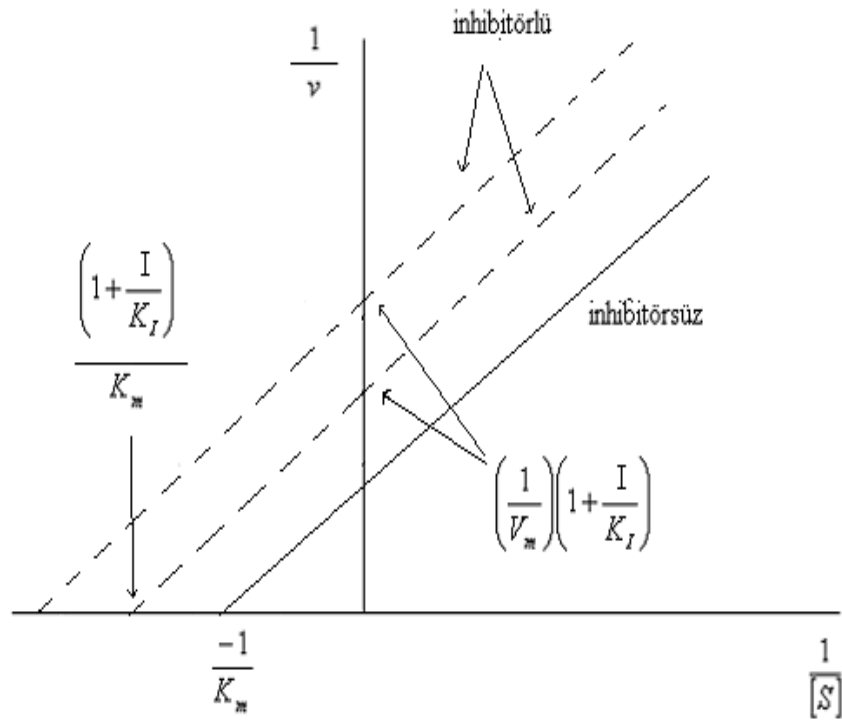
Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör direkt olarak enzime değil enzim-substrat kompleksine bağlanır. Böylece kompleksin yapısı bozulmuş olacağından ürün meydana gelmez. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Bunun için tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona daha az rastlanır. Reaksiyon şeması;



Şekil 2.12. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right) \quad (2.5)$$

ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{\max} değeri azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_m değeri küçülür.



Şekil 2.13. Yarı yarışmalı inhibisyon

Farklı inhibitör konsantrasyonlarında $1/V-1/S$ grafikleri çizilirse yukarıdaki Şekil 2.13.'de görüldüğü gibi birbirine paralel doğrular elde edilir. Yarı yarışmalı inhibisyonda hem V_{max} hem de K_m değerleri değişmektedir. Bu tip inhibisyon daha çok iki substratlı reaksiyonlarda gözlenmektedir [8, 12].

BÖLÜM 3. POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ

3.1. Doğada Bulunuşu

Polifenol oksidaz (PPO) (EC 1.14.18.1), Polifenol oksidazlar iki sınıfa ayrılırlar. Tirosinazlar (EC 1.14.18.1) ve lakkazlar (EC 1.10.3.2). Sebze ve meyvelerde kesim yüzeylerinde fenol bileşiklerinin oksitlenme ürünleri sonucu kahverengine sebep olan bir grup enzim için genel bir terimdir. PPO ilk olarak mantarlarda Schoenbein tarafından 1856 yılında bulunan bakır içeren oksidoredüktaz sınıfından bir enzimdir [1, 13, 14].

PPO; birçok bitki dokusunda, ıstakoz, karides, yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarında ve bazı mikroorganizmalarda bulunur [1, 13].

PPO ayrıca organizma içerisinde koyu pigmentlerin birleşimle birlikte gelişmesi, melanin pigmentinin biyosentezini, başlatılması ve polifenolik grupların korunması görevini sağlar.

Bitkiler kesildikleri yada çürüdükleri zaman, PPO savunma mekanizması içerir, genel olarak fenolik bileşikler oksijenin hazır bulunduğu ortamda polimer yapılara oksitlenir. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin miktarı ve dağılımı, bitkinin cinsine, yaşına ve olgunluğa bağlıdır [15].

PPO enziminin, meyve ve sebzelerin değişik kısımlarındaki dağılımı oldukça farklıdır. Örneğin üzüm kabuğunda bulunan enzimin, etli kısmına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Elmanın çekirdeğinde bulunan enzim, diğer kısımlarında bulunan enzimden daha fazla aktiflik göstermektedir. Armut, şeftali ve kirazda ise en

yüksek PPO aktivitesi kabuk kısmında yer almaktadır. Yeşil yapraklarda bulunan PPO enzimi aktivitesinin en yüksek olduğu yerin kloroplastlar olduğu belirlenmiştir [2].

3.2. PPO Enziminin Doğada ve Yiyeceklerin İşlenmesindeki Rolü

PPO solumun zincirinin sonunda yer alan oksidazlardan birisi olduğu düşünülmektedir. Ancak bu durum henüz açığa kavuşmamıştır.

Enzimin, bitkilerin mikrobiyal veya viral enfeksiyonlara ve değişik iklim şartlarına karşı direnç göstermelerinde çok önemli rolünün olduğu düşünülmektedir [2].

Enzimatik kararma önemli bir problemdir, ana sorun ürünlerdeki ekonomik kayıptır, özellikle taze meyve örneğin elma, armut, muz ve üzüm, sebzelere örnek olarak patates, marul ve mantar ve deniz ürünlerine örnek olarak karides verilebilir. Ticari olarak bozulmadaki görsel etkiyi azaltmak önemlidir [15].

PPO enzimi, fermantasyonla elde edilen içeceklerin tat ve lezzetini de etkileyebilir. Örneğin fermente edilmiş elma ve armut suyu üretiminde, meyvelerde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler okside olarak çökelirler. Ancak bunlar süzülerek uzaklaştırılabilir.

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik kararmalar; bunların depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında kesilme, zedelenme, dondurulmuş meyvenin çözülmesi durumlarında hava oksijeninin etkisiyle meydana gelir. İstenmeyen bu tür kararma reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır.

Bazı besin teknolojilerin da ise enzimatik polifenol oksidazın neden olduğu enzimatik kararma istenen bir durumdur. Örneğin; siyah çay, siyah üzüm ve kuru erik üretiminde bu enzimatik kararma çok önemlidir [2].

3.3. Molekül Yapısı

Polifenol oksidaz, birden fazla alt birimden oluşan oligomerik yapıda bir enzimdir. PPO'nun içerdiği alt birim sayısı enzimin izole edildiği kaynağa ve substrata bağlı olarak değişmektedir. Amasya elmasından elde edilen PPO enzimi için katekol ve L-DOPA substratları kullanılarak 3 izozim tespit edilmiştir.

Tablo 3.1.'de kaynaklardan izole edilen PPO enziminin kaç adet alt birim oluştuğu, uygulanan yöntemler ile birlikte verilmiştir [2].

Tablo 3.1 Kaynaklardan izole edilen PPO enzimi ve alt birimleri

Enzim Kaynağı	Alt Birim Sayısı	Ayrırma Yöntemi
Elma (Amasya)	3	PAGE
Mango	2	PAGE
Kivi	8	PAGE
Şeftali	4	Tampon ekstraktı, aseton çöktürmesi, DEDA-Selüloz
Üzüm (Kloroplast)	3	PAGE
Patlıcan	2	AS çöktürme DEDA-Selüloz ^a
Kayısı	2	Tampon ekstraktı pH:5,0 ve PH:7,0

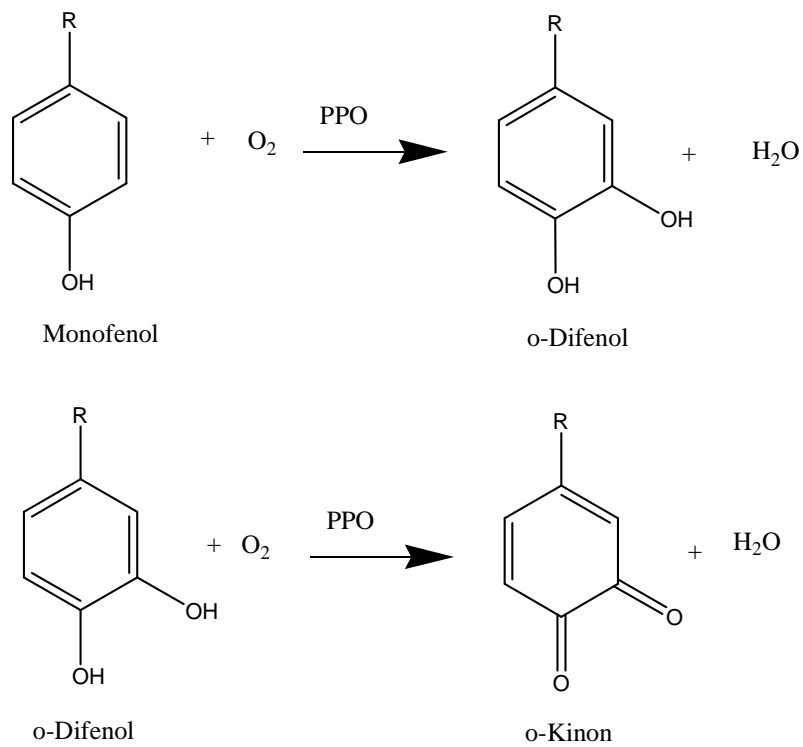
a: kromatografik basamak

AS: Amonyum Sülfat

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

3.4. PPO enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

PPO ilk olarak oksijenin hazır bulunduğu ortamda monofenolleri hidroksilasyon ile o-difenollere daha sonra o-difenolleri dehidrojenasyon ile oksijenin hazır bulunduğu ortamda o-kinonlara katalizler (Şekil 3.1.). O-kinonların non-enzimatik polimerizasyonu, oksidatif bileşen tarafından bir seri oligamerisasyon ve polimerisasyon reaksiyonu ile melanin yada melanin benzeri bileşenleri oluşturur [13, 15, 16].



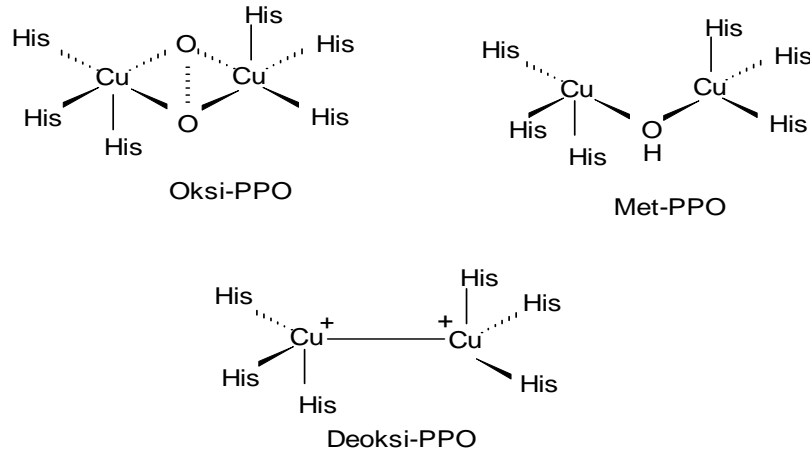
Şekil 3.1. PPO 'nun katalizlediği reaksiyonlar

Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantardan elde edilen PPO enzimi her iki aktiviteyi göstermektedir. Ancak çay yaprağı, tütün yaprağı, mango, muz, armut gibi bitkilerden elde edilen PPO enziminin monofenollerle reaksiyon göstermediği belirlenmiştir [1].

PPO enzimini monofenolleri katalizlemesine krezolaz aktivitesi o-difenolleri katalizlemesine katekolaz aktivitesi denir.

3.5. Mekanizma

PPO için yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aktif bölgenin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğunu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir (Şekil 3.2.).



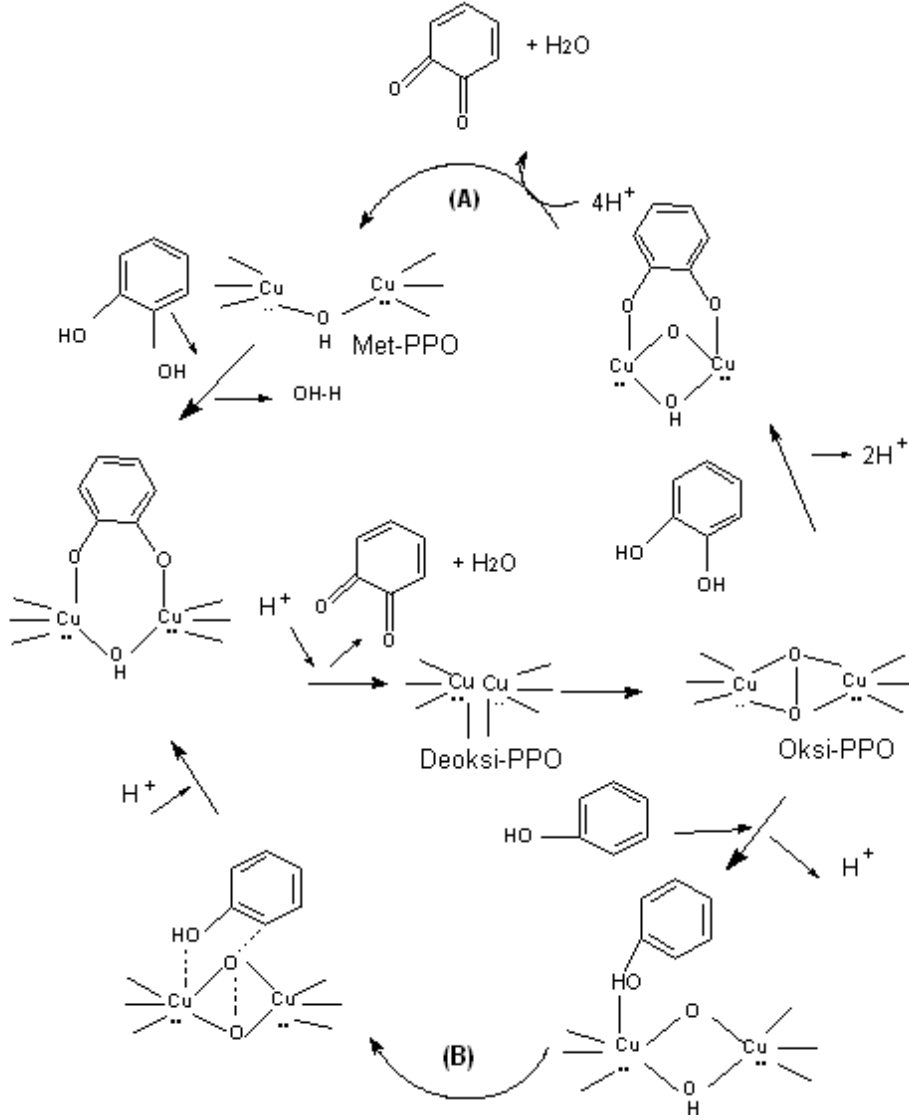
Şekil 3.2. PPO'nun bakır merkezleri

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

Fizyolojik fonksiyonları farklı olmasına rağmen PPO ve hemosiyanin aktif bölgesi birbirine benzerlik gösterir ve bu model sistemler üzerinde yapılan çalışmalar monofenollerin PPO ile katalizlenen dönüşümlerinin substratın enzimin oksî formuna bağlanmasıyla başladığını ortaya koymaktadır [17].

Dehidrogenasyon için orta seviyede ileri sürülen mekanizma Şekil 3.3.'de gösterilmiştir. O₂ ilk olarak iki Cu(I) içeren deoksi-PPO, oksî-PPO vermek için, O₂

bağının uzunluğu iki Cu(II) grubu içeren peroksidin karakteristik özelliğine göre bağlanır.

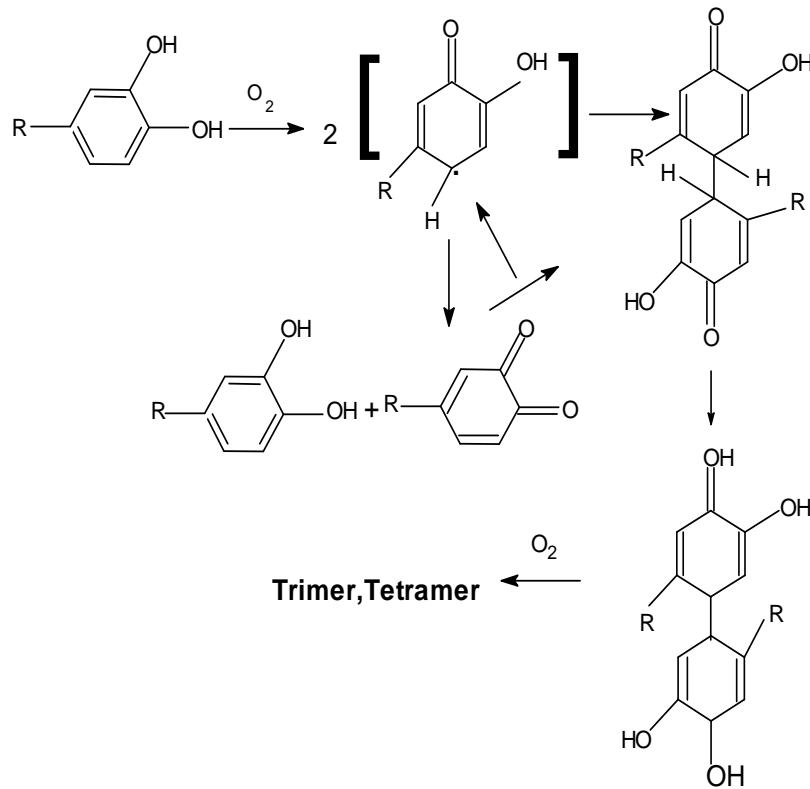


Şekil 3.3. Tirozin aktivitesi ile katekol mekanizmasının düzenlenmesi (A) ve krezol (B)

Oksi-O₂ deki Cu(II) grupları, aynı zamanda katekolun iki hidroksil grubundaki oksijen atomuna, O₂-katekol-PPO kompleksini oluşturmak için bağlanır. Katekol o-benzokuonine oksitlenir ve enzimi karşılamak için met-PPO azaltılır.

PPO tarafından monofenollerin o-hidroksilasyon mekanizması Şekil 3.3'de gösterilmektedir. Reaksiyon met-PPO ile başlar. Eğer geri dönüşüm engellenirse, met-PPO katekol bileşiği ile deoksi-PPO vermek için indirgenir. Deoksi-PPO bağları

oksijen ile oksi-PPO verir; monofenoller bir tane Cu(II) grupları bağlıdır, hidroksil grubunun oksijen atomu vasıtasıyla O₂ monofenol PPO kompleksi verir. Daha sonra monofenolun o-pozisyonu O₂ monofenol PPO kompleksinin oksijeni tarafında katekol vermek için hidroksillenir, sonra kompleksin dönüşümü ile deoksi PPO ayrılır. Monofenollerin hidroksilasyonu ile ilk dönüşüm met PPO'ya olması istenirse; sonraki bütün dönüşümler deoksi PPO ile başlar [18].



Şekil 3.4. Melanin pigmentlerinin oluşum mekanizması

Reaksiyon sonucunda oluşan o-kinonlarla fenolik substratlar polimerizasyona uğrayarak kahverengi melanin pigmentleri oluşturmaktadır (Şekil 3.4.).

Çiftleşmemiş elektronlar, kolayca yeni kovalent bağlar oluştururlar ve yeni bağlanmış karbonlar üzerindeki hidrojenler tekrar oksitlenecek olan hidrokinona geç ederler. Sonuçta kompleks yapıdaki büyük polimerler oluşur [1].

Bu melaninler bariyer oluşturur ve enfeksiyonun yayılmasından yada bitki dokusunun bozulmasından koruyan antimikrobiyal özelliğe sahiptir. İklim

değişikliğine yüksek direnç gösteren bitkiler kolay etkilenenlere göre yüksek polifenoloksidaz içeriğine sahiptir ve polifenol oksidaz ayrıca hayvanlarda oluşur, böceklerde ve kabuklularda hastalık direncini arttırdığı düşünülmektedir [19].

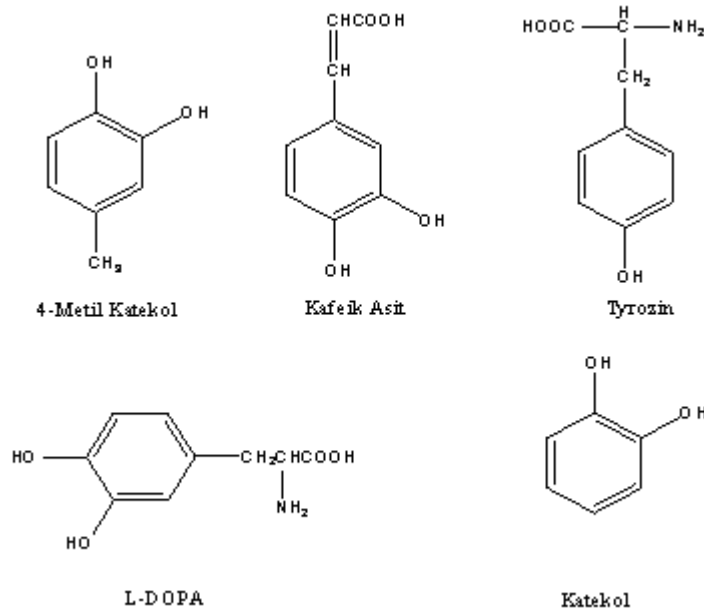
3.6. PPO enziminin Substratları

Spesifikliğin en önemli anlamı bir enzimin bir aktif bölgesi için yarışan substratlar arasındaki ayrımıdır. Esmerleşmede duyarlılık bir bitkiden diğerine değişir. Bu değişim nitel ve nicel özelliklerin her ikisine de bağlıdır. Meyve ve sebzelerde fenolik bileşiklerin çeşitliliği bulunur, sadece küçük bir grup direkt substrat olarak PPO'ye etki eder; kafeik asit türevleri örnek verilebilir, klorojenik asit her zaman PPO için en iyi substratlardandır. Buna ek olarak diğer nicel önemli fenol grupları antoksiyanin, flavanol ve tanin zayıf olarak PPO tarafından oksitlenir.

Bir diğer fenol grupları kolayca PPO tarafından oksitlenir, örneğin; 3,4-dihidrosifenil asetik asit, katekol, 4-metil katekol, 3,4-dihidroksifenil propiyonik asit, m- ve p-kresol, 3,4-dihidroksi benzoik asit, L-adrenalin, D-adrenalin, L-noradrenalin ve D-noradrenalin verilebilir. Dahası bazı meyve polifenol oksidaz enzimi diğer fenolik substratları kullanır. Örneğin DOPA, dopamin muz için önemli substratlardır. DOPA, bakla yapraklarında doğal substrat olarak bulunur. Mandalina için substrat olarak pirogallol verilebilir. En önemli substratlar Şekil 3.5' te verilmektedir [15,18].

Son günlerdeki çalışmalarda, PPO aktivitesi için iki yeni sınıf substrat daha eklenmiştir; bunlar aromatik aminler ve o-aminofenollerdir [1-2].

PPO aktivitesi doğal olarak bulunan proses sonucu farklı substratlarda farklı oranlarda oksitler [20].



Şekil 3.5. PPO enzimi için substrat bileşikleri

Enzimin, bu substratların yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizleme hızı bitkinin neresinden izole edildiğine, bitkinin türüne ve yaşına bağlıdır. Örneğin mantardan, üzümünden ve kayısıdan izole edilen enzimlerin katekol için katalizleme hızı birbirinden farklıdır.

Ayvadan izole edilen PPO enziminin kısmen saflaştırılmış enzimin, katekol, L-DOPA, ve pirogallol ile oksitlendiği fakat L-tirozin ve p-kresol ün oksitlenmediği gösterildi. Enzimin L-tirozin ve p-kresol ile karıştırıldıktan bir saat sonrasına kadar reaksiyon gözlenmedi. Bu ayva polifenol oksidazının aktivitesinin orta-difenolle doğru ilerlediği fakat monofenole doğru ilerlemediği görüldü. Benzer aktiviteler fasulye ve armutta da not edilmiştir [21].

Kekikten izole edilen enzim için yine katekol pirogallol ve domamin substrat olarak denenmiş ve sırasıyla K_m değerleri 682,2, 15,4 ve 62,0 mM, olarak bulunmuştur. Kekikten izole edilen enzim için en iyi substrat pirogallol olarak bulunmuştur [22].

Literatürdeki şeftali çeşitlerinden izole edilen enzim için bazı veriler kıyaslanabilir. Buna göre; Fay Elberta çeşidi şeftalilerden ekstrakte edilmiş PPO enzimi için K_m 120

mM (katekol) ve V_{max} 16,7 Klett Üntesi/dak. olarak saptanmıştır. Red Haven şeftalilerinde ise, K_m 29 mM (katekol), Halford şeftalilerinde K_m 15 mM (katekol) düzeyinde bulunduğu bildirilmektedir [23].

Şeker kamışından elde edilen PPO enziminin DOPA'yı yükselttiği halde L-tirozine etki göstermediği gözlenmiştir [1-2].

Hurmadan elde edilen PPO için substratlara olan ilgisi farklı sıcaklıklarda ve pH'larda nasıl etkilendiği gözlenmiştir. PPO aktivitesi 20 °C katekol, 40 °C 4-metil katekol için, 10 °C L-DOPA için pH'ı 7,5 fosfat tamponu kullanılarak enzim aktivitesi bulunmuştur [24].

Meyve sebzelerin çoğunda fenol konsantrasyonunun dış tabakalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Örneğin; elma ve armudun kabuk kısmının fenol içeriği etli kısmına göre daha fazladır [2].

Bir kaynaktan elde edilen PPO enzimi için en iyi substrat yine aynı kaynaktan bulunan substrat olduğu görülmüştür. Tablo 3.2.'te bazı kaynaklardan izole edilen enzimin fenolik substratları verilmiştir [2, 21, 24].

Tablo 3.2. Bazı kaynaklardan izole edilen enzimin fenolik substratları

Enzim Kaynağı	Substratları
Armut	Katekol, Klorojenik asit, Kafeik asit 4-Metil katekol
Elma (Kloroplast)	Klorojenik asit, Katekol, Kafeik asit L-DOPA, 3,4-Dihidroksi benzoik asit p-Krezol
Elma	Katekol, Pirogallol, L-DOPA L-Tirozin, p-Krezol
Trabzon hurması	Katekol, DHPPA, L-DOPA

3.7. PPO Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

3.7.1. pH'm etkisi

pH enzim aktivitesi için kararlaştırılan önemli bir etkidir; pH, amino asit yan zincirlerinin iyonlaşma durumu yada substratın iyonlaşması ile değişir [20].

Herhangi bir kaynaktan elde edilen PPO'un en iyi aktivite gösterdiği (optimum pH) substratın türüne göre değişmektedir [1].

Çeşitli kaynaklardan izole edilen enzimin optimum pH'larındaki farklılık enzimin farklı alt birimlerinin bulunması ile enzim kaynağının olgunluk durumu ile, enzimin saflık derecesi ile yakından ilgilidir [2].

Ayva PPO'ı için katekol substratı ile optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. PPO için bazı kaynaklarda pH 6,0-9,0 aralığında bulunmuştur. Fasulye, armut, fasulye çekirdeği yağında, elma da optimum pH 7,0 olarak kaydedilmiştir.

Bitki polifenol oksidazı için pH profili çalışmalarında optimum pH aralığının 4,5- 8,0 olduğu bulunmuştur [20].

pH 8,0 olduğu durumlar da enzimin hızla deaktivitesini takip eden olasılıklar atfedilir; bazik koşullarda enzim değişir ve/veya enzim daha hızlı Maillard reaksiyonuna girer ve/veya Strecker alçalması olabilir [21].

Çakşır otu kök ve yapraklarından izole edilen enzim aktivitesi için çeşitli substratlar için optimum pH'lar belirlenmiştir. Bu çalışmada katekol için 7,0, 4-metil katekol için 6,0, klorejnik asit için optimum pH ise 6,0 olarak bulunmuştur [25].

Çeşitli kaynaklardan, çeşitli substratlarla kaydedilen optimum pH'lar Tablo 3.3.'te verilmiştir [2, 21, 22, 26].

Tablo 3.3. Optimum pH değerleri

Enzim Kaynağı	Optimum pH	Substrat
Ayva	8,0	Katekol
Trabzon hurması	7,5 5,5	4-Metil katekol DHPPA
Dut	5,0 7,0 7,5	4-Metil katekol Katekol Pirogallol
Malta eriği	3,0-5,0 5,0-7,0	4-tert-butil katekol (asetat tamponu) 4-tert-butil katekol (fosfat tamponu)
Muz (Anamur)	5,5-7,0	Katekol

3.7.2. Sıcaklığın etkisi

Polifenol oksidaz enziminin meyvelerde aktivasyon gösterdiği optimum sıcaklık aralığı 25-30  C'dır [1-2].

Enzimin optimum sıcaklığı da pH gibi izole edildiği kaynağa, ortamın pH'sına ve kullanılan substrata bağlıdır [2].

Dut polifenol oksidazının aktivitesi için optimum sıcaklıkta enzim substratında değişim gözlenmiştir. Buna göre, 4-metil katekol ve pirogallol için enzimin optimum sıcaklığı 20  C aynı koşullarda katekol için 45  C verilmiştir. Enzimin güçlü bir şekilde pirogallol'u oksitlediği gözlenmiştir [26].

Yer elmasından izole edilen PPO enzimini için optimum sıcaklık 25-30 °C olarak bulunmuştur. 40 °C'nın üzerinde enzim aktivitesinde azalma kaydedilmiş ve 75 °C'de enzim aktivitesini kaybettiği kaydedilmiştir [27].

3.7.3. Basıncın etkisi

Hemen hemen bütün enzimler basınçla inaktive veya denatüre olurlar. Enzimlerin yeterince denatüre edilmesi için, basıncın süresi ve miktarı, ortamın kimyasal bileşimi substratlar, ortamın pH'sı, sıcaklık gibi şartların iyi ayarlanması gerekmektedir.

Süperkritik şartlarda CO₂ gazı kullanımı son yıllarda enzimin inaktivasyonu için ümit verici bir çalışma olacaktır. Yüksek basınç şartlarındaki CO₂'in en önemli özelliği gıda sanayinde emniyetli ve etkili bir çözücü olmasıdır [1].

3.8. PPO enziminin inhibitörleri

Bazı durumlarda esmerleşme, taze sebze ve meyvelerde büyük ekonomik kayıplara neden olur, patates, marul ve diğer yapraklı sebzeler, elma, muz, üzüm, şeftali, çilek bu duruma örnek verilebilir. Enzimatik kararma kalitede kötü lezzetlere ve kayıplara neden olur.

Esmerleşmeyi kontrol etmek gıda endüstrisindeki en önemli sorunlardan biridir, gıda endüstrisinde en önemli noktalardan biri renktir, tüketicinin kararını etkileyen önemli nitelikler ve kahverengi gıdalar (özellikle meyveler) bozuk görünür. Enzimatik esmerleşmeyi önlemek için çeşitli metodlar uygulanabilir, bunlar enzimi inaktif etmeye (ısı) yada gerekli bileşenleri (oksijen) üründen uzaklaştırmaya dayanır [28].

Enzimatik kararma reaksiyonları, inaktivasyon ya da PPO aktivesi için inhibitörlerle, oksijenin uzaklaştırılması, modifikasyon ya da polifenik bileşiklerin düşürülmesi, indirgeyici substratların toplanması, bakırın prostetik grubu ile etkileşimi, indirgenmesi yada kinonların tutulması ve hatta ürünlerin kararma reaksiyonlarına katılması ile kontrol edilebilir [12, 29].

Enzimlerin inhibisyonu tersinir yada tersinmez olabilir; ısı gibi fiziksel bir etki ile bu durum gerçekleşebilir yada kimyasal maddelerin bir yada birkaçı ile oynanabilir [15, 18].

Kimyasal inhibitörler sadece bir enzime etki edebilirler ve iki gruba ayrılırlar; bakırla etkileşen bileşikler birinci grup ve enzimin aktif bölgesini etkileyen fenolik substratlar ikinci grup olarak verilir.

İlk grupta, metal iyonların inhibisyonu, örneğin azit, siyanür ve karbon monoksit ile az yada fazla spesifik olarak bakırı kaplaması şeklinde farklı kaynaklardan elde edilen PPO için gözlenmiştir. Benzer şekilde inorganik iyonlarının inhibisyonu yüksek pH'a bağlı olarak elmada belirlenmiştir [15].

İkinci gruba ait inhibitörler, karboksilli asitlerden benzoik asit ve sinamik asit dizileri geniş ölçüde çalışılmıştır. Bunlar, PPO için yarışmalı inhibitör olarak rol oynar çünkü onların yapıları fenolik substratlarla aynıdır [14].

Tütün yaprağından elde edilen PPO enziminin KCN, sodyum azid ve tiyoüre ile inhibe olduğu görülmüştür [2].

Dietil ditiyokarbomat, enzimin yapısında bulunan bakır ile şelat kompleksi yaparak onun inhibisyonuna neden olmaktadır. L-Sistein, diğer tiyol amino asitlerin ve tiyollerin inhibitör etkisi vardır. O-kinonlar L-sisteinin tiyol grubu ile kovalent bağ yaparlar. L-Metioninin tiyoester grubu ile proteinin yapısında bulunan lizinin amino grubu arasında reaksiyon meydana gelebilmektedir.

Proteinler, peptidler ve amino asitler, meydana gelen kinonlarla etkileşerek ve aktif merkezdeki Cu^{+2} ile kararlı kompleksler vererek melanin pigmentlerinin oluşumunu önler [2].

Sinamik asit ve benzoik asit, elma sularında enzimatik karamaya karşı etki gösterdikleri bulunmuştur, özellikle bu etki askorbik asitin kombinasyonu ile kullanılır [13].

Askorbik asit, oluşan o-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir, sonuçta kendisi yükseltgenir. Askorbik asitin tamamı yükseltgendikten sonra kararlı reaksiyonu devam eder. Bu nedenle kullanılan askorbik asidin miktarı önemlidir. Sitrik-askorbik asit karışımının dondurulmuş meyvelerin kararlılığının engellenmesinde çok büyük rolü vardır [2].

Karbon monoksit ayrıca mantarlar için enzim inhibitörü olarak önerilmiştir [13].

Süperkritik karbon dioksit (SC-CO₂) davranışı, patates polifenol oksidazı için inaktivasyonu araştırılmıştır. Enzimlerin davranışı yüksek basınçta CO₂ (58 atm) aktivite kaybı gözlenmiştir; dahası 30 dakika için enzim aktivitesindeki kayıp % 91 olarak not edilmiştir [15, 18].

PPO enziminin inaktivasyonunda SO₂ kullanımı etkili olmaktadır. SO₂, ortamda bulunan oksijeni harcayarak ve oluşan yükseltgenmiş polifenollerle veya kinonlarla reaksiyon vererek enzimin aktiflik göstermesine engel olmaktadır [2].

Kirazdan izole edilen enzim için pH 5,0'te inhibisyonu incelenmiş ve inhibitör olarak sodyum azide, sodyum metabisulfit, askorbik asit ve EDTA'nın inhibisyon etkisi bulunmuştur [29].

Anamur muzundan izole edilen enzim için katekol substrat olarak kullanılarak inhibitör konsantrasyonları 2 ve 4 mM alınmıştır. Bu koşullarda askorbik asit için sırasıyla % 98 ve % 100 inhibisyon, sodyum metabisulfit için sırasıyla % 52 ve % 98 inhibisyon gösterilmiştir. Sitrik asit ve sodyum klorür için bu konsantrasyonlarda inhibisyon bulunamamıştır [30].

Yer elmasından izole edilen enzim için askorbik asit, sodyum azid, sodyum metabisulfit, potasyum siyonür, tiyoüre için yarışmalı inhibisyon gözlenirken β-merkaptan etanol ve sodyum dietil dikarbomat için yarışmasız inhibisyon yaptıkları gözlenmiştir [31].

3.9. PPO enziminin aktivatörleri

Aktivatörlerin, enzimin içerdiği monomerlerindeki Cu^{+2} iyonlarının ve bakırlı oligamerlerin etki gösterdiği ve enzimin aktive göstermesi için gerekli polimerizasyonu sağladığı düşünülmektedir.

Örneğin ortamda Cu^{+2} iyonlarının ilavesi ile kırmızı turptaki enzim aktivitesinin arttığı, ama bunun patatesteki enzimi etkilemediği görülmüştür.

Dimetil sülfoksitin armut PPO'nun aktivitesini önemli derecede arttırdığı görülmüştür.

Suni gübrelerde bulunan eser elementler, olgunlaşmayı hızlandıran maddeler ve iyonlaştırıcı maddelerin enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.

Üzümde elde edilen PPO enziminin asidik pH'ta veya üre ile kısa muamelesinden sonra aktivitesinin 4-10 kat arttığı görülmüştür

Manganezyum gibi elementlerin elma, patates, yulaf ve domates PPO aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Özellikle yüksek PPO aktivitesi kabuk kısmında yer almaktadır. Yeşil yapraklarda bulunan PPO enzimi aktivitesinin en yüksek olduğu yer ise kloroplastlar olduğu belirlenmiştir [2].

Polifenol oksidazların moleküler ağırlıklarının şartları, genel olarak farklı oldukları bilinmektedir. Değişik polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlıkları enzimin elde edildiği kaynağına göre değişir. Bitki polifenol oksidazlarının molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 144,000 Da. Mantar polifenol oksidazın genel olarak kabul edilen molekül ağırlığı 128,000 Da' dır. Buna karşın birçok mantar türünde polifenol oksidazın moleküler ağırlıkları 46,000 ile 88,000 Da arasında değişmektedir.

Örneğin, *Neurospora crassa* polifenol oksidazın molekül ağırlığı 46,000 Da'dır.. *Aternaria* da 88,000 Da'dır. Bakterilerde, *Streptomyces glaucens* ve *Streptomyces antibioticus* polifenol oksidazın molekül ağırlıkları sırasıyla 30,900 ve 30,736 Da'dır.

Değişik polifenol oksidazların izoelektrik noktaları kaynaklarına göre değişir. Basidiomycete'ın pI oranları 3,3 ile 5,0 arasında değişir. Cynodon hirsutus pI oranı 4,0'dır [1-2].

Polifenol oksidaz aktivitesinin substrat tüketim miktarının oranına göre ya da ürün oluşum oranı ile kararlıdır. Substrat tüketim oranının karalılığı, O₂ bağlama oranı bağlıdır. Ürün oluşum karalılığı spektrofometrik olarak ürünün görünen renkli bileşiklere bağlıdır [16].

Meyve ve sebzelerin olgunlaşma süresince, içerdikleri PPO enziminin aktivitesi değişmektedir. Ham meyvelerde, PPO aktivitesi ve dolayısıyla renklenme daha fazla olmaktadır. Zeytinin olgunlaşması sırasında o-difenol konsantrasyonu arttığı, enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür.

Bitkilerin içediği PPO enzimi, onların yetiştirilmesi esnasında tarımsal tekniklerinden etkilenebilir. Örneğin, şeker pancarı yetiştirilmesi esnasında toprak bakır ile muamele edildiği zaman yapraklarda bulunan enzimin aktivitesinde artış görülmüştür [1-2].

3.10. PPO Enziminin tıptaki kullanım alanları

PPO enzimi, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda da dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç hapsedilmesi myopolimer olarak da melaninden yararlanılmaktadır. Bundan başka, bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir.

Memelilerde tirozinazın aktif biçimi, melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunmaktadır. Tirozinazın bir substratı

olan 4-hidroksianizolün farelerde Harding-Passey melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Tirosinazın kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA'nın üretimidir [1].

3.11. Atık Sularda PPO Enzimi ile Fenol Tayini

Dünyada ve ülkemizde 80'li yıllardan sonra hızlı bir endüstriyel değişim meydana gelmiştir. Bu değişimle birlikte öncelik üretime verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerine etkileri pek fazla düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıklardan en önemlilerinden biriside fenol ve fenol türevleridir.

Önemli bir endüstriyel atık olan fenolün dünyadaki ve ülkemizdeki kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Fenolik reçineler, kâğıt endüstrisi, kauçuk işletme endüstrisi ile yalıtım ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretiminde kullanılmaktadır. Bunun dışında fenol, ilaç endüstrisinde, temizlik ürünlerinin imalatında kullanılmaktadır [32].

Fenoller zehirli olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin öldürücü dozları deri tarafından absorblanabilir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir. Fenol içeren suların içilmesi böbrek bozukluklarına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere neden olabilir. Klor içeren fenollerin zehirleyici etkisi ise izomere bağlı olarak değişir. Klorlu fenollerin çoğu deride ve gözde oldukça yıpratıcı özelliklere sahiptir ve yine zehirleyici miktarları deri tarafından absorblanabilir [33].

Fenol ve fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri, gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve spektrofotometrik yöntemler olarak sıralanabilir. Bunların dışında çok azda olsa elektrokimyasal yöntemlerde vardır. Son yıllarda enzim elektrotlarda fenol ve fenol bileşiklerinin tayininde kullanılmaktadır

Fenol tayininin enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonun elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak indirgenmesi esasına dayanılarak yapılması düşünülmüştür.

Bu amaçla yapılan çalışmalar göstermiştir ki; enzimatik yolla açığa çıkan kinonların bozulduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla kinonların bozulma sorunu giderilmeden fenol miktarının doğru tayin edilemeyeceği gözlenmiştir [32].

Özellikle PPO çeşidi olan tirozinazın toksik olan fenolik bileşikleri uzaklaştırmada kullanılabileceğinin ortaya çıkmasıyla bu konu üzerinde daha yoğun çalışmalar sürdürülmüş ve bilim adamları bu çalışmaların mühendislik alanına taşınmasının gerektiğini bildirmişlerdir.

Araştırmalar sonucunda; Atlow ve arkadaşları endüstriyel atık sularından 0,01-1,0 g/L konsantrasyon aralığındaki fenollerin başarıyla çöktürülerek ortamdan uzaklaştırılabileceğini söylemişlerdir. Ancak Wada ve arkadaşları bu araştırmacılarla uyuşmayan sonuçlar bildirmişlerdir. Wada ve arkadaşları “polifenollerin tirozinazla polimerizasyonundan sonra, herhangi bir çökeleğin oluşmadığını ve çözeltinin renginin, renksizden kahverengiye dönüştüğünü” açıklamışlardır. Wada ve diğer araştırmacılar, tirozinazın saflığının çökeltmenin oluşmasında büyük rol oynadığını düşünmektedirler. Çökeltme gözlenmediğine göre, reaksiyon ürünlerinin ortamdan alınması için, kitin gibi maddeleri adsorbans olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucu, oksidasyon ürünü olan kinonların ve diğer yan ürünlerin adsorplanarak ortamdan uzaklaştırılması için kitosanın başarıyla kullanılabileceği görülmüştür [34].

BÖLÜM 4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1 Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada, Sakarya yerel marketten alınan badem çağlası (*Prunus dulcis*) PPO enziminin izolasyonu için kullanılmıştır. Çağla, sert çekirdekli bademin yeşil ve körpe haline verilen addır. Geniş ölçüde tohumla üretimin yapıldığı badem, yeşil kabuklu çağla devresinden itibaren tüketilen bir meyve türüdür. Çiçeklenme başlangıcında -3 ile -4 °C ve çağla döneminde de -1 ile -0,5 °C’de zarar görürler [35].

Çağla başlıca magnezyum ve potasyum olmak üzere sodyum, kalsiyum, demir ve bakır kaynağıdır. Çağla (badem) kanser ve kalp krizine karşı koruyucudur. Antioksidan olarak, en fazla E vitamini ihtiva eder. Yapılan çalışmalarda % 35 oranında alfa-tokoferol ihtiva ettiği bulunmuştur [36].

Bu çalışmada kullanılan, polivinil pirolidon (PVP), amonyum sülfat, sefadeks G-100, 4-metil katekol (4-MK), katekol, pirogallol, gallik asit, kafeik asit, L-tirozin, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), bovine serum albumin (BSA), sodyumdodesil sülfat (SDS) ve tampon çözelti hazırlamada ve diğer işlemlerde kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, trizma-HCl ve trizma-base, sodyum asetat, asetik asit, etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), askorbik asit, tiyoüre, benzoik asit, sodyum azid, sodyum klorür, glisin, Coomasie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 kimyasalları Sigma kimyasal firmasından sağlanmıştır.

Çalışmada Shimatzu UV-2401 PC UV-VIS recording spectrophotometer marka UV cihazı ve nüve, NF 8000R marka ultra soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

4.2 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu

İzolasyon işlemi için 500 gram çayla kullanılmaya kadar -20 °C'de depolanmıştır. Çekirdekleri temizlenmiş halde 10 gram çayla ince dilimler halinde doğranmıştır. %0,5 polivinil piroidon (PVP) ve 0,01 M askorbik asit içeren 50 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti ile 5 dakika boyunca karıştırılarak blender da parçalanmıştır. Bu karışım ham enzim ekstratı olarak adlandırılmıştır.

4.2.1 Amonyum sülfat çöktürmesi

Ham enzim ekstratı hızlı bir şekilde süzöldükten sonra, süzöntü soğutmalı ultra santrifüjde 4 °C de 14000 rpm de 25 dk süresince santrifüjleşmiştir. Elde edilen süpernatant, doymun amonyum sülfat çözeltisi kullanılarak %30 doymunluğa getirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürme işlemleri için kullanılacak olan amonyum sülfat miktarları için aşağıdaki formöl kullanılmıştır.

$$g(\text{amonyum}_\text{sülfat}) = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0.3S_2}$$

S_1 = mevcut amonyum sülfat doymunluğu

S_2 = istenilen amonyum sülfat doymunluğu

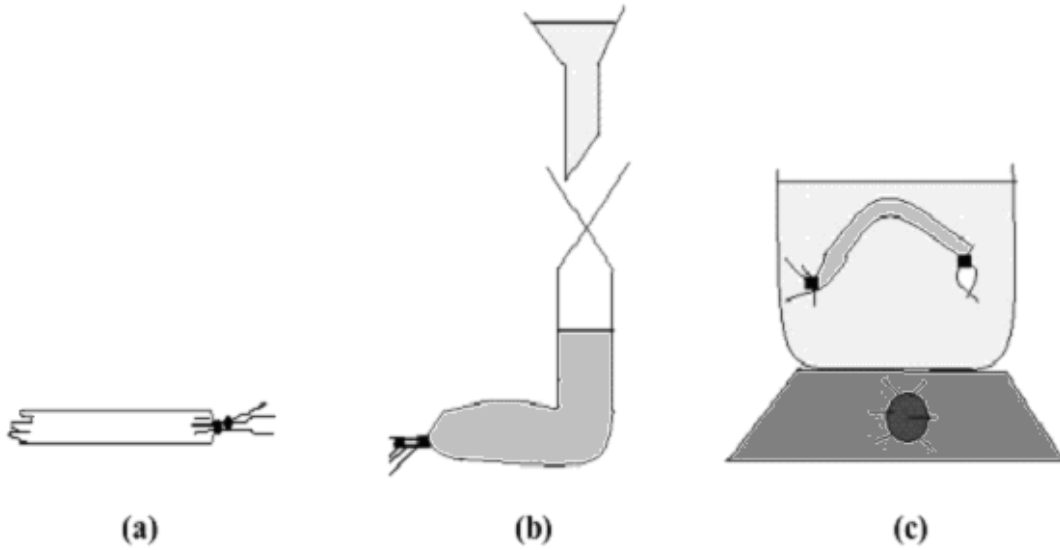
Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham enzim ekstratına katı amonyum sülfat yavaş yavaş ve az miktarlarda ilave edilmiş ve her ilave sonrasında daha önce eklenen katı amonyum sülfatın çözönmüş olmasına dikkat edilmiştir. Çöken PPO enzimleri 4 °C'da 14000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmiş ve daha sonra çöken PPO enzimi, az miktarda fosfat tamponunda (pH 7,0) çözölmüştür.

4.2.2 Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları genellikle moleköl ağırlığı 10,000'den daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar

küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye ise çalışılan hacme bağlı olarak, genellikle 4-6 saatte ulaşılır. Dengeye ulaşıldıktan sonra, eğer dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, istenilen ayırım tamamlanuncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir.

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (selüloz, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek veya konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdaki uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür (Şekil 4.1) [1].



Şekil 4.1. Genel diyalizin uygulanış şekli a.Diyaliz tüpünün bağlanması, b.Diyaliz tüpünün doldurulması, c.Tuzların uzaklaştırılması

Santrifüjleme işleminden sonra süpernatant diyaliz torbalarına doldurulmuştur. 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak diyaliz işlemi başlatılmıştır. Belli bir dengeye

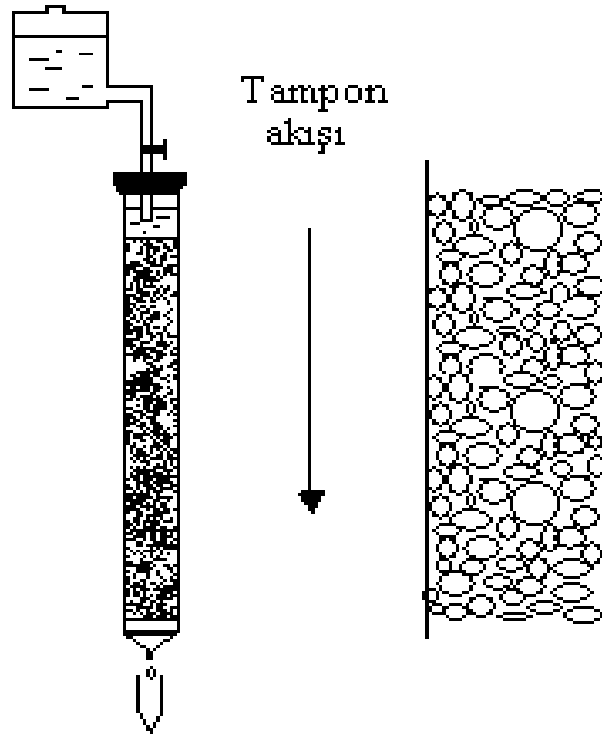
geldikten sonra tampon çözeltisi değiştirilmiştir. Bu işleme 3 defa tampon çözelti değiştirilerek 24 saat boyunca devam edilmiştir.

Amonyum sülfat ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim artık kısmen saf hale gelmiştir. Elde edilen kısmen saf enzim çözeltisi, daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere kapaklı cam tüplerde -20°C 'de derin dondurucuda depolanmıştır. Bu enzim, daha sonraki kinetik çalışmalar optimum pH ve sıcaklık, depolama ve kararlılık gibi karakterizasyon çalışmalarında ve sonraki saflaştırma adımları olan jel filtrasyon kromatografisinde ve poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılmıştır.

4.2.3. Jel filtrasyon kromatografisi

Proteinlerin molekül büyüklüklerinin farklı olması dolayısıyla yapılan bir ayırma yöntemidir. Moleküller, dolgu maddesi (jel) ve çözücü sistemi arasında dağılır. Kolona verilen büyük moleküller, jel taneciklerinin boyutundan çok büyük ise kolonu önce terk eder. Küçük moleküller ise jel tanecikleri içine girerek orada alıkonurlar. Kolonun üzerine sürekli çözücü verilerek jel taneciklerinde bulunan küçük moleküller elue edilirler. Orta boyuttaki moleküller ise jel taneciklerine tamamen girememektedir. Bu nedenle moleküller kolondan büyüklüklerine bağlı olarak elue edilmektedir. (Şekil 4.2) [37].

1,5 gram Sefadex G-100, 50 ml 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) 4 gün bekletilerek jel oluşması sağlanmıştır. 1 cm çapında ve 50 cm boyundaki kuru bir kolonun dibine cam pamuğu yerleştirilip üzerine tampon çözelti ilave edilmiştir. Üzerine tampon çözeltisi ilave edilmiştir



Şekil 4.2. Jel filtrasyon kromatografisi

Sefadex G-100 bir huni yardımı ile kolona verildikten sonra musluk açılarak jelin kolona homojen olarak yerleşmesi sağlanmıştır. Kolonun üzerinden tampon çözeltisi geçirilerek akış hızı ayarlanmıştır. Kolon tampon içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra enzim numunesi 15 ml halinde kolona uygulanır. 1,5 ml'lik kısımlar halinde toplanmıştır. 18 dakika sonra ilk numune alınmaya başlanmıştır. Proteinin varlığı bradford çözeltisi ile varlığına bakılmıştır. 4-25 tüp aralığında mavi renk gözlenmiştir.

4.3. Polifenol oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1. Substrat spesifikliğı

Optimum substratı belirleyebilmek amacı ile PPO enziminin 5 farklı substrat karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, gallik asit, kafeik asit, L-tirozin substrat olarak kullanılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren enzim karakterizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

4.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu

En yüksek aktiviteyi bulabilmek için kullanılan tüm substratlar 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 50 mM, çözeltileri kullanılarak en fazla aktivite gösterdikleri konsantrasyon belirlenmiştir.

4.3.3. pH etkisi

PPO enzimi aktivitesi farklı pH'larda 3,6-9,0 arasında hazırlanmış 5 farklı substrat kullanarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, gallik asit, kafeik asit,) tayin edildi. Bu substratlardan stok çözelti olarak kafeik asit 20 mM; 4-metil katekol ve katekol 10 mM; pirogallol ve gallik asit 8 mM olarak hazırlanmıştır.

Bunların enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

pH: 4,6-9,5 arasındaki çeşitli tampon çözeltiler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

pH'ları 4,6-5,0 arasındaki tamponları hazırlamak için;

10,52 gram sitrik asit monohidrat saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti A çözeltisidir. 14,705 gram sodyum sitrat saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti B çözeltisidir.

A ve B çözeltilerinin aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırılması ile istenilen pH'larda tamponlar hazırlanmıştır.

Tablo 4.1. 0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması

PH	A (ml)	B (ml)
3,6	35	20
4,5	25	27
5,0	25	58

pH'ları 6,0-7,5 arasındaki tamponları hazırlamak için;

Bu tamponların hazırlanmasında $pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$ formülü kullanılmıştır.

pH'ları 7,5-9,5 arasındaki tamponları hazırlamak için;

Trizma -HCl ve Trizma-Base'dan aşağıda verilen miktarlarda tartılıp saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tablo 4.2. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

PH	Trizma -HCl	Trizma-Base
8.0	3,59 g	3,66 g
8.5	1,1 g	4,36 g
9.0	0,23 g	7,45 g

4.3.4. Sıcaklığın etkisi

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °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. Bu çalışmada substrat olarak katekol (10 mM) kullanılmıştır.

4.3.5. Enzim kinetiği

Enzim maksimum hızı (V_{max}) ve Mizhaelis-Menten sabiti (K_m) bulunması için kinetik çalışmalar 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM'lık 4-metil katekol, katekol, kafeik asit substrat, çözeltileri 100mM'lık stok çözeltileri (pH 7,0) kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra spektrofotomerik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

4.3.6. İnhibitör etkisi

PPO enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisini incelemek için 7 adet inhibitör sodyum azide, tiyoüre, EDTA, benzoik asit, askorbik asit, sitrik asit, sodyum klorür kullanılmıştır. Her inhibitör için farklı konsantrasyonlarda katekol kullanılarak ne tür inhibisyon yaptıkları bulunmuştur. Her bir inhibitör için K_i ve I_{50} değerleri bulunmuştur.

4.3.7. Metallerin etkisi

PPO enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak ağır metaller ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir.

Ağır metallerin etkisini incelenmesi amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+3} , Mn^{+4} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+} metal iyon çözeltilerinden 2 mM, 4 mM, 10 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir.

4.3.8. Enzimin depolanma kararlılığı

Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek amacıyla ilk önce oda sıcaklığında aktivitesindeki azalma saat başı 420 nm'deki 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Burada substrat olarak katekol 10 mM olarak kullanılmıştır.

Enzimin -20 °C'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim -20 °C'de saklanarak 24 saatte bir 420 nm'deki 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedildi. Yine substrat olarak 10mM katekol kullanılmıştır.

4.3.9. Bradford metodu

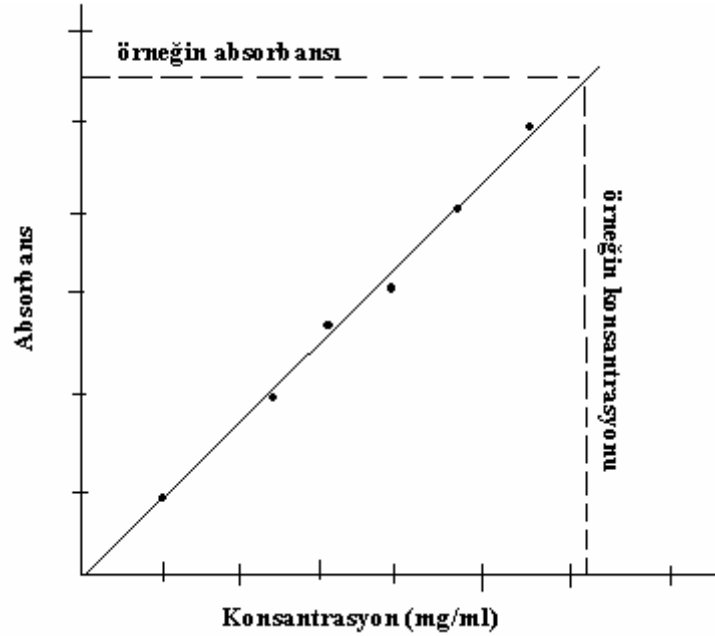
Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5-100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbans verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir.

Anlatılan metotların yanı sıra protein tayini yapılırken, koşullar uygun olduğu takdirde, Smith yöntemi, Kjeldahl analizi, bulanıklık ölçümleri (turbidimetri), özgül aktivitenini ölçülmesi, kırılma indeksinin ölçülmesi (refraktometri) ve saflaştırılıp kurutulmuş örneklerin doğrudan, tartılması yöntemlerinden de faydalanılabilir [37].

4.3.9.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini

Bradford yöntemi Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır.

Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Bu deneyde standart protein çözeltileri, sığır serum albumini (BSA) kullanılarak hazırlanmış ve standart grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Bradford yönteminin standart grafiği

Bu amaçla bizim çalışmamızda standart protein grafiğinin elde edilmesi için 1 mg/ml serum albumin miktarı olacak şekilde 250 ml serum albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözümden 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl alınmıştır. Hacim 1ml Bradford ile tamamlanmıştır. 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart protein grafiği elde edilen sonuçlara göre çizilmiştir. Jel filtrasyon ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen kısmen saf enzim 595 nm'de absorbansı ölçülerek standart standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir.

4.3.10. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)

Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Çözülmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda hareket (göç) etmeleri prensibine dayanır [1].

En yaygın kullanım alanı olan elektroforez tipidir. Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Akrilamid/bisakrilamid oranı yükseldikçe jellerde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik artar, daha kolay yıkanır.

Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşme derecesi; sıcaklık, pH, amonyum persulfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar.

Poliakrilamid jel elektroforezi; SDS-PAGE (denatüre edici page), ND-PAGE (non denatüre edici page) olarak ikiye ayrılır.

ND-PAGE (non denature edici page); Proteinlerin doğal (intakt) yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE yöntemidir. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi direk olarak saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir.

SDS-PAGE (denatüre edici page); SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlerde yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır [37].

4.3.10.1. Native jel elektroforezi (ND-PAGE)

Kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici maddeleri içermediğinden, prosedür doğal koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem, protein içeren karışımların ayrılmasında, bir protein ya da protein kompleksinin aktivitesi veya yapısı ile ilgili elektroforetik çalışmalarda, proteinin saflığının kontrolünde ve oligomerik proteinlerin ayrılmasında kullanılır.

Native jel elektroforezi (ND-PAGE) için ekstraksiyon işleminden sonra 3 kısım stok enzim çözeltisi ile 1 kısım native örnek tamponu ependorf tüpünde karıştırıldı. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması ek1'te verilmiştir.

Ayırma jeli (% 7,5)' ün hazırlanması Tablo 4.3.'te verilmiştir. Bu karışım daha önce hazırlanan cam plaklar arasına üstte yaklaşık 4-5 cm kalacak şekilde dökülüp üzerine izopropil alkol eklenerek düz bir şekilde polimerizasyonlaşması için 30 dk bekletilmiştir.

Polimerizasyondan sonra üzerine hazırlanışı Tablo 4.4.'te verilen yoğunlaşma jeli (% 5)'lik üzerine dökülerek tarak uygun bir şekilde yerleştirilerek polimerizasyonun gerçekleşmesi için 20 dakika bekletilmiştir [38].

Tablo 4.3. % 7,5'luk ayırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Büyük elektroforez tek jel için (ml)
Destile su	8,74
Ayırma tamponu (pH 8,8)	17,12
% 30'luk akrilamid/bisakrilamid	8,66
TEMED	0,173
% 10'luk amonyum persülfat	0,0163

Tablo 4.4. % 4,5'lik yoğunlaştırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Büyük elektroforez tek jel için (ml)
Destile su	1,64
Ayırma tamponu (pH 8,8)	5,86
% 30'luk akrilamid/bisakrilamid	2,5
TEMED	0,060
% 10'luk amonyum persülfat	0,010

Yoğunlaşma jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak çıkarılarak numuneler yerleştirilmiştir. Ayırma jeli ve yoğunlaşma jeli boyunca 250 voltluk 70 amperlik sabit akım uygulanarak elektroforez tamamlanmıştır. Aktivite bantlarının gözlenmesi için jel bir gece 50 mM 250 ml substrat çözeltisinde bekletildi. Yıkama çözeltisi ile yıkanarak bantların fotoğrafı çekilmiştir.

BÖLÜM 5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması

PPO enzimi izolasyonu, bölüm 4.2.'de anlatıldığı gibi % 0,5 piroidon (PVP) ve 0,01 M askorbik asit içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, çağlada bulunan fenolik maddeleri bağlayarak, PPO enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzimi inhibe edebilmektedir. Askorbik asit izolasyon sırasında oluşan o-kinonları azaltmak amacı ile kullanılmıştır ve kendisi yükseltgenir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işleminde elde edilen saflaştırılmış enzim ile kinetik çalışmalar yapılmıştır. Enzim -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

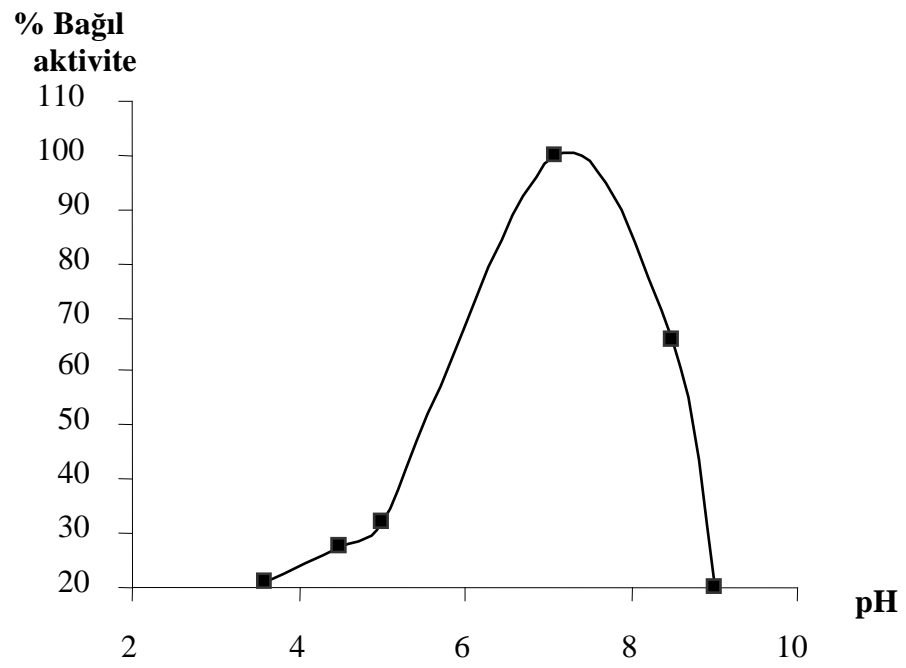
5.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu

5.2.1. pH etkisi

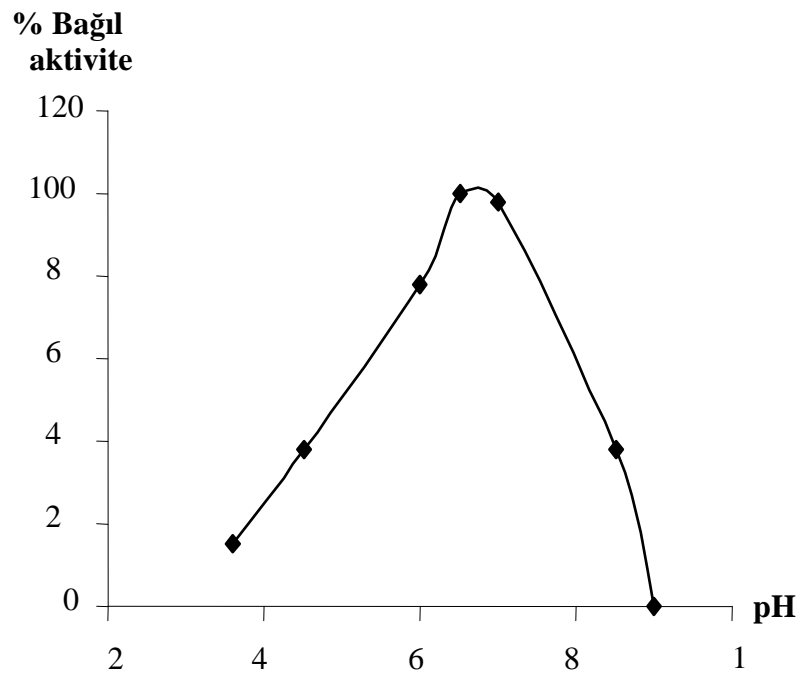
Altı farklı substrat kullanılarak PPO enziminine karşı aktivite varlığı tespit edilmiştir. Aktivite gösteren substratlar için optimum pH değerleri belirlenmiştir.

d'Anjou armudu, kayısı ve kuru erik, Clingstone şeftalisi, erik, Concord üzümü gibi meyvelerde bulunan PPO enziminin genellikle nötral pH'ta veya buna yakın pH'larda en aktif olduğu belirlenmiştir.

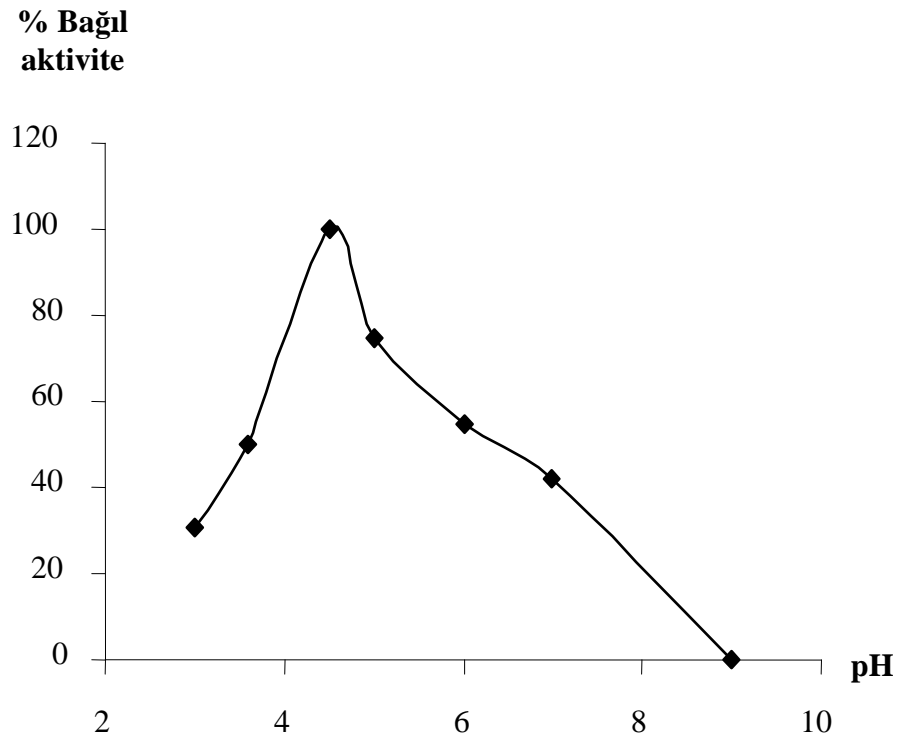
Bu çalışmada, katekol ve 4-metil katekol bu genellemeye uyduğu görülmüştür (Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.). Diğer substratlar için elde edilen değerlere göre optimum pH'lar asidik değerlerdedir (Şekil 5.3 ve Şekil 5.4).



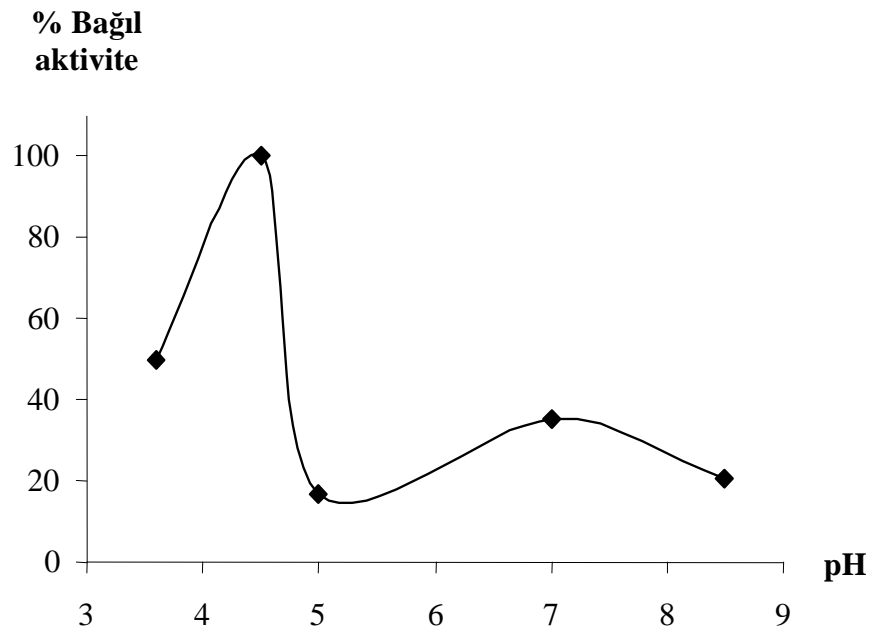
Şekil.5.1. Katekol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi



Şekil.5.2. 4-metil katekol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi



Şekil.5.3. Kafeik asit substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi



Şekil.5.4. Pirogallol substratı ile enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

Bulunan optimum pH değerlerinin farklı olması enzimin elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Aynı zamanda kullanılan substratlarda optimum pH'ları etkilemektedir.

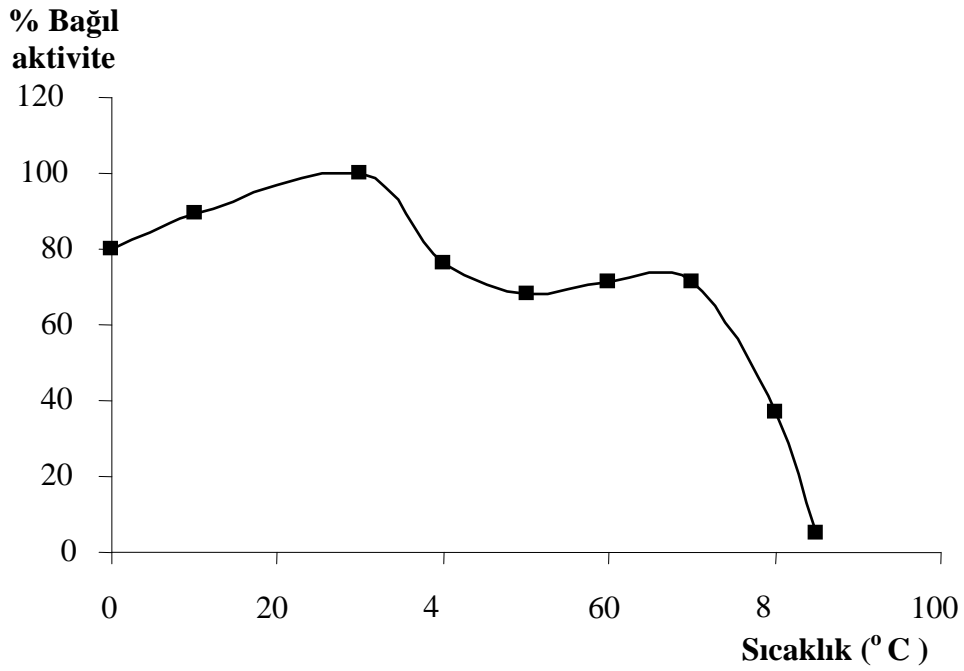
Bu çalışmada katekol substrat olarak kullanıldığı koşullarda enzim aktivitesinin için optimum pH 7,0 olarak bulunurken aynı koşullarda 4-metil katekol için 6,5, kafeik asit ve pirogallol için optimum pH 4,5 olarak bulunmuştur.

şekil 5.4.'te pirogallol için iki farklı pH değerinde artış gözlenmektedir. pH 7,0 bulunan artış suni bir artış olarak değerlendirilmiştir. Bu artışın nedeni ortamın sıcaklığı, hava oksijeninin etkisi, kişisel deney hataları olarak verilebilir.

5.2.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 4.3.4.'de anlatıldığı gibi yapılan, katekol substrat olarak kullanılarak enzim aktivitesinin 9 farklı (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C'lerde) sıcaklıkta belirlenmesi deneylerinde elde edilen sonuçlar sıcaklığa karşı bağlı aktivite cinsinden grafiğe alınmıştır.

şekil.5.5. incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın (optimum sıcaklık) 30 °C olduğu görölmektedir. Bu sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede azalma görölmektedir. Bu da enzimin sıcaklıkla kısmen inaktive olduğunu göstermektedir. 50 °C'den sonra enzim aktivitesi sabit kalmış 60 °C'nin üzerinde çok az aktivite göstermiştir. 80 °C'de 20 saniyede tamamen inaktivite olmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, ağladaki kararım sıcaklığın artırılmasıyla önlenebilecektir.

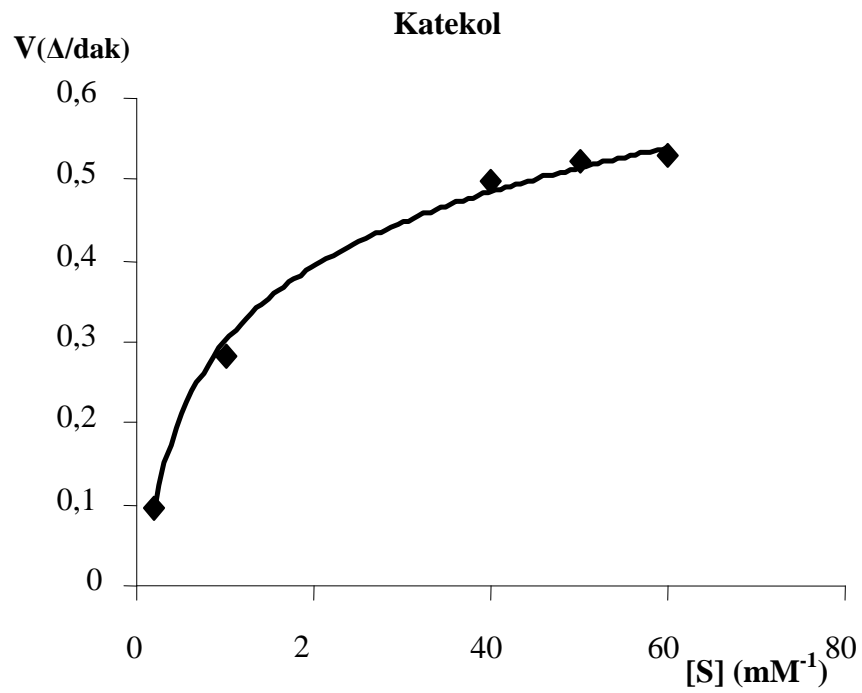


Şekil.5.5. PPO enziminin sıcaklığa etkisi

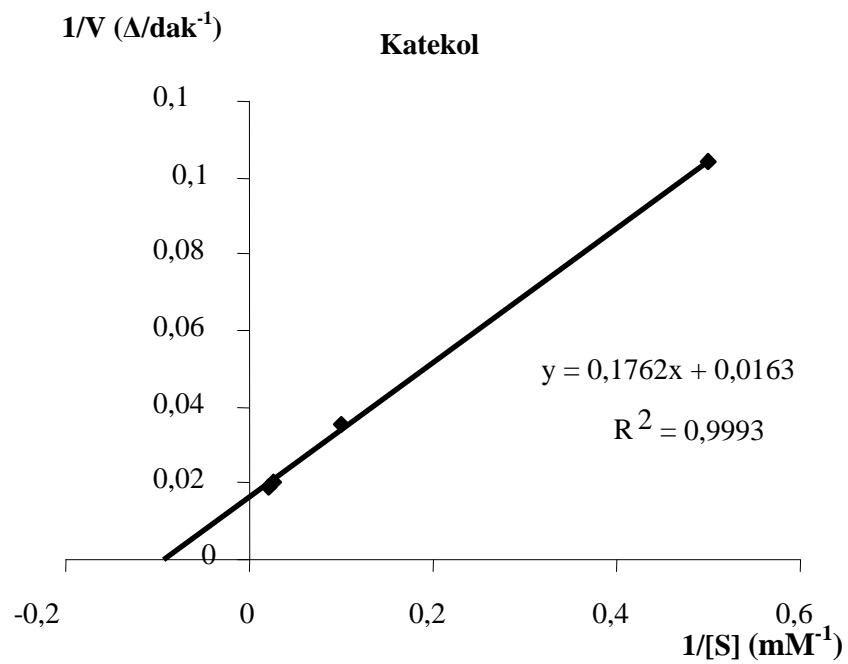
5.2.3.Enzim kinetiği.

Enzim kinetik parametreleri olan V_{max} ve K_m değerleri Lineweaver-Burk grafiği ile belirlenmiştir. Kinetik çalışmada katekol, 4-metil katekol, kafeik asit substratları için yapılmıştır. Her bir substrat için farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır Her işlem en az üç kez tekrarlanmıştır.

K_m değeri, bir enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermekte olup, bu değer genellikle enzimin elde edildiği kaynağa ve kullanılan substrata bağlı olarak değişir.

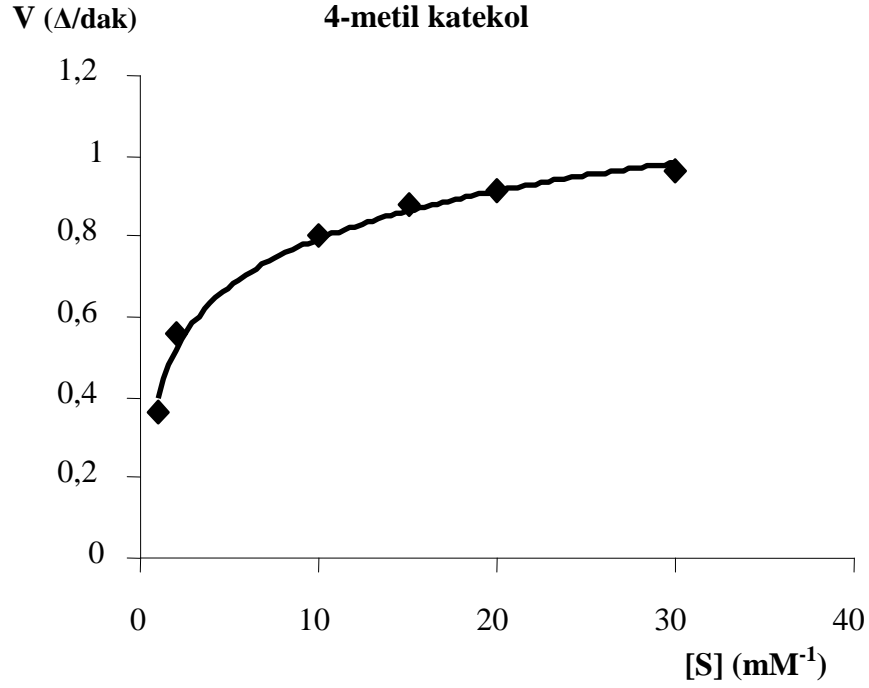


Şekil.5.6. PPO enziminin katekol substratına karşı Michaelis-Menten grafiği

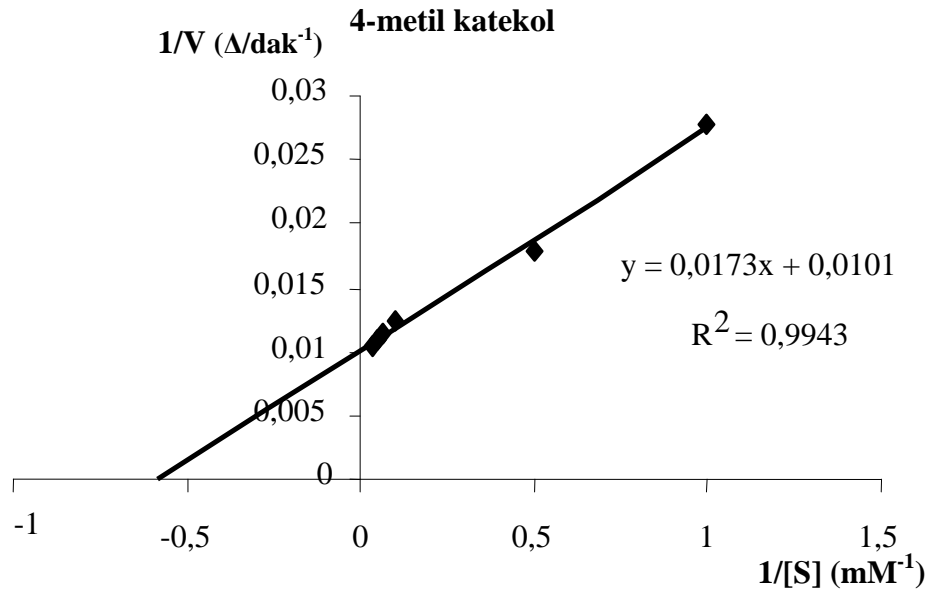


Şekil.5.7. PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği

PPO enzimi için katekol substrat olarak kullanıldığında Şekil 5.7. ve Şekil 5.6.'da verilen deney sonuçlarına göre K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış Tablo 5.1.'de gösterilmiştir.

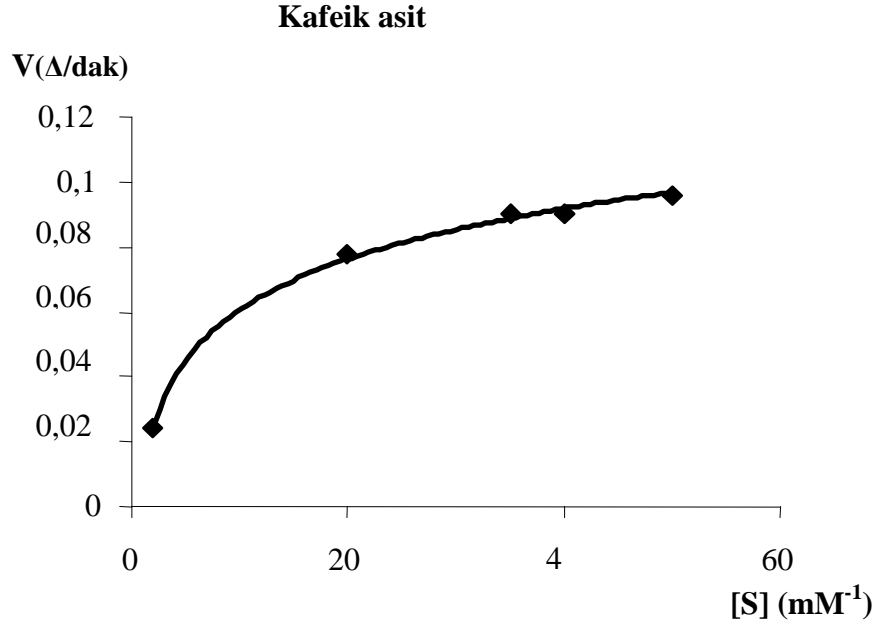


Şekil.5.8. PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Michaelis-Menten grafiği

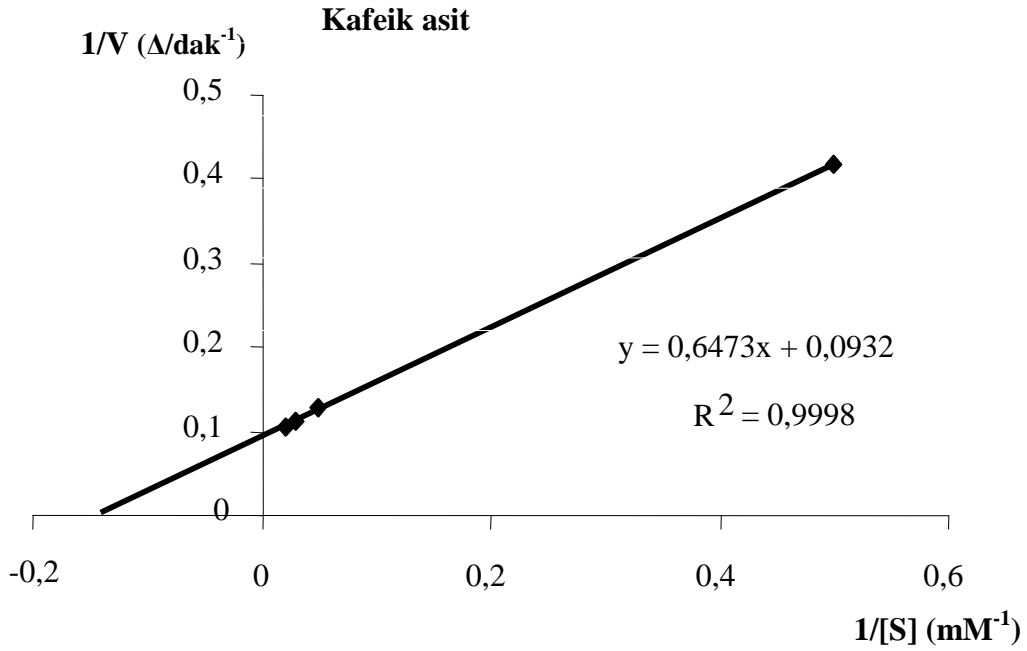


Şekil 5.9. PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği

PPO enzimi için 4-metil katekol substrat olarak kullanıldığında Şekil 5.8. ve Şekil 5.9.'da verilen deney sonuçlarına göre K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış Tablo 5.1.'de gösterilmiştir.



Şekil.5.10. PPO enziminin kafeik asit substratına karşı Michaelis-Menten grafiği



Şekil.5.11. PPO enziminin kafeik asit substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği

PPO enzimi için kafeik asit substrat olarak kullanıldığında Şekil 5.10. ve Şekil.5.11.'de verilen deney sonuçlarına göre K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış Tablo. 5.1.'de gösterilmiştir. Sonuçlardaki K_m değerlerine göre badem çağıla PPO'su için en iyi substrat 1,71 mM K_m değeri ile 4-metil katekol olarak bulunmuştur.

Tablo.5.1. PPO enziminin substrat spesifikliği

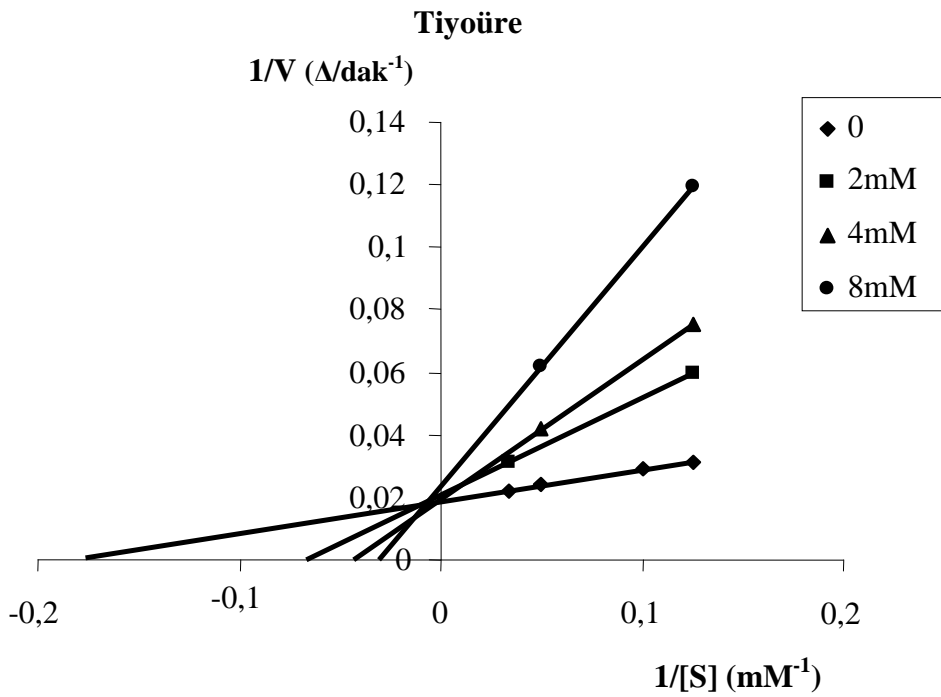
Substrat	pH	V_{max} (Δ/dak)	K_m (mM)
Katekol	7,1	62,5	10,80982 \pm 1,94
4-metil katekol	6,5	99,0099	1,712871 \pm 0,28
Kafeik asit	4,5	10,72961	6,45277 \pm 0,88
Gallik asit	-	-	-
Pirogallol	4,5	-	-
L-tirozin	-	-	-

Bu çalışmada, çağladan izole edilen PPO enzimi için gallik asit ve L-tirozin substrat olarak kullanıldığında enzimin aktivite göstermediği bulunmuştur. Pirogallol için optimum pH bulunurken enzimin kinetik çalışma yapabilecek kadar aktivite göstermediği bulunmuştur.

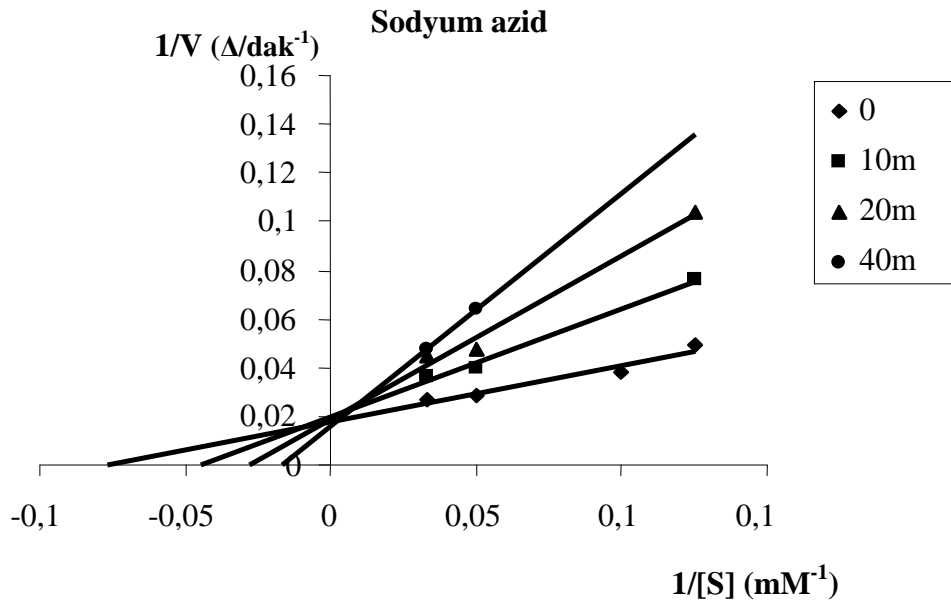
5.2.4. İnhibitörün etkisi

PPO inhibitörleri olarak bilinen, L-askorbik asit, sodyum azid, tiyoüre, benzoik asit, sitrik asit, sodyum klorür, EDTA moleküllerinin badem çağla PPO'su üzerine inhibitör etkileri bölüm 4.3.6. 'da anlatıldığı gibi incelenmiştir.

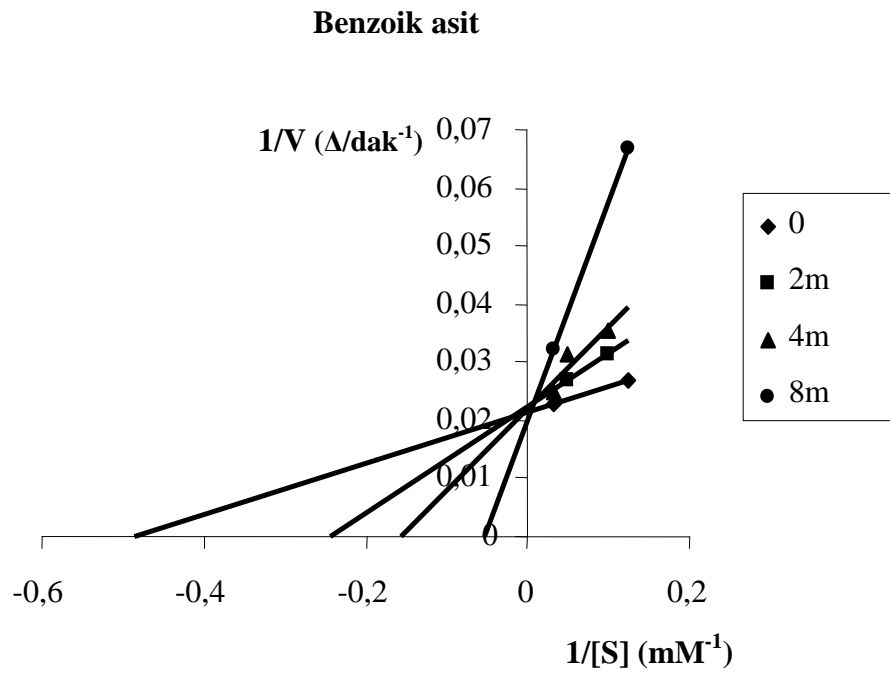
Bu çalışmada, L-askorbik asit, sodyum azid, tiyoüre, benzoik asit, sitrik asit için inhibisyon görülmüş ve çağlardan izole edilen PPO enzimi için bu inhibitörlerin yarışmalı inhibisyona neden oldukları Line-weaver Burk grafikleri ile belirlenmiştir (Şekil 5.12, Şekil 5.13, Şekil 5.14, Şekil 5.15 ve Şekil 5.16)



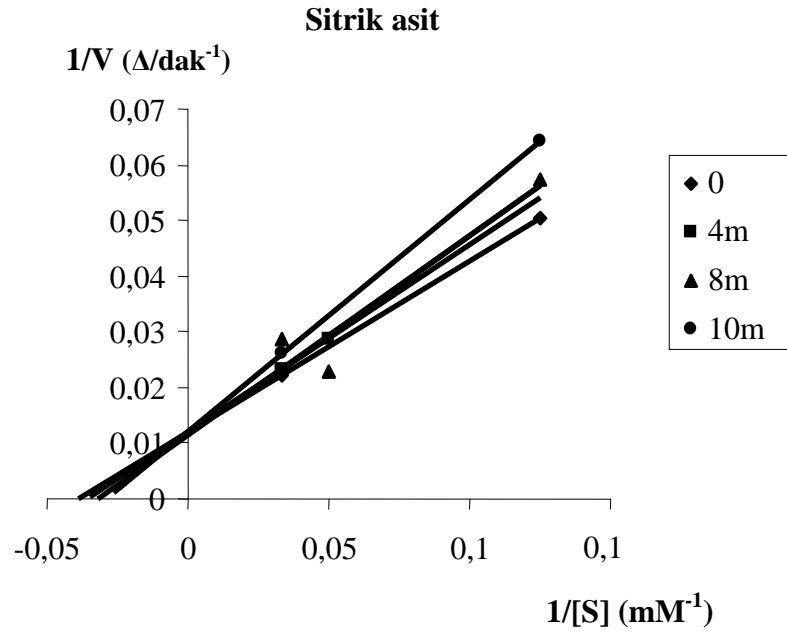
Şekil.5.12. Tiyoüre kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



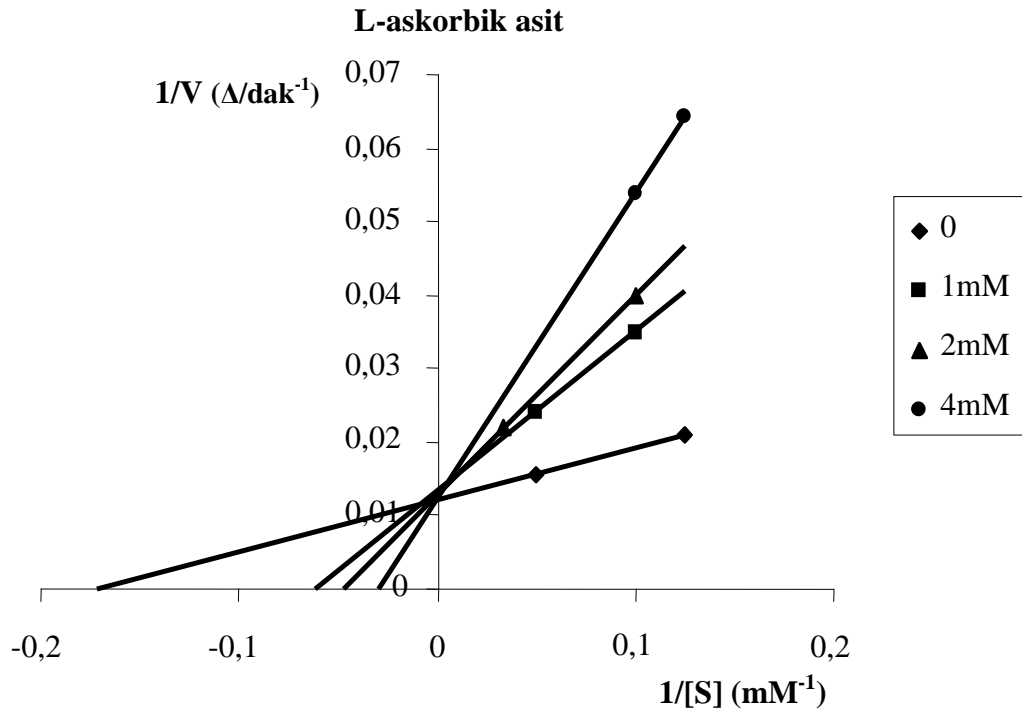
Şekil.5.13. Sodyum azid kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil.5.14. Benzoik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil.5.15. Sitrik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil.5.16.L-askorbik asit kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan bu çalışmada her inhibitör için üç farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Bu işlem en az üç kez tekrarlanmıştır. Bu konsantrasyonlar enzim aktivitesinin yarıya indiren I_{50} değerinin katları olarak belirlenmiştir. K_i değerleri bu konsantrasyonların katları olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 5.2.'de verilmiştir.

Tablo 5.2. PPO enziminin inhibisyon türleri, I_{50} ve K_i sabitleri

İnhibitör	I_{50}(mM)	İnhibisyon Türü	Ortalama K_i (mM)
Tiyüre	4	Yarışmalı	$1,67 \cdot 10^{-3} \pm 0,23$
Sodyum azid	20	Yarışmalı	$12,47 \cdot 10^{-3} \pm 0,78$
Benzoik asit	4	Yarışmalı	$1,67 \cdot 10^{-3} \pm 0,23$
Sitrik asit	4	Yarışmalı	$4,18^{-2} \pm 6,62$
Askorbik asit	2	Yarışmalı	$7,10^{-4} \pm 0,08$
EDTA	-	-	-

Tablodan görüldüğü gibi en iyi yarışmalı inhibitörün $1,66$ mM K_i değeri ile tiyüre ve benzoik asit olduğu belirlenmiştir.

5.2.5. Metallerin etkisi

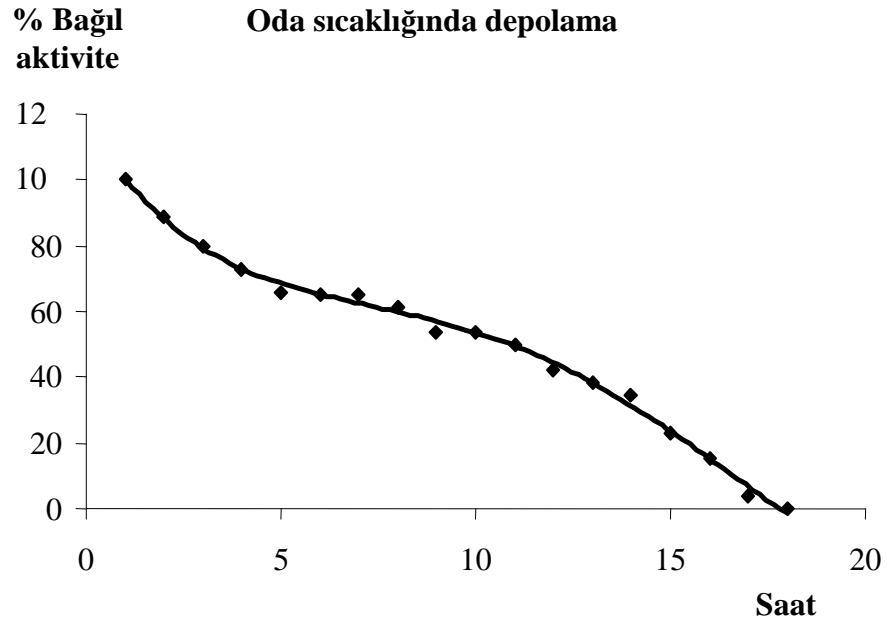
Bitkilerin içerdiği PPO enzimi, onların yetiştirilmesi esnasında tarımsal tekniklerinden etkilenebilir. Ağır metallerin etkisini incelenmesi amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında (10 mM) Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+3} , Mn^{+4} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} metal iyonların etkisi yüzde olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 5.3. incelendiğinde Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} , Pb^{+2} , nin aktivatör buna karşılık diğer metallere Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Sn^{+2} ve K^{+1} ise inhibitör olduğu Na^{+1} , Li^{+1} ve Hg^{+2} ise badem ç ağla PPO' su üzerine etki göstermediği gözlenmiştir.

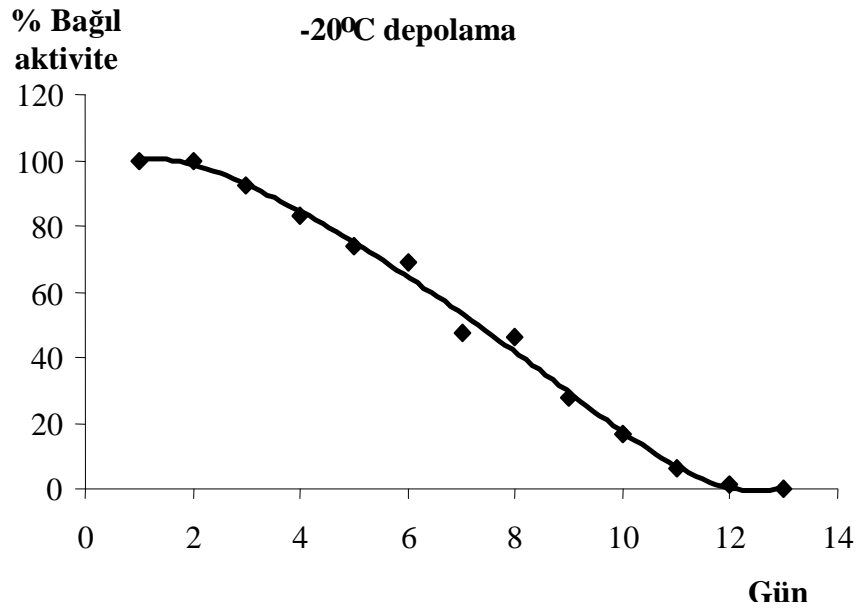
Tablo.5.3. PPO enzimine ağır metallerin etkisi

Metaller	% aktivasyon	% inhibisyon
Fe^{+3}	150	yok
Cu^{+2}	50	yok
Zn^{+2}	yok	29
Mg^{+2}	yok	50
Hg^{+2}	yok	yok
Ba^{+2}	yok	50
Ca^{+2}	yok	77
Li^{+1}	yok	yok
Co^{+3}	yok	89
Mn^{+4}	157	yok
Pb^{+2}	125	yok
Sn^{+2}	yok	100
Na^{+1}	yok	yok
K^{+1}	yok	100

5.2.6. Enzimin depolanma kararlılığı



Şekil.5.17.Oda sıcaklığında depolama şartlarında enzim aktivitesinin zamanla değişim



Şekil.5.18. -20°C'de depolama şartlarında enzim aktivitesinin zamanla değişim

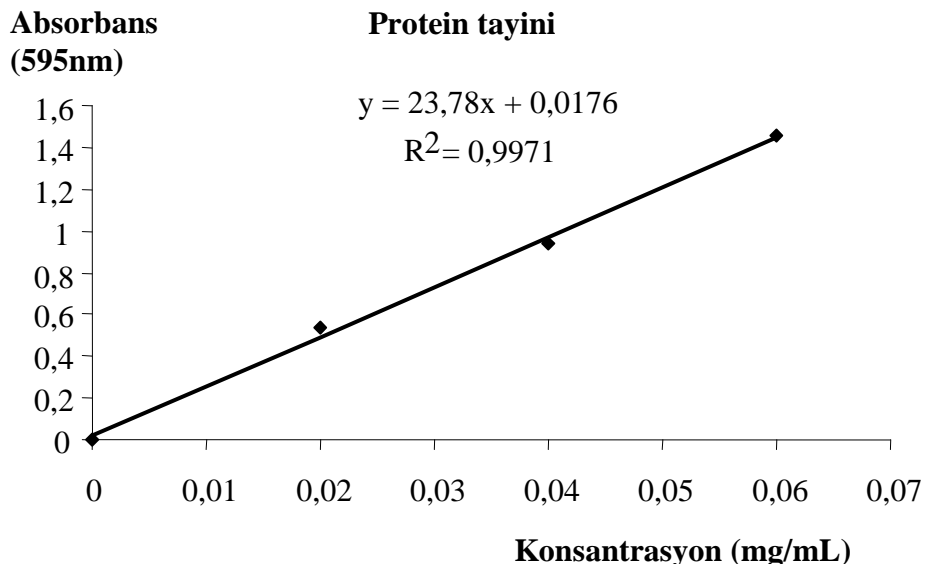
Bölüm 4.3.8.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında ve -20 °C'de depolama süresince kararlılığını incelemek amacı ile 10 mM katekol (pH 7,0) substratı kullanılmış; oda sıcaklığında her saat ölçüm alınırken, -20 °C'de her 24 saatte bir ölçüm alınmış ve enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, PPO enziminin aktivitesi ilk üç saatte % 11, yedinci saatte % 34, onuncu saatte % 46, onüçüncü saatte % 61, onaltıncı saatte % 86 azalarak on altıncı saatin sonunda PPO enzimi aktivitesinin kaybetmiştir. -20 °C'de ise PPO enziminin aktivitesi ilk iki günde % 0, yedinci günde % 47, onuncu günde % 83, azalarak onüçüncü gün sonunda PPO enzimi aktivitesinin kaybettiği belirlenmiştir.

5.2.7. Protein tayini

Bölüm 4.3.9.1. anlatıldığı gibi Bradford yöntemiyle protein tayinleri yapılmıştır. Standart BSA (Bovin Serum Albümin) çözeltilerinin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 5.19.'da gösterilen standart grafikten elde edilen aşağıdaki Eşitlik 5.1.'de yerine konularak bulunmuştur.

$$y = 23,78x + 0,00176 \quad (5.1)$$

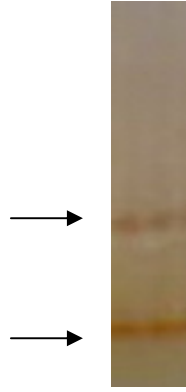


Şekil. 5.19. Bradford yöntemiyle protein tayin grafiği

Yaptığımız bu çalışmada çağla polifenol oksidazı için 595 nm’de okunan değerlere göre protein miktarı 20 µl enzim çözeltisi için 0,007 mg/ml bulunurken alınan 60 µl enzim çözeltisi için 0,028mg/ml olarak bulunmuştur.

5.2.8. Native jel elektroforezi (ND-PAGE)

Bölüm 4.3.10. ve 4.3.10.1.’de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda katekol substratı kullanılarak, PPO enziminin aktif bandları Şekil 5.20.’de gösterilmiştir.



Şekil. 5.20. Ham enzim ekstraktının katekol substratı ile elde edilen Native-PAGE band profili;

Şekil 5.20. incelendiğinde katekol substratı kullanılarak yapılan elektroforez işlemi sonucu PPO aktif bandlar elde edildiği görülmektedir. Elde edilen bu bantlardan enzimin iki alt birimin olduğu gözlenmiştir.

BÖLÜM 6. TARTIŞMLAR VE ÖNERİLER

Çalışmaya başlamadan önce yapılan fizibilite aşmasında birçok bitki türü denenmiş ve PPO aktivitesi çağla (Badem) için diğer birçok bitki türünde tespit edilen değerlere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Çağlanın antioksidant etkisinin bulunması ve aktivitenin yüksek olması nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir

Bu çalışmada, PPO enzimi pH 7,0 tamponu ile ekstrakte edilerek enzimin kinetik karakterizasyonu için çeşitli PPO substratları kullanılmıştır. Bunlardan katekol substrat olarak kullanıldığı koşullarda enzim aktivitesinin için optimum pH 7,0 olarak bulunurken aynı koşullarda 4-metil katekol için 6,5, kafeik asit ve pirogallol için optimum pH 4,5 olarak bulunmuştur. Litaratürde Ankara armutundan izole edilen PPO enzimi için pirogallol substratı için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Bulunan optimum pH değerlerinin farklılık göstermesi, elde edilen kaynağa göre PPO enziminin özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Litaretürde genel olarak PPO enziminin optimum sıcaklığı 35-40°C olarak verilmektedir. Bu çalışma, katekol substrat olarak kullanıldığında bu genellemeye uyduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, çağladan izole edilen PPO enzimi için gallik asit ve L-tirozin substrat olarak kullanıldığında enzimin aktivite göstermezken, sonuçlardaki K_m değerlerine göre badem çağla PPO'su için en iyi substrat 1,71 mM K_m değeri ile 4-metil katekol bulunmuştur. Çağladan izole edilen polifenol oksidaz enziminin lakkaz aktivitesi göstererek difenollere etki ettiği bulunmuştur.

Bu çalışmada, PPO enzimi inhibitörü olarak bilinen EDTA' ya karşı aktivite göstermezken, en iyi inhibitörün 1,66 mM K_i değeri ile tiyoüre ve benzoik asit olduğu gözlenmiştir.

Böyle bir çalışma, PPO aktivitesini çeşitli bitkilerde kontrol etmek, böylece esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimlerindeki değişimlerinin besinsel ve toksikolojik özelliklerine etkisinin ortaya konulması için önemli bir adım oluşturur. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işlemi mümkün olabileceğinden dolayı, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konması hem beslenme ve hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından faydalı olacaktır. Bu çalışma ile bitkinin PPO aktivitelerinin ortaya konması besin endüstrisi açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Yine bu bilgiler ışığında tıp ve ilaç endüstrisinde bitkinin PPO aktivitesi hakkında bilgi sahibi olmak bu endüstri alanlarındaki kullanım açısından faydalar sağlayacaktır.

Benzer çalışmalar, diğer mevcut çeşitlerinde de yapılması ile bu meyvenin hasat zamanı ve market ömrü açısından bir dökümü çıkmış olacaktır. Bunun ise üreticiye ve tüketiciye, hatta pazarlamacıya ihracat açısından bir rehber bilgi sağlayacağı kanaatindeyiz.

Enzimin, elde edilen kaynağın olgunlaşma dönemlerinde de farklı aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle çağlanın olgunlaşması ile badem hali ve körpe çağla hali PPO enzim aktivitesi açısından karşılaştırılabilir. Çeşitli dönemlerin enzim aktivitesinin incelenmesiyle Üreticilerin en azından bu dönemleri dikkate almaları meyvenin tüketilmesi ve pazarlanması açısından avantaj sağlayacaktır.

Çağladan saflaştırılan PPO enzimin yüksek miktarda saflaştırılması ve bu saflaştırma oranının şimdiye kadar yapılan çalışmalarda görülmemesinin literatüre katkı yapacağı kanısındayız ve bu çalışmanın bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

- [1] ÖNEZ, Z., " Üzümden (*vitıs vinifera l.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2006.
- [2] ZİYAN, E., "Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (*pyrus communis*)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi" ,Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 1998.
- [3] YENSON .M., "İnsan biyokimyası", İstanbul Üniversitesi Tıp Anabilim dalı, Kırklareli, 1984.
- [4] PAMUK, F., "Biyokimya", Gazi Kitapevi, Ankara, 2000.
- [5] ÖZATA, A., KUTLU, M., "Enzimoloji ders notları" T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:1254, Fen Fakültesi Yayınları No:15, Eskişehir,2000.
- [6] ERDEN İNAL, M., " Biyokimya", T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:489, Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 218,Eskişehir, Eylül, 1996.
- [7] www.mustafaaltinisik.org.uk, 2008.
- [8] ÖZTAN, D., "Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu saflaştırılması ve fenollerin giderilmesinde kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Temmuz, 2007.
- [9] SAÇAK. M., "Kimyasal kinetik" Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Gazi Kitapevi, Ankara, 2002.
- [10] URUÇ, H., " Katalaz enziminin (E.C.1.11.1.6) montmorillonit analsim kili üzerine immobilizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Van, 2007.
- [11] ERKAYA, E., ÇAYLIKOCA, B, A., KALİNYAPRAK, F., "Enzimatik kataliz" Selçuk Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Konya, 2006.
- [12] MARANGONI, A, G., "Enzyme kinetics a modern approach", Department

of Food Science University of Guelph, 2003.

- [13] BAO, HAIHONG., "Biocatalysis of tyrosinase in organic solvent media using phenolic substrate models" A Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University Montreal, Quebec, Canada, Mayıs, 1999.
- [14] KIRALP,S., " Synthesis of conducting block copolymers and their use in the immobilization of invertase and polyphenol oxidase enzyme", A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the middle east technical university, in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in the department of chemistry, Mayıs, 2004.
- [15] CRUMIERE, F.," Inhibition of enzymatic browning in food products using bio-ingredient", A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University Montreal, Québec, Eylül, 2000.
- [16] ASTARCI, E. "Production and biochemical characterization of polyphenol oxidase from thermomyces lanuginosus", A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the middle east technical university, in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in the department of biotechnology, Haziran, 2003.
- [17] DEMİR, Ö.," Muşmula (*mespilus germanica* l.) meyvelerinin olgunlaşması sırasındaki polifenol oksidazın karakterizasyonu" ,Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon, Ağustos, 2006.
- [18] MADANI, W.,"Characterization of a polyphenol esterase from aspergillus niger and its role in the Inhibition of tyrosinase", a thesis submitted to the faculty of graduate studies and research in partial fulfillment of the requirements of the degree of doctor of philosophy, Department of Food Science & Agricultural Chemistry McGill University Montreal, Canada, Mayıs, 2000.
- [19] MARSHALL, M, R., KİM, J., WEI,C-I., " Enzymatic browning in fruits, Vegetables and Seafoods", 2000
- [20] JUKANTI, A, K.," Molecular and biochemical characterization of wheat (*triticum aestivum*. l) polyphenol oxidases (ppos)", A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Sciences, Montana State University Bozeman, Montana, Ocak, 2005.

- [21] SAĞIROĞLU, A., YAĞAR, H., " Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince" Turk J Chem, 26 (2002), 97 -103., Edirne, 2000.
- [22] DOĞAN, M., DOĞAN, S., " Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from thymus (thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii)" Food Chemistry 88 (2004) 69–77, Balıkesir, 2003.
- [23] CEMEROĞLU, B., YEMENİCİOĞLU, A., " Hale haven şeftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri" Tr. J. of Agriculture and Forestry, 22 (1998) 261–265, Ankara, 1996.
- [24] ÖZEN, A., COLAK, A., DİNÇER, B., GÜNER, B., "A diphenolase from persimmon fruits (Diospyros kaki L., Ebenaceae)", Food Chemistry 85 (2004) 431–437, Trabzon, 2003.
- [25] KUFREVİOĞLU, İ., ŞAKİROĞLU, H., ERAT, M., "Purification and characterization of polyphenol oxidase from Ferula sp.", Food Chemistry 95 (2006) 503–508, Erzurum, 2005.
- [26] 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, Balıkesir , 2004.
- [27] PEKYARDIMCI,Ş., ZİYAN, E., "Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus)", Turk J Chem, 27 (2003) , 217 .225., Ankara, 2001.
- [28] www.food-info.net/, Mart, 2008.
- [29] ÖZEN, A., COLAK, A., DİNÇER, B., GÜNER, S., AYAZ, A., " Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (Laurocerasus officinalis Roem.) fruits at an early stage of maturation", Food Chemistry 90 (2005) 801–807, Trabzon.
- [30] ÜNAL, M., Ü., " Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii)" Food Chemistry 100 (2007) 909–913, Adana, 2005.
- [31] AYDEMİR, T., KAVRAYAN, D., ÇINAR, S., "Isolation and characterisation of polyphenoloxidase from jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus)", S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi, Sayı 21 (2003) 115-125, Konya.
- [32] ARSLAN, H., "Atık sularda fenol tayini", Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 06500 Ankara.
- [33] YENER, J., AKSU, Z., "Atıksulardaki fenol ve klorofenollerin aktif karbon

ve kurutulmuş aktif çamura adsorpsiyonu", Tr. J. of Engineering and Environmental Science, 23 (1999) , 93 104. Ankara, 1997

- [34] ÖZÇELİK, D., "Mantardan (*agaricus bisporus*) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, GAZİ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 2005.
- [35] ÖZSU, B., "Badem Sektörü" Mart, 2003.
- [36] <http://www.gapdogukalkinma.com/gida/55.bad.htm>.
- [37] http://www.yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab_pdf/408.pdf, 2008.
- [38] ARAT, Ö, "Aspergillus flavus HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi", Adnan Menderes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2007.

EKLER

Ek-A Native jel elektroforezi (ND-PAGE) için gerekli çözeltiler

Ek-A.1. %30'luk akrilamid / N,N-metilen bisakrilamid stok çözeltisi:

14,6 gram akrilamid ve 0,4 gram N,N-metilen bisakrilamid 50 ml saf suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir.

Ek-A.2.Ayırma tamponu (separating tamponu):

17,172 gram tris-baz az miktarda saf su içerisinde çözüldükten sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır ve saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Ek-A.3.Yoğunlaşma tamponu (stacking tamponu):

1,515 gram tris-baz az miktarda saf su içinde çözüldükten sonra konsantre HCl kullanılarak pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır ve saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır.. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir.

Ek-A.4. %10'luk Amonyum persülfat:

0,1 gram amonyum persülfat 1 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır.

Ek-A.5. Tris-glisin elektrot tamponu (yürütme tamponu):

1,5 gram tris-baz ve 7,2 gram glisin az miktarda saf su içerisinde çözüldü ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8,5'e ayarlanmıştır. Saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon 2-3 kez kullanılabilir.

ÖZGEÇMİŞ

Kadriye Güngör, 06.06.1982 de İzmit'te doğdu. İlk ve ortaöğretiminin son dönemine kadar İzmit'te okudu. Ortaöğretimini Ankara'da tamamladı. 2001 yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2005 yılında aynı fakültenin kimya bölümünden kimyager olarak mezun oldu. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı