

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

KUŞBURNU MEYVASINDAN İZOLE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Halis ŞAKİROĞLU

Yönetici : Doç.Dr.Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU

Doktora Tezi

ÖZET

Bu çalışmada, kuşburnu meyvasından polifenol oksidaz enzimi izole edilerek, çeşitli kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, 8 ayrı substrat için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere optimum şartlar (pH, sıcaklık ve iyonik şiddet) tesbit edildi. Optimum şartlarada 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. K_M değerleri katekol, 4-metil katekol, L-dopa, dopamin, gallik asit, pirogallol, L-tirozin ve p-kresol için sırasıyla 7.41×10^{-3} M , 6.06×10^{-4} M, 2.82×10^{-3} M, 2.64×10^{-3} M, 2.79×10^{-3} M, 8.27×10^{-4} M ve 8.63×10^{-5} M; V_{max} değerleri ise aynı substratlar için 41.66, 431.96, 45.45, 42.48, 111.11, 111.73, 142.85 ve 40.00 EÜ/ml dak. olarak bulundu.

Inhibitör çalışmalarında substrak olarak 4-metilkatekol kullanılarak, sodyum metabisülfid, L-sistein, askorbik asit, glutatyon, tiyoüre, sodyum azotür, sodyum dietilditiyokarbamat, ditiyoeritritol, tannik asit, benzoik asit ve β -merkaptotanol inhibitörleri ile çalışıldı. Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla bu inhibitörler için K_i sabitleri ve inhibisyon türleri bulundu. Ayrıca I_{50} değerleri tesbit edildi. K_i sabitleri ve I_{50} değerlerine göre en etkili inhibitörün sodyum metabisülfid olduğu ve kompetetiv inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi.

Enzimin sıcaklık artışına paralel olarak daha kısa sürede denatüre olduğu sıcaklığın düşürülmesi ile renatüre olduğu gözlemlendi.

Enzim saflaştırma işlemlerinde, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile iki pikin elde edilmesi ve tabii elektroforez ile iki bantın gözlenmesi iki izoenziminin varlığını gösterdi.

SUMMARY

The polyphenol oxidase enzyme was extracted from doge rose fruit and its kinetic and electrophoretic features were investigated in this study.

For this purpose, optimum conditions, i.e., pH, temperature and ionic strength, affecting the values of K_M and V_{max} for eight different substrates were determined. The assay of activities were carried out in the optimum conditions for five different concentrations of the substrate. The values of K_M for catechol, 4-methyl catechol, L-dopa, dopanine, gallic acid, pyrogallol, L-tyrosine and p-Cresol are 7.41×10^{-3} M, 8.46×10^{-3} M, 6.06×10^{-4} M, 2.82×10^{-3} M, 2.64×10^{-3} M, 2.97×10^{-3} M, 8.27×10^{-4} M, and 8.63×10^{-5} M. and V_{max} values for the same substrates were found 4.66, 431.96, 45.45, 42.48, 111.11, 111.73, 142.85, and 40.00 EU/ml min. respectively.

In inhibitor studies, 4-methyl catechol substrate was employed with sodium metabisulphite, L- cysteine ascorbic acid, glutathione thiourea, sodium azide sodium diethyl-dithiocarbamat, benzoic acid, dithioerythritol, tannic acid and β -mercaptoethanol inhibitors for the investigation. K_i constants and the types of inhibition of these inhibitors were found by using lineweaver-Burk graphics. In addition, the values of I_{50} were found. Sodium metabisulfite is found to be the most effective inhibitor and to display competitive inhibition effect on the basis of the K_i constants.

It was observed that the enzyme was denaturated as the temperature increased, it was renaturated as the temperature decreased.

In the processes of enzyme purification, the presence of two peaks obtained with gel filtration chromatography and ion-exchange chromatography and of two bands observed from nature polyacrylamid gel electrophoresis show that there are two distinct isoenzymes of the enzyme.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç.Dr.Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU yönetiminde Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Başta, doktora çalışmalarımın her safhasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm sayın hocam Doç.Dr. Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU'na şükranlarımı arz ederim.

Ayrıca çalışmalarımda maddi ve manevi desteklerini gördüğüm Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof.Dr.Metin BALCI ve bölümümüz öğretim üyelerinden Prof.Dr.Yaşar SÜTBELAZ'a; tezimin yazılmasında yardımlarını gördüğüm Doç.Dr. Nihat AKBULUT'a, Doç.Dr. Hasan SEÇEN'e, Yrd.Doç.Dr. Abdullah MENZEK'e, Yrd.Doç.Dr.Yavuz ONGANER'e, Öğr.Gör. A.Emin ÖZTÜRK'e, Yrd. Doç.Dr. Yunus KARA'ya, Arş.Gör. Oktay ASLAN'a, Zeki TURAN'a ve bölümümüz bütün elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Nisan - 1994

Halis ŞAKIROĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	1
1.1.1. Enzimatik Kararma.....	1
1.1.2. Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı.....	1
1.1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyası.....	3
1.1.3.a. Adlandırılması.....	3
1.1.3.b. Katalizlediği Reaksiyonlar.....	3
1.1.3.c. Polifenol Oksidazın Substratları.....	5
1.1.3.d. PPO Aktivitesinin Optimum pH ve Sıcaklığı.....	11
1.1.3.e. PPO'nın Isı Stabilitesi.....	13
1.1.3.f. PPO'nın Aktivatörleri.....	13
1.1.3.g. PPO'nın İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi.....	14
1.1.4. Enzimatik Kararma Reaksiyonlarında Bakırın Rolü.....	18
1.1.5. O-Kinonların Sekonder Reaksiyonları.....	19
1.1.5.a. Çiftleşmiş Oksidasyon.....	20
1.1.5.b. Amino asitler ve Proteinlerle Kompleks Oluşumu.....	20
1.1.5.c. Kinon Oluşumundan Sonra Polifenollerin Polimerleşmesi.....	21
1.1.6. PPO'nın Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Homojenliği ve Molekül Ağırlığı.....	22
1.1.6.a. Ekstraksiyon.....	22
1.1.6.b. Saflaştırma.....	24
1.1.6.c. PPO Enziminin Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı.....	24
1.1.7. Enzim Aktivitesi Tayin Metodları.....	25
1.1.8. PPO'nın Tabiatta ve Gıda İşletmeciliğindeki Rolü.....	27
1.2. Çalışmanın Amacı.....	29
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	31
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	31
2.2. Faydalanılan Alet ve Cihazlar.....	31
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
2.4. Yöntemler.....	35
2.4.1. Protein Tayini.....	35
2.4.1.a. Kalitatif Protein Tayini.....	35

2.4.1.b. Coomassie bleu Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	35
2.4.2. Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	36
2.4.3. Kuşburnu Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması Çalışmaları.....	36
2.4.3.a. Kuşburnu Meyvasının Temini ve Ham Ekstrakt Hazırlanması.....	36
2.4.3.b. Amonyum Sülfatla Çöktürme ve Diyaliz.....	37
2.4.3.c. Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	37
2.4.3.d. DEAE-Sephacel İyon Değişim Kromatografisi.....	38
2.4.3.e. SDS - Poliakrilamid Jel Elektrofrez.....	39
2.4.4. Kuşburnu Polifenol Oksidaz Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar.....	42
2.4.4.a. Optimum pH Çalışması.....	42
2.4.4.b. Optimum Sıcaklık Çalışması.....	42
2.4.4.c. İyonik Şiddet Etkisi Çalışması.....	43
2.4.4.d. Enzimin Stabil Olduğu pH'nın Belirlenmesi Çalışması.....	43
2.4.4.e. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin Bulunması.....	43
2.4.4.f. Farklı İnhibitörler için K_i Sabitlerinin ve I_{50} Değerlerinin Bulunması.....	44
2.4.5. Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması.....	46
2.4.6. Sıcaklıkla Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması.....	46
2.4.7. Kuşburnu Polifenol Oksidaz İzoenzimlerinin Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Belirlenmesi.....	47
3. DENEY SONUÇLARI.....	49
3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	49
3.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme Sonuçları.....	49
3.3. Polifenol Oksidaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisiyle Saflaştırılması.....	50
3.4. PPO Enziminin DEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisiyle Saflaştırma Sonuçları.....	52
3.5. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez Sonucu.....	53
3.6. Farklı Substratlar İçin pH-Aktivite Grafikleri.....	54
3.7. Farklı Substratlar İçin Sıcaklık-Aktivite Grafikleri.....	54
3.8. İyonik Şiddet Etkisi Çalışmasının Sonuçları.....	63

3.9. Enzimin Stabil Olduğu pH Çalışması Sonuçları.....	63
3.10. Aktivasyon Enerjileri.....	63
3.11. Farklı Substratlar için K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	69
3.12. Farklı İnhibitörler İçin K_i Sabitlerinin ve I_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	73
3.13. Sıcaklıkla Denatürasyon ve Renatürasyon Çalışmalarının Sonuçları.....	89
3.14. Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroföresi Çalışması Sonuçları.....	90
4. TARTIŞMA	92
KAYNAKLAR	100

KISALTMALAR

PPO	: Polifenol oksidaz enzimi
E.C.	: Enzim kod numarası
E Ü	: Enzim ünitesi
TEMED	: N,N, N', N', tetrametil etilen diamin
PVP	: Polivinilpirolidon
PVPP	: Polivinilpolipirolidon
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
DLIECA	: Sodyum dietilditiyokarbamat
Tris	: Trihidroksimetilaminometan
TCA	: Triklor asetik asit
PEG	: Polietilenglikol
DEAE	: Dietilaminoetil
PER	: Amonyum persülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
E _A	: Aktivasyon enerjisi
I ₅₀	: Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu

1. GİRİŞ

1.1. Polifenol Oksidaz Enzimi

1.1.1. Enzimatik Kararma

Bir çok meyva ürünlerinde esmerleşme, genel adıyla bilinen renk değişimleri meydana gelmektedir. Bunlar bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez arzu edilen seviyede durdurulamadıklarından gıda ürününün tabii rengini bozarlar. Işının şekerlere etkisiyle meydana gelen karamelizasyon, indirgen şekerlerle proteinlerin etkileşmesinden ortaya çıkan bazı renk bozulmaları, enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzimatik renk kararmalarının çoğunda, oksijen varlığında polifenol oksidaz (PPO) enziminin, özellikle o-difenol grubu, fenolik maddeleri renkli bileşiklere yükseltgemesi söz konusudur. Enzimatik kararma, bitki tür ve çeşidine göre farklı olduğundan bu olayda PPO enzimi, fenolik substratlar ve askorbik asitin ayrı ayrı veya birlikte etkili olabileceği belirlenmektedir¹. Bu üç faktörden, yani fenolik madde, O₂ ve PPO enziminden birinin ortadan kaldırılması ile enzimatik kararmaları durdurulabilir veya azaltılabilir².

Genellikle bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında bitki dokularının mekanik bir etkiyle (basınç, yaranma, donma, preslenme vb.) zarar görmesi sonucu ortaya çıkan enzimatik kararma, bazı ürünlerde istenmeyen renk, koku ve tad oluşumuna neden olmakta ve sonuçta ürünlerin gıda değerinde önemli derecede kayıplar oluşturmaktadır³.

1.1.2. Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı

Polifenol oksidaz tabiatta geniş bir alana yayılmıştır. Genel olarak bitkilerde bulunursa da, özellikle mantar ve hayvan organlarındaki bazı mikroorganizmalarda da bulunabilir⁴. Farklı kültürlerdeki PPO muhtevası tür ve kültürlere bağlı olarak değişir⁵.

Enzimin bitki hücresindeki konumu, meyva ve sebzenin türü ve yapı olgunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yeşil yapraklarda PPO aktivitesinin önemli bir kısmı kloroplastlarda bulunmaktadır^{6,7}.

Patates yumrularının bütün hücre organellerinde PPO bulunduğu tesbit edilmiştir. PPO muhtevasının hemen hemen protein muhtevasıyla orantılı olduğu bulunmuştur⁸.

İspanak pancarı gövdesinde aktivitenin çoğu plastid membranlarında ve mitokondrilerde yer almaktadır⁹. Taze olarak hasat edilen elmalarda enzimin daha ziyade kloroplastlarda ve mitokondrilerde yer aldığı tesbit edilmiştir¹⁰. İspanak, yonca, yulaf, buğday, bezelye ve şeker kamışı yaprakları gibi bazı türlerde enzim, kloroplastlarda gizlidir ve aktive edilmesi için tripsin veya kırmızı ışığa ihtiyaç duyulur⁷. Asma yapraklarında hücre partiküllerine sıkıca bağlı bulunan PPO kafein ile aktive edilebilir¹¹. Bakla yapraklarındaki PPO'nun aktive edilmesi için asidik veya bazik ortama ihtiyaç duyulurken¹², patates, mantar, mısır yaprağı, domates ve fasulyede hücre partiküllerine bağlı veya kloroplastlarda yer alan enzim gizlilik arz etmez^{7,11}.

Stanley eriklerinde etli kısımdaki ham enzim aktivitesi kabuğundakinden 3,5 kat daha büyük olduğu belirtilmiştir¹³. Brezilyanın değişik muz türlerinde yapılan çalışmalarda enzim aktivitesinin kabukta, iç kısımdan (pulp) ve dış kısımdan sırasıyla 8,9 ve 10 kat daha büyük olduğu bulunmuştur¹⁴.

Enzim aktivitesi üzümde, pulp veya özsuya nazaran kabukta daha fazla bulunmuştur ve olgunlaşma esnasında aktivite azalması kabukta daha belirgin olmuştur⁹. Bazı araştırmacılar kabukta daha yüksek aktivite bulurken¹⁵, bazıları çekirdek bölgesinde daha fazla aktivite olduğunu tesbit etmiştir¹⁶. Elmada polifenol oksidaz aktivitesi, o-dihidroksi fenol bileşeni kararma eğiliminin büyük oranda kültüre bağlı olduğu bazı yazarlar tarafından rapor edilmiştir^{17,18}. Herhangi bir elma kültürünün kararma eğilimi birkaç yıl için kararlıdır¹⁹ ve farklı iklimik şartlar veya farklı coğrafik bölgelerde bu kararlılık pek fazla değişmemektedir^{17,18}. Farklı kültürlerdeki elma dokularının kararma hızı fazla olmamakla birlikte PPO substratlarının çeşidine bağlıdır²⁰. Enzimin armuttaki dağılımı elmadakine benzer bulunmuştur. Her iki meyvanın özsuları pratik olarak aktiviteden yoksundur. Aktivitenin hemen hemen tamamı pulpta kalmaktadır²¹. Tatlı kirazlarda pH 4,7 ve 7,0 de ölçülen aktivite değerleri meyve olgunlaştığında aniden yükselmektedir²². Zeytinlerden olgunlaşma esnasında o-difenol konsantrasyonu arttığı halde enzim aktivitesi azalmaktadır. Temel olarak siyah zeytin türlerinde enzim çözünebilir haldeyken, olgun yeşil meyvalarda kloroplastlara sıkı sıkıya bağlı olarak bulunmaktadır²¹. Amasya ve Golden türü elmalar üzerinde yapılan bir çalışmada, Amasya türünün Golden'e göre daha fazla PPO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur²³.

Birçok meyvada enzimin çözünmeyen kısmı daha fazla bulunmuştur. Çözünen kısmın aktivitesi, toplam aktivitenin şeftalilerde %20-30, tatlı kirazlarda %15-17, kayısıda %13 ve elmalarda %8-15'i olarak bulunmuştur²⁴.

Kuşburnu meyvasında PPO enzimi, ilk defa tarafımızdan izole edilerek kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

1.1.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyası

1.1.3.a. Adlandırılması

Bitki PPO'ların uluslararası adlandırılması yakın zamanlarda yeniden değiştirilmiş ve monofenol mono oksijenaz [Tirozinaz E.C. 1.14. 18.1] ile difenol oksidaz (katekolaz; difenol: O₂ oksidoredüktaz: E.C.1.10.3.2) olarak adlandırılmıştır^{13,25,26,27,28,-29,30}.

Bu yeni adlandırma önceden kresolaz ve katekolaz aktivitelerinde bulunduğu gibi aynı enzimin iki reaksiyonları arasında farkı belirttiğinden dolayı yeni bir gelişme sayılmaz. Aynı zamanda mantarlardan ve yeşil bitkilerden elde edilen lakkazlar aynı enzim kod numarasıyla verilirler (E.C. 1.10.3.1).

Diğer bazı yayınlarda da polifenol oksidazlar, [difenol: O₂ oksidoredüktaz, polifenol-oksidad (PPO) E.C.1.10.3.1] olarak verilmiştir^{14,31,32,33}.

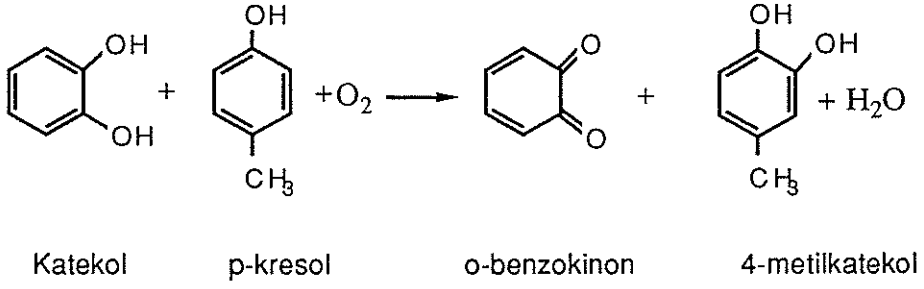
PPO lar; fenolaz, fenol oksidaz, polifenol oksidaz o-difenol oksidaz, tirozinaz, katekol oksidaz ve klorogenik asit oksidaz olarak adlandırıldıkları da bilinmektedir³⁴.

1.1.3.b. Katalizlediği Reaksiyonlar

Moleküler oksijen varlığında PPO enzimi tarafından iki tip reaksiyon katalizlenmektedir.

- a) Monofenollerin hidroksilasyonu ile o-dihidroksifenollerin oluşturulması,
- b) Dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu .

Bu reaksiyonlar aşağıdaki gibi bir basit şekilde gösterilebilir.



Monofenollerin hidroksilasyonu sonucu oluşan dihidroksifenoller, yine PPO enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla o-kinonlara dönüştürülür. Oluşan kinon birimleri polimerleşerek kararmayı meydana getirir³⁵.

Ortamda askorbik asit veya o-dihidroksi fenollerin bulunması halinde oksidasyon potansiyeli, askorbik asit veya o-dihidroksi fenolün indirgenmesi için harcanır. Ancak bu işlem tamamlandıktan sonra hidroksilasyon reaksiyonu başlayabilir³⁶.

Monofenollerin hidroksilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin oksidasyonu reaksiyonlarının, aynı enzim tarafından katalizlenip katalizlenmediği konusunda farklı düşünceler ileri sürülmüştür^{37,38}. Bu konudaki bazı görüşler şöyle özetlenebilir:

1. Hidroksilasyon enzimatik bir proses değildir, fakat o-dihidroksi fenollerden kinonların oluşumu PPO tarafından katalizlenmektedir.
2. Her iki reaksiyona da iki ayrı protein molekülünden ibaret enzimin faaliyeti sebep olmaktadır.
3. Her iki reaksiyon da enzimattır, fakat katalizin aynı veya ayrı ikinci dereceden önemli olan enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği açık değildir.
4. Reaksiyonlar, iki aktif bölgeye sahip olan bir enzim tarafından katalizlenir.
5. Her iki reaksiyon da enzimin aynı aktif bölgesi tarafından yürütülür. Ancak enzimin prostetik grubu veya bakırın değeriği ortama göre sürekli değışir.

Bugün o-dihidroksi fenollerin dehidrogenasyon ve mono fenollerin hidroksilasyonu reaksiyonlarının her ikisinde, iki ayrı bölgeye sahip aynı PPO enzimi tarafından katalizlendiği düşüncesi daha fazla rağbet görmektedir³⁹. Bununla birlikte son zamanlarda en güçlü tartışmalardan birini oluşturan "iki aktivite; ultrasantrifüj ve elektroforez teknikleriyle ayrılamaz." teorisi çürütölmüş görünmektedir. Maydanoz

hücrelerinden bir preparasyonda dehidrogenasyon ve hidroksilasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren protein kısımlarının DEAE-selüloz kolonu üzerine yapılan iyon değişim kromatoğrafisiyle ayrıldığı bildirilmiştir³⁹.

Muz PPO ile yapılan bir çalışmada ilginç bir sonuç olarak enzimin, reaksiyonun ilerlemesiyle inaktif olduğu gözlenmiştir⁴⁰. Bu olay, aktif bölgenin çevresindeki enzim ile bir kovalent bağ oluşturduğu kabul edilen ortamda var olan kinonun hareketine atfedilir⁴¹.

Enzimin Cu muhtevası, PPO molekülü başına mantarda 4, viciafaba'da 1 atom Cu olduğu bulunmuştur^{42,43}. Bakır konsantrasyonları mantarda %0,2-0,3 patatesten %0,2, tatlı patatesten %0,27 ve tütünde %0,32 olarak bulunmuştur^{42,44}.

Hidroksilasyon reaksiyonu bakırın tek değerlikli formda olmasını gerektirir ve bu form dehidrogenasyon basamağıyla sağlanır. Bakırın iyon değişim kromatoğrafisi gibi bir metodla uzaklaştırılması sonucu aktivite kaybolur ve bakırın ilavesiyle aktivite yeniden kazanılır^{45,46}.

Dihidroksi fenollerin PPO tarafından oksidasyonu düzenli seri bir mekanizmasıyla gerçekleşir⁴¹. Patatesten elde edilen enzim için oksijen ilk substrat olarak rapor edilirken³⁶, diğer çalışmalarda substrata bağlı olarak farklı mekanizmaların olduğu bulunmuştur³⁴. Son zamanlarda reaksiyonun, enzimin aktif bölgesinde yer alan bakırın değerliğinin değişmesi sonucu bir radikal oluşumuyla gerçekleştiği gösterilmiştir⁴⁷.

Lakkazda saf halde koyu mavi renkte olan ve bakır ihtiva eden bir enzimdir. PPO dan lakkaz substrat spesifikliği ve inhibitörlere karşı olan ilgisi yoluyla ayırdedilebilir. Lakkaz, PPO'nun substratı olan tirozin ve p-kresol ile bir reaksiyon vermezken, p-fenilendiamin ve guinolu kolaylıkla oksitler⁴⁸.

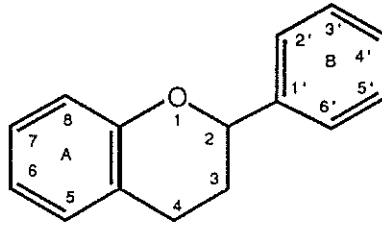
1.1.3.c. Polifenol Oksidazın Substratları

Meyva ve sebzeler oldukça fazla çeşitli fenolik bileşik ihtiva ederler. Bununla birlikte bunların sadece bir kısmı PPO'nun substratlarıdır⁴⁹. PPO'nun meyva ve sebzelerdeki en yaygın tabii substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir^{49,50}. Flavonoidler, bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyva ve tohum kısımlarında bulunurlar. Bitkilerin hiçbirinde flavonoidler

konsantre olarak belirli bir noktada bulunmamışlardır. Bitkilerin muhtelif bölümlerinde eşite yakın olarak dağılmışlardır. Bitkinin farklı kısımlarında en azından eser miktarda flavonoid bileşiklerine rastlanmıştır⁵¹. Değişik konsantrasyonlardaki polifenoller yenilebilir ürünlerin çoğunda, karma reaksiyonlarının vuku bulması için yeterli sebeptir.

Bitkilerdeki tabii olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca, katekinler, lökoantosiyandinler, antosiyaninler, flavonoller ve sinamik asit türevleri besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler.

Flavonoidlerin kimyasal yapısı (I);



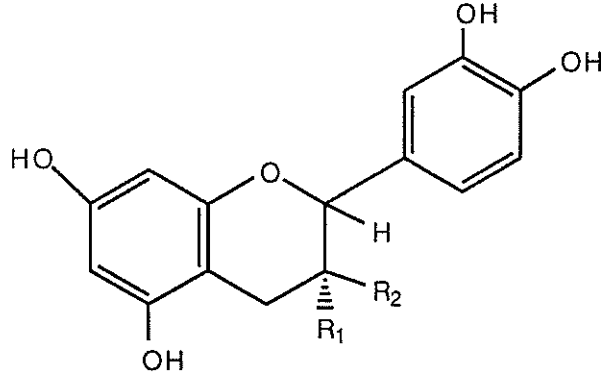
(I)

şeklinde olduğu açıklanmıştır⁵².

Katekinler ;

Flavonoidlerin çoğunun hidroksilli türevleri, resorsinol (A halkası) ve bir katekol birimi (B halkası) ihtiva eder. Flavonoid halkasının kırılma, parçalanma ve sentez reaksiyonları incelenerek katekinlerin yapısı için model geliştirilmiştir.

Katekinleri, (+)-katekin (II) ve onun stereozimeri olan (-) epikatekin (III) tabii olarak bulunmuştur. Diğer formları; tabii olarak bulunan katekinlerin sıcak sodyum karbonatla muamelesiyle elde edilir⁵².



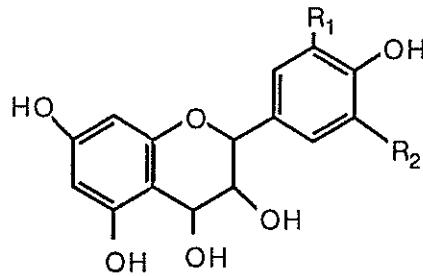
(II) (+) - Katekin ($R_1=H$, $R_2=OH$)

(III) (-) - Epikatekin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

(+) katekin (II) ve (-) epikatekin (III)'ün 3 nolu karbon atomunda zıt konfigürasyonda, 2 nolu karbon atomunda ise aynı konfigürasyonda olduğu gösterilmiştir.

Lökoantosiyonidinler ;

Lökoantosiyonidinlerin ilk göze çarpan özelliği asidik ortamda ısıtılmasıyla antosiyonidinlere çevrilme kabiliyeti olan bileşikler sınıfına dahil olmasıdır. Lökoantosiyonidinlerden (5,7,3',4'- tetrahidroksi-3,4-diol (IV) Lökosiyanid (5,7,3',4',5' -pentahidroksi-3,4 diol) (V) ve Lökopelargonidin (5,7,4' - trihidroksiflavon-3,4 - diol) (VI) izole edilebilmişlerdir⁵⁵.



(IV) Lökosiyanidin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

(V) Lökodelfinidin ($R_1=R_2=OH$)

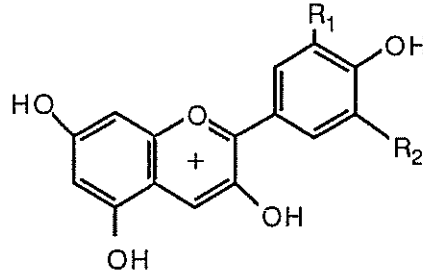
(VI) Lökopelargonidin ($R_1=R_2=H$)

Lökoantosiyonidinlerin stereokimyası, katekinlerin stereokimyası kadar araştırılmamıştır. Bununla beraber 2,3 ve 4 nolu karbon atomları asimetriktir, üç

asimetrik merkez içeren bu molekülün 8 izomer yapısı ihtimali mevcuttur. Ancak bu 8 izomer ayrı ayrı rasemik karışımlarda sayılamamıştır. Farklı lökoantosiyanidinlerin karakteristik özelliklerinin incelendiği bildirilmiştir⁵⁶.

Antosiyaninler;

Antosiyaninler renklidirler, fakat bu durum kararmış reaksiyonları için o kadar önemli değildir. Birkaç değişik durumda sekonder reaksiyonlar için vazgeçilmez bir bileşen oldukları gösterilmiştir. Çiçek, meyva ve bitkilerin diğer kısımlarında, çözünmüş halde, hücre özsuyunda mevcuttur ve genellikle glikozidler halinde bulunurlar. Antosiyaninler serbest şeker rezidüleri, antosiyanidin olarak bilinir. Hidroksilasyonun temelini teşkil eden antosiyanidinler, üç ana sınıfta sınıflandırılmıştır. Pelargonidin (VII); siyanidin (VIII) ve delfinidin (IX) buna ilaveten metillenmiş türevler tabii olarak da bulunabilirler.



(VII) Pelargonidin ($R_1 = R_2 = H$)

(VIII) Siyanidin ($R_1 = OH, R_2 = H$)

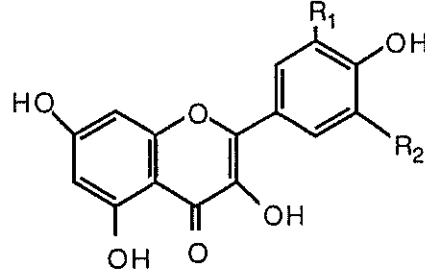
(IX) Delfinidin ($R_1 = R_2 = OH$)

Antosiyaninler, antosiyonidinlerin %20 lik HCl ile 3 dakika civarında kaynatılarak hidroliz edilmesinden bir veya birçok şeker molekülleriyle beraber elde edilirler⁵⁷.

Flavonoller;

Flavonoller ve flavononlerle birlikte toplu olarak antoxantin pigmentleri olarak adlandırılırlar. Genelde bunların renkleri açık yeşildir. Flavonoller bazı durumlarda kararma reaksiyonlarına bizzat iştirak ederler.

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksi flavon) (X) ve bir başka türevi olan myricetin (3,5,7,3',4',5' - hegzahidroksiflavon) (XI) ve kaemferol (3,5,7,4'-tetrahidroksi flavon) (XII) nin flavonollerin yapısında yaygın olarak bulunurlar.



(X) Quercetin ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$)

(XI) Myricetin ($R_1 = R_2 = \text{OH}$)

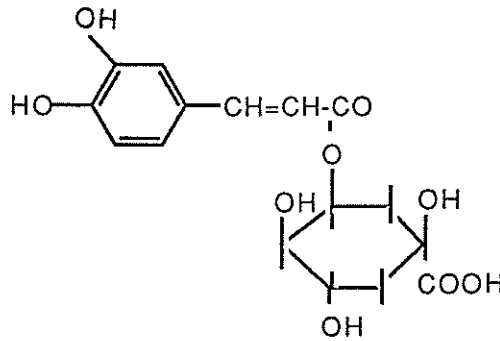
(XII) Kaempferol ($R_1 = R_2 = \text{H}$)

Bunlar genellikle glikozidler halinde mevcuttur. Bu glikozidlerde, bir ya da daha çok hidroksil grubu olan glukoz, ramnoz ve nadiren de rafinoz şeker türleri bir araya gelmiştir. Genellikle şeker rezidülerinin, substitüsyon reaksiyonlarında flavonol çekirdeğinin hidroksil grupları esterleşme reaksiyonuna uğrar. Özellikle 3 nolu C atomundaki hidroksil, bazen de 7 nolu C atomundaki hidroksil üzerinde esterleşme olur⁵⁸.

Sinamik asit türevleri;

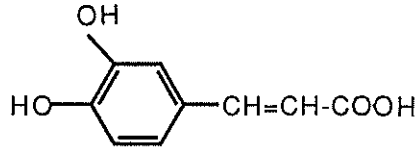
Sinamik asit tam anlamıyla hakiki flavonoid değildir. Fakat flavonoid bileşiklerinin $\text{C}_6\text{-C}_3$ fenil propan biriminin oluşmasında önce B halkasının sentezlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir⁵⁹.

Sinamik asitin yiyeceklerdeki önemli üyesi olan klorogenik asit (XIII), kafeik asitle quinic asidin 3-depsitidir (sinamik asit türevi).



(XIII) Klorogenik asit

Kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit), (XIV) ve p-kumarik asitin (4-hidroksi sinamik asit) diğer quinik asit depsitlerine bazen karşılaşılabılır¹⁶⁰.



(XIV) Kafeik asit

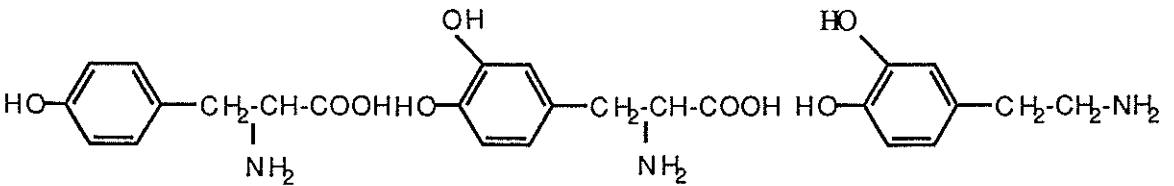
Klorogenik asitin bir kısmını oluşturan, kafeik asidin PPO tarafından p-kumarik asitten hidroksillenebildiği rapor edilmiştir⁶⁰. Klorogenik asidin izomerleri olan izoklorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudo klorogenik asit de PPO substratları olarak sayılmıştır⁶¹.

Basit Fenoller;

Tabii olarak oluşan flavonoidlerin bir çoğu, katekole benzer B halkası hidroksilasyon örneğine sahiptir. Katekol bu yüzden en basit o-dihidroksi fenol olarak düşünülebilir.

Gallik asit, hidroliz olabilen taninlerin esas birimi oluşturur ve bu bileşikler örneğin, m-digallat ve ellagic asit hidroliz olabilen ester bağlarıyla birleşirler. Hidroliz olabilen tanninler gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmazlar. Bununla birlikte gallik asit serbest olarak, az miktarlarda birkaç meyvada ve diğer gıdalarda bulunur⁶².

Tirozin (XV) çoğu gıdalarda bulunan önemli bir amino asittir ve melanin oluşumunda enzimatik oksidasyon için, monohidroksifenol klasik bir substrattır. Tirozinin hidroksilasyon ürünü olan dihidroksi fenil alanin (Dopa) (XVI) ve dihidroksifenil etilamin (dopamin) (XVII) bitki dokularında bulunur^{63,64}.



(XV) Tirozin

(XVI) 3,4-Dihidroksifenil alanin (dopa)

(XVII) 3,4-Dihidroksifenil etilamin (dopamin)

Şeker pancarı PPO enzimi, tirozin üzerinde etkili olmazken, pancar dokularının ihtiva ettiği DOPA'yı oksitlemektedir. Bununla birlikte tirozin, L-dopaya nazaran dokularda daha fazla bulunmaktadır⁶⁵. Buda bir çok araştırmacılarca öne sürülen "PPO enziminin elde edildiği bitkilerde en iyi substratlar bulunmaz" tezine uygun düşmektedir^{10,66}.

Mono ve dihidroksi fenollerin sübstitüsyon yeri de enzimin reaksiyona katılması açısından önemlidir. Monofenoller, yalnızca p-sübstitüe $>CH_2$ -grubuna sahip iseler hidroksillenebilirler. 3,4-Dihidroksi fenoller, 2,3-dihidroksifenollere nazaran daha yüksek hızda oksitlenebilirler^{6,50}. 3 pozisyonundaki sübstitüentler (3-metil katekol; 2,3-dihidroksi benzoik asit; 2,3-dihidroksi 4-metoksi benzoik asit; 2,3-dihidroksifenil sulfonik asit) enzimin substrata ilgisinde muhtemelen sterik etki nedeniyle azalmaya neden olmaktadır. 4 pozisyonunda elektron veren grupların bulunması halinde (klorogenik asit, 4-metil katekol gibi) substratın reaktiviteleri artarken, elektron alıcı grupların bulunması halinde (4-nitro katekol, 3,4-dihidroksi benzoik asit ve 3,4- dihidroksi benzaldehit gibi) azalmaktadır⁶⁷.

p-Sübstitüentlerin tabiatı da reaksiyon hızında etkilidir⁶⁸. Bütün bunlardan oksidasyonun elektrofilik bir kademeye yönlendirildiği ve fenolün muhtemelen keto formuna yükseltgendiği söylenebilir^{67,68}.

Tabii fenolik substratların meyva ve sebzelerdeki enzimatik kararmaya katkıları, farklı kinonlardan elde edilen makromoleküler pigmentlerin renk şiddetine olduğu kadar, fenolün lokalizasyon ve konsantrasyonuna da bağlıdır⁶⁹.

1.1.3.d. PPO Aktivitesinin Optimum pH ve Sıcaklığı

PPO aktivitesinin optimum pH'sı, enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle pH 4.0-7.0 arasında değişir⁷⁰. Birçok kaynaklardan elde edilen PPO'nin, pH 4.0'ün altında inaktif olduğu belirtilmiştir⁷¹. Patetes homojenatındaki enzim pH 5.0 de pirogallol ve klorogenik asit substratları için inaktif olduğu bulunmuştur. Oysa pirogallol, pH 6.0 nın altında Satsuma mandalinasından elde edilen PPO ile oksitlenmiştir⁷². Diğer taraftan üzümünden hazırlanan PPO, üzüm suyunun normal pH'sı olan 3,4 de maksimum aktivitenin %50 nin üzerinde olduğu bulunmuştur⁷³. Erikten elde edilen enzim nötral ortamda aktivitesini tamamen kaybettiği halde, normal pH sı olan 3.8 de maksimum aktivite göstermiştir.

Enzimin saflığı ve içinde bulunduğu tamponun çeşidi optimum pH yı son derece etkiler. Bu yüzden enzimin, çözünmüş ve partikül halde olması optimum pH'nın zorunlu olarak farklı olmasına sebep olacaktır⁷⁴. Aynı zamanda izoenzimler de farklı optimum pH ya sahip olacaktırlar.

Aynı meyva ve sebzelerin olgunlaşmasının değişik devrelerinde elde edilen enzimlerin optimum pH sının farklı olduğu belirlenmiştir⁷⁵. Birçok kaynaklardan elde edilen enzimlerin çoğunun tek bir optimum pH sı vardır. Fakat saflaştırmanın niteliğinden dolayı ikinci bir optimum pH ya rastlamak mümkündür.

Lakkaz aktivitesinin optimum pH sı enzimin kaynağına ve substratlarına son derece bağlıdır. Değişik mantarlardan elde edilen enzimler için, optimum pH 4,5-7,5 arasında olduğu belirtilmiştir. Verilen bir preperasyon için en yüksek aktivite; katekol substratı için pH=5.0, hidrokinon için de pH=4.0 de gözlenmiştir. Şeftali lakkazı, 4-metil katekol ve quinol substratlarının her ikisi için de pH 6,0 da net bir optimum pH ya sahiptir⁷⁶.

PPO için, optimum sıcaklık üzerindeki araştırmalar, optimum pH ya göre oldukça azdır. Yapılan araştırmalar, enzimin optimum sıcaklığının, optimum pH gibi aynı faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir.

Şeftali PPO'nun aktivitesi, sıcaklık 3°C den 37°C ye yükseltildikçe arttığı ve 45 °C den sonra azaldığı bulunmuştur. 3°C deki aktivite maksimum değerinin yaklaşık olarak %50 si kadardı. Enzimin aktivitesi, kaysıda 25°C de, muzda ise 37°C de maksimum aktiviteye erişir.^{75,77}. Muz PPO'nun katekol substratıyla katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisi 18,6 kJmol⁻¹ olarak bulunmuştur⁷⁷.

Cvs elmalarında, klorogenik asit substratıyla PPO'nun maksimum aktivitesi sıcaklıkla hızlıca arttığı fakat 35°C ye gelindiğinde bile maksimum aktiviteye ulaşamadığı belirtilmiştir⁷⁵. pH 5,2 de klorogenik asit substratı ile yabani havuç PPO aktivitesinin 22-27°C arasında yavaşça arttığı halde, daha sonra sıcaklık 32°C ye yükseltildiğinde aktivitede daha fazla artış gözlenmemiştir⁷⁸. Patatestte, PPO 22°C de katekol substratıyla maksimum aktiviteye sahipken⁷⁹, pirogallol substratı ile 15°C ve 35°C arasında aktivitede lineer bir artış kaydedilmiştir⁷⁵.

1.1.3.e. PPO'nın Isı Stabilitesi

PPO enzimleri aşırı sıcaklıklarda kararlı değildir. Dokularda ve çözeltilerde enzim, 70 ve 90°C sıcaklıklara kısa aralıklarla maruz bırakmak çoğu durumlarda katalitik fonksiyonunu tamamen ya da kısmen dönüşümsüz olarak kaybetmesine yetmektedir. Aynı zamanda 0°C nin altındaki sıcaklıklara maruz bırakmakta aktiviteyi etkileyebilir.

Meyva yada sebze dokularında PPO, enzimatik kararmayı önlemek için düşük sıcaklıklara maruz bırakmadan ziyade genellikle ısıyla ya da kimyasal bileşiklerle inaktif edilirler. Aksi takdirde donma esnasında hücre parçalanmasının bir sonucu olarak hızlı bir şekilde enzim ortama geçecek ve substratlarıyla daha kolay etkileşecektir⁸⁰.

PPO'nın ısıya dayanıklılığı, substrat spesifikliğine, optimum pH ya, optimum sıcaklığa ve enzim kaynağına bağlıdır. Dokuda mevcut olan enzimi göz önüne aldığımız zaman, partikül büyüklüğüne bağlı olan ısı geçirgenliği termal inaktivasyonu kayda değer bir şekilde etkileyebilir.

Ayvadaki PPO'nun inaktivasyonu, 95°C de 16-30 saniye arasında bulunurken, 75°C de 25-80 dakika arasında bulunmuştur⁸¹.

Aynı kaynaktan elde edilen farklı molekül yapıdaki izoenzimle çok daha farklı termal stabilitelere sahip olabilir. Şeftaliden elde edilen üç izoenzimin 55°C de yarılanma süreleri sırasıyla 5.5, 14.1 ve 14.6 dakikadır. Dördüncü izoenzim ise 50 dakikalık bir sürenin üzerinde aktiftir ve hızlı bir inaktivasyon için 76°C de ısıtmak gerekir⁸².

1.1.3.f. PPO'nın Aktivatörleri

Literatürde PPO'nun inaktivasyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi hakkında çok geniş bilgi varken, enzimin aktivasyonu hakkındaki bilgiler oldukça azdır. Bu durumun temel sebebi, PPO'nun aktivasyonunun istenmeyen durum olmasından kaynaklanmaktadır.

Elma kabuğundan hazırlanan mitokondrial enzim; polivinilpirolidon (PVP) ile inaktive edildikten sonra anyonik deterjanlarla (sodyumdodesil sülfat; SDS) reaktif

olduğu bulunmuştur⁸³. Aynı zamanda SDS, kısmi olarak saflaştırılmış ve olgunlaşmamış farklı kaynaklardan elde edilen gelişmemiş PPO'ı aktive ettiği bulunmuştur⁸⁴. Üzüm PPO'ı kısa aralıklarla asidik pH ya da üreye maruz bırakıldığında 4-10 kat dönüşümlü olarak aktive olduğu, asidik pH ya daha uzun süre maruz bırakıldığında dönüşümsüz aktivasyona uğradığı belirlenmiştir. Asitlerle aktivasyon yüksek iyonik şiddetlerde daha da aktif durumdadır. Bu durum sağlam kloroplastlarda olduğu gibi kısmi olarak saflaştırılmış enzim çözeltilerinde de tesbit edilmiştir. Buna ilaveten dönüşümsüz aktivasyona enzimin elektroforetik hareketliliğindeki azalmanın etki ettiği bulunmuştur⁸⁵. Bu ifade konformasyonel yüklerin aktivasyona sebep olabileceğini destekler. Üre aynı zamanda olgunlaşmamış kaynaklardan elde edilen PPO'ı da aktive etmektedir.

Ortama Cu^{+2} iyonlarının katılması patatesteki PPO'a etki etmezken, turptaki enzimin aktivitesini artırdığı bulunmuştur^{86,87}.

L-DOPA, PPO'nın katalizlediği adrenalin siklizasyon reaksiyonunu ve nitelikli ara ürünlerinin oluşumunu aktive ettiği belirtilmiştir⁷⁰. Substratın indüklediği bu aktivasyona patates dokularında rastlanmıştır⁷⁹.

PPO'nın aktif formu, Cu ihtiva eden bir oligomerik protein olduğunu gösterir. Aktivatörün rolü enzimi biyolojik aktivite için gerekli konformasyon derecesine getirir⁸⁸.

1.1.3.g. PPO'nın İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi

PPO'nın inhibisyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi genelde aynı başlık altında incelenir. Ancak kararmanın önlenmesi, yalnızca enzimin inaktivasyonu ile değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli olan iki substrattan (O_2 ve polifenol) birinin uzaklaştırılması ya da enzim reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin, ikinci defa enzimatik olmayan bir reaksiyonla yeni renkli bileşikler i inhibe edebilir.

Gıda teknolojisinde kararma inhibitörlerin kullanılması, zehirleyici olmayan, sağlıklı, tadı ve görünümü bozmayan özellikli olmasıyla sınırlanır.

En iyi sonuçlar, kimyasalların karışımlarıyla elde edilmiştir. Walker⁸⁹ enzimatik inhibitörleri aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır.

i. Enzimi birinci derecede etkileyen inhibitörler;

PPO, prostetik grup olarak Cu ihtiva eden bir metaloprotein olduğu için, siyanür, karbonmonoksit, sodyum-dietil-ditiyo-karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid ve potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir^{69,89,90,91}.

Bu inhibitörlerden bazıları meydana gelen kinonlarla da reaksiyona girerler. DIECA, muz PPO'ı üzerinde etkisiz olduğu bulunmuştur. Bu durum DIECA'nın saflaştırılmış enzimdeki Cu'la kompleks yapamadığı gerçeği ile açıklanabilir⁹². Askorbik asit enzimin prostetik grubunu şelatlayarak PPO üzerinde direkt etkili olabilir.

Florür ve azotür gibi inorganik iyonlar asidik ortamda enzimi genellikle inhibe etmektedir. Bakla PPO'ı üzerinde florür nonkompetitiv inhibisyon etkisi gösterirken azotür karışık tip inhibisyon göstermektedir. Borat gibi bazı inorganik iyonlar substratla kompleks yaparak inhibisyon etkisi gösterirler. Substrat olarak L-DOPA yada L-adrenalin kullanıldığında boratın inhibisyonu kompetetiv tip olduğu bulunmuştur^{93,94}.

Benzoik asit ve sinamik asidin bazı türevleri, tatlı kiraz, elma, armut, kayısı ve patateslerden elde edilen enzimler üzerinde daha ziyade kompetitiv inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur^{95,96,97,98}. K_i değerleri; sinamik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, m-kumarik asit, o-kumarik asit ve benzoik asit sırasıyla artış gösterirler^{89,95}. Aromatik asit inhibitörleri, ya direkt benzen halkası üzerinde ya da konjüge pozisyonunda serbest bir karboksilik grup ihtiva etmeleri gereklidir. Düz zincirli asit inhibitörleri etki gösterebilmeleri için, en az iki konjüge etilen grubuna sahip olmaları gereklidir⁹⁸. Metilasyonla, inhibisyon ve K_i değerlerinin daha düşük olduğu bulunmuştur. İnhibitörün, benzen halkasının metilasyonu ya da hidroksilasyonu aktif bölgeyi yarışmalı olarak inhibe ettiği bulunmuştur⁹⁸.

Benzoik asitle mantar PPO'nın inhibisyonu, katekol substratı ile kompetitiv, O_2 le nonkompetetiv olduğu halde siyanid inhibitörü aynı substratlarla zıt etki gösterdiği bulunmuştur. Bu durum enzim molekülü üzerinde iki farklı bölgenin varlığı ile açıklanabilir. Bu bölgelerden birisi fenolik substratları da kapsayan aromatik bileşikler için yüksek afiniteye sahipken, diğer bölgesi metal bağlayabilen reaktifler ve oksijen için fonksiyon görebilen bakır ihtiva etmektedir⁹⁹.

Verilen bir inhibitör için K_i değeri, aynı orjinli izoenzimler için farklı olabilir. pH 6,2 de klorogenik asit substratı ile p-kumarik asit, armut PPO'ı üzerinde

nonkompetetiv, pH 4.0 de bu enzim fraksiyonu üzerinde benzoik asit kompetetiv bir etki gösterdiği bu inhibitör gruplarının K_i değerleri, substrat olarak o-dihidroksifenol yada monofenola bağlı olduğu bulunmuştur¹⁰⁰.

Polivinilpirolidon (PVP, MA 10.000-60.000) gibi çözünebilen polimerler, PPO'a kompetetiv bir inhibitör olarak etki eder^{89,101,102}. Bu etki anyonik deterjanlarla kaldırılabilir.

Şeker kamışı PPO'nın güçlü bir inhibitörü olan tiyoglikolat, hem enzimle, hem de substratla reaksiyona girer^{64,103}.

2,3 Naftalendiol PPO'ın spesifik kompetetiv bir inhibitördür. Bu inhibitör lakkaz üzerine etki etmez ve bu iki enzim arasındaki farklılığı ortaya çıkarır¹⁰⁴. PPO'ın inaktivasyonunun bir başka yolu da proteolitik enzimlerin aktivatörleriyle muamelesiyledir. Yani PPO'ın inhibitörleri, proteolitik enzimlerin aktivatörüdür. Kültür mantarlarının enzimatik kararması süksinik asit-2,2-dimetil hidrazid ile önlenir. Kararma aynı zamanda bu inhibitörlere substratların bağlanmasıyla önlenmiştir. Diklorodiflarometan donmuş reaktiflerle temas ettiği zaman proteini denatüre ederek PPO'ı inhibe ettiği bulunmuştur¹⁰⁵.

ii. Reaksiyon Ürünleri veya Substratlar ile Reaksiyona Giren Bileşikler;

Reaksiyon ürünleri veya substratlar ile reaksiyon veren enzimatik kararma inhibitörleri aşağıdaki gruplara ayrılabilir;

1. O-dihidroksifenollerden oluşan kinonlar üzerine indirgeyici reaktif olarak etki edenler: Bu bileşikler inhibisyon esnasında tükenirler. Ve bunlar yüksek konsantrasyonlarda kullanılmadıkça renk değişimine karşı geçici bir koruma sağlarlar. Enzimin inaktif olması, indirgenme reaktifinin tükenmesinden kaynaklanmaktadır. Bu özelliği gösteren ve kullanılan bazı maddeler; askorbik asit, SO_2 , potasyum metabisulfat, 2-merkaptotanol, 2-merkaptobenzotiyazol ve tiyoglikolat.

2. Kinonlar ile kararlı renksiz bileşik oluşturan kinon çiftleri: Bunlar tükenmediği müddetce devamlı koruma sağlarlar. Sistein, glutatyon, benzensülfonik asit, DIECA ve Na-etilksantat böyle reaksiyolarda etkilidirler.

Bazı enzimler metilasyon yada benzen halkasının oksidatif parçalanmasıyla PPO 'ın substratlarını inhibitörlere dönüştürür. O-metil transferaz enzimi, 3,4-dihidroksi

aromatik bileşiklerin 3 pozisyonunu metilleyerek PPO'nun substratlarını, inhibitörlerine dönüştürür (kafeik asitin ferulik asite çevrilmesi gibi). Bu işlem için kofaktör olarak S-adenozilmetiyonine ihtiyaç vardır⁸⁹.

iii. Özel inhibitörlerin uygulanması;

Isıpanak kloroplastlarından elde edilen PPO, azidden pratik olarak etkilenmezken 0,01 M konsantrasyonundaki potasyum siyanür içinde kuvvetli inhibe olur¹⁰⁶. Patatesten elde edilen enzim 0,1 mM'lık KCN ve NaN_3 ün her ikisiyle de %60'a kadar inhibe olmuştur. Concord üzümü PPO'yu 5 mM KCN çözeltisinde %98'e kadar inhibe olurken aynı konsantrasyonlu NaN_3 içinde yalnızca %60'a kadar inhibe olur⁷³.

Atmosferi çevreleyen O_2 , CO_2 ve CO seviyelerinin değişmesiyle enzim aktivitesi uygun bir dereceye kadar inhibe olur. CO_2 /CO oranı 80/20 olduğunda, mantar PPO'sının katekol oksidaz aktivitesi %68'a kadar azaltılabilir¹¹³. %30 luk CO_2 , 20°C'de %70'lik inhibisyona sebep olur. %5 ile %10 arası, O_2 ve %1'lik CO ihtiva eden veya etmeyen %1'lik CO_2 'li atmosferde salatanın rengini korumada etkili olmuştur. CO'nun fasulye kabuğu üzerinde PPO'nun etkili bir inhibitörü olduğu kaydedilmiştir¹⁰⁷. Diğer taraftan taze üzüm ya da homojenatları CO_2 ortamında korunduğunda 30 güne kadar havaya göre aktivitesi daha çok korunmuştur¹⁰⁸.

2-Merkaptobenzotiyazol, farklı kaynaklardan elde edilen PPO'nun etkili bir inhibitörü olduğu kaydedilmiştir. %1 veya %2'lik çözeltisi Anjou armutunun renk değişimini tamamen durdurmuştur¹⁰⁹. 0,02 mM konsantrasyonlarında muz PPO'sunun inhibisyonuna sebep olduğu belirtilmiştir. Tütün yaprakları, patates ve mantar'dan elde edilen PPO enzimleri üzerine etkili olduğu gözlenmiştir¹¹⁰.

Elma dilimlerinin kahverenginin önlenmesinde 1 mM konsantrasyonundaki 2,3-naftalendiol etkili olmuştur. Ancak bu bileşiklerin çeşitli izoenzimler üzerine etkisi çok farklıdır. Bazı izoenzimler ile benzer etkiler gösterir. Bu inhibitör bir kaç bitki veya onların meyvalarından (şeftali, patates yumrusu, salata tohumu ve şeker pancarı yaprakları gibi) elde edilen PPO üzerine etkili olduğu bulunmuştur.

Askorbik asit, enzimatik kararma inhibitörü olarak en çok kullanılanlardan biridir. Çünkü gıda ürünlerinin biyolojik değerini artırmaktadır. Oksidatif parçalanmadan gelen antosiyaninlere karşı koruyucu görev yapar ve aynı zamanda kırmızı meyvaların renk korumasında yardımcı olur. Askorbik asitin PPO-polifenol sistemi üzerine etkisi kompleksdir ve kinonların indirgeyicisidir. Diğer taraftan Cu^+

şelatlama reaktifi olarak görev yapar. Bunların yanında enzim tarafından direkt oksitlenerek yarışmalı bir inhibitör olarak kullanılır. Kinetik çalışmalar üstün bir inhibitör olduğunu göstermiştir. Bazı fenollerde gözleendiği gibi (rezorsinol gibi), PPO'nun yarışmalı inhibisyonu askorbik asitle artırılabilir^{111,112}.

Askorbik asit aynı zamanda düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip bileşiklerin yanında pro-oksidant olarak hareket eder. L-tirozin, DOPA ve prokatekük asitin PPO ile oksidasyonu askorbik asitle arttığı bulunmuştur. Askorbik asitin yüksek konsantrasyonları kararmaya karşı devamlı bir koruyuculuk sağladığı gözlenmiştir¹¹³.

Askorbik asit yanında SO₂ yada sülfite çok sık olarak sebze ve meyvalardaki enzimatik kararmayı önlemek için kullanılır. Bu bileşikler, PPO-polifenol sistemi üzerine kompleks bir etkiyede sahiptirler. Sülfite, kinonları renksiz bileşiklere çevirerek dönüşümsüz bir inhibisyonla kararmayı önler. Aynı zamanda bu inhibitör mono ve dihidroksi fenollere karşı enzimin aktivitesini azaltır¹¹⁴.

Elma dilimlerine SO₂ in inhibisyon etkisi, %5 lik malik asitle büyük oranda artırılabilir. Bu gibi şartlarda %0,02 lik SO₂ içerisinde 17 saat tutulması tam bir etki için yeterlidir. Geri kalan SO₂'in 30 ppm ve pişirme sonunda tayin edilmediği gözlenmiştir. Üzüm PPO'ı sodyum metabisülfite tamamen inaktif edilmiştir¹¹⁵.

1.1.4. Enzimatik Kararma Reaksiyonlarında Bakırın Rolü

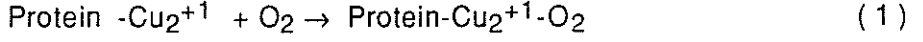
Bakır; polifenol oksidazın yapısında mevcut olduğundan Cu⁺, Cu⁺² nin etkileri dikkate alınmalıdır. Kertesz ve grubu çeşitli mantar numunelerinden PPO enzimini izole etmiş ve 2,2'-diquinolyll ile test edilerek Cu⁺¹ in varlığını tesbit etmişlerdir¹¹⁶.

Aynı kişiler numunenin hazırlanış şekline ve tazeliğine bağlı olarak Cu⁺² nin de %25' e kadar arttığını elektron spin rezonans spektroskopisiyle tayin etmişlerdir. Enzimin Cu⁺² ye karşı özel bir absorblama özelliği göstermeyişi PPO daki Cu⁺ in Cu⁺¹ halinde olduğunu ispatlar.

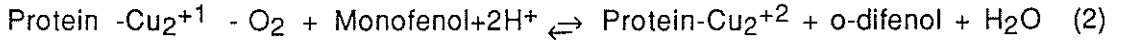
Kertesz ve Zito'nun yaptıkları başka bir çalışmada da apoenzimlerin Cu⁺² ye aktif olduklarını, apoenzime az miktarda Cu⁺² nin eklenmesi halinde Cu⁺² nin aktif Cu⁺ e indirgendiği ispatlanmıştır¹¹⁷.

Mason'un; enzimin katalitik kısmındaki bakır atomlarının valans durumu etkilidir teorisine göre, ortamda o-difenol molekülünün varlığında, enzimin yapısındaki iki

bakır atomu Cu_2^{+2} halinden Cu_2^{+1} haline indirgenir¹¹⁸. Bu teoriye göre, kresolazın (monofenolaz) aktif bölgesinin katalitik kısmında proteine bağlı komşu iki Cu_2^{+1} vardır ve bir oksijen molekülü proteine bağlı Cu_2^{+1} le bir kompleks oluşturur.

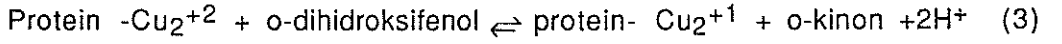


Bir oksijen molekülünden monofenolün hidroksilasyonu sırasında bir atomu kullanırken, diğer atomu da suya dönüştürülür.

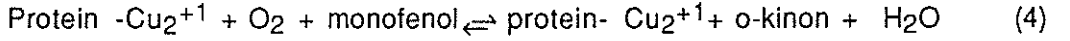


Bunun için 2 elektron ihtiyacı Cu^{+1} atomları tarafından sağlanır. Burada Cu^{+2} inaktif haldedir.

Bakırın inaktif halden (Cu^{+2}) aktif hale (Cu^{+1}) geçmesi, dihidroksifenolün kinona oksidasyonu yoluyla sağlanır :



Bu üç basamağında aynı ortamda olduğu varsayılırsa net reaksiyon denklemi şöyledir:



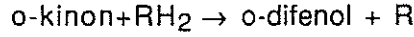
1.1.5. O-Kinonların Sekonder Reaksiyonları

Fenolik substratlardan teşekkül etmiş o-kinonlar, her nekadard kırmızıdan kahverengiye değişen renkler gösterirlerse de, daha çok koyu renkli sekonder ürünlerin oluşumuna neden olan sekonder reaksiyonlar da rol oynarlar.

Polifenol kararmasında önemli sekonder reaksiyonlar şunlardır : 1) Zorla oksitlenmiş substratların çiftleşmiş oksidasyonu, 2) Amino asitler ve proteinlerle kompleks oluşturma 3) Yoğunlaşma ve polimerizasyon.

1.1.5.a. Çiftleşmiş Oksidasyon

Okside olmuş kinonlar, yükseltgenme-indirgenme potansiyelleri daha düşük olan diğer bileşiklerin oksidasyonuna neden olabilirler.



Bu yüzden, polifenoloksidazlar tarafından doğrudan oksitlenmemiş olan bileşikler dolaylı olarak oksitlenirler. Antosiyaninler, fenollerin glikozidleri, askorbik asit ve amino asit veya proteinlerle kompleks oluşturan polifenoller, bu tür bileşiklerdendir¹¹⁹.

PPO'nın inhibitörleri olarak bilinen birkaç bileşiğin, tütün yaprağı PPO'ı ile klorogenik asitin oksidasyonu ile oluşan kinon ile gerçekleşmesi muhtemel olan reaksiyonlar denenmiştir. Bunun sonucu olarak askorbat, potasyum etilksentat, sodyum dietilditiyokarbamat ve sistein gibi bileşiklerin kinon oluşumunu farklı derecelerde inhibe etmekle kalmayıp aynı zamanda kinonlar ile reaksiyon verdikleri tesbit edilmiştir.

Rutin (quercetin glikozidi)'nin, patatesin ihtiva ettiği polifenoloksidazın etkisiyle çok miktarlarda oksitlendiği gözlenmiştir. Fakat bu oksidasyonun hızı, klorogenik asit ve kafeik asit gibi basit fenolik asitlerin ilavesiyle dikkate değer oranda arttığı bulunmuştur. Buda gösteriyorki reaksiyon dolaylı olarak oluşan bir çiftleşmiş oksidasyondur¹²⁰.

1.1.5.b. Amino asitler ve Proteinlerle Kompleks Oluşumu

Kinonun ilk teşekkülünden sonra, gıda kararmasıyla ilgili en önemli sekonder reaksiyonlarından biri, amino asit veya protein gruplarıyla kompleks oluşturmalarıdır.

a) Aminler ve ilgili bileşikler; Aminler, hem o-hem de p-kinonlarla reaksiyona girerler. o- kinon halinde substitüsyon 4 ve 5. pozisyonlarında cereyan eder. Oluşan ürünler kinoniminler olarak bilinir. İndollerde, o-kinon ve p-kinonlarla reaksiyona girerler. Normalde 3. pozisyon mevcut olduğunda indoller, kinon ve naftakinonla yoğunlaşarak koyu renkte indolil kinonları dönüşürler.

b) Amino asitler; Birçok hallerde enzimatik olarak oluşmuş o-kinonun çok koyu renkli ürünler vermek üzere farklı amino asitlerle reaksiyon vereceği gösterilmiştir. Renk oluşturan reaksiyonlar amino asitlerin türlerine ve onların türevlerine göre

incelenmiştir. Bu tür bileşiklere örnek olarak, prolin, hidroksiprolin etilester, pirolidin, glisin, dimetilamin ve metilamin ve sınırlı hallerde alanin, glutamik asit ve arginin verilebilir.

c) Sülfhidril grupları; o-Kinon ve proteinler arasındaki reaksiyonun incelenmesi göstermiştir ki amino ve sulfhidril gruplarının varlığında çiftleşmenin amino hidrokinonlar oluşturmak üzere vuku bulduğu ve fazla o-kinonunda aminokinona dönüştürüldüğü gözlenmiştir¹²¹.

Enzimatik olarak üretilmiş kinonlar ve amino asitler arasındaki reaksiyonun sistematik olarak incelenmesi göstermiştir ki; o-kinonlar ile bir kompleks oluşturan proteinin fonksiyonel grubu tiyol grubudur. Bu durumda reaksiyon, kinonun hidrokinona geri oksidasyonunu ihtiva eden birkaç basamaktan ibarettir. Bu basamaklar sırasıyla R-S-hidrokinon ve sonuçta R-S-kinon oluşumudur.

1.1.5.c. Kinon Oluşumundan Sonra Polifenollerin Polimerleşmesi

Katekinin otooksidasyonunda (pH=4-8), temel reaksiyon sırasının oksidatif yoğunlaşmayı takip eden o-kinonun oluşumu esasına dayanır. Fenol ile kinon arasındaki bağ karbon-karbon bağıdır. Bu bağın oluşumu o-kinonun elektrofilik olarak aktiflenmiş kısımlarından biri ile (2',5' veya 6') bir başka katekin-kinonun nükleofilik olarak aktiflenmiş kısımdan biri (6. veya 8. pozisyon) arasında veya bir katekin molekülünün 6-pozisyonu arasında cereyan eder. Takip eden çalışmalar göstermiştir ki, katekinin polimerleşmesi bir molekül katekol kalıntısıyla bir başka floro glucinol kalıntısı arasında bir baş-kuyruk bağı oluşturur¹²².

Katekinin, o-kinonlara benzer oksidasyonunun mantar, patates ve tütün PPO'dan etkilendiği gözlenmiştir. Böyle bir durumda oluşmuş o-kinonun, bir başka molekülü floroglucinol ile kinonun B halkası arasında bir baş-kuyruk bağı halinde polimerleştiği bulunmuştur.

Polimerleşmenin özel bir hali olan koyu renkli ve yüksek molekül ağırlıklı bir polimer olan melanin; fenolik amino asit tirozinden oluşur. Melanın oluşumu gıda prosesleri nazara alındığında gıdaların kararması açısından herhangi bir önemi yoktur. Fakat melaninin reaktif grupları proteinlerle birleşerek koyu renkli pigmentler oluşturabilirler.

Bu polimerleşme çeşitli basamaklarda cereyan eder. Tirozin enzimatik olarak o-dihidroksi bileşiği dopa'ya ve ondan sonra dopa kinona oksitlenir. Dopa kinonun kendi kendine ve dönüşümsüz olarak molekül yapısındaki bir değişme ile 5,6-dihidroksi dihidroindol-2-karboksilik asite dönüşür ve buda kinonun bir hali olan dopakroma oksitlenir. Takip eden basamak dekarboksilasyon ve tekrar düzenlemeden sonra kırmızı renkli dopakromdan 5,6-dihidroksi indolun oluşumudur. Bu bileşiğin daha ileri oksidasyonu 5,6-indol kinonu oluşturur bu da çapraz bağlı bir polimerleşme olan oksitlenmenin neticesinde melanin teşekkül eder.

1.1.6. PPO'nın Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Homojenliği ve Molekül Ağırlığı

1.1.6.a. Ekstraksiyon

Bitki materyalinden PPO yada lakkazın ekstraksiyonu işleminde üç önemli husus dikkate alınmalıdır.

1. Enzim kaynağının olgunlaşmamış durumundan dolayı aktivite göstermemesi, 2- Hücreye bağlı aktif enzimin çözünabilirliği ve 3-Bazı fenollerin enzim proteini üzerindeki oksidasyonu ve bunun sonucu olarak da polimerizasyon ve çökmenin önlenmesi.

Enzim kaynağının olgunlaşmamış halinden dolayı aktivite göstermemesi bitki PPO'ı için çok önemli bir problem değildir. Çünkü, olgunlaşmamış partikül haldeki enzim, kafein-sodyum benzoat'la çözmekle aktif hale getirilebilir. Olgunlaşmamış kaynaklardan elde edilen ya da kısmi olarak saflaştırılmış PPO, SDS ile aktive edilebilmiştir⁸⁴.

Çözünme işlemi, genellikle Triton X-100 yada Twen-80 gibi deterjanlarla gerçekleştirilebilir, Diğitionin elma mitokondrisinde kullanılırken, bu işlemin kloroplastlar için etkili olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyonda sodyumdioksalatın kullanılması, şeker pancarı yaprağı kloroplastlarından elde edilen PPO'nın aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir. Enzim proteinlerine bağlı lipoproteinleri uzaklaştırmak için, bütanol ekstraksiyonu, elma kabuğundan PPO'nın hazırlanması için tavsiye edilmiştir⁷⁴. Kararlı bir PPO çözeltisi hazırlanmasında ortaya çıkan en büyük güçlük; enzimatik fenol oksidasyonu ve bitki materyalinin parçalanmasında ve ekstraksiyonunda ortaya çıkan pigment oluşumunun önlenmesidir. Pigmentler, enzim

çözeltisinde çökebilirler ve çözünmeyen kısımlar aktiviteyi etkileyebilirler. Daha da önemlisi enzimin dönüşümsüz inaktivasyonuna sebep olabilirler. Bu tehlikeleri azaltmak için, tüm ekstraksiyon işlemleri mümkün mertebe -20, -30°C arasında yapılmalıdır. Ve kesinlikle 0°C nin üstüne çıkılmamalıdır. Toz haline getirme ve homojenleştirme genellikle sıvı azot yada azot atmosferinde yapılmaktadır. Bazı durumlarda materyalin, kuru ve hızlı dondurma enzim ekstraksiyonunun ilk basamağı için istenilen bir durumdur. Aseton çöktürmesi ve bunun tampon ekstraksiyonu ile takip edilmesi çok sık kullanılan metodlardan biridir^{64,65,95}.

Aseton çöktürmesi ve tampon ekstraksiyonun etkisi, şeftali PPO aktivitesi üzerinde karşılaştırıldığında, asetonla çöktürmede aktivitenin 20 kat fazla olduğu bulunmuştur. Aktivitedeki bu son derece yüksek artış, asetonun bir inhibitörü elimine etmesi ya da enzim proteinini aktif formuna dönüştürmesiyle açıklanabilir¹²³.

Uygun bir tamponla bazı ekstraksiyonlar, aseton çöktürmesinden daha çok tercih edilir. Çok çeşitli tamponlar, enzimi kaynağından ekstraksiyon için uygun pH değerlerinde (asidik yada bazik) sağlayabilirler. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin formunu etkileyebilir. Enzimatik polifenol oksidasyonundan ekstraksiyon sistemini korumak için, ortama indirgen reaktifler yada kinonlar gibi enzimin dönüşümlü inhibitörleri katılabilir. Askorbik asit, sistein sodyum metabisulfit, DIECA yada sukroz bu maksatla kullanılan inhibitörlerdir^{76,124,125}.

Enzim ekstraksiyonu boyunca fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili yolu, çözünmeyen bir polimer materyaline substratları bağlayarak ortamdaki uzaklaştırmaktır. Fenol bağlamada en yaygın kullanılan polivinil pirrolidon (PVP) dir. PVP fenollerin iyonlaşmadığı nötral yada asidik pH da çok kuvvetli proton alıcısıdır^{125,126}. Aynı zamanda PVP kısmi olarak PPO'nun kompetetiv bir inhibitörüdür. Ancak onun inhibitör etkisi, enzim çözeltisini yıkamakla elimine edilebilir. Polietilenglikol (PEG), bu iş için bazen daha fazla tercih edilir. Belki de bunun sebebi, PEG'nin asetondaki çözünürlüğünün enzim çözeltisi elde edilmesinde belirli avantajlar sağlamasından dolayıdır¹²⁶.

Poliamid (nylon) ve polikaprolaktam da aynı zamanda fenol bağlamak için yaygın olarak kullanılmıştır. Katalitik olarak inaktif olan proteinler (kazein gibi), fenollerle hidrojen bağı oluşturmak üzere kullanılabilir¹²⁷.

Proton alabilen organik solventler (ketonlar, esterler, dimetil amidler, dimetilsulfoksit ve N-metilpirolidon) da fenollerle kompleks yapımında etkilidirler.

Enzim ekstraksiyonunun ilk basamağında çok sık kullanılan kuru aseton (özellikle %20 su ihtiva eden), aynı zamanda fenollerı uzaklaştırmada da etkili bir faktördür.

Meyva dokularındaki PPO substratlarının uzaklaştırılması, ya aseton yada kalsiyum asetat çöktürmesi ile yapılabilir. şeftaliden lakkaz ekstraksiyonunda, zayıf alkali hidrolizi ve amonyum bromürle çöktürmekle ilgili substratlar uzaklařtırılabilir⁷⁶.

1.1.6.b. Saflaştırma

Ekstraktlanmış ham PPO çözeltilerinin saflaştırılması için enzim kaynağına ve saflaştırma derecesine göre birkaç metod uygulanmıştır. Farklı doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100 yada G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatoğrafisi ve DEAE-Seluloz yada DEAE-Sephadex anyon değıştiricileri ile iyon değışim kromatoğrafisi çok sık olarak kullanılmıştır. Ayrıca diyaliz yada sephadex G-25 kromatografisiyle düşük molekül ağırlıklarına sahip safsızlıkları uzaklaştırmak için bu metodların bazı kombinasyonları ara basamaklarda tatbik edilmiřtir⁷⁶. İşlemlerin sırası duruma göre değışebilir. Bazı durumlarda bir yada diğerk saflaştırma basamakları tekrar edilebilir. Örneğın; Mantar PPO'ı için bir saflaştırma prosedürü; iki amonyum sülfat çöktürmesi basamağı ve diğerk saflaştırma basamakları takip edilerek son olarak DEAE-seluloz iyon değışim kromatoğrafisi uygulanmıştır. Daha yakın zamanda şeftali PPO'ı hidrofobik kromatoğrafi çeşidi olan fenil-sepharose CL-4B ile saflaştırıldığı rapor edilmiřtir⁹⁵.

1.1.6.c. PPO Enziminin Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı

Çoğı kaynaklardan elde edilen PPO'ların farklı molekül yapılarında olduğı açıklanmıştır. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına, ayrıca ekstraktlama ve ayırmada tatbik edilen metodlara bağılıdır. Molekül yapılarının farklı oluşunun nedeni birleşme-ayrışma durumuna göre değışir. Bu ifade; 1-Benzer birimlerin değışik polimerizasyon derecesinde birleşmeleri, 2-Farklı birimlerin değışik kombinasyonuna, 3-Tek bir proteinin konformasyonel değışimleri, 4-Yukarıda bahsedilen üç ihtimalin kombinasyonlarına bağılıdır.

Bu formlar kendi aralarında da değışebilir. Bu değışmeler; farklı pH, iyonik şiddet konsantrasyon yada protein parçalama reaktifleri ihtiva eden çözeltilerde bekletmekle daha da artırılabilir¹²⁵. Bu yapıların; substrat spesifikliğı, optimum pH, stabil

olduğu sıcaklık ve de inhibitörlere karşı davranışlarında farklılıklar vardır. Dehidrogenasyon ve hidroksilasyon aktivitelerinin oranları üzerinde çok detaylı çalışmalar vardır. Genelde, çeşitli yapılarının yalnızca bir kısmı monofenollere etki eder^{65,129}.

Hidroksilasyon aktivitesi, dört alt birimin birleşme derecesine bağlıdır. Ancak alkali pH'larda daha büyük molekül ağırlıklı yapılar hidroksilasyon aktivitesinin çoğunu kaybeder. Bu şartlarda o-difenolün yükseltgenme aktivitesinden daha az kararlıdır¹³⁰.

Şeker pancarı kloroplastları ve muzdan elde edilen enzimleri için, dikkate alınacak derecede daha düşük molekül kütleleri (10.000 ve 12.000 dalton) bulunmasına rağmen genelde monomerin 30.000 dalton civarında molekül kütlesine sahip olduğu ve bir bakır atomu ihtiva ettiği kabul edilir¹³¹.

Bu enzim yapılarının yanı sıra, yalnızca elektroforetik özellikleri farklı olan özdeş molekül kütleli yapılarda vardır. Patatesten elde edilen PPO'nun farklı izoelektrik noktalara sahip birkaç monomerik yapıları PAGE ile belirlenmiştir¹³².

Şeftali lakkazının molekül ağırlığı 70.000-90.000 arasında olduğu belirlenmiştir. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın farklı molekül yapılarına sahip olduğu ifade edilmektedir¹³³.

1.1.7. Enzim Aktivitesi Tayin Metodları

PPO aktivitesi, substratın parçalanma yada ürünün oluşma hızını belirli sınırlar içinde ölçmekle belirlenebilir. Her iki metod ile de reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesine dikkat edilmelidir. Çünkü, o-dihidroksifenolün oksidasyonu ile enzim çok çabuk inaktif hale geçer.

Substratın parçalanma hızının belirlenmesinde, O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresiyle monometrik olarak yada bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülür. İki metod da aynı sonuçları vermez. Çünkü aynı şartlar altında elde edilen O₂ nin adsorpsiyon değerleri polarografik metotta daha yüksektir. Bu metod PPO aktivitesi tayini için birkaç araştırmacının seçtiği metodla uyum içindedir¹³⁴.

Ürünün oluşma hızı, kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluklarının spektrofotometrik metodla ölçülmesiyle tayin edilebilir. Bu metodun çok basit olmasından dolayı rutin analizlerde ve polarografik metoda göre nisbeten daha uzun

zaman aralıklarında kullanıldığından tercih edilir. Ancak bazı yazarlar spektrofotometrik metodun kullanılmasına karşıdır. Çünkü; PPO'nın sekonder reaksiyon ürünleri oluşur ve sekonder reaksiyonlar kontrolü güç olan bir çok faktörden etkilenirler.

Askorbik asitin varlığı elde edilen değerleri düşürürken, aminoasit; protein parçalanma ürünleri, ağır metal iyonları, meyvaların kendi yapısındaki substratları ve fenollerin otooksidasyon ürünleri enzim aktivitesinin seviyesini arttırabilirler. Spektrofotometrik metodlar, enzim aktivitesi ve enzim kararması arasında bir ilişki kurulduğu zaman tavsiye edilebilir¹³⁵.

Katekol, pirogallol yada klorogenik asit gibi nötral substratlar spektrofotometrik metodlarda kullanılabilirler. Değişik fenollerin oksidasyonundan elde edilen renkli bileşikler farklı dalga boylarında maksimum absorpsiyon verirler vede substratlar özellikle bazik pH larda otooksidasyona maruz kalabilirler. Daha da önemlisi; bazı substratların aşırısı enzim inhibisyonuna sebep olduklarından bu hususlara spektrofotometrik ölçümler yapılırken dikkat edilmelidir¹³⁶.

Enzimin hidroksilasyon aktivitesi, O₂ absorpsiyon metoduyla belirlenmektedir. Saf enzim o-dihidroksi fenolün mevcut olmadığı ortamda monofenol substratı (en sık kullanılan; p-kresol ya da tirozin) kullanılarak enzim aktivite değeri hesaplanmasında, reaksiyonun geri kalan fazı dikkate alınmadan yapılır. Değerlendirme periyodunun sonu, reaksiyonun başlangıcı olarak düşünülür ve de O₂ absorpsiyonunun zamana karşı grafiği çizilir. Bu grafikten enzim aktivitesi hesaplanır¹³⁷.

Aktivite ölçümleri esnasında inaktivasyonu geciktirmek için ilave reaksiyonlar kullanılır. Enzim ve substratın yanı sıra reaksiyon karışımı, oluşan kinonları hemen indirgeyen hidrokinon ve askorbik asit gibi oldukça zıt oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip olan bir yada daha çok bileşikler ihtiva eder. Substratın katalitik değeri, bu reaktantın konsantrasyonu sabit kaldıkça yeterlidir. Sistemin oksidasyon-redüksiyon potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bu prensibi temel alan diğer varsayımlar, reaksiyon karışımına oksitlenebilen askorbik asit tatbik edilir. Ve onun maksimum absorpsiyonu olan 265 nm de konsantrasyondaki azalma ölçülür. Askorbik asitin parçalanma hızı, enzim aktivitesiyle direkt olarak orantılıdır¹³⁸. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen basamak; substrat $\rightleftharpoons$ kinon transformasyonudur. Aksorbik asit oksidaz sonuçlarla zıttır. Bu metodun diğer bir varsayımına göre reaksiyon

karışımına katılan askorbik asit miktarının tam olarak tüketilmesi için gerekli zaman ölçülür. Böyle bir metodun kullanılması, lineer olarak proses durdurulmadığı zaman tavsiye edilmez. Gerçekten bu reaksiyon süresinin lineer olmadığı bulunmuştur¹³⁴.

Askorbik asit yerine $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ kullanıldığında, 420 nm'de absorbans verir. Bu durumda askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm dalga boyu civarında absorbans veren bitki materyalleri etkilenmez. Bu metodun diğer bir avantajı da ferrosiyanürün özellikle asidik pH'lardaki değişmelerden askorbik asite göre daha az etkilenir. Ve de çözeltide daha karardır. Ferrosiyanür metodunda aynı substratlar kullanıldığı zaman askorbik asit prosedüründen yarı yarıya daha az hassastır¹³⁹.

Fenolik substratlar ve reaksiyon ürünleri üzerinde yapılan gaz kromatografisi çalışmaları, kolayca oksitlenebilen materyaller kullanılmadıkça, katekol substratı ile daha yüksek K_M değerlerinin elde edildiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu göstermiştir ve reaksiyon boyunca enzimin inaktivasyona uğradığı tesbit edilmiştir.

Inaktivasyonu önlemek için birçok prosedür geliştirilmiştir. Bu prosedürler reaksiyon karışımından kinonları uzaklaştırma esasına dayanmıştır. 3-metil-2-benzotiyazonon, hidrazon hidro klorid, kinonlar ile kondansasyon ürünleri verir. Bu ürünler $CHCl_3$ ile reaksiyon karışımından ekstraktlanır ve organik fazın absorpsiyonu 500 nm'de okunur⁷⁹. Ekstraktlama yerine kondanse olmuş ürünleri asetonda çözmekle daha hassas sonuçlar elde edilir. Enzim aktivitesi, meydana gelen sarı bileşiğin 412 nm de absorbansındaki azalma spektrofotometrik olarak ölçülerek bulunur. Substrat olarak katekol yerine 1,4-dihidroksi benzen kullanıldığında bu metod lakkaz aktivitesi belirlemek için de uygun olur¹⁴⁰.

1.1.8. PPO'nın Tabiatta ve Gıda İşletmeciliğindeki Rolü

PPO'nın bitkilerdeki mevcudiyeti sınırlı olsa bile tabiattaki rolü oldukça fazladır. Kısmen de olsa enzimin önemli bir görevi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direncinde rol oynamasıdır. PPO enziminin patalojisindeki rolü çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir^{141,142}.

Patates x virüsü tarafından etkilenen yumruların, sağlıklı olanlara nazaran daha fazla PPO ihtiva ettiği ve enzimatik kararmaya karşı daha hassas olduğu bulunmuştur. Tatlı patates dokularının *ceratocystis fimbriata* mantarından izole edilen patojenik

veya patojenik olmayan izolatla aşılmasında, dokularda PPO aktivitelerinin artmasına neden olmaktadır. Daha hassas türlerin patojenik olmayan izolatla aşılması, aşılana yerle kuşatılmış tabakalarda daha sonra meydana gelebilecek bir hastalığa karşı bağışıklık sağlamaktadır. Tatlı patates köklerinde kesme işlemi veya enfeksiyon, sağlıklı dokularda mevcut olmayan yeni bir PPO bileşeninin oluşmasına neden olmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu ve aktivitedeki artış çeşitli antibiyotiklerle inhibe edilmektedir. Bu durum aktivitedeki artışın yeniden protein sentezi sonucu meydana geldiğini göstermektedir⁴⁴.

Bitkilerin enfeksiyona karşı direnci ile ilgili olarak PPO'nun rolü hakkında yapılan bir açıklamada enzimin faaliyeti sonucu oluşan kinonların ikinci bir polimerizasyon reaksiyonuna uğramasıyla koyu renkli, suda çözünmeyen polimerler oluştuğu belirtilmiştir. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonunun yayılmasına karşı tampon görevi yapmaktadır. Bu düşünce bazı araştırmacılar tarafından enzimin ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir¹⁴³.

Olumsuz iklim şartlarına dayanıklı olan bitkiler genellikle dayanıksız olanlara nazaran daha fazla PPO aktivitesine sahiptirler. Mesela kış şartlarına dayanıklı bir erik türü olan *Prunus ussuriensis* yapraklarında yüksek seviyede aktivite bulunmuştur. Yine kış şartlarına dayanıklı üzüm asmalarında, dayanıklı olmayanlara nazaran daha fazla aktivite bulunmuştur^{144,145}.

PPO faaliyeti sonucu oluşan kinonlar, sonuçta enzimatik olmayan kararmaya ve humuslaşmaya kadar giden reaksiyonlara iştirak edebilir. Böylece toprağın organik maddelerinin oluşmasına yardımcı olur¹⁴⁶.

Genelde mamül ürünlerin işlenmeleri sırasında gıdaların doğal özelliklerinin olabildiğince korunması görevini üstlenen gıda teknologları için çoğu kez istenmeyen renk değişimleriyle sonuçlanan enzimatik esmerleşmenin kontrolü güç bir uğraşı alanı olmuştur. Enzimatik kararma elma, armut, şeftali ve muz gibi meyvalarda, patates ve yemeklik mantar gibi sebzelerde nisbeten daha fazla görülür. Ancak yeterli seviyede fenolik madde ve PPO içermeyen domates ve sunbeam çeşidi şeftali gibi meyvalarda, PPO ihtiva etmeyen yada az miktarda bulunan PPO'yu yapılarındaki yüksek asit nedeniyle inaktifleştiren limon ve diğer turuncgil meyvalarında birçok üzüksü meyvalarda ve çeşitli sebzelerde enzimatik kararma problem oluşturmamaktadır^{2,35}.

Öte yandan bazı tahıllardan elde edilen unlardaki yüksek PPO aktivitesinden dolayı, ekmek ve makarna ürünlerinin kararma gösterdiği enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan kinonların proteinlerle birleşerek onların hazmolma yeteneklerini ve bu arada lizin amino asidinin yararışlılığını azalttığını bildirilmiştir³⁵. Şeker kamışından şeker üretiminde esmerleşme sonucu hem son ürünün rengi etkilenmekte hem de esmer polimerlerden dolayı kristalizasyon güçleşmekte ve verim düşmektedir. Kiraz, vişne ve patlıcanların antosiyaninlerden kaynaklanan güzel renklerinin enzimatik kararma ile oluşan kinonlarla bozulduğu, daha düşük yükseltgenme-indirgenme potansiyelinden dolayı askorbik asidin antosiyanin oksidasyonunu önlediği ve sonuçta kendisinin oksitlenerek vitamin değeri daha az olan veya hiç olmayan ürünlere dönüştüğü ve gıdaların bu vitamince zayıfladığı öne sürülmüştür^{35,147}.

Siyah çay üretiminde enzimatik kararma istenen bir olaydır. Kinonlar, çaya içim tadı ve kalitesini kazandıran teaflavin ve tearübiğinlerin ön maddeleridir. Bu nedele çay PPO'ı üzerinde çok çalışma yapılmıştır¹⁴⁸. Benzer şekilde çekirdeksiz kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen güzel renkleri enzimatik esmerleşme sonucudur. Açık renkli meyvalardan elde edilen meyva sularının altın sarısı rengi, ılımlı ve kontrollü bir esmerleşme ile elde edilir. Bu ürünlerin lezzet ve aromasında da aromatik esmerleşme ile oluşan maddeler etkili olabilmektedir. Kakao ve kahvenin renk ve aroması, siyah zeytinin renk ve lezzetinde enzimatik kararmanın rolü büyüktür. Ancak yeşil zeytinlerde enzimatik kararma istenmemektedir³⁵. Son olarak meyva suyu üretimi sırasında PPO'nın fenolik maddelere ve tanenlere etki etmesi halinde polimerleşme sonucu durultma sağlanmakta ve fenolik maddelerden ileri gelen buruk tat giderilmektedir^{149,150,160}.

1.2. Çalışmanın Amacı

Enzimatik kararma, polifenollerin o-kinonlara oksidasyonu ve o-kinonların da çabucak esmer renk maddelerine veya melaninlere polimerizasyonu şeklinde cereyan eder. Enzimatik kararmanın kontrolü, enzim, substrat ve O₂ faktörlerinden en az birinin kontrol edilmesine bağlıdır. PPO enzimin inaktif hale getirilmesi veya inhibisyonunda ilk adım, meyva ve sebzeden ekstrakte edilen enzim aktivitesinin optimum şartlarının belirlenmesidir. Bunun için enzim kaynağı olarak, Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nde bol yetişen ve diğer türlerine göre daha etli, büyük ve değerli bir besin olan Kuşburnu meyvaları, Atatürk Üniversitesi Kampüsü'nde yetişkin haldeki bitkilerden Eylül ve Ekim aylarında toplanarak kullanıldı. Kuşburnu

meyvası, meyva suyu, reçel ve marmelat yapımında kullanılır ve hatta çiğ olarak tüketilir. PPO enzimi çoğu meyva ve sebzelerde olduğu gibi Kuşburnu meyvasında da enzimatik kararmaya sebep olmaktadır.

Bu çalışmada ilk defa tarafımızdan kuşburnu meyvasında mevcut olduğu belirlenen PPO enzimi izole edilerek kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için aşağıdaki hedefler belirlenmiştir.

- a) Enzimin uygun tekniklerle saflaştırılması,
- b) Çalışılan herbir substrat için optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi,
- c) Belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- d) Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla inhibisyon türünün tesbiti ve K_i sabitlerinin ve I_{50} değerlerinin bulunması,
- e) Enzimin sıcaklıkla denatürasyon ve renatürasyon özelliklerinin araştırılması,
- f) İzoenzimlerin uygun bir elektroforetik metodla belirlenmesi,

Ayrıca, çalışmada elde edilen sonuçların diğer PPO kaynaklarından elde edilen diğer sonuçlarla mukayese edilmesi amaçlanmıştır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçların, hem bilimsel açıdan faydalı olacağına hem de kuşburnu işletmeciliğine yön vereceğine inanıyoruz.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmalarımızda kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, amonyum sülfat, trihidroksimetilaminometan (Tris), hidroklorik asit, triklor asetik asit (TCA), sodyum hidroksit, sitrik asit, akrilamid, amonyum persülfat, glisin, bromfenolmavisi, gliserin, coomassie brilliant blue G-250, etanol, fosforik asit L-tirozin, tiyoüre, benzoik asit, sodyum azotür, β -merkaptotanol, sodyum dodesilsülfat (SDS), metanol, asetik asit, gümüş nitrat, amonyak, formaldehit ve metilamin E. Merck A.,G dan; polietilenglikol (PEG), askorbik asit, N,N,N',N' tetrametil etilendiamin (TEMED), katekol, L-dopa, o-fenilendiamin, coomassie brilliant bleu R-250, standart serum albumin, diyaliz torbaları, Sephadex G-100, 4-metil katekol, p-kresol, pirogallol, gallik asit, dopamin, L-sistein, glutatyon, sodyum dietilditiyokarbamat (DIECA), ditiyoeritritol, tannik asit glutardialdehit ve N,N' metilen bisakrilamid Sigma Chemical Comp'den; dietilaminoetil (DEAE)-Sephacel pharmacia Fine Chemicals'dan ve sodyum metabisulfit DAYM'den sağlandı.

2.2. Faydalanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifuj : Heraeus Sepatech

Spektrofotometre: LKB-Biochrom, ULTROSPEC-II model 4050

pH metre : Schoot C6 840 pH Meter

Mağnetik karıştırıcı : İKAMAG RH Janke Kunkel

Peristaltik pompa : Pump p-3 Pharmacia Fine Chemicals

Elektroforez tankı : Hoefer, HSI

Terazi : Libror, EB. 330 H

Karıştırıcı : Vortex-Genie Model K-55

Kronometre : Hanhard, Elektronische Digital Stoppuhr

Otomatik pipetler : Fischer

Çalkalayıcı : GFL

Homojenize edici: Waring Blender

Gradient karıştırıcı : Gradient Mixer GM-1 Pharmacia Fine Chemicals

Sabit sıcaklık sirkülatörü : HAAKE FE

Fraksiyon Toplayıcı : Eldex Universal Fraction Collector.

2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir.

i) Ekstraksiyon tamponu (%0.5 PEG, 10 mM askorbik asit, pH=7,3 0,5 M fosfat tamponu): 8,7 g (0,05 mol) K_2HPO_4 , 0,5 g polietilenglikol, 0,176 g (0,001 mol) askorbik asit 80 ml saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH=7,3 e kadar pH metre yardımıyla titre edildi. Çözelti daha sonra saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

ii) 5 mM fosfat tamponu, pH=6,3 (Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözeltiye alındığı, diyalizin yapıldığı tampon): 0,87 g (0,005 mol) K_2HPO_4 950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,3'e kadar titre edildi ve saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

iii) Optimum pH çalışması için kullanılan pH sı 3-10 arasında olan tampon çözeltiler: pH sı 3-5 aralığında 0,1 M sitrat/0,2 M K_2HPO_4 tamponu kullanıldı. Bu tampon için 2,1 g sitrat (0,01 mol), 3,48 g (0,02 mol) K_2HPO_4 80 ml saf suda çözülerek 1M NaOH veya 1M HCl yardımıyla istenen pH ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile hacim 100 ml ye tamamlandı.

pH=5-7 aralığında 0,2 M fosfat tamponu kullanıldı. Bu tampon çözeltide 3,48 g K_2HPO_4 80 ml saf suda çözülerek, 1 M HCl ile çözelti istenen pH ya ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 100 ml ye tamamlandı.

pH= 7-10 aralığında 0,2 M Tris-HCl Tamponu kullanıldı. Bu tampon çözelti için 12,114 g (0,1 mol) Tris 400 ml suda çözülerek, bu çözeltiden 40'ar ml alındı 0,1 M HCl ile istenen pH ya ayarlanarak saf su ile 50'şer ml ye tamamlandı ve böylece değişik pH lı seri Tris-HCl tamponları hazırlandı.

iv) Substrat çözeltileri : Her bir substrat çözeltisi 0,1 M, 10 ml olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0,11 g (1.10^{-3} mol) katekol, 0,124 g (1.10^{-3} mol) 4-metil katekol, 0,126 g (1.10^{-3} mol) pirogallol, 0,191 g (1.10^{-3} mol) L-trozin, 0,108 g (1.10^{-3} mol) p-Kresol suda, 0,197 g (1.10^{-3} mol) L-dopa 0,189 g (1.10^{-3} mol) dopamin ve 0,170 g (1.10^{-3} mol) gallik asit çok az miktartlı bazik ortamlarda çözüldü (suda çözünmedikleri için). Uygun pH'lara ayarlandı .

v) Stok İnhibitör çözeltileri: Enzim inhibisyonu çalışmalarında kullanılan çözeltiler. Tablo 2.1.de gösterildiği miktar ve konsantrasyonlarında hazırlandı. Bazik tampon çözeltilerde çözünenlerin pH'sı HCl ile 8.5'a ayarlandı. İhtiyaç duyulanların seyreltilmeleri saf su ile yapıldı.

Tablo 2.1. Enzim inhibisyonu çalışmalarında kullanılan stok İnhibitör çözeltilerin hazırlanışı

Inhibitör	Miktar (g)	Mol sayısı (mol)	Stok Çözelti konsantrasyonu (M)	İnhibitörün çözündüğü ortam	Çözeltinin hacmi (ml)
Sodyum metabisüfit	0.190	1.10^{-3}	0.1	su	10
L-Sistein	0.121	1.10^{-3}	0.1	su	10
Askorbik asit	0.176	1.10^{-3}	0.1	su	10
Glutasyon	0.307	1.10^{-3}	0.1	su	10
Tiyoüre	0.760	1.10^{-2}	1.0	su	10
Sodyum Azotür	0.390	6.10^{-3}	0.6	su	10
DECA	0.225	1.10^{-3}	0.1	su	10
Ditiyoeritritol	0.154	1.10^{-3}	0.1	su	10
Tannik asit	0.340	2.10^{-4}	0.02	su	10
Benzoik asit	0.366	3.10^{-3}	0.3	pH=8.5 1M Tris Tamponu	10
Sodyum Klorur	1.71	2.10^{-2}	2.0	su	10
Na EDTA	1.86	5.10^{-3}	0.5	pH=8.5 1M Tris Tamponu	10
β -Merkaptoetanol	0.07 ml	1.10^{-3}	0.1	su	10
Tiyodiglikol	1.05 ml	1.10^{-2}	1.0	su	10
Etilenglikol	0.56 ml	1.10^{-2}	1.0	su	10

vi) Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

vii) Coomassie brilliant bleu G-250 reaktifi (kantitatif protein tayini için kullanılan reaktif) : 100 mg coomassie brilliant bleu G-250, 50 ml %95 lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 ml %85 lik fosforik asit ilave edilerek toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

viii) DEAE-selulöz iyon değişim kromatografisinde elüsyon için pH:10-4 arasında gradient oluşturmak amacıyla kullanılan tampon serisi,

0.1 M Tris-HCl tamponu (pH=10)(dengeleme tamponu) : 6,057 g (0.05 mol) Tris 450 ml saf suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH=10 a kadar titre edildi. Toplam Hacim 500 ml ye tamamlandı.

0,1 M fosfat tamponu (pH=7): 8,705 g (0.05 mol) K_2HPO_4 450 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH=7 ye kadar titre edildi toplam hacim 500 ml ye tamamlandı.

0,1 M fosfat tamponu (pH=4); 8,705 g (0,05 mol) K_2HPO_4 450 ml saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=4 e pH metre ile ayarlandı. Son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

ix) Elektroforez çalışmalarında kullanılan çözeltiler :

1M Tris-HCl tamponu pH=8,8; 12,114 g (0,1 mol) Tris 80 ml saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=8,8 e ayarlandı, toplam hacim 100 ml ye tamamlandı.

%10 luk ayırma jeli; 15 ml pH=8,8 olan 1M Tris-HCl, 13,2 ml %30 luk akrilamid % 0,8 lik bis akrilamid, 0,4 ml %5 lik TEMED (N,N,N,N'- tetrametil etilen diamin) ve 9,4 ml saf su karıştırılarak hazırlandı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'lik PER ($(NH_4)_2S_2O_8$: amonyum persülfat) karıştırılarak ilave edildi. PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. (SDS-elektroforezinde bu karışıma %0,1 lik SDS ilave edildi).

% 3 lük yığma jeli; 1M'lik Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, %30 luk akrilamid, % 0,8'lik bis akrilamidden 1 ml, %5 lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml ilave edilerek karıştırıldı. Son olarak taze hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edilerek hazırlandı (SDS-elektroforezinde bu karışıma 0,1 ml %0,1 lik SDS çözeltisi ilave edilerek kullanıldı).

Yürütme tamponu : 3 g Tris ve 14,4 g glisin 200 ml saf suda çözüldü. Çözeltinin hacmi saf suyla 1000 ml ye tamamlandı (SDS elektroforezinde bu çözeltiye %1 oranında % 0,1 lik SDS ilave edildi).

Numune Tamponu : 0,65 ml 1M Tris-HCl pH=6.8, 1 ml %100 lük gliserin ve 1 ml %0,1 lik bromfenol mavisinin karışımıyla toplam hacim saf suyla 10 ml ye tamamlandı (SDS-elektroforezinde su yerine 3 ml %0,1'lik SDS çözeltisi ve kullanılmadan hemen önce 0,950 ml numune tamponuna 50 µl β-merkapt etanol ilave edildi).

2.4. Yöntemler

2.4.1. Protein Tayini

2.4.1.a. Kalitatif Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen elüsyon çözeltilerinde kalitatif protein testi uygulandı. Kalitatif protein tayini, protein yapılarında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır¹⁵¹.

Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede absorbanları proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak ölçüldü.

2.4.1.b. Coomassie bleu Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri, bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem; fosforik asitli ortamda proteinlerin, coomassie brilliant-bleu G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin, diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır¹⁵².

Protein tayin işlemlerinde şu yol izlendi; 1 ml sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 0,10,20,30,40,50,60,70,80,90 ve 100 µl alındı. 5 mM fosfat tamponu (pH=6,3) ile tüm tüplerin hacimleri 0,1 ml'ye

tamamlandı. 5 ml coomassie brillant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vortex ile karıştırılarak 10 dk sonra 595 nm de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml lik 5 mM fosfat tamponu (pH=6,3) olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0,1'er ml 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.4.2. Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

PPO enzimi aktivitelerinin ölçümlerinde, spektrofotometrik metod kullanıldı ve absorbans ölçümleri 420 nm dalga boyunda gerçekleştirildi¹⁵³. Aktivite ölçümü için 0,1 ml enzim 2,9 ml tampon+substrat (+inhibitör) çözeltisi ilave edildi. Tampon olarak 0,2 M, pH=5-7 aralığında fosfat tamponu veya 0,2 M pH=7-10 aralığında tris tamponu kullanıldı; 2,5-10 mM substrat konsantrasyonlarında çalışıldı. 30 saniyelik zaman aralıklarında absorbanslardaki artışlar 3 dakika boyunca kaydedildi. Kör olarak enzim dışındaki çözeltiler aynı miktarlarda kullanıldı; enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampon konuldu. Enzim çözeltisi, substrat çözeltisine ilave edilir edilmez kronometre çalıştırıldı ve küvet spektrofotometreye yerleştirildi. İlk 30 s den itibaren 3 dakika boyunca her 30 s de bir absorbans değeri kaydedildi. Aktivite birimi olarak "1 ml enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişim" kullanıldı^{34,83}.

2.4.3. Kuşburnu Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması Çalışmaları

2.4.3.a. Kuşburnu Meyvasının Temini ve Ham Ekstrakt Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan kuşburnu meyvaları (*Rosa dumalis*) Atatürk Üniversitesi Kampüsünde yetişkin haldeki bitkilerden Eylül-Ekim aylarında toplandı. İncelemelerde kullanılıncaya kadar 4°C de depo edildi. Kuşburnu meyvaları 4 yıl boyunca aynı bitkiden toplandı.

Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, her 20 g kuşburnu meyvası 100 ml %0,5 polietilenglikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden 0,5 M fosfat tamponu (pH=7,3)

içinde Waring Blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzüldü. Süzüntü 48.000 x g'de 5°C de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant diğer saflaştırma basamaklarından amonyum sülfat'la çöktürme işlemlerinde ve ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.4.3.b. Amonyum Sülfatla Çöktürme ve Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi için uygun doygunluk noktasını bulmak amacıyla, % 0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80 ve % 80-90 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her çöktürme kademesinde aktivite ölçümü yapıldı. %80'lik amonyum sülfat doygunluğuna kadar olan bütün safhalarda ihmal edilemeyecek düzeyde aktivite gözlemlendiğinden bundan sonraki amonyum sülfatla çöktürme işlemleri %0-80 arasında doygunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları şu formülle tesbit edildi (0°C için)

$$g (NH_4)SO_4 = \frac{1.77 V (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V = Süpernatantın hacmi

S₁= 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂= 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş porsiyonlar halinde katıldı (0°C de), her porsiyon ilavesi sırasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄ ların çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle- bir buçuk saat arasında sürdü. Amonyum sülfatın süpernatantda çözünme işlemi mağnetik karıştırıcıda yapıldı. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra %80 doygunluğa getirilen suspansiyon, 48.000xg'de, 5°C de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Oluşan çökelek 5 mM fosfat tamponunun (pH=6,3) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Enzimin içinde bulunduğu tampona (5mM fosfat tamponu pH=6.3) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi mağnetik karıştırıcı üzerinde buz dolabı içinde (4°C) gerçekleştirildi.

2.4.3.c. Jel Filtrasyon Kromatografisi

100 ml'lik yatak hacmi elde etmek için 5 g Sephadex G-100, 100 ml saf su içine alındı. 90°C de su banyosunda 5 saat bekletilerek polimer materyal (sephadex G-100)

şışırıldı. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trombu kullanarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali %10 luk gliserinli pH'sı 6,3 olan 0,1 M fosfat tamponuyla dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tesbit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorban değerleri aralıklarla ölçüldü, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi ve kolonun akış hızı 15-20 ml/saat olarak ayarlandı.

Elüsyon işlemi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Numune tatbiki için %10 luk gliserinli enzim çözeltisinden 8 ml kolona tatbik edildi. Bu enzim çözeltisinin jel tarafından emdirildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, daha yüksek seviyede bulunan erlen içindeki elüsyon tamponu ile kolon arasında bağlantı kuruldu. Numune tatbikinden itibaren kolondan elüatlar fraksiyon toplayıcı yardımıyla 4'er ml olacak şekilde tüplere toplandı.

Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak 280 nm de, toplanan elüatların absorbanları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon almaya 280 nm deki absorban sıfır oluncaya kadar devam edildi. 280 nm de absorban gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçümü için alınan absorban değerleri ve 420 nm'de alınan aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafikleri çizildi (şekil 3.2). Kromatografi işlemi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen eluat çözeltileri için coomassie-blue metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler belirlendi. Saflaştırma oranları tesbit edildi.

2.4.3.d. DEAE-Sephacel İyon Değişim Kromatografisi

Bu çalışmada kullanılan ve daha önceden şişirilmiş olan jel materyali havası uzaklaştırılıp 1,2 cm² x 70 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra jel filtrasyon kromatografisinde olduğu gibi kolona dengeleme işlemi uygulandı. Dengeleme işlemi 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH=10) ile yapıldı. Kolonun akış hızı peristatik pompa yardımıyla 10-15 ml/saat'a ayarlandı. Dengeleme işlemine kolona üstten ilave edilen tamponun pH ve 280 nm'deki absorban değerlerine kolonun altından alınan elüatların pH ve 280 nm'deki değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon işlemi soğuk odada gerçekleştirildi. Elüsyon işlemi için dengelenen kolona; jel

filtrasyon sonucundan elde edilen fraksiyonlardan 5'er ml alınarak karıştırıldı. Bu 10 ml'lik karışıma 1 ml gliserin ilave edilerek, gliserinli karışımdan 10 ml tatbik edildi. Enzim çözeltisini jele emdirme işlemi jel filtrasyon kromatografisinde olduğu gibi yapıldı. Gradient mixerin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml pH sı 10 olan 0.1 M Tris-HCl tamponu, bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml pH sı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu dolduruldu. Elüsyona başlandı. Böylece ilk kademede pH 10 dan 7'ye değişen pH gradienti uygulanmış oldu. İkinci kademede kolona bağlı olan hazneye pH sı 7 olan 0,1 M fosfat tamponunun 250 ml si konulurken diğer hazneye pH sı 4 olan 0,1 M fosfat tamponundan 250 ml konuldu. Elüsyon işlemi bu ikinci kademe sonunda tamamlandı. Sonuçta pH 10 dan 4'e değişen (azalan pH) pH gradienti uygulanarak elüsyon yapılmış oldu.

Elüatlar fraksiyon kollektor yardımıyla 4'er ml halinde tüplere alındı. Elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde 420 nm'de aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler tüp sayısına karşılık grafik edildi (Şekil 3.3). Enzim aktivitesi gösteren tüpler fraksiyonlar halinde birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için coomassie-blue metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

2.4.3.e. SDS - Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektroferez çalışmalarında, Laemmli tarafından tanımlanan sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Bu amaçla %3'lük ve %10 luk olmak üzere iki farklı akrilamid konsantrasyonlarında kesikli SDS-PAGE kullanıldı¹⁵⁴.

Elektroferez işlemi için, elektroferez plakaları önce su sonra etil alkol ile iyice temizlendikten sonra plakalar arasına konulan aralık oluşturunuculara vazelin sürülerek cam plakalar arasına yerleştirilip, kışkaçlarla tutularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynayınca kadar ısıtılıp 40°C ye kadar soğutulan %0.5 lik ağar çözeltisi ile 0.5 cm kadar doldurularak kapatıldı. Böylece sızmalar önlenmiş oldu.

Taze olarak hazırlanan %10'luk ayırma jeli enjektör yardımıyla cam plakalar arasına 2/3 seviyesine kadar döküldü. Bu sırada jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için su ile ince bir tabaka

oluşturuldu. Jelin katılaşması için yarım saat kadar beklenildi. Katılaştıran ayırma jelinin üzerindeki su tabakası boşaltıldı. Daha sonra %3'lük yığılma jel, ayırma jelinin üstüne cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üzerine ıslatılmış süzgeç kağıdı konularak üzeri kapatıldı ve %3 lük jelin katılaşması için bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak, jelde oluşan oyuklar önce saf su ile sonra yürütme tamponuyla yıkandı ve tekrar yürütme tamponuyla dolduruldu. Oyukların yerleri işaretlenerek cam plakalar arasındaki kesikli jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına elektrik devresini içine alacak şekilde yürütme tamponu dolduruldu.

Numune hazırlanışı şöyle yapıldı; ham ekstrakt (H_1), amonyum sülfat çöktürmesi (AS_1) ve jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan; 1. fraksiyon (JF_1) dan 3 ml ve 2. fraksiyon (JF_2) dan 8 ml alınarak amonyum sülfatla %80 doygunluğa getirildi. Ayrıca amonyum sülfat çöktürmesi (AS_2) sonucunda elde edilen çözeltiden 2 ml alınarak o da yeniden amonyum sülfatla %80 doygunluğa getirildi, Ham ekstrakt ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu çözeltiler 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Yeniden amonyum sülfat çöktürmesi yapılan JF_1 , JF_2 ve AS_2 lar 48.000xg de yarım saat 5°C de santrifüj yapıldı oluşan çökeklere JF_1 200 µl, JF_2 100 µl ve AS_2 de 300 µl numune tamponlarında çözüldü ve numune tamponunun 950 µl sine 50 µl β-merkaptoetanol katılarak ve kaynar su banyosunda 3 dakika bekletilerek proteinlerin denaturasyonu sağlandı. Böylece hazırlanan numunelerden 75'er µl (en az 20 µg protein olacak şekilde) çok ince bir enjektör yardımıyla alınarak jel oyuklarına (jelin 1. ve 2. oyuğuna ham ekstrakt, 3., 4. oyuğuna AS_2 , 5., 6. oyuğuna AS_1 , 7., 8. oyuğuna JF_1 ve 9., 10. oyuğuna JF_2 numuneleri) tatbik edildi.

Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anod), üst taraftan (-) kablo (Katot) bağlandı. Önce 80 voltda yarım saat, daha sonra 150 voltda oda sıcaklığında 4-5 saat süreyle akım geçirildi (yürütme işlemi, jelin alt ucundan 1,2 cm kalıncaya kadar devam etti). Akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere kabına dolduruldu. Yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli özel kabına alınarak %50 lik TCA çözeltisinde bir gece bekletildi. Sabahleyin % 50 lik TCA çözeltisinden çıkarılıp 37°C de renklendirme çözeltisi (%50 lik TCA çözeltisinde çözünmüş %0,1 lik coomassie brilliant bleu R-250) içine alınarak bir saat bekletildi. Daha sonra %7 lik asetik asit

çözeltisiyle bir kaç kez yıkandı. Bu çözeltiden çıkarıldıktan sonra jelin fotoğrafı çekildi.

Ayrıca, yürütme işleminden sonra proteinlerin boyanması için değişik metodlar uygulandı, bunlardan gümüş boyamasında şu prosedür uygulandı.

1. Su, asetik asit ve metilalkol (5:1:5) karışımında 30 dakika çalkalandı.
2. %15 lik metil alkol çözeltisinde 15 dakika çalkalandı.
3. %10 luk glutardialdehit çözeltisinde 30 dakika çalkalandı.
4. 3 defa hızlıca saf su ile yıkandı. Daha sonra 5 dakikada bir suyu değiştirilmek üzere 45 dakika saf suda çalkalandı (glutardialdehit kokusu kalmayınca kadar) gerekirse bir gece suda bırakılır.
5. AgNO_3 çözeltisi; 3 ml NH_3 +42 ml 0,1 N NaOH karışımı üzerine 8 ml %20 lik AgNO_3 çözeltisi yavaş yavaş alttaki çözelti kuvvetlice karıştırılarak ilave edilir. Eğer çökelek oluşursa az miktarda NH_3 ilave edilebilir ve son hacim su ile 200 ml ye tamamlanır, bu çözeltide 15 dakika çalkalandı (kullanılan NH_3 , 35-75 ml 1N HCl i pH 7-8 ye titre edecek miktar).
6. Bir defa saf su ile hızlıca yıkandı ve daha sonra 3 defa 5 dakika aralıklarla saf su ile çalkalandı.
7. Renk açma basamağı; 50 mg sitrik asit/litre çözeltisinin 200 ml sine (kullanmadan hemen önce) 100 μl % 37 lik formaldehit katıldı. Jel bu çözelti içinde 2-10 dakika bekletildi.
8. Bir defa saf su ile hızlıca yıkandı.
9. Rengin durulması; 500 mg sitrik asit/litre çözeltisinin 200 ml sine (kullanmadan hemen önce) 100 μl metilamin katıldı ve bu çözeltide 15 dakika çalkalandı.
10. Jel saf su ile yıkandı, bantlar karışık ve yürümenin iyi olmadığından dolayı fotoğrafı çekilmedi.

Diğer bir metoddan ise jel özel kabına alınarak üzeri örtülünceye kadar renklendirme çözeltisi döküldü. 1,5-2 saat çalkalandıktan sonra, renksizleştirme çözeltisine nakledildi. Aralıklarla renksizleştirme çözeltisi değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün çalkalandı. Renksizleştirme çözeltisi aktif karbondan süzülerek yeniden kullanılabilir hale getirildi. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldı. Bantlar çok belirgin olmadığı için fotoğrafı çekilemedi.

Renklendirme çözeltisi (SDS-PAGE de kullanıldı); 0,66 g Coomassie brilliant bleu R-250, 120 ml metanol da çözüldü. Bu çözeltiye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml saf su eklendi.

Renksizleştirme çözeltisi (SDS-PAGE de kullanıldı); %7.5 asetik asit % 5 metanol ve %87.5 su oranlarında 75 ml asetik asit, 50 ml metanol ve 875 ml saf su ile hazırlandı.

2.4.4. Kuşburnu Polifenol Oksidaz Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar

Kuşburnu polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere önce sekiz farklı substrat için, optimum pH, optimum sıcaklık ve optimum iyonik şiddetler belirlendi. Daha sonra bu substratlar için K_M ve V_{max} değerleri tayin edildi. 11 farklı inhibitör için 4-metil katekol substratı ile inhibisyon türü, K_i sabitleri ve I_{50} değerleri tesbit edildi.

2.4.4.a. Optimum pH Çalışması

Optimum pH çalışması; katekol, 4-metil katekol, L-DOPA, dopamin, gallik asit, pirogallol, L-tirozin ve p-kresol substratları kullanılarak yapıldı. Bu substratlarla enzimin substrata doyduğu noktalarda pH=4-10 aralığında uygun tampon çözeltilerinde enzimin gösterdiği aktiviteler, spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar grafikler halinde verildi (Şekil 3. 5-3.12), Tampon çözeltilerin pH sı 4.0, 4.5 , 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0'a 0,1N HCl veya 0.1 N NaOH ile ayarlandı. Küvet içindeki substrat konsantrasyonu 10 mM (sadece L-tirozin için 5 mM) olacak şekilde 2,9 ml tampon+substrat çözeltisine 0,1 ml enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Tesbit edilen optimum pH değerleri tablo 3.3'de verildi. Ayrıca optimum pH çalışmalarında, Kuşburnu meyvasının Ağustos (yeşil hali), Eylül (yarı olgun hali) ve Ekim (olgun hali) aylarında toplanarak yukarıdaki halleri için katekol substratı ile optimum pH ları tesbit edildi. Üç ayda da toplanan kuşburnu meyvalarının optimum pH larında önemli bir fark görülmediğinden yeşil ve yarı olgun halleri için değerleri verilmedi ve yalnız olgun hali ile diğer çalışmalar yapıldı.

2.4.4.b. Optimum Sıcaklık Çalışması

Optimum sıcaklık çalışması yine aynı substratlarla gerçekleştirildi. Substratların optimum pH larında 5°C-85°C sıcaklık aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, oda

sıcaklığının altında buz banyosunda, oda sıcaklığının üstünde, ısıtıcıli mağnetik karıştırıcı üzerinde yer alan su banyosu kullanılarak ayarlandı. Tampon+substrat çözeltilerinin küvete boşaltılması esnasında meydana gelebilecek sıcaklık kayıplarını önlemek amacıyla küvetlerde bir kaç dakika süreyle buz veya su banyosu içinde bekletildi ve mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar grafik halinde verildi (Şekil 3.13-3.20). Tesbit edilen optimum sıcaklık değerleri tablo 3.3' de gösterildi.

2.4.4.c. İyonik Şiddet Etkisi Çalışması

İyonik şiddet etkisi çalışması; katekol, 4-metil katekol ve dopamin substratlarıyla 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, ve 0.50 M seri tris-tamponlarıyla yapıldı. Bu esnada her substratın kendi optimal pH'sında çalışıldı. 2,9 ml Tampon+substrat (substrat konsantrasyonu 0,01M) küvete konulduktan sonra 0,1 ml enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar tablo 3.4'de gösterildi.

2.4.4.d. Enzimin Stabil Olduğu pH'nın Belirlenmesi Çalışması

Enzimin stabil olduğu pH'yı belirlemek için 0,1 M sitrat/0,2M fosfat (pH=5), 0,1 M fosfat (pH=6,2 ve 7,0), ve 0,2 M tris tampon (pH=8,3)'ları hazırlandı. Bu tamponlardan 4 er ml alındı. Bunun üzerine amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltilerinden 1'er ml ilave edilerek 4°C de muhafaza edildi. Bu çözelti enzim stabil olduğu pH çalışması için enzim kaynağı olarak kullanıldı. Aktivite ölçümleri 4-metil katekol substratı ile optimum şartlarda (0,2 M tris tamponu pH=8,5), belirli zaman aralıklarında ölçüldü. % Aktivitelere karşılık gelen depolama süresi grafik halinde gösterildi (Şekil 3.21).

2.4.4.e. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tesbit edilmesi amacıyla; Optimum şartlar (pH, sıcaklık ve iyonik şiddet)'da katekol, 4-metil katekol, L-dopa, dopamin, gallik asit ve pirogallol substratları için 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ve 15.0 mM L-tirozin için 0.15, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 mM, p-kresol substratı için de 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.5 mM substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı (her ölçüm 2 defa tekrarlandı) 420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (EÜ/mlxdak) olarak alındı.

$1/V-1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.30-3.37). Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Bulunan K_M ve V_{max} değerleri Tablo 3.3 de verildi.

2.4.4.f. Farklı İnhibitörler için K_i Sabitlerinin ve I_{50} Değerlerinin Bulunması

Bu çalışmada inhibitör olarak; sodyum metabisüfit ($Na_2S_2O_5$), L- sistein ($SH-CH_2-CH_2(NH_2) COOH$), L-askorbik asit ($C_6H_8O_6$), glutatyon (γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), tiyoüre ($H_2N CSNH_2$), sodyum azotür (NaN_3), β -merkaptetanol ($HSCH_2-CH_2-OH$) sodyum dietilditiyokarbamat ($C_5H_{10}NS_2Na.3H_2O$) ditiyoeritritol ($C_4H_{10}O_2S_2$), tannik asit ($C_{76}H_{52}O_{46}$), benzoik asit ($C_6H_5 - COOH$), sodyum klorur ($NaCl$), Na EDTA ($(C_{10} H_{14} N_2 Na_2 O_8 . 2H_2 O)$), etilenglikol ($C_2H_6O_2$) ve tiodiglikol ($C_2H_6S_2$) kullanıldı.

Her inhibitör için inhibisyon etkisi literatür araştırmaları göz önüne alınarak 4-metil katekol substratının sabit konsantrasyonunda (10 mM), en az beş olmak üzere farklı İnhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler okundu. % Aktivite- $[I]$ grafikleri çizildi (Şekil 3.49-3.59). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyonun %50 civarında olduğu 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonları tesbit edildi. Çalışılan inhibitörlerin 3 farklı konsantrasyonları, Tablo 2.2'de verilmiştir.

Önce inhibitörsüz, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 ve 10.0 mM 4-metilkatekol substratı ile aktiviteler belirlendi. Daha sonra bu substrat konsantrasyonlarında, her farklı inhibitörün tesbit edilen 3 farklı sabit konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı.

Sodyum klorur, Na EDTA (Titriplex-III), tiyodiglikol ve etilenglikol'un belirgin bir inhibisyon etkileri gözlenmediği için sabit inhibitör konsantrasyonlarında çalışılmadı. Tablo 2.2'de verilen sabit inhibitör konsantrasyonlarında $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.38-3.48). Bu grafikler kullanılarak inhibisyon çeşidi ve K_i değerleri tesbit edildi. Her bir inhibitör için bulunan K_i değerleri Tablo 3.6'da verildi.

Tablo 2.2. Çalışılan İnhibitörlerin üç farklı konsantrasyonları

İnhibitörler	I_1 (M)	I_2 (M)	I_3 (M)
Sodyum metabisüfit	1.5×10^{-5}	3.0×10^{-5}	4.5×10^{-5}
L-Sistein	7.0×10^{-5}	1.0×10^{-4}	2.5×10^{-4}
Askorbik asit	2.0×10^{-4}	2.5×10^{-4}	3.0×10^{-4}
Glutasyon	8.0×10^{-5}	1.5×10^{-4}	3.0×10^{-4}
Tiyoüre	5.0×10^{-2}	1.0×10^{-1}	1.5×10^{-1}
Sodyum azotür	6.0×10^{-2}	1.0×10^{-1}	2.0×10^{-1}
Sodyum dietilditiyo karbamat	2.0×10^{-5}	4.0×10^{-5}	6.0×10^{-5}
Ditiyoeritritol	2.0×10^{-5}	4.0×10^{-5}	8.0×10^{-5}
Tannik asit	7.5×10^{-6}	1.5×10^{-5}	3.0×10^{-5}
Benzoik asit	1.0×10^{-1}	2.0×10^{-1}	3.0×10^{-1}
β -Merkaptoetanol	2.5×10^{-5}	5.0×10^{-5}	7.5×10^{-5}

I_{50} değerleri de, çalışılan inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin araştırılmasından yararlanarak hesaplandı. Bunun için 4-metil katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Tablo 2.1'de gösterilen stok inhibitör çözeltileri kullanılarak değişen inhibitör konsantrasyonlarına karşılık absorbanslar 420 nm de köre karşı okundu (Kör olarak sadece enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu 5 mM fosfat tamponu (pH=6.3) kullanıldı). Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi ([I]: küvetteki 3 ml hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonu). Bu grafikler ve denklemlerinden

yararlanarak her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 3.8'de verildi.

2.4.5. Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

Aktivasyon enerjilerinin hesaplanmasında Arrhenius denklemi kullanıldı¹⁵⁵.

$$\log k = - \frac{E_A}{2.303 R} \frac{1}{T}$$

k = T (K) sıcaklığındaki reaksiyon hızı

R = İdeal gaz sabiti (1.987 kal mol⁻¹ K⁻¹)

E_A = Aktivasyon enerjisi (kal. mol⁻¹)

Her bir substrat için optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen aktivite değerlerinin (EU/ml) logaritması, reaksiyon sıcaklıklarının (K) tersine (1/T) ye karşı grafik edildi. Grafik eğimlerinden ($-E_A/2,303R$) yararlanılarak aktivasyon enerjileri hesaplandı. Elde edilen aktivasyon enerji değerleri tablo 3.5'de verildi.

2.4.6. Sıcaklıkla Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması

PPO enziminin sıcaklıkla denatürasyon özelliğinin araştırılmasında; 50°, 60°, 70°, 80° ve 90°C lerde 10', 20', 30', 45' ve 60' dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteleri okundu. Bu işlem için sabit sıcaklık sirkülasyonu kullanıldı. Sabit sıcaklık sirkülasyonu çalışılacak sıcaklığa ayarlandı, daha sonra kullanılan tampon çözelti, substrat çözeltisi, saf su ve enzim çözeltisi bu sabit sıcaklık sirkülasyonuna yerleştirilerek yukarıdaki sürelerde bekletildikten sonra absorbansları okundu. Bu absorbanslardan yararlanılarak % aktiviteler hesaplandı. Zamana karşılık % aktiviteler grafik edildi (Şekil 3.60). Aktiviteler 0.2 M tris-HCl tamponu (pH=8.5) ve 4-metil katekol substratı ile bölüm 2.4.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sıcaklık hariç diğer optimum şartlara uyuldu.

Renatürasyon işlemlerinde ise yukarıda denatürasyon çalışmasında kullanılan ve bahsedilen sıcaklıklarda bekletildikten sonra ki enzim çözeltisi sabit sıcaklık sirkülatöründen çıkarılarak 22°C ye kadar soğutuldu. 22°C de 10', 20', 30', 45' ve 60' dakika zaman aralıklarında absorbanslar okundu. Okunan bu absorbanslardan yararlanılarak % orijinal aktiviteler hesaplandı. % orijinal aktivitelere karşılık 22°C'de inkübasyon süresi grafik edildi (Şekil 3.61). Aktiviteler 22°C'de yukarıda açıklandığı gibi belirlendi.

2.4.7. Kuşburnu Polifenol Oksidaz İzoenzimlerinin Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Belirlenmesi

Tabii şartlarda poliakrilamid jel elektrofrez de, laemmlı tarafından tanımlandığı şekilde SDS kullanılmadan soğuk odada (8°C de) gerçekleştirildi. Böylece enzimin aktif konumu korunmuş oldu¹⁵⁴.

Bu elektrofrezde de %10 luk ayırma, %3 lük yığma jelleri bölüm 2.3. ix da anlatıldığı şekilde SDS kullanılmadan bölüm 2.4.3 e SDS-PAGE deki gibi hazırlanarak kesikli-PAGE'i numune tatbik edilecek duruma getirildi.

Kullanılan enzim kaynağındaki protein miktarı düşük olduğu için, amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen çözeltiden 5 ml enzim çözeltisi alınarak yeniden katı amonyum sülfatla %80 doygunluğa getirildi. 48.000xg'de yarım saat soğutmalı santrifüjle 5°C'de santrifüj edildi. Oluşan çökelek doğrudan doğruya 3 ml numune tamponunda çözüldü. 50, 80 ve 100 er µl'lik numuneler jel boşluklarına çok ince bir enjektör yardımıyla aynı sırayla üç bölüm halinde tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anot), üst taraftan (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltda yarım saat, daha sonra 150 voltda 4-5 saat süreyle akım geçirildi. Elektrofrez işlemi soğuk odada gerçekleştirildi. Akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere alıkonuldu.

Çıkarılan jel, 50, 80 ve 100 er µl numuneli üç parçaya ayrıldı. Jellerden 1. ve 2, parçası ayrı ayrı 15 mM katekol, 15 mM 4-metil katekol, %0,05 o-fenilendiamin ihtiva eden ve üçüncü parçası 10 mM dopamin içeren 0,2 M Tris tamponuna (pH=8.5) daldırıldı. Daldırma işleminden 1-1,5 saat sonra jellerde bantlar belirginleşti. Daha sonra 5 dakika süreyle 1 mM askorbik asit çözeltisinde çalkalandı. Bundan sonra jeller %30 luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları çekildi.

Jellerin içine daldırıldığı substrat çözeltilerinin hazırlanması amacıyla , üç ayrı 280 ml'lik saf su içinde 7,26 şer g'lık Tris çözüldü. Oluşan çözeltilerin birincisinde 0,495 g (4.5×10^{-3} mol) katekol ve 0,15 g ortofenilendiamin, ikincisinde; 0,56 g (4.5×10^{-3} mol) 4-metil katekol ve 0,15 g ortofenilendiamin ve üçüncüsünde de 0,57

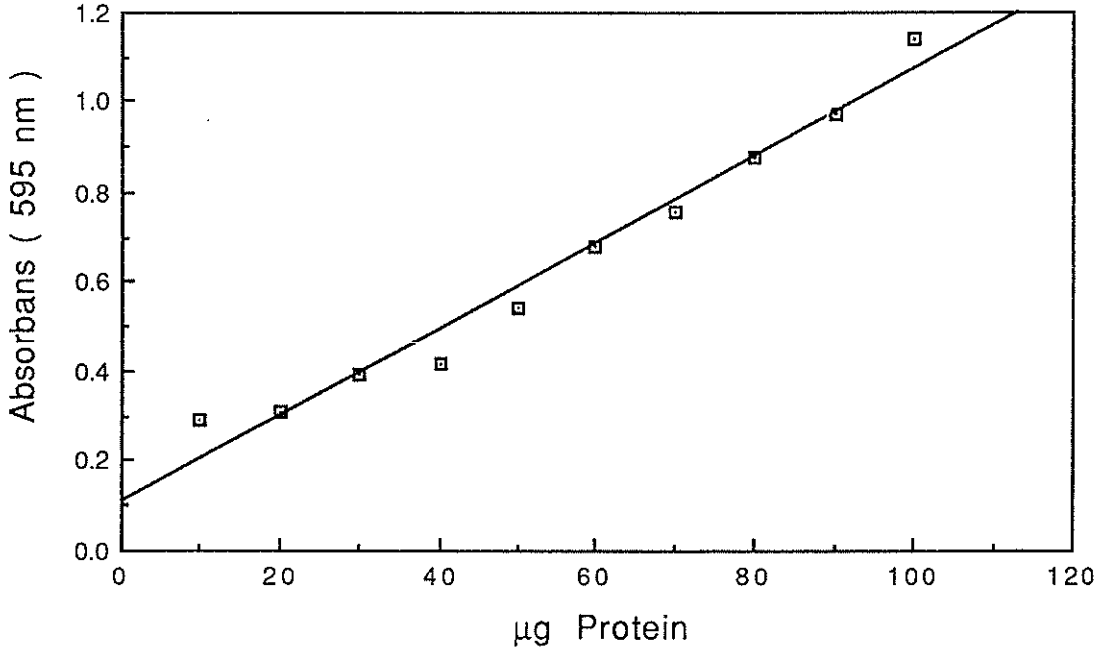
g (3.0×10^{-3} mol) dopamin çözüldü. Çözeltilerin pH'sı 0.1 N HCl ile 8.5'a (optimum pH'larına) ayarlanarak toplam hacimleri saf su ile 300 ml'ye tamamlandı.

Ayrıca yukarıda açıklandığı şekilde numune tatbik edilecek duruma getirilen elektroforeze bu sefer amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar (JF₁ ve JF₂) numune olarak tatbik edil'di. Yürütme işleminden sonra çıkarılan jel iki parçaya ayrılarak, 4-metil katekol ve L-dopa substratlarıyla bölüm 3.14'de açıklandığı gibi etkileştirildi.

3. DENEY SONUÇLARI

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde coomassie-blue yöntemi kullanıldı. Standart grafik 2.4.1.b de açıklandığı gibi hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonunda ki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Coomassie-blue yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik

3.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme Sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesinde, uygun doygunluk noktasını tesbit etmek amacıyla, %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-90 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her çöktürme kademesi için gerekli olan katı amonyum sülfat miktarı bölüm 2.4.3.b de anlatıldığı gibi tesbit edildi. Her çöktürme kademesindeki çökelekler çözünmediği en az miktardaki 5 mM fosfat tamponunda (pH=6,3) çözüldü. Her basamaktaki süpernatant ve çökelek çözeltilerindeki PPO enzim aktiviteleri diyaliz işleminden

sonra 10 mM katekol substratıyla aktiviteler bölüm 2.4.2 de açıklandığı şekilde belirlendi. Çöktürme kademelerindeki çökelek ve süpernatantların aktiviteleri tablo 3.1 de verildi. Tablo incelendiğinde çöktürme yüzdesi arttıkça aktivitenin, süpernatanda giderek azaldığı, çökelek çözeltilerinde ise arttığı %80 lik doygunluk noktasında maksimum değere ulaştığı görüldü. Daha sonraki çalışmalar için amonyum sülfatla çöktürme işlemleri doğrudan %80 doygunluk noktasına getirildi.

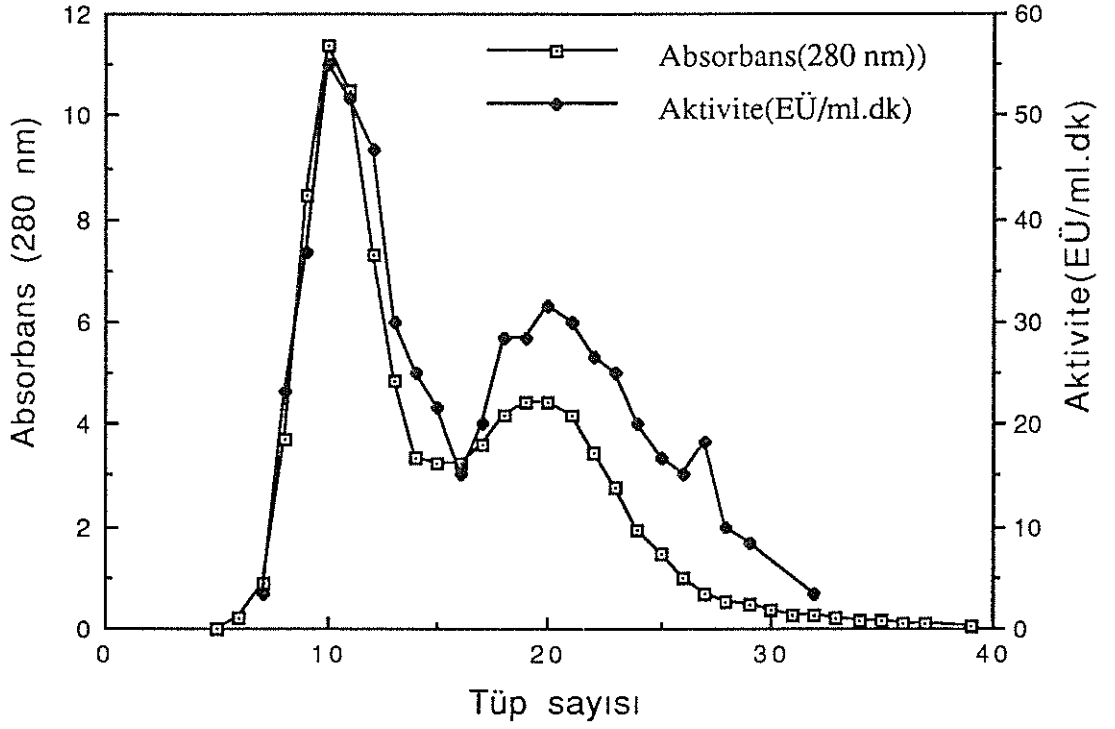
Tablo 3.1. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için amonyum sülfatla çöktürmede doygunluk noktası tesbiti

% doygunluk	% 0-20	% 20-40	% 40-60	% 60-80	% 80-90
Aktivite (EÜ/ml) (çökelek)	21.2	25.1	34.2	40.1	40.0
Aktivite (EÜ/ml) (süpernatant)	15.3	11.7	4.1	0.01	0.01

3.3. Polifenol Oksidaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisiyle Saflaştırılması

Ekstraksiyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen enzim çözeltisinin 9 ml sine 1 ml gliserin ilave edilerek %10 luk gliserinli enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 8 ml (7,2 ml saf enzim) si dengelenmiş kolondaki jele tatbik edildi. Elüsyon işlemi %10 gliserinli 0,1 M fosfat tamponuyla (pH=6,3) yapıldı. Fraksiyon toplayıcısı yardımıyla 4 er ml'lik tüpler halinde toplanan elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein analizleri yapıldı. Protein olan tüplerde enzim aktiviteleri 420 nm'de belirlendi. Sonuçlar Şekil 3.2'de grafik halinde verildi.

Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen elüatlardan enzim aktivitesi görülen 7-15 (JF₁=35,3 ml) ve 16-29 nolu (JF₂= 61,3 ml) fraksiyonlar bir araya getirildi. Bir araya getirilen fraksiyonlarda ve kolona tatbik edilen numunede protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Enzim ünitesi ve spesifik aktiviteler hesaplandı. Ve saflaştırma oranları belirlendi. Hesaplanan değerler Tablo 3.2'de verildi.



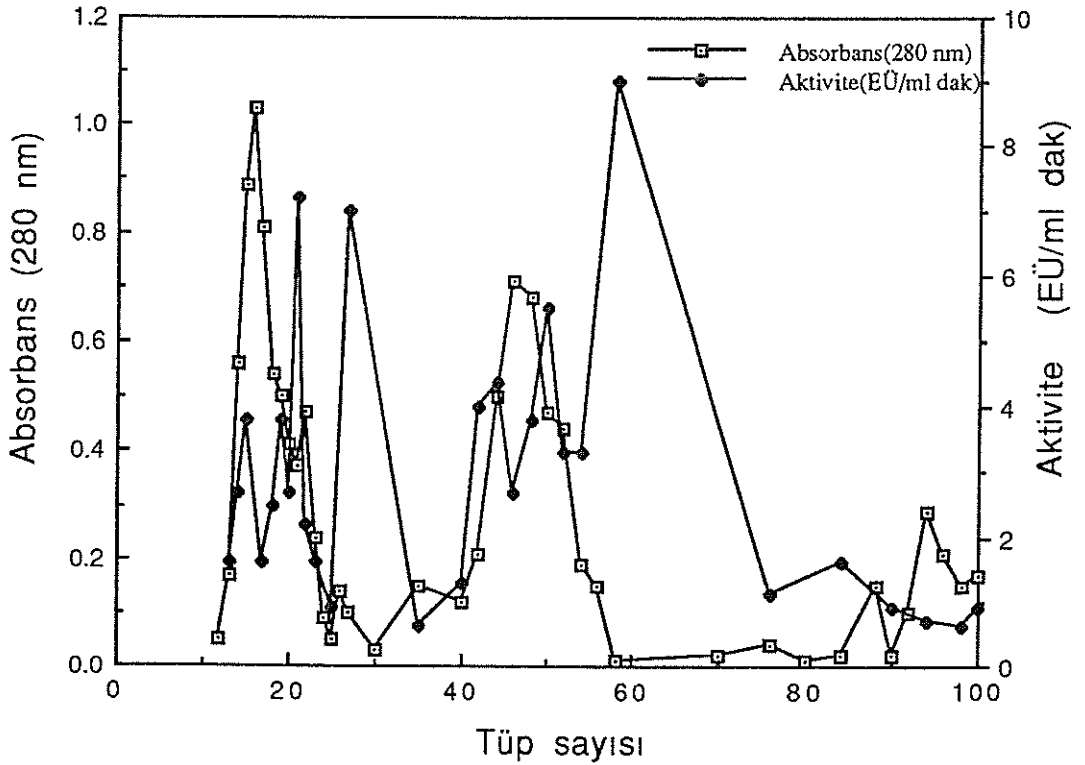
Şekil 3.2. Polifenol oksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılması

Tablo 3.2. Kuşburnu meyvası polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	Aktivi. (EÜ/ml)	Toplam aktivi.	Protein (mg/m)	Toplam protein (mg)	Spesi. aktivi. (EÜ/mg prote.)	Verim (%)	Saflaş. derecesi
Ham ekstrakt	460	-	-	0.59	271.4	-	-	-
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası	130	755	98150	0.98	127.4	770.4	100	0
Jel filtrasyon kromatografisi sonu 1.fraksiyon	637	76.5	48730	0.07	44.6	1092.8	49.6	1.4
Jel filtrasyon kromatografisi sonu 2.fraksiyon	1106	42.5	47005	0.04	44.2	1062.5	48.6	1.3
İyon değişim kromatografisi sonu 1.fraksiyon	9424	5.0	47120	0.004	37.6	1250.0	48.0	1.6
İyon değişim kromatografisi sonu 2.fraksiyon	9730	4.4	42812	0.003	29.2	1466.6	43.6	1.9

3.4. PPO Enziminin DEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisiyle Saflaştırma Sonuçları

Bölüm 2.4.3.d'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen iki fraksiyondan 5'er ml'den toplam 10 ml alınarak 1 ml gliserin ilave edildi. Bu % 9'luk gliserinli enzim çözeltisinden 10 ml kolona tatbik edildi. Gradient mixer cihazı yardımıyla önce pH'sı 10-7, daha sonra pH'sı 7-4 aralığında azalan pH gradienti oluşturan elüsyon tamponu kullanıldı. Böylece elüsyon işlemi boyunca pH'sı 10'dan 4'e kadar değişen 0,1 M elüsyon tamponu kolondan geçirilmiş oldu. Fraksiyon toplayıcı cihazıyla 4'er ml'lik tüplerde toplanan elüatlarda, jel filtrasyon kromatografisinde olduğu gibi 280 nm'de köre (elüsyon tamponu) karşı kalitatif protein analizi ve protein olan tüplerde 420 nm'de aktivite tayinleri yapıldı. Protein tayini için ölçülen absorbans değerleri ve 420 nm'deki aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 3.3.'de verildi.



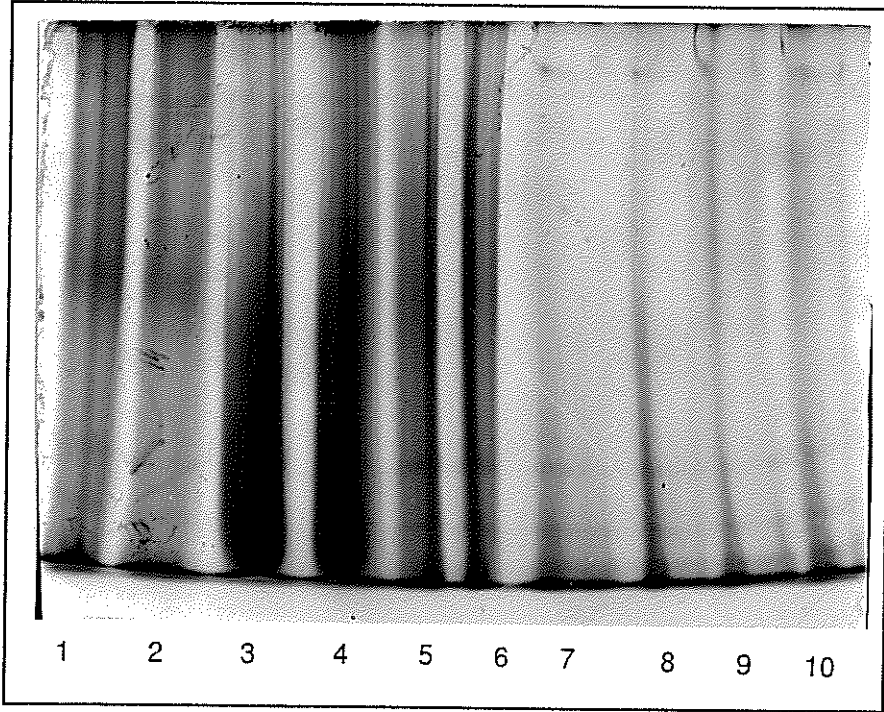
Şekil 3.3. Kuşburnu meyvası polifenol oksidaz enziminin DEAE-sephacel iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen elüatlardan enzim aktivitelesi görülen 13-23 ($ID_1=49,2$ ml) ve 42-54 ($ID_2=50,8$ ml) fraksiyonlar bir araya getirildi.

Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen fraksiyonlarda coomassie-blue metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldı. Enzim üniteleri ve spesifik aktiviteler hesaplandı. Ve saflaştırma oranları belirlendi. Test edilen değerler Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca, bir kaç kez 0,005 M dan 0,5 M'a değişen konsantrasyon aralığında iyonik şiddet gradientli (pH=6.3) elüsyon işlemi yapıldı, net bir sonuç alınamadığından burada anlatılmadı.

3.5. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez Sonucu

Kuşburnu meyvasının, ekstraksiyon ve saflaştırma kademelerinden (amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi) sonra elde edilen numuneler, bölüm 2.4.3.e'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Belirlenen protein bantlarının fotoğrafı çekilerek şekil 3.4'de gösterildi.



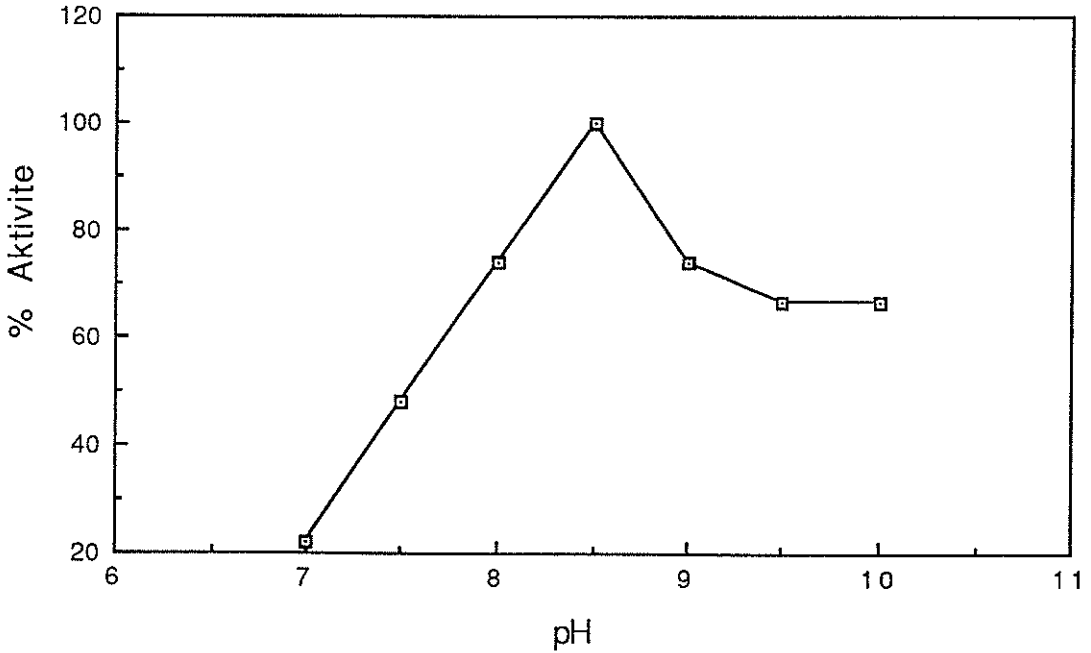
Şekil 3.4. Kuşburnu meyvasından saflaştırılan PPO ın SDS-PAGE'i sonucu çekilen fotoğraf . 1. ve 2. kanal ham ekstrakt (H_1), 3. ve 4. kanal 2. defa %80 doygunluğa getirilmiş amonyum sülfat çöktürmesi sonucu (AS_2), 5. ve 6. kanal %80 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu (AS_2), 7. ve 8. kanal jel filtrasyon kromatografi sonucu 1. fraksiyon (JF_1) ve 9. ve 10. kanal Jel filtrasyon kromatografi sonucu 2. fraksiyon (JF_2)

3.6. Farklı Substratlar İçin pH-Aktivite Grafikleri

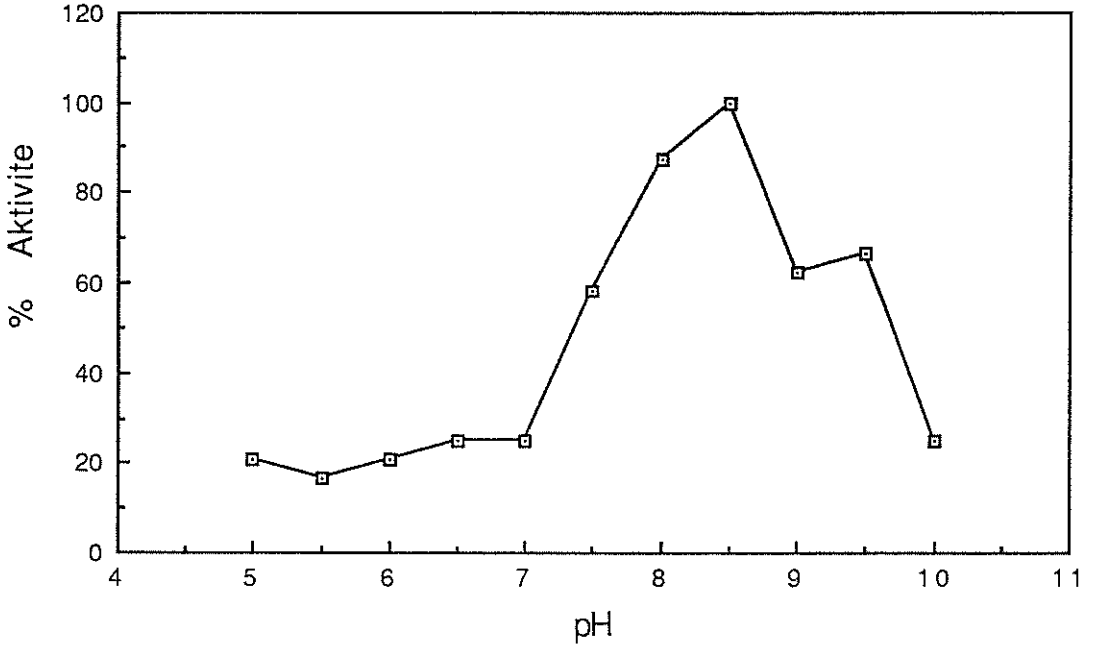
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla, sekiz ayrı substratla uygun tampon kullanılarak 4'den 10'a kadar değişen pH aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri 10 mM substrat konsantrasyonlarında (L-tirozin için 5 mM) gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri ile pH grafikleri şekil 3.5-3.12 de verildi. Grafiklerin çiziminde % aktivitelere karşılık pH değerleri kullanılmıştır. Her bir substrat için elde edilen optimum pH değerleri Tablo 3.3 de verildi.

3.7. Farklı Substratlar İçin Sıcaklık-Aktivite Grafikleri

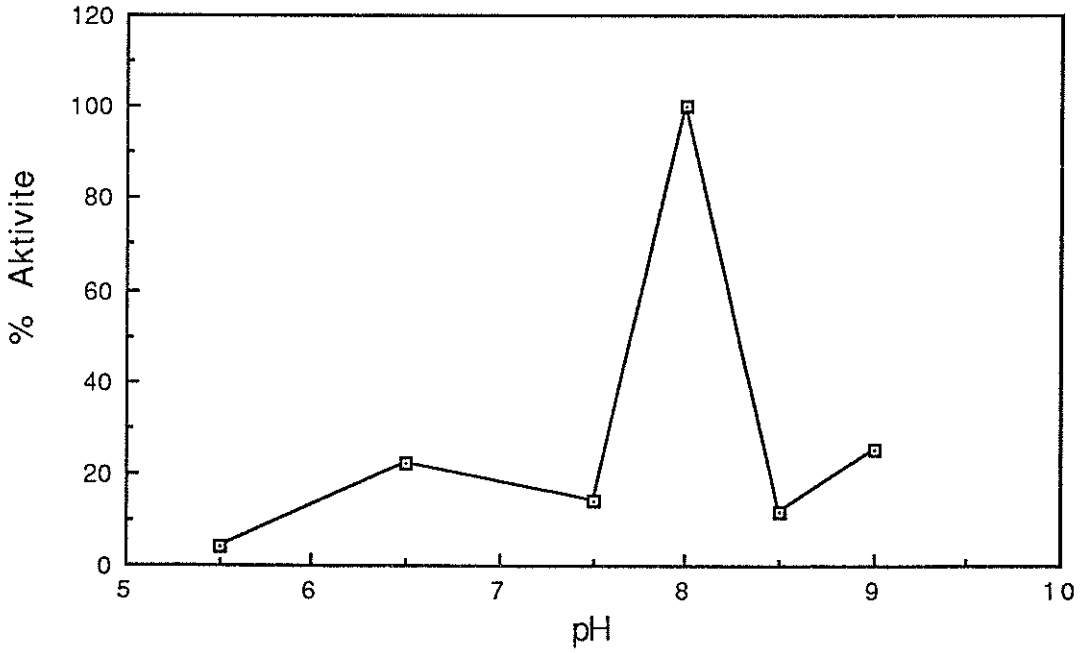
Optimum sıcaklık belirlenmesi amacıyla, sekiz ayrı substratın optimum pH larında 5°C-85°C sıcaklık aralığında aktiviteler bölüm 2.4.4.b'de açıklandığı şekilde tesbit edildi, elde edilen aktivite değerleri, % aktivite-sıcaklık olarak grafikleri şekil 3.13-3.20 de verildi. Bulunan optimum sıcaklıklar Tablo 3.3'de gösterildi.



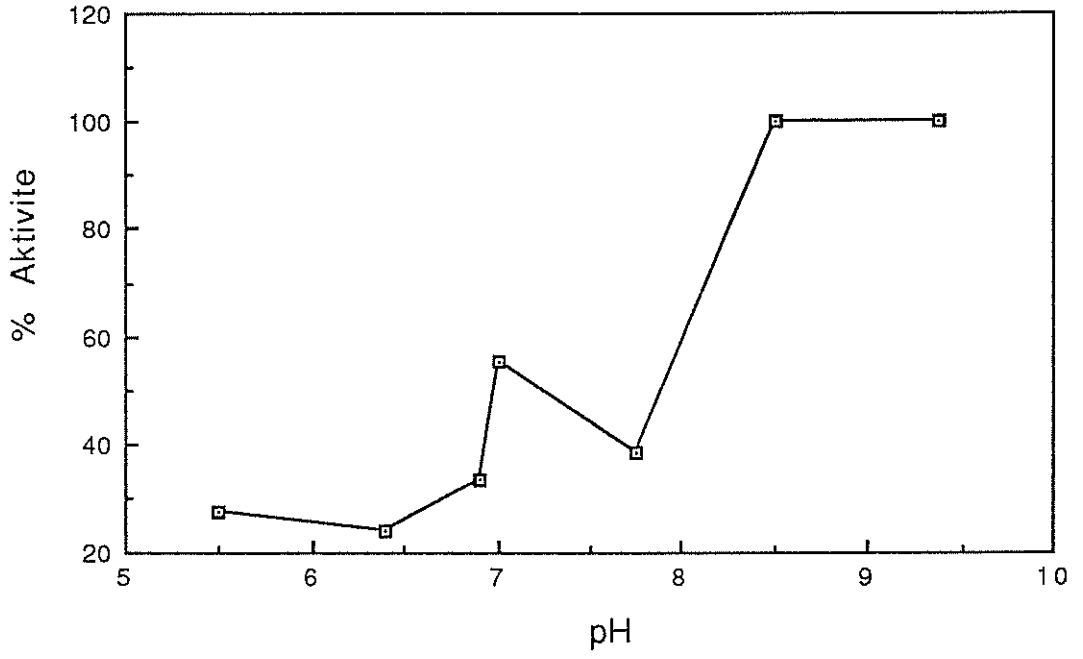
Şekil 3.5. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM katekol substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



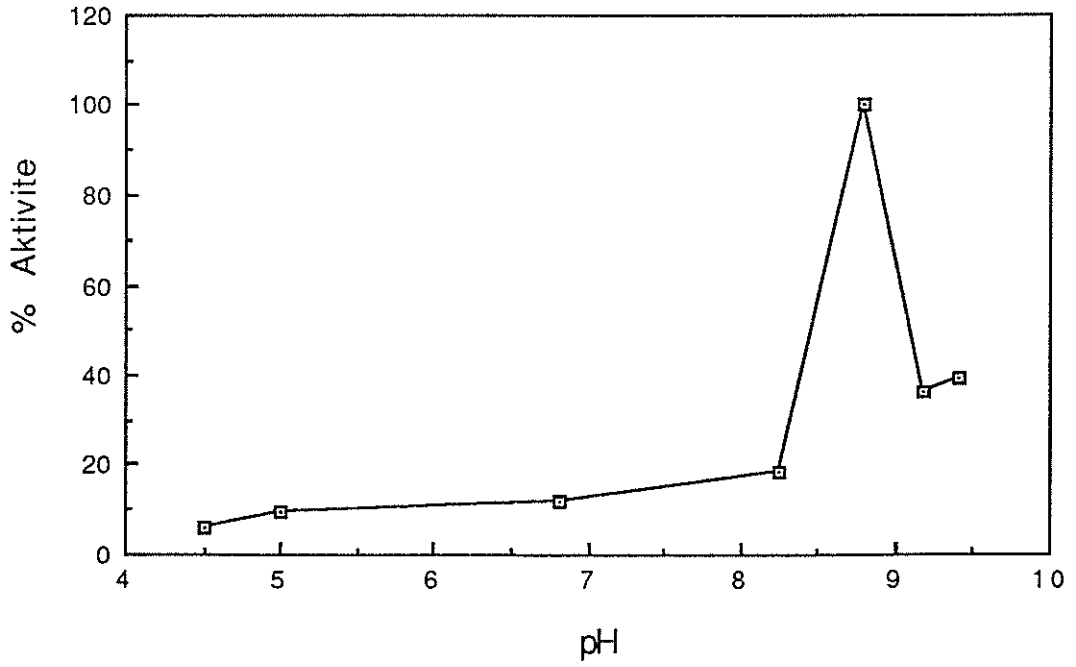
Şekil 3.6. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



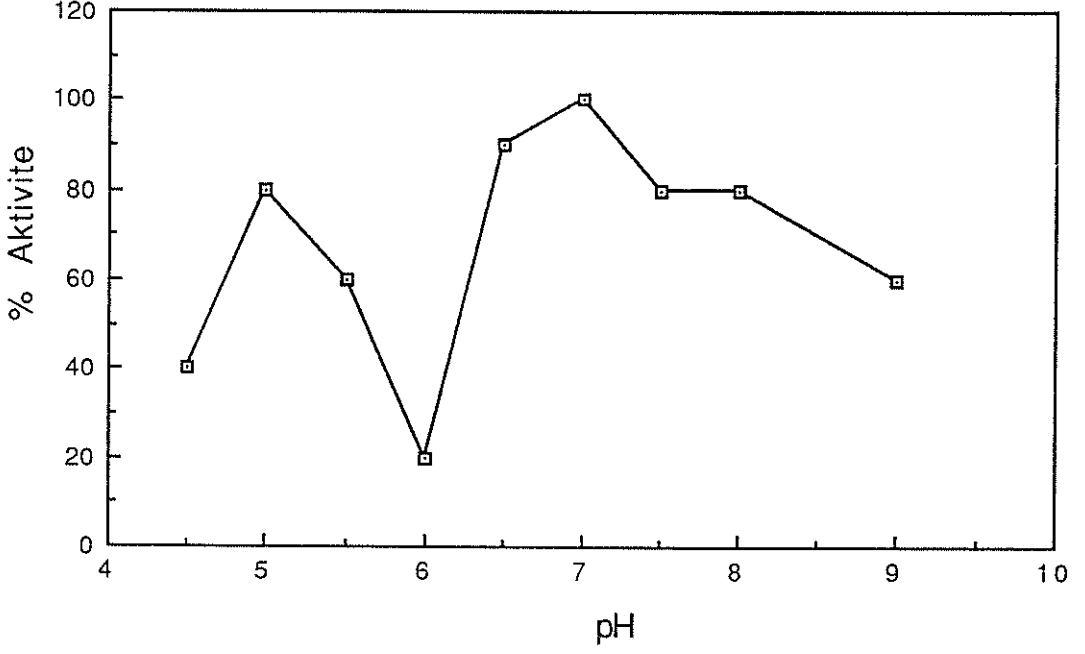
Şekil 3.7. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM L-dopa substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



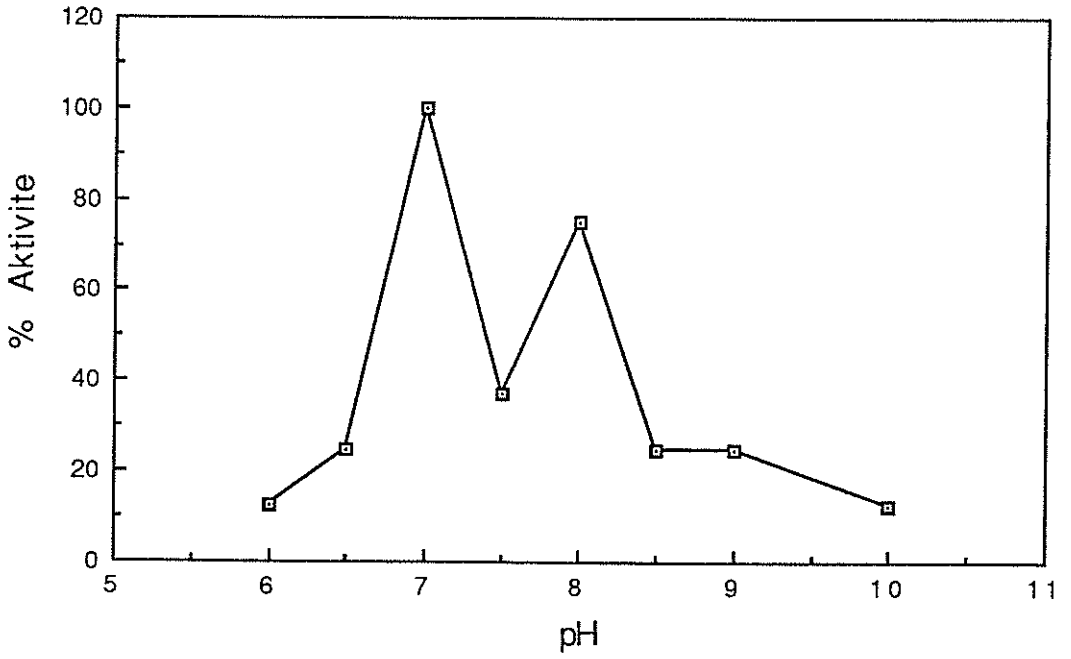
Şekil 3.8. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM dopamin substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



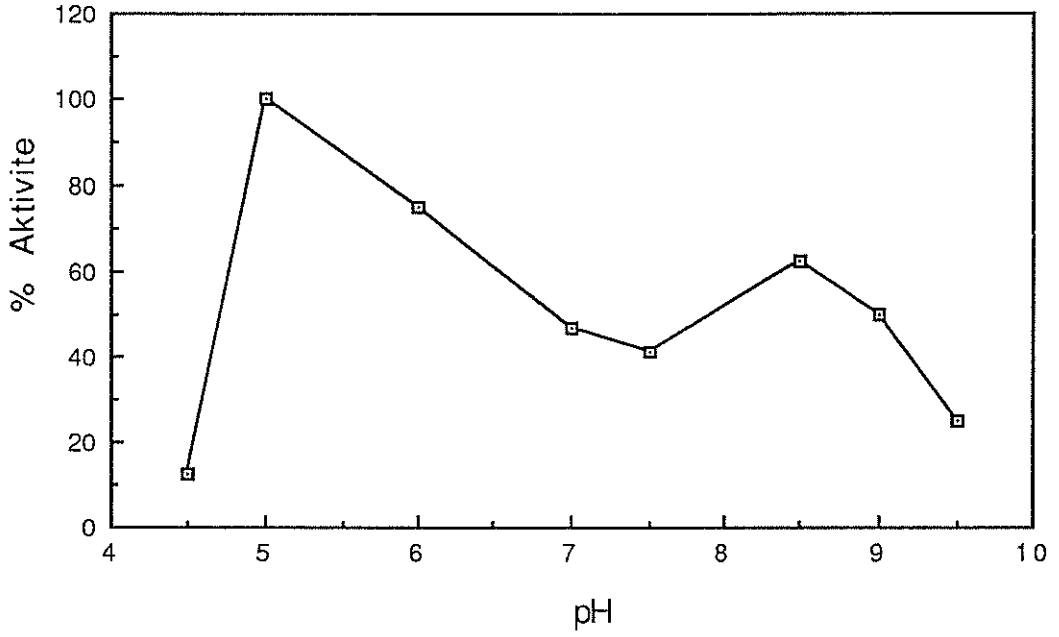
Şekil 3.9. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM gallik asit substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



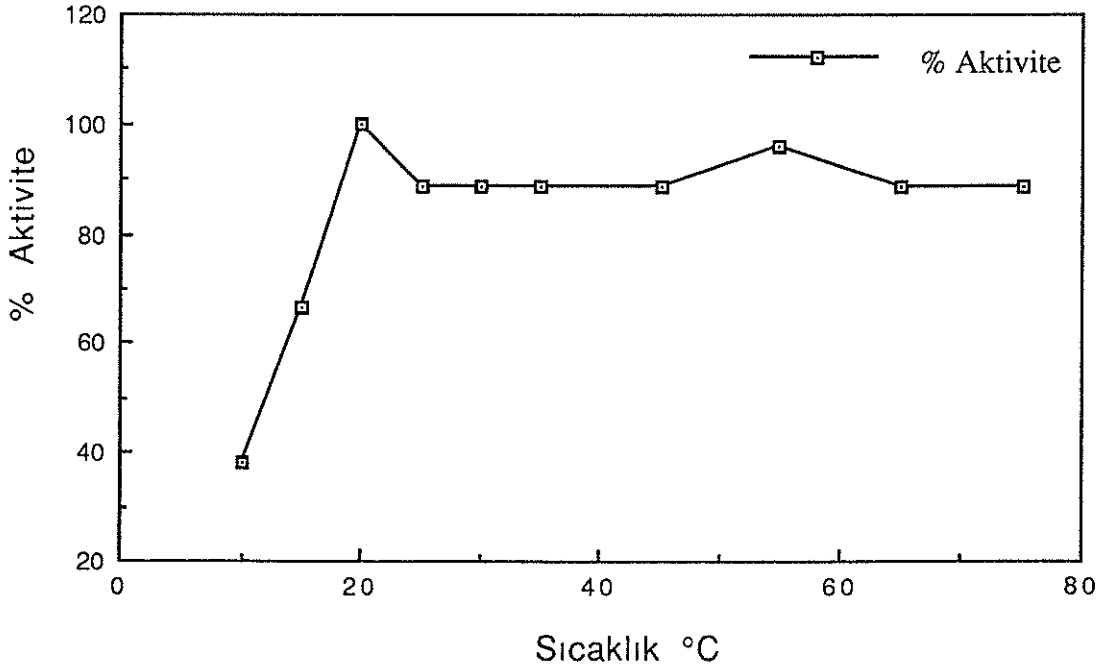
Şekil 3.10. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM pirogallol substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



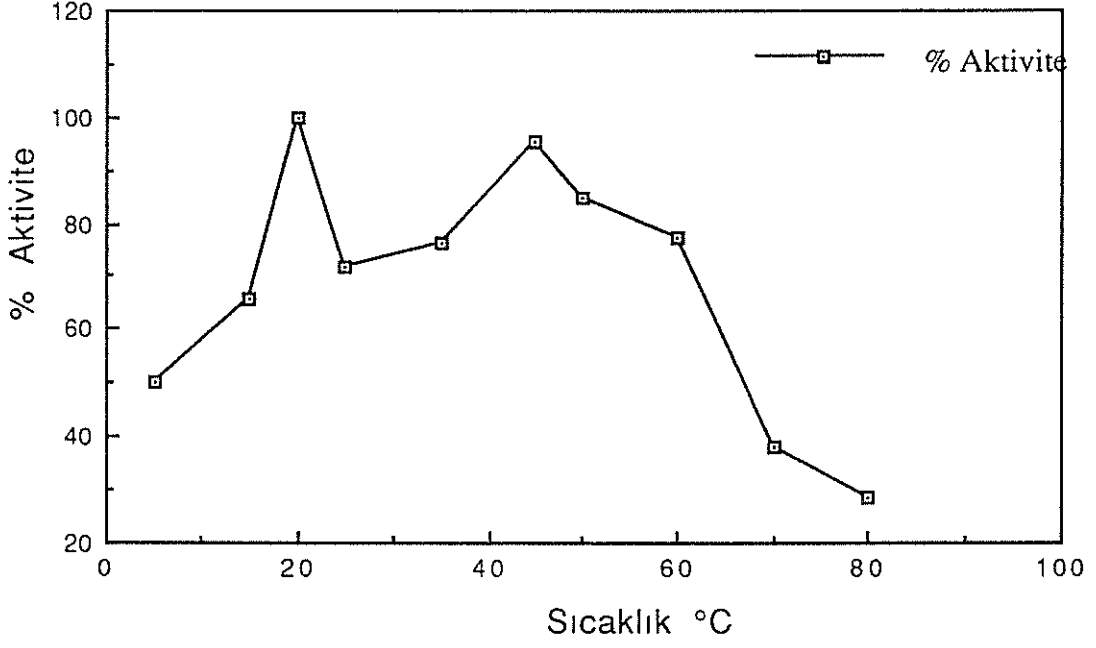
Şekil 3.11. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 5 mM L-tirozin substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



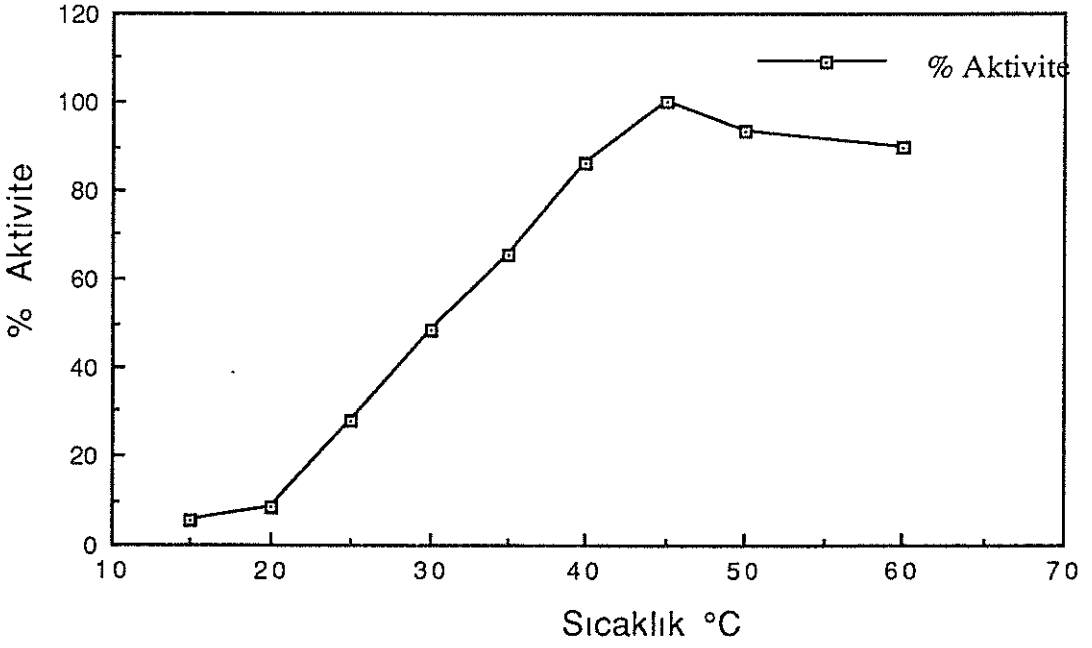
Şekil 3.12. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM p-kresol substratıyla elde edilen pH-% aktivite grafiği



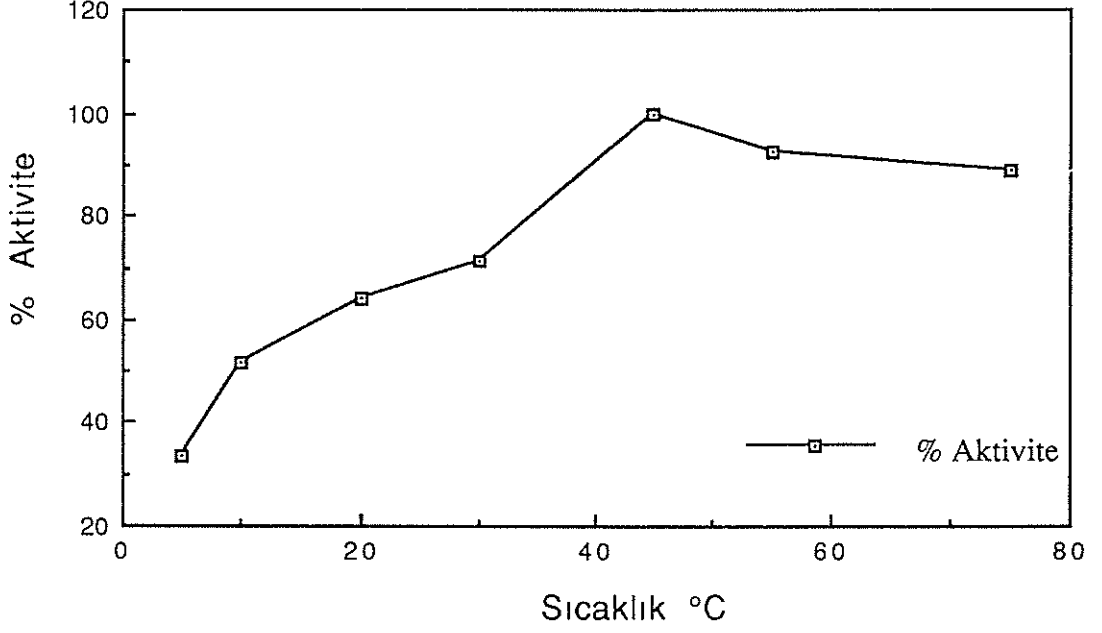
Şekil 3.13. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM katekol substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



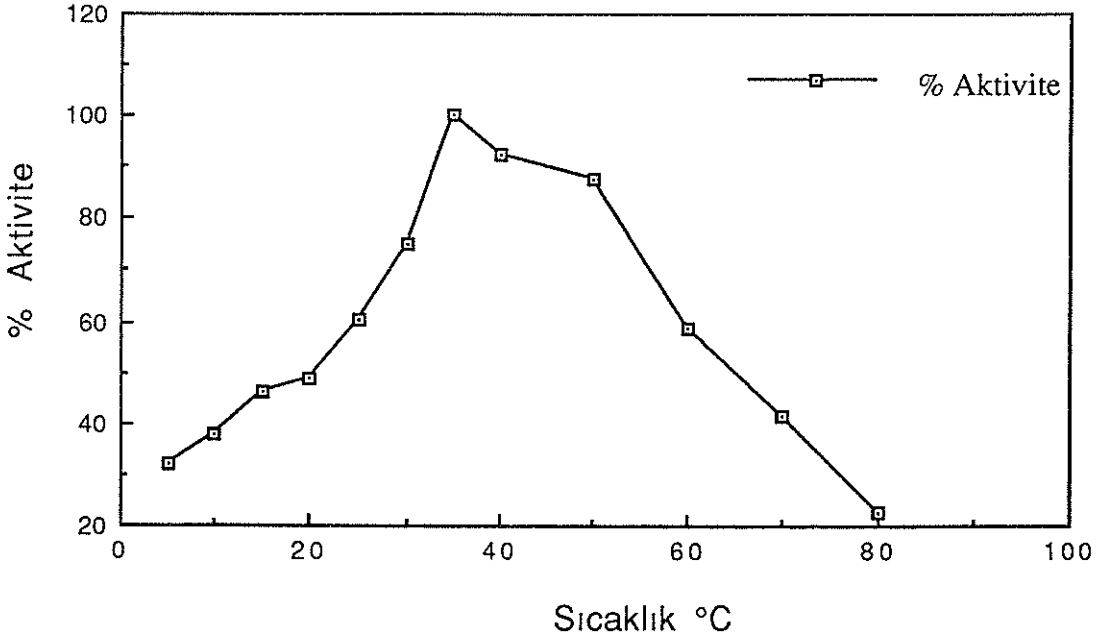
Şekil 3.14. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



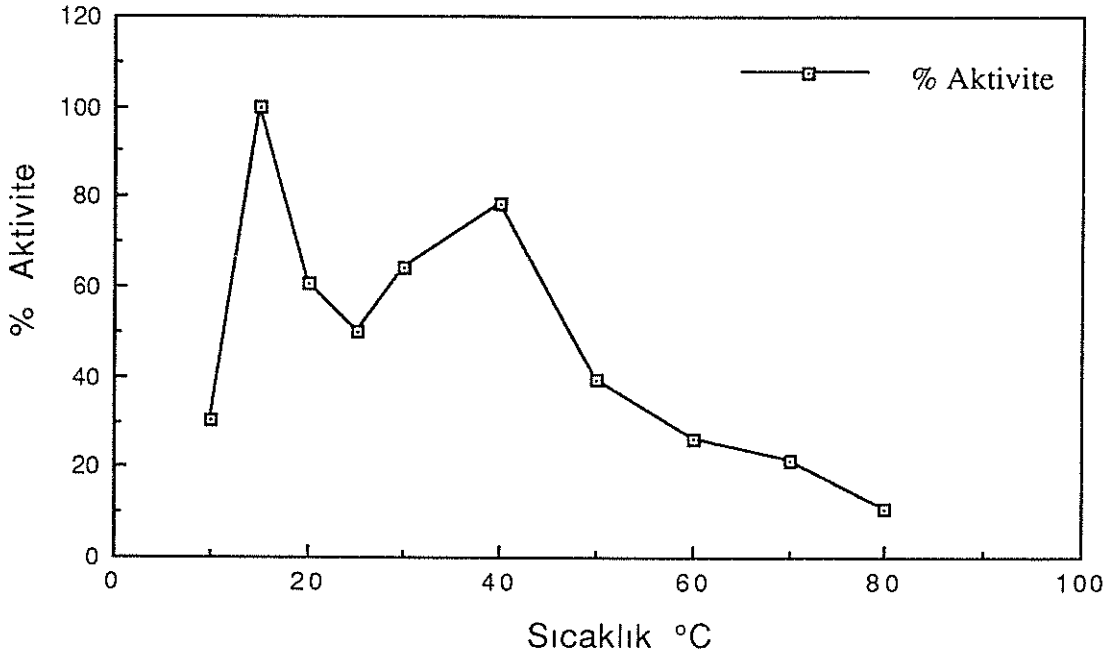
Şekil 3.15. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM L-dopa substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



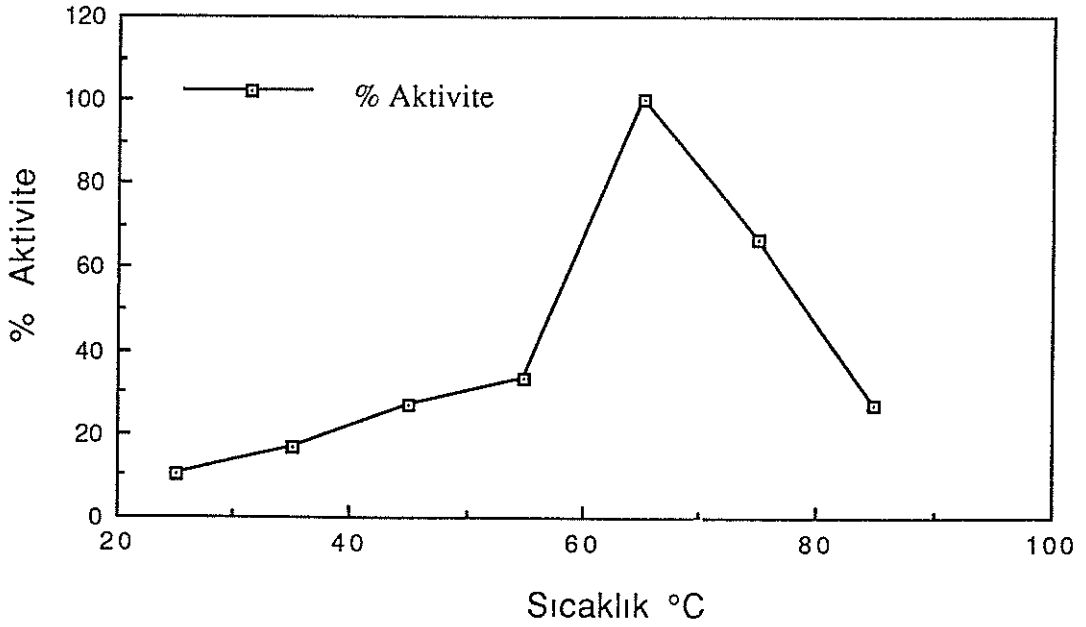
Şekil 3.16. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM dopamin substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



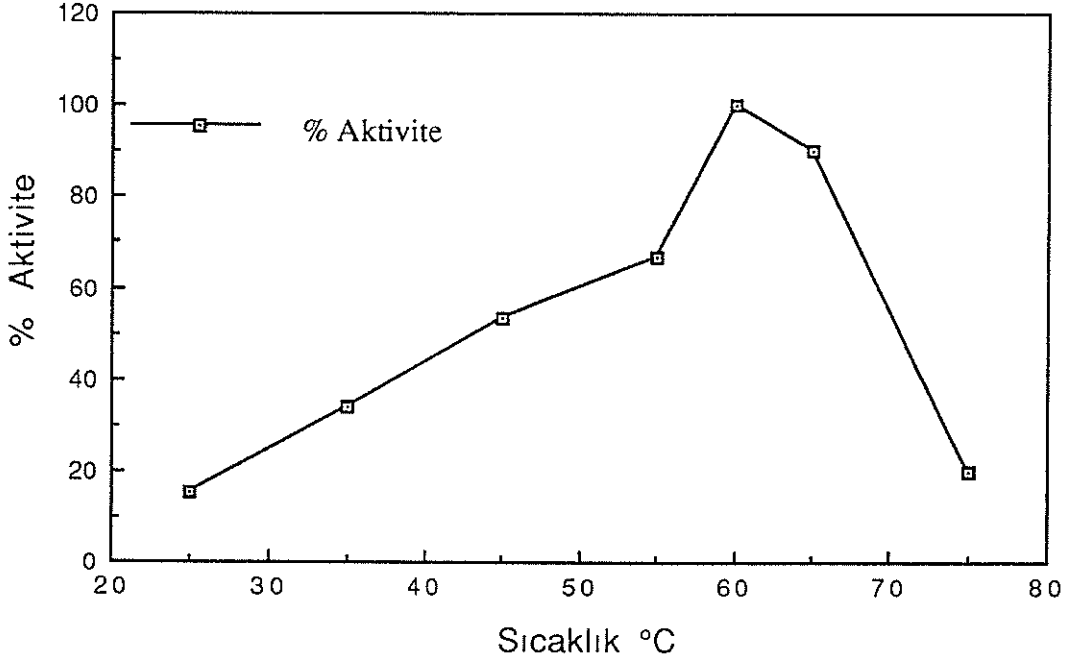
Şekil 3.17. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM gallik asit substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



Şekil 3.18. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM pirogallol substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



Şekil 3.19. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 5 mM L-tirozin substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği



Şekil 3.20. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için, 10 mM p-kresol substratıyla elde edilen sıcaklık - % aktivite grafiği

Tablo 3.3. Kuşburnu polifenol oksidaz enziminin substrat spesifitesi ile ilgili bulunan sonuçlar

Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	K _M (M)	V _{max} (EÜ/ ml xdak)
Katekol	8.5	25	7.41×10^{-3}	41.66
4-metil katekol	8.5	20	8.64×10^{-3}	431.96
L-Dopa	8.0	45	6.06×10^{-4}	45.45
Dopamin	8.5	45	2.82×10^{-3}	42.48
Gallik asit	8.8	35	2.64×10^{-3}	111.11
Pirogallol	7.0	15	2.79×10^{-3}	111.73
L-Tirozin	7.0	65	8.27×10^{-4}	142.85
p-Kresol	5.0	60	8.63×10^{-5}	40.00

3.8. İyonik Şiddet Etkisi Çalışmasının Sonuçları

İyonik şiddet etkisi çalışması; 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M ve 0.5 M Tris tamponu (pH=8.5) çözeltileri ile katekol, 4-metil katekol ve dopamin substratları (10 mM) kullanılarak aktiviteler EÜ/ml dakika olarak tesbit edildi. Sonuçlar Tablo 3.4'de verildi her üç substrat için de aktivitenin 0.2 M tris tamponunda en yüksek olduğu görüldü.

Tablo : 3.4 . Kuşburnu meyvası PPO enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddet etkisi

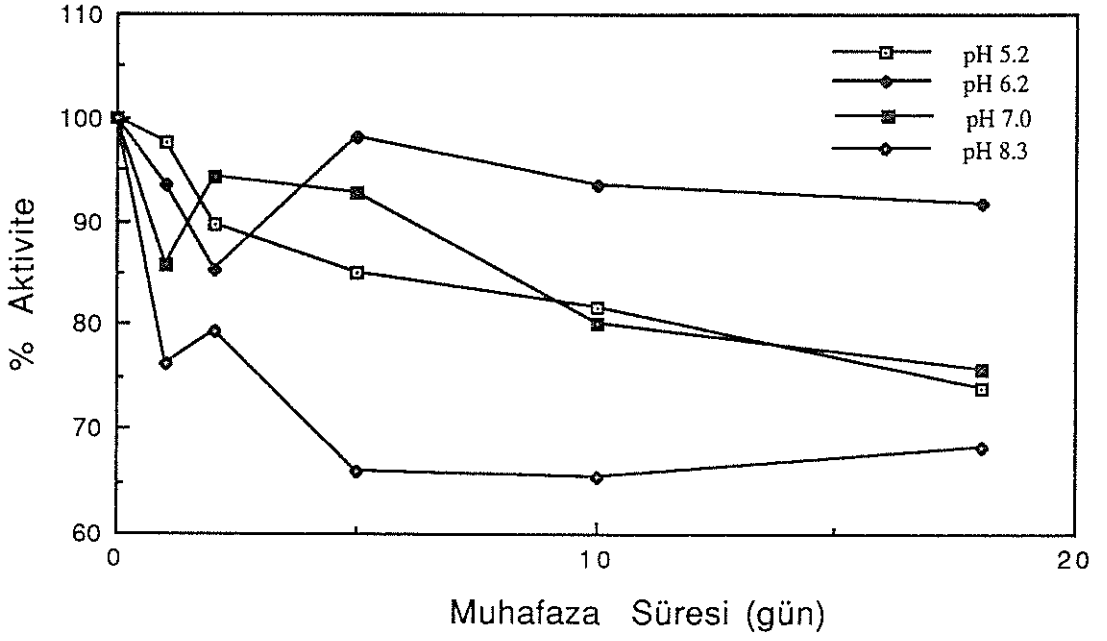
Tris Tamponu (pH=8.5) Konsantrasyon	0.01 (M)	0.05 (M)	0.1 (M)	0.2 (M)	0.3 (M)	0.5 (M)
Katekol	20	17	24	36	31.4	30
4-Metil katekol	60	90	110	140	90	110
Dopamin	26	20.6	46.6	63	35	36

3.9. Enzimin Stabil Olduğu pH Çalışması Sonuçları

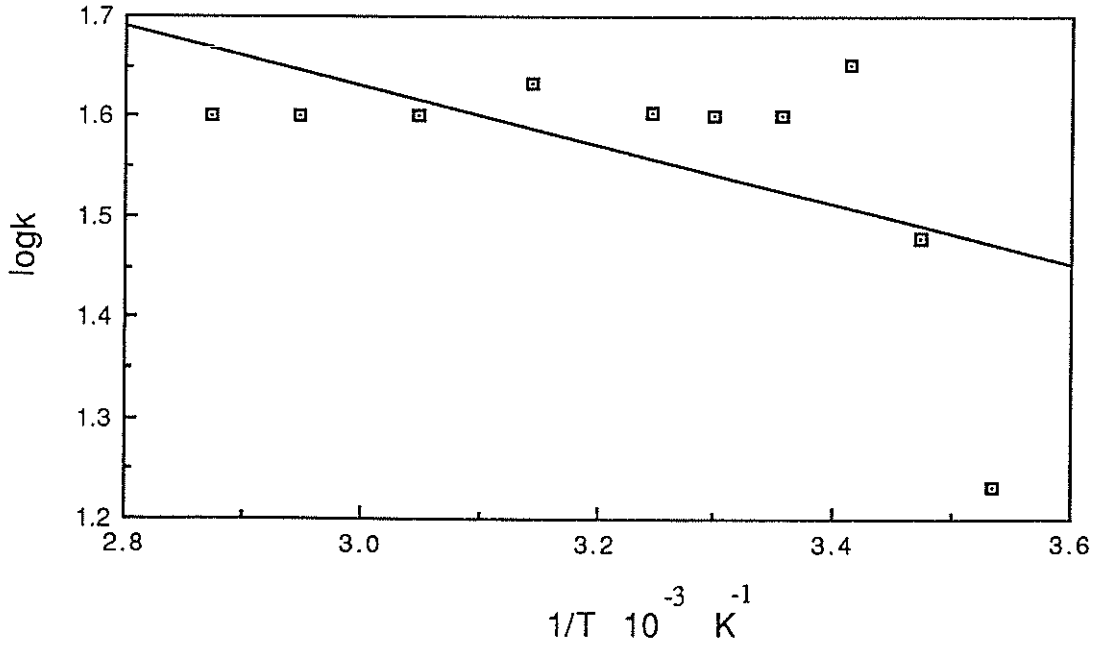
Bölüm 2.4.4'de anlatıldığı gibi, 0.1 M sitrat/0.2 M fosfat (pH=5), 0.1 M fosfat (pH=6.2-7.0) ve 0.2 M Tris (pH=8.2) tamponları ile enzim 5 kat seyreltilerek, 4°C de muhafaza edildi. Başlangıçta, 1., 2., 5., 10. ve 18. günlerde aktiviteleri 10 mM 4-metilkatekol substratı ile optimum şartlarda (0.2 M Tris tamponu pH=8.5 ve 20°C de) belirlendi. Sonuçlar zamana karşı aktivite değerleri grafik edilerek şekil 3.21 de gösterildi. Buna göre kuşburnu meyvası PPO enziminin stabil olduğu pH'nın 6.2 olduğu görülmüştür.

3.10. Aktivasyon Enerjileri

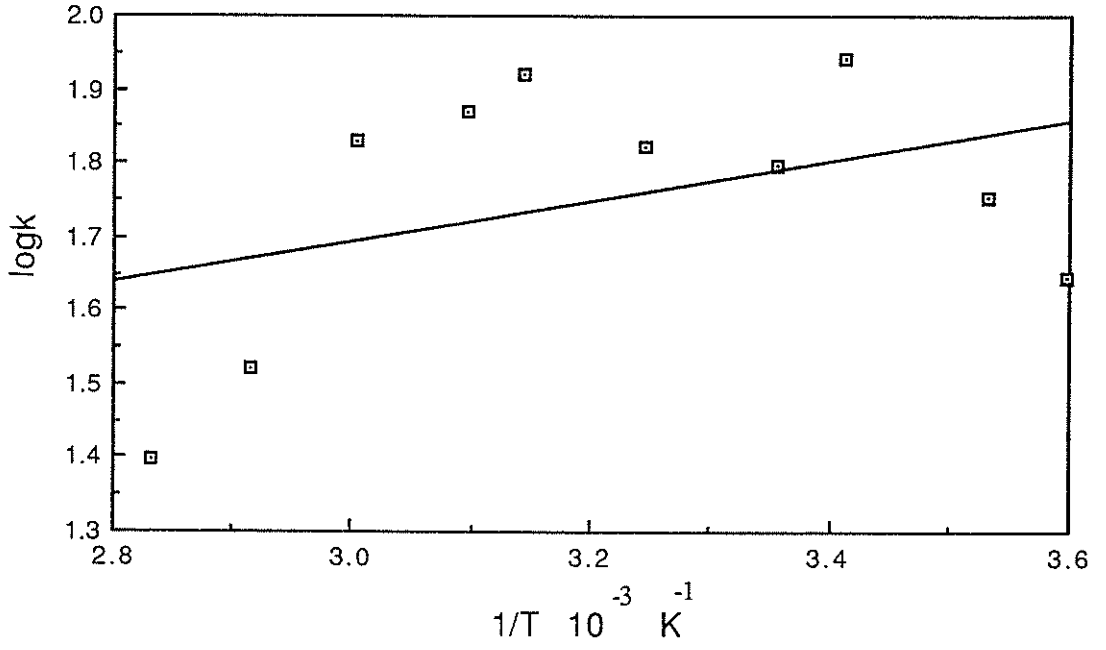
Optimum sıcaklık belirlenmesi çalışmalarından yararlanılarak her bir substratın enzimle olan reaksiyonu için aktivasyon enerjileri hesaplandı. Aktivasyon enerjisi, logK değerlerinin 1/T değerlerine karşı grafik edilmesiyle elde edilen doğrunun eğiminden bulundu. Çizilen grafikler Şekil 3.22-3.29'da; elde edilen aktivasyon enerjileri de Tablo 3.5'de verildi.



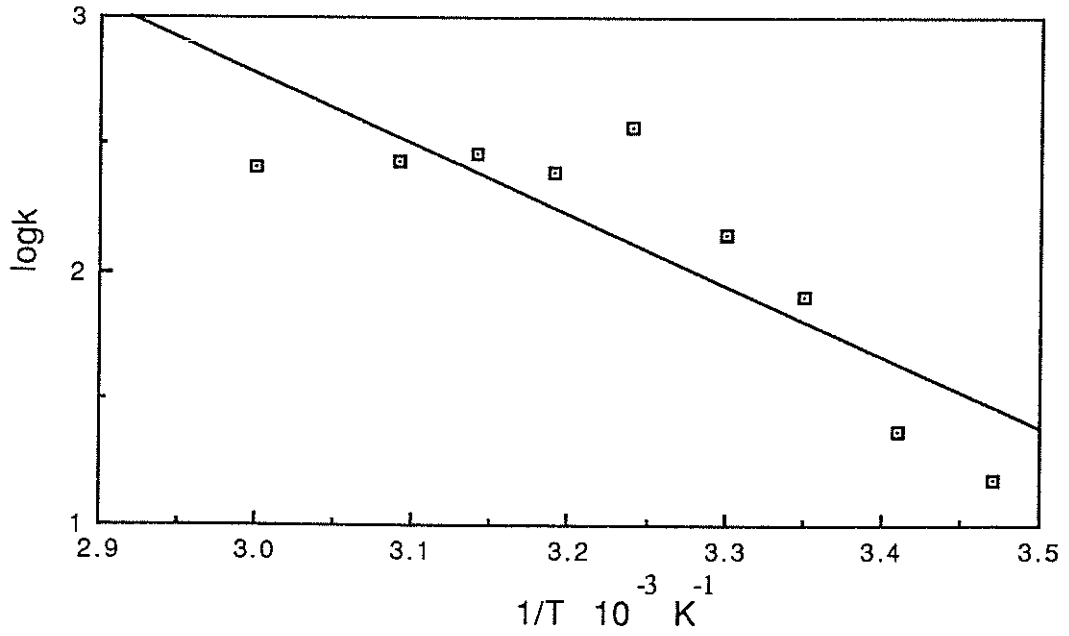
Şekil 3.21 Kuşburnu meyvası PPO enziminin stabil olduğu pH'ı gösterir grafik



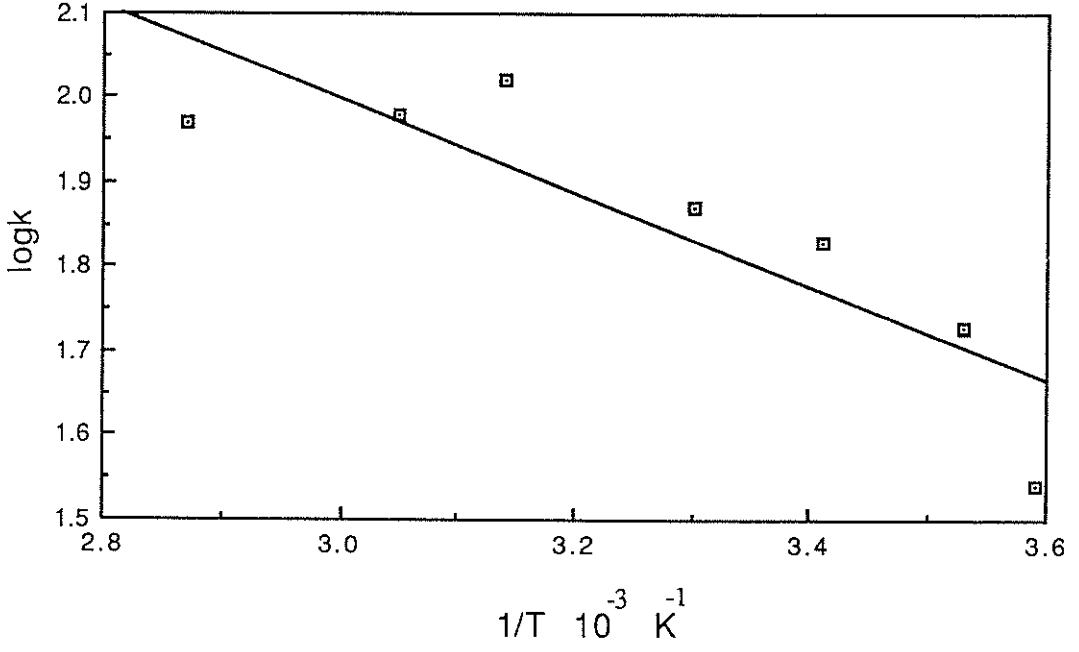
Şekil 3.22. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



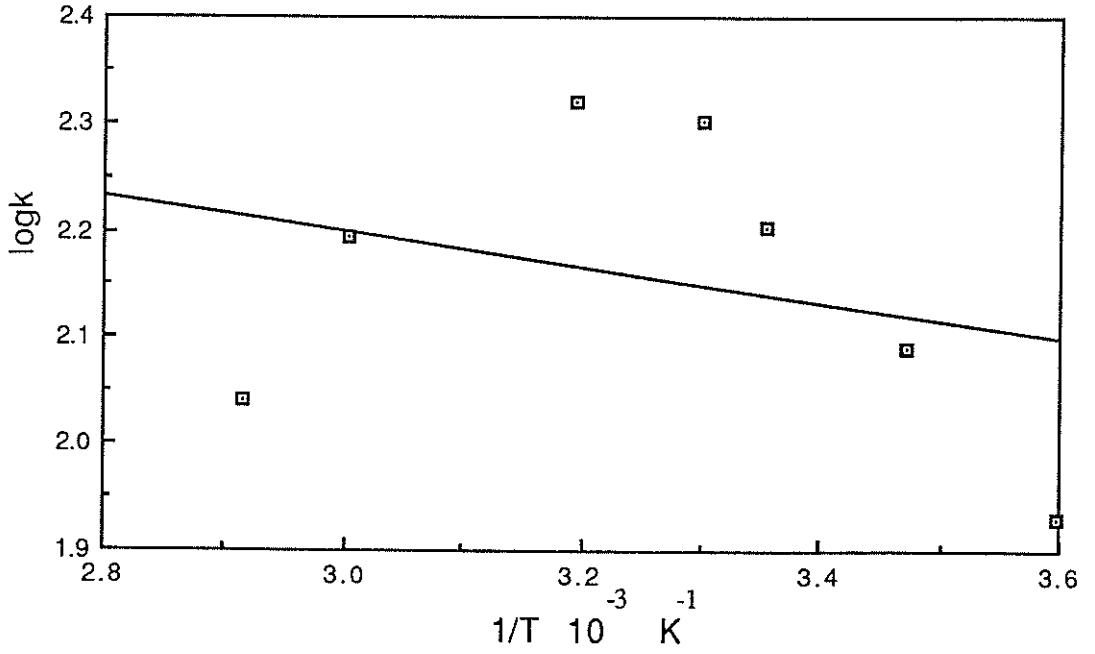
Şekil 3.23. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen $\log k$ -($1/T$) grafiği



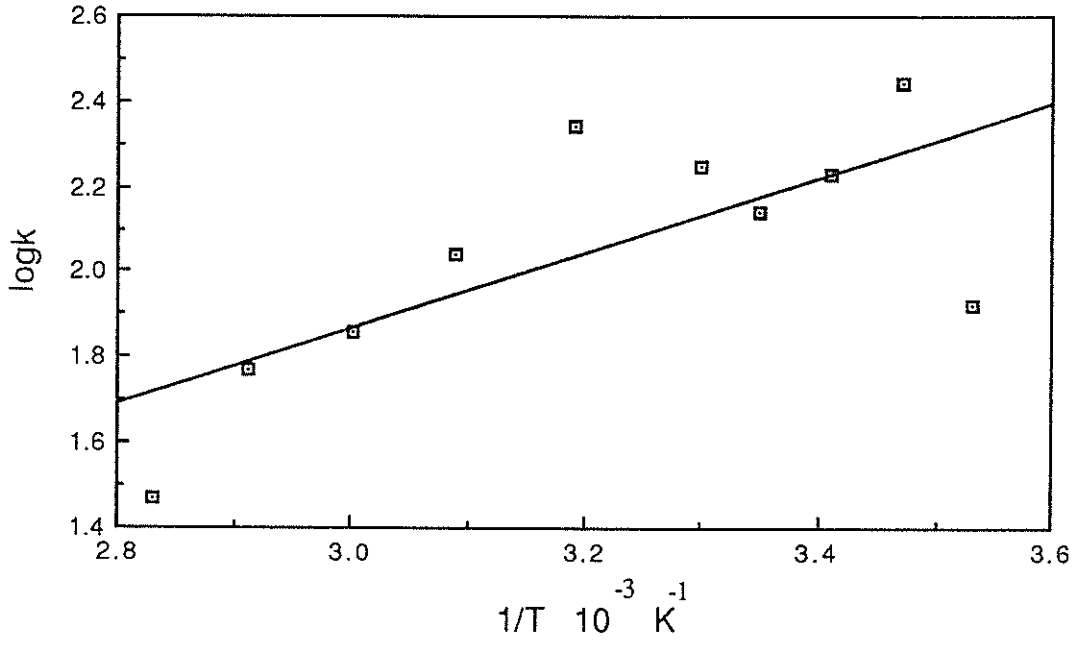
Şekil 3.24. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için L-Dopa substratı ile elde edilen $\log k$ -($1/T$) grafiği



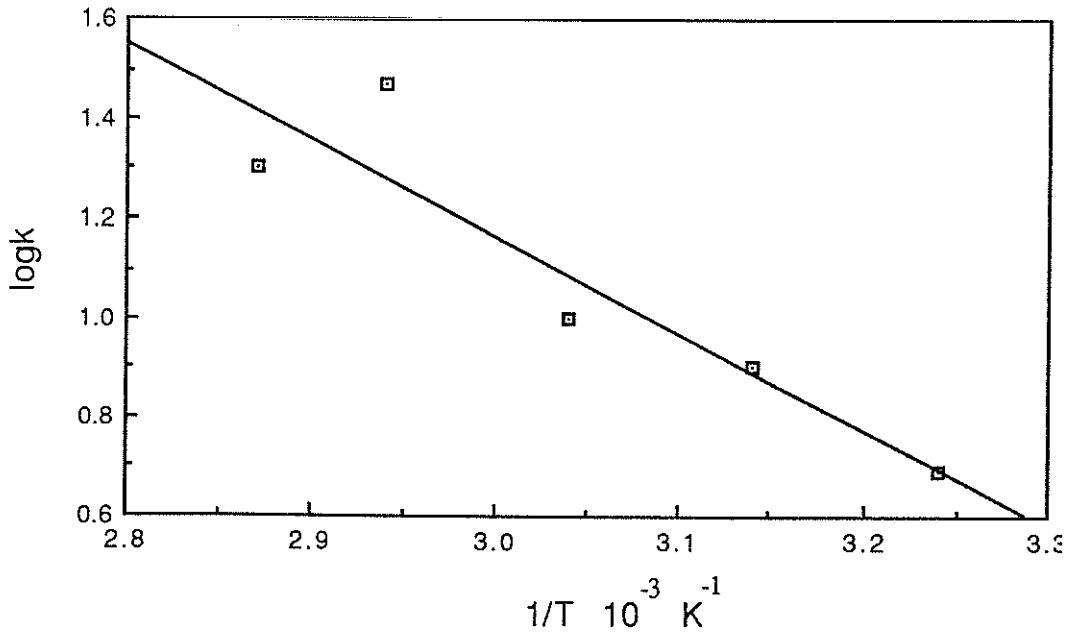
Şekil 3.25. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için dopamin substratı ile elde edilen logk-(1/T) grafiği



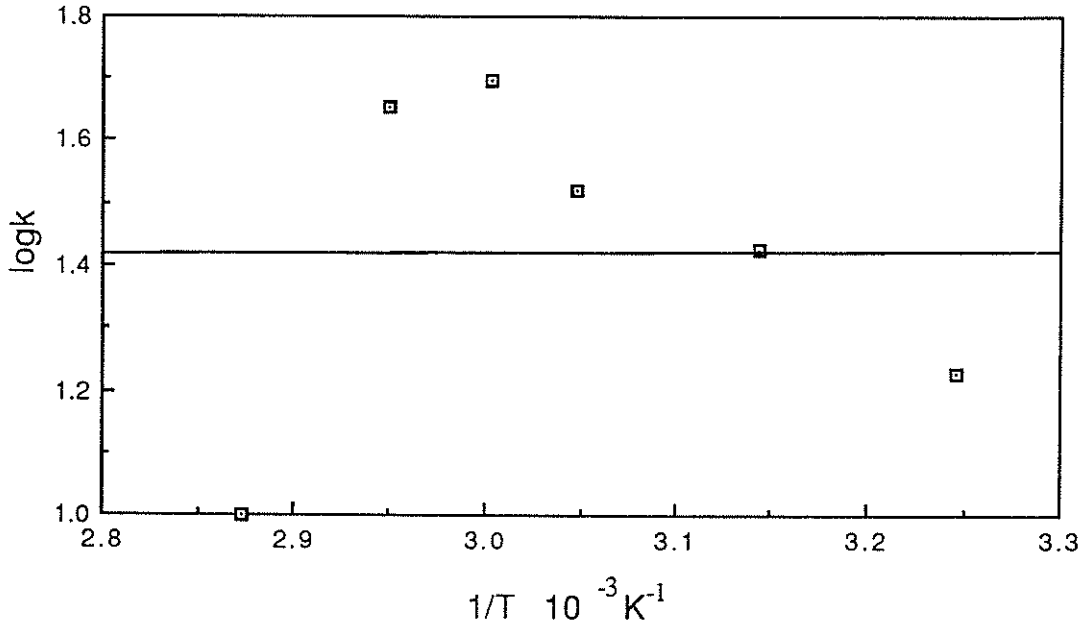
Şekil 3.26. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için gallik asit substratı ile elde edilen logk-(1/T) grafiği



Şekil 3.27. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen $\log k-(1/T)$ grafiği



Şekil 3.28. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için L-tirozin substratı ile elde edilen $\log k-(1/T)$ grafiği



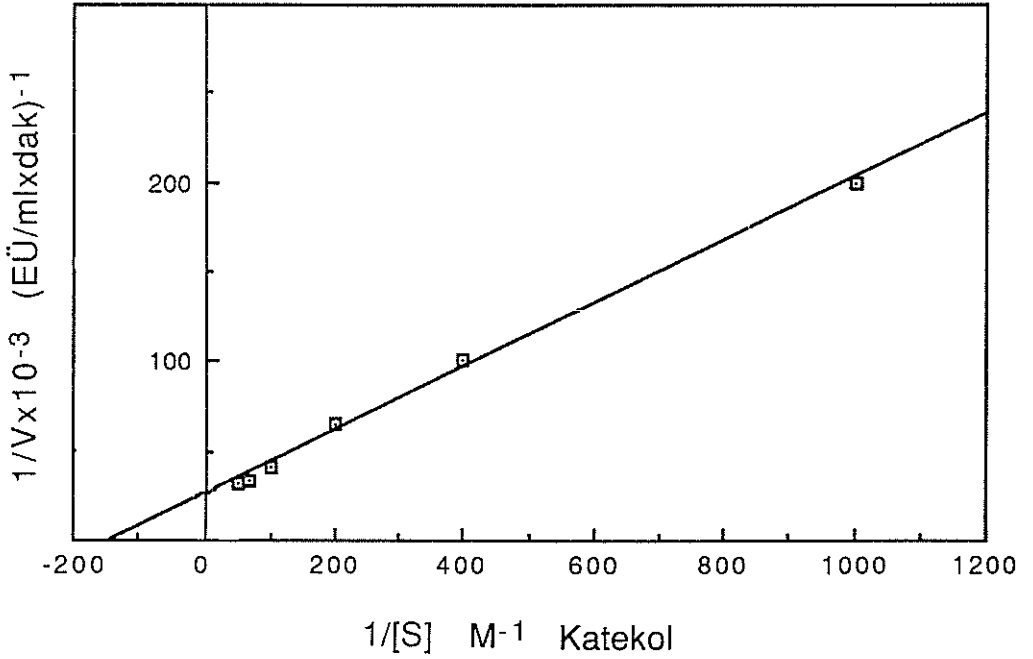
Şekil 3.29. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için p-kresol substratı ile elde edilen $\log k$ -($1/T$) grafiği

Tablo 3.5 Kuşburnu meyvası PPO enziminin değişik substratlar için elde edilen aktivasyon enerjileri

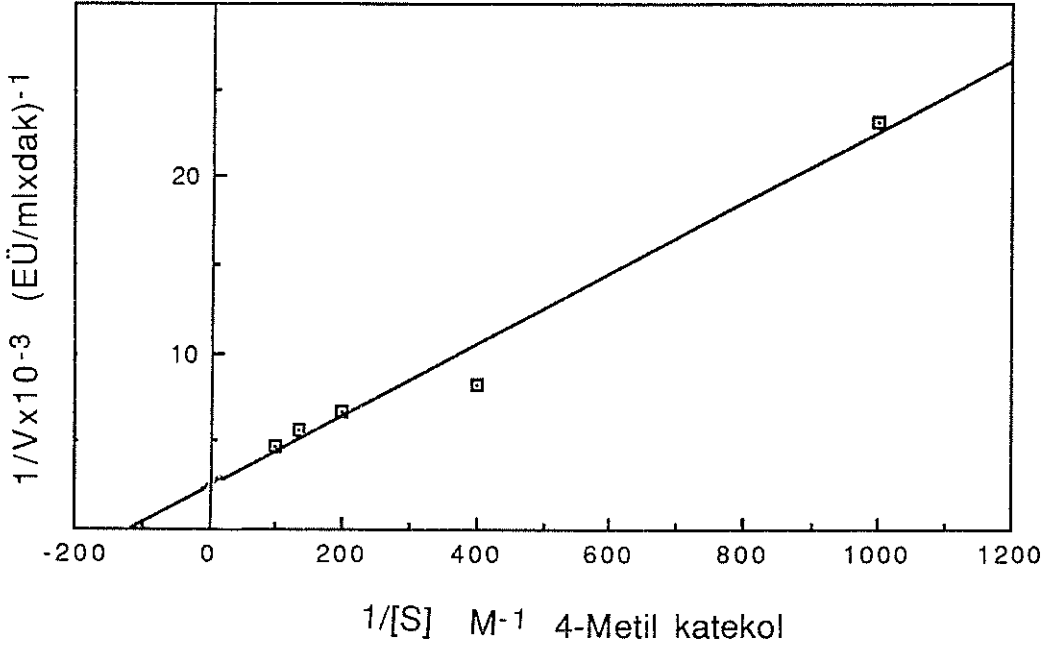
Substrat	Eğim ($-E_A/2.303 R$)	Aktivasyon enerjisi (kal.mol^{-1})
Katekol	-0.2984	1.3654
4-Metil katekol	0.2785	-1.2744
L-Dopa	-2.7807	12.7246
Dopamin	-0.5540	2.5351
Gallik asit	-0.1705	0.7802
Pirogallol	0.8798	-4.02260
L-Tirozin	-1.9210	8.7906
p-Kresol	0.0079	-0.0361

3.11. Farklı Substratlar için K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

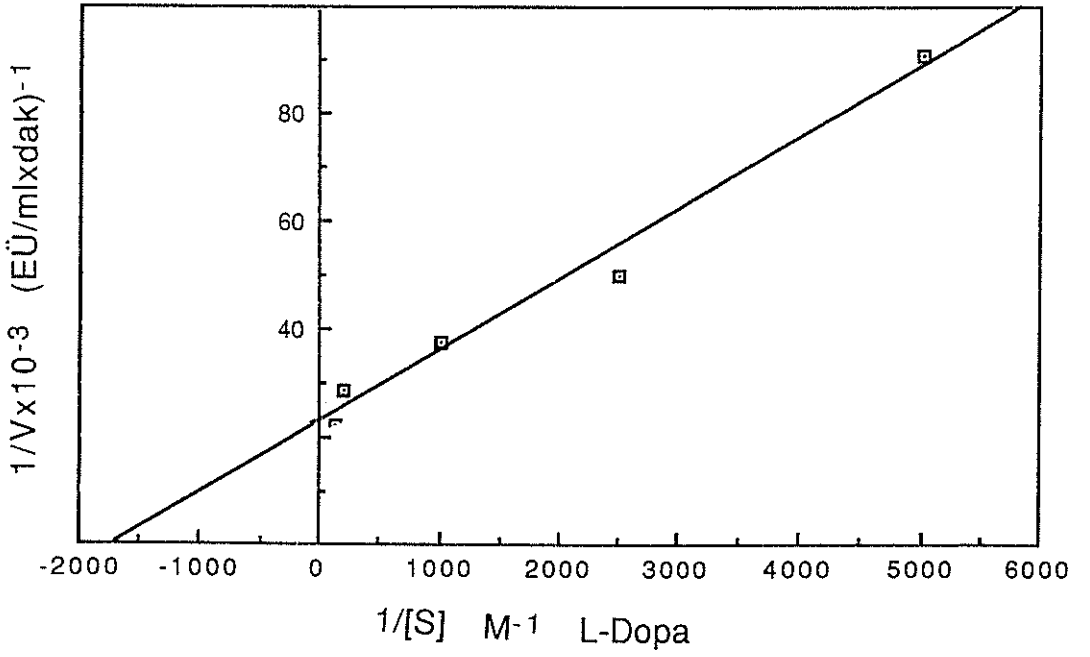
Optimum pH ve sıcaklıkları belirlenen substratlar için optimum şartlarda en az 5 ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V$ - $1/[S]$ değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Çizilen grafikler şekil 3.30-3.37'de, grafiklerden yararlanılarak hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Tablo 3.3'de verildi.



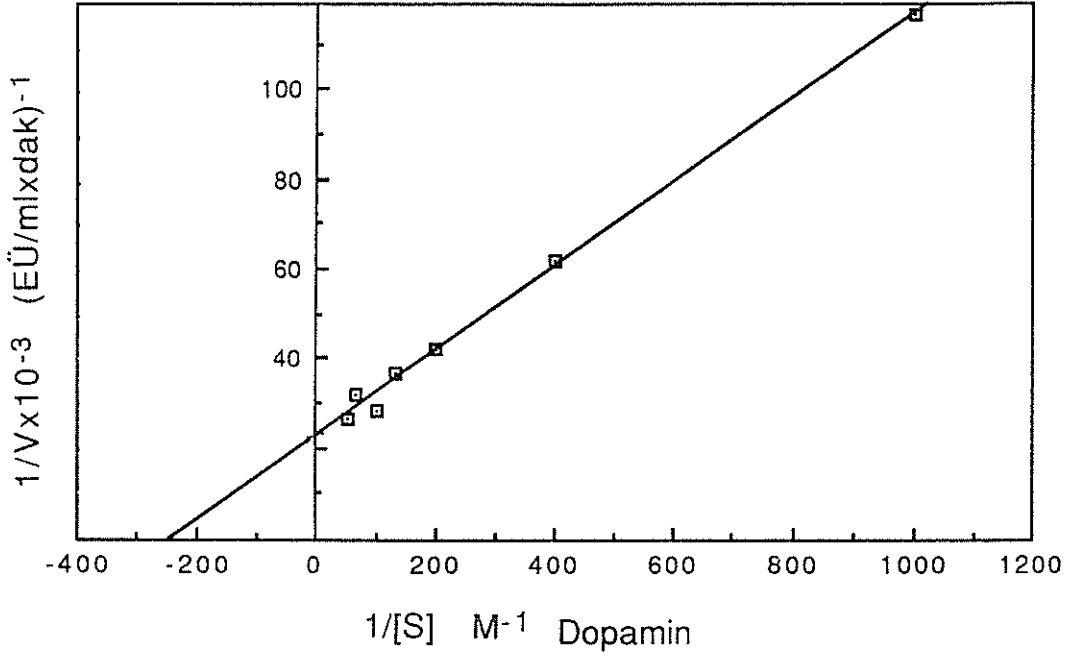
Şekil 3.30. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği



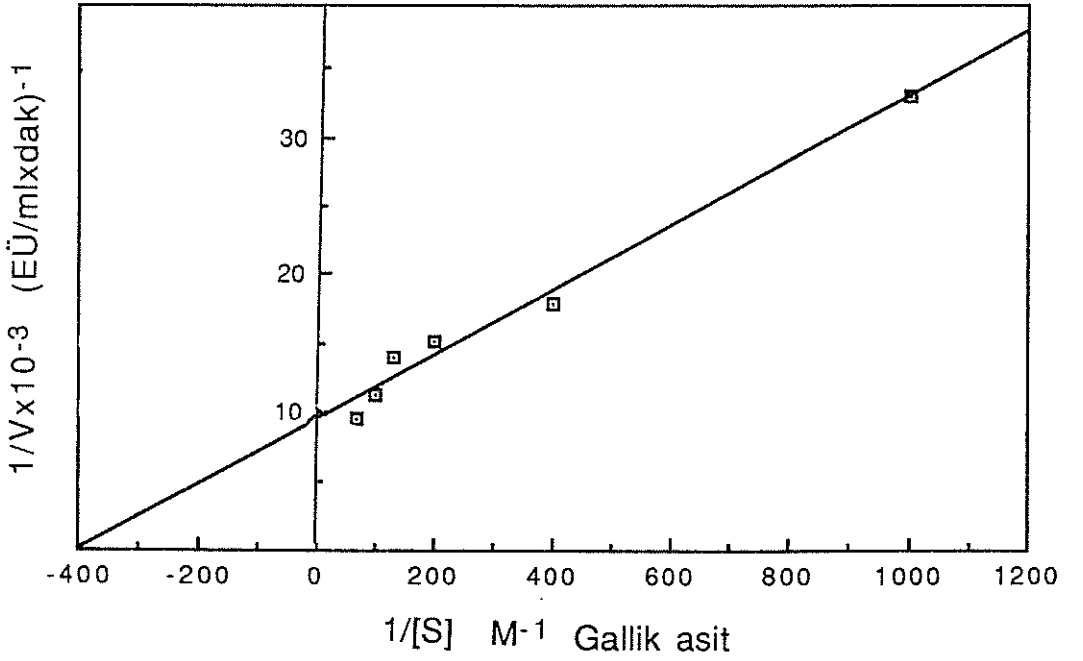
Şekil 3.31. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



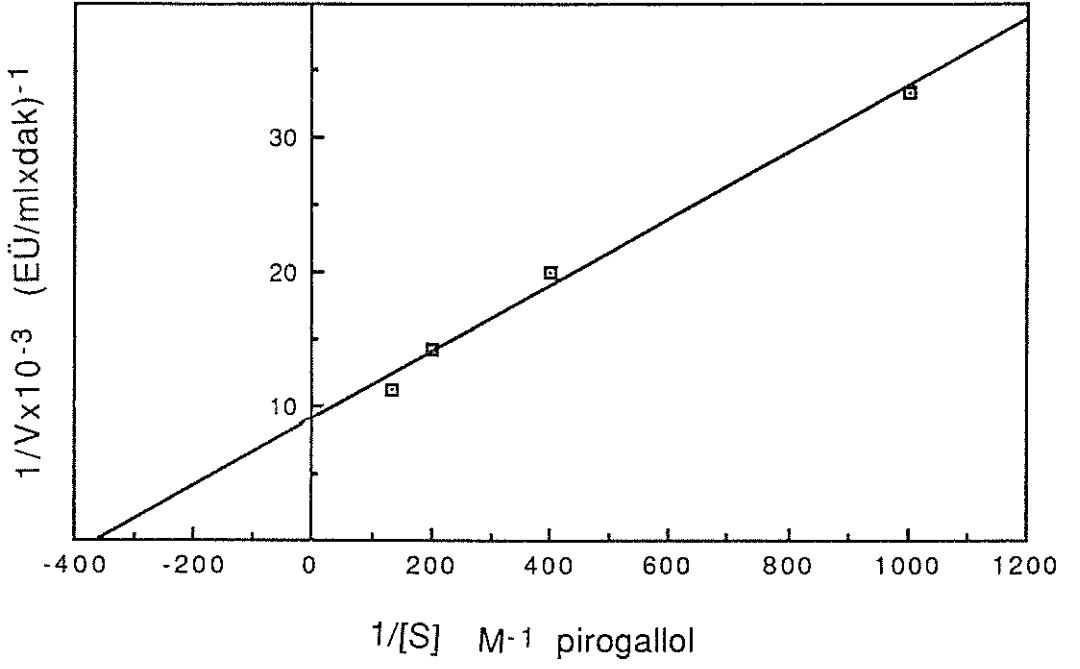
Şekil 3.32. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için L-dopa substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



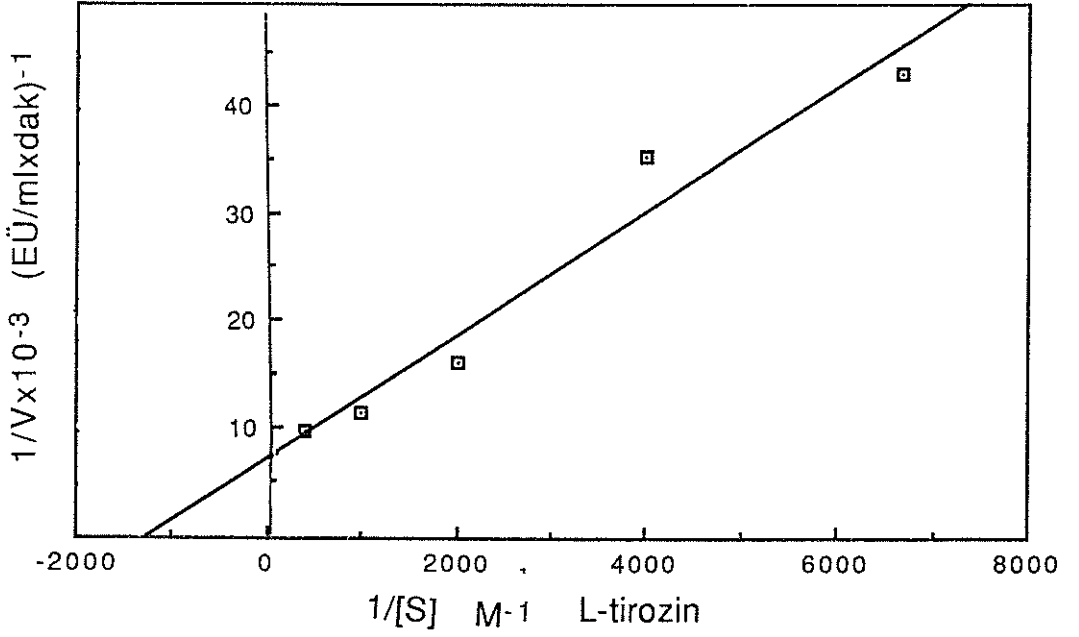
Şekil 3.33. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için dopamin substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



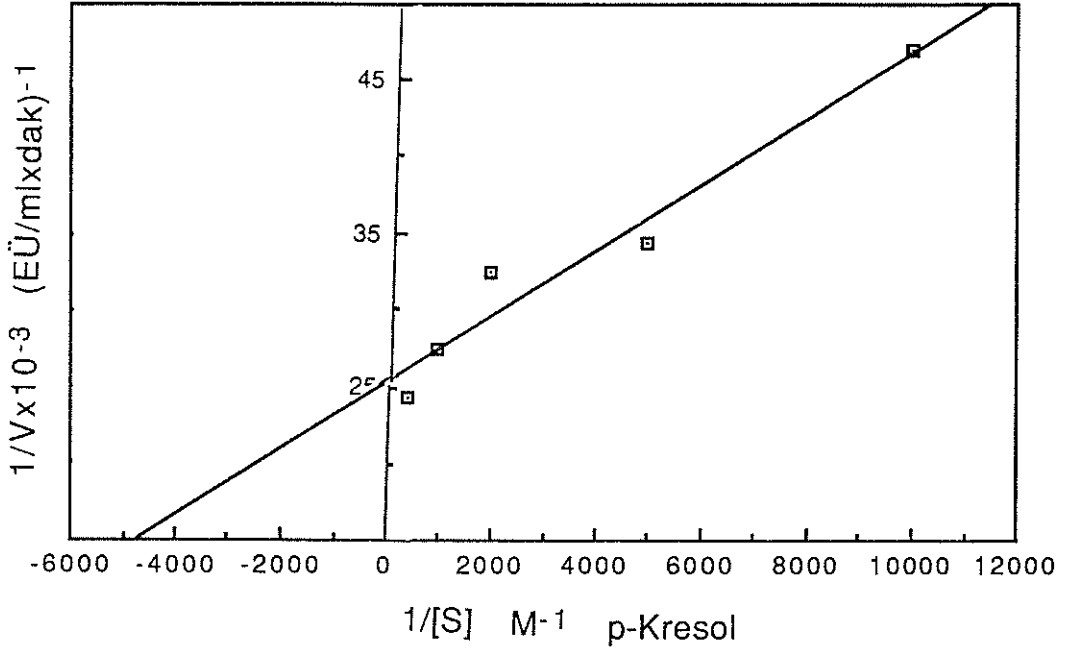
Şekil 3.34. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için gallik asit substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



Şekil 3.35. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



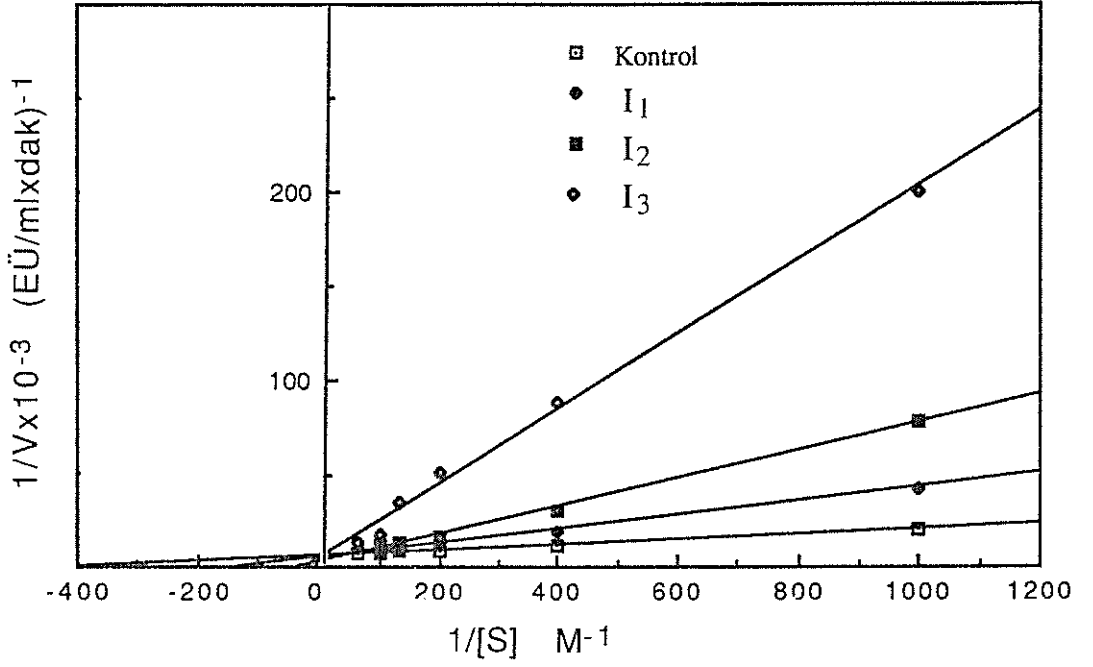
Şekil 3.36. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için L-tirozin substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



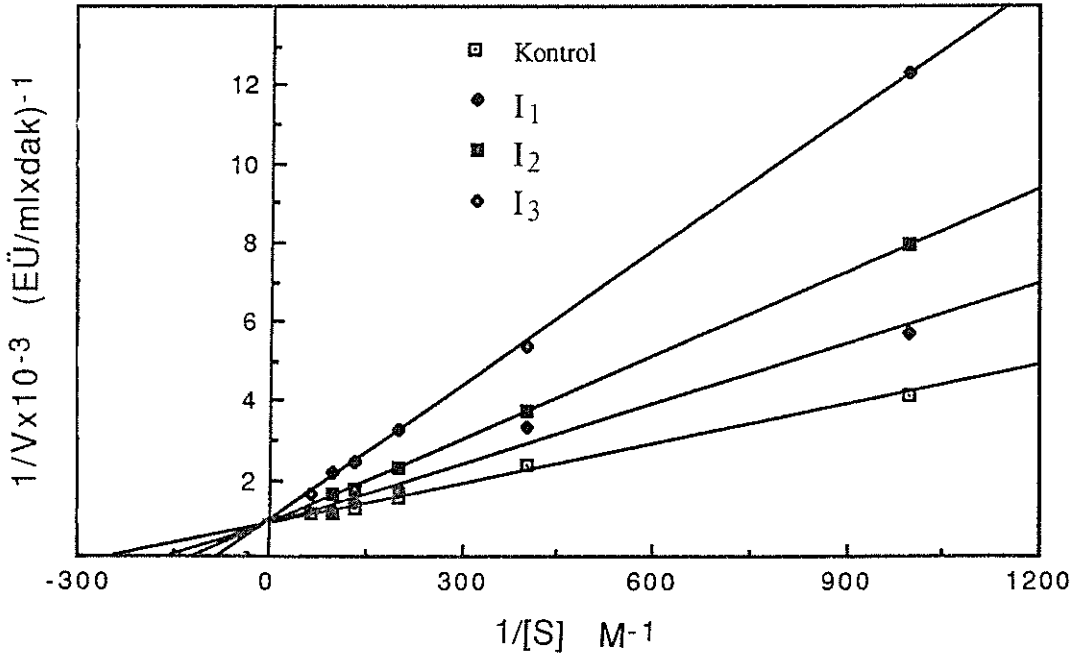
Şekil 3.37. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için p-kresol substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

3.12. Farklı İnhibitörler İçin K_i Sabitlerinin ve I_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

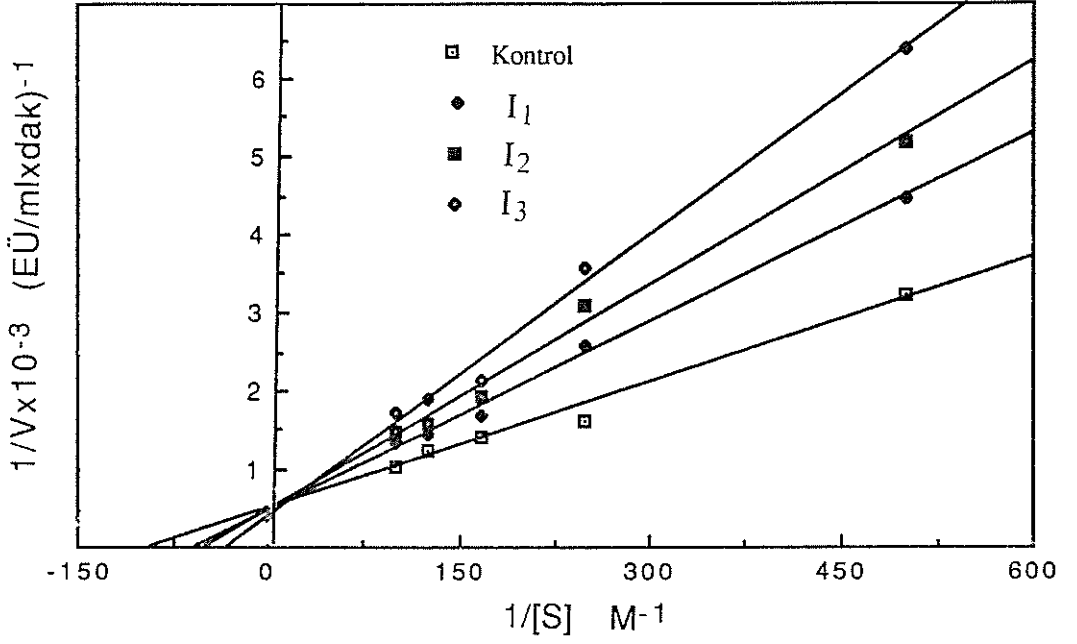
Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda bölüm 2.4.4.'e'de açıklandığı gibi beş farklı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler belirlendi. Daha sonra 11 farklı inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda optimal şartlarda aktiviteler 4-metil katekol substratı beraberliğinde belirlendi. $1/V-1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (şekil 3.38-3.48). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve İnhibisyon türleri tesbit edildi ve Tablo 3.6'da gösterildi., K_i değerleri yarışmalı (Kompetetiv) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{\max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarı yarışmalı (unkompetetiv) inhibisyon için aynı eğrinin $1/V$ eksenini kestiği noktayı veren $1/V_{\max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetetiv) inhibisyon için $V_{\max} = V'_{\max} (1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanarak hesaplandı. Denklemlerde kullanılan K_M ve $V_{\max}$ değerleri, inhibitörsüz ortamda belirlenen değerlerdir.



Şekil 3.38. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum metabisülfitin inhibisyon etkisi
 $[I_1] = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $[I_2] = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $[I_3] = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

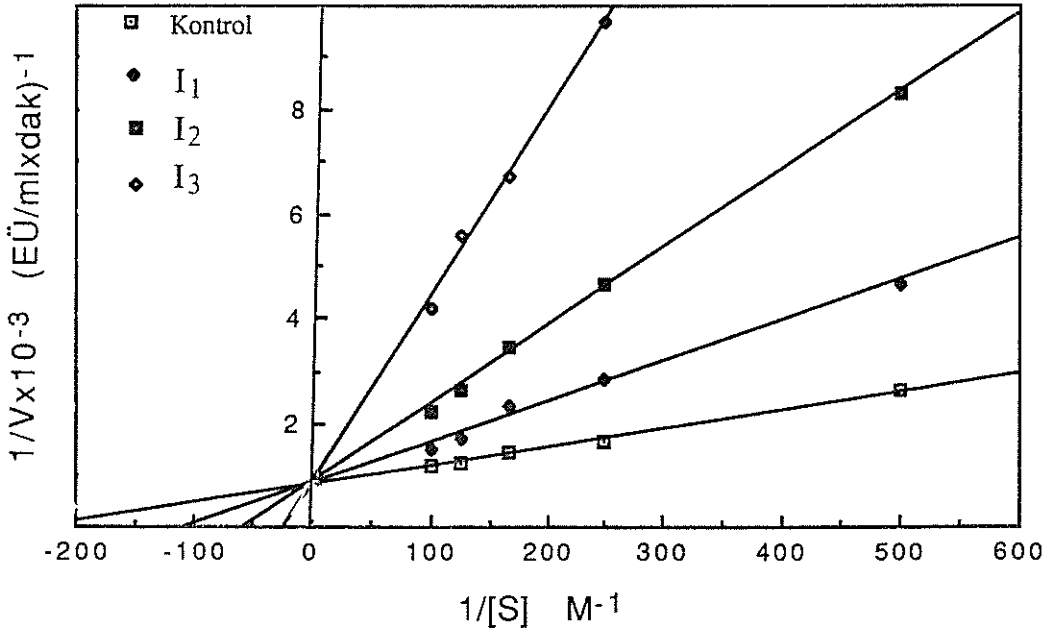


Şekil 3.39. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine L-sisteinin inhibisyon etkisi
 $[I_1] = 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $[I_2] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $[I_3] = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$



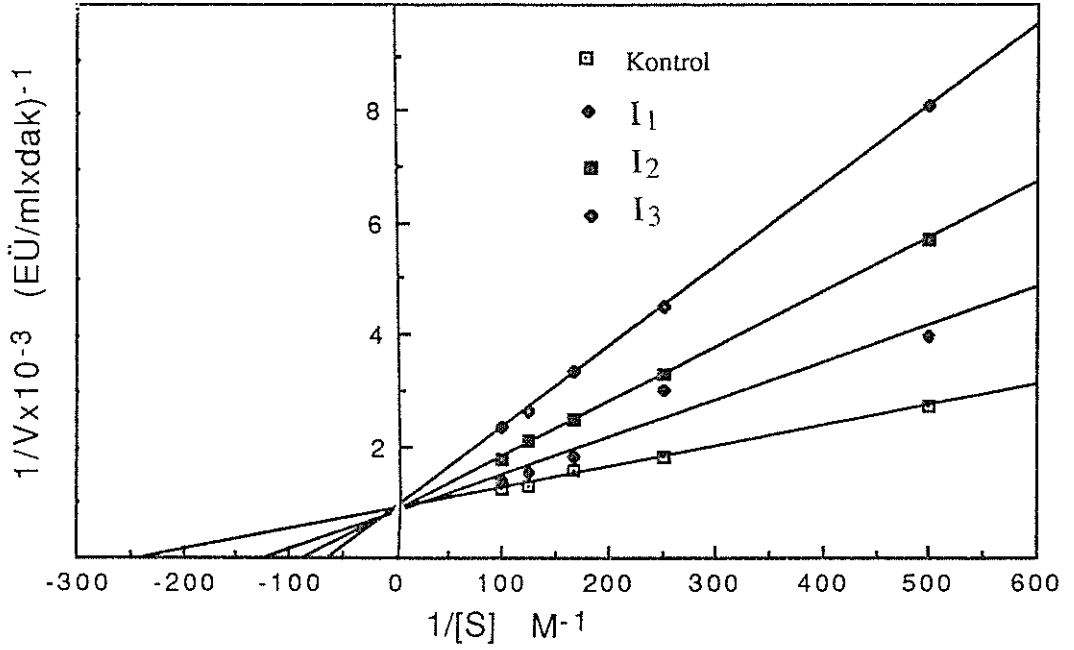
Şekil 3.40. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine askorbik asitin inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ M} \quad [I_2] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M} \quad [I_3] = 3.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$



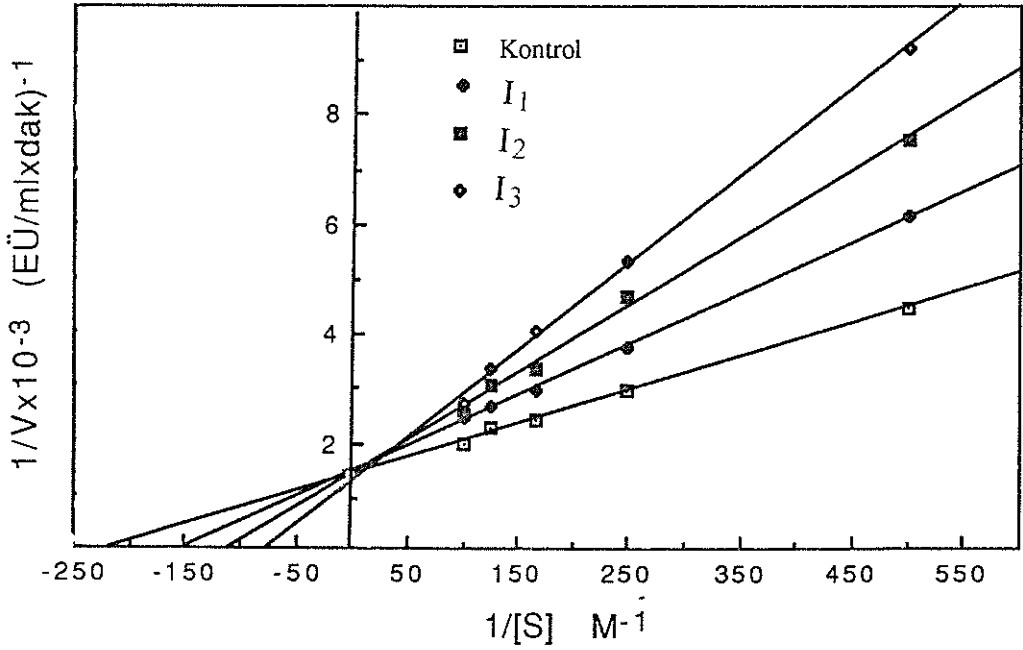
Şekil 3.41. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyonun inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 8.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_2] = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M} \quad [I_3] = 3.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$



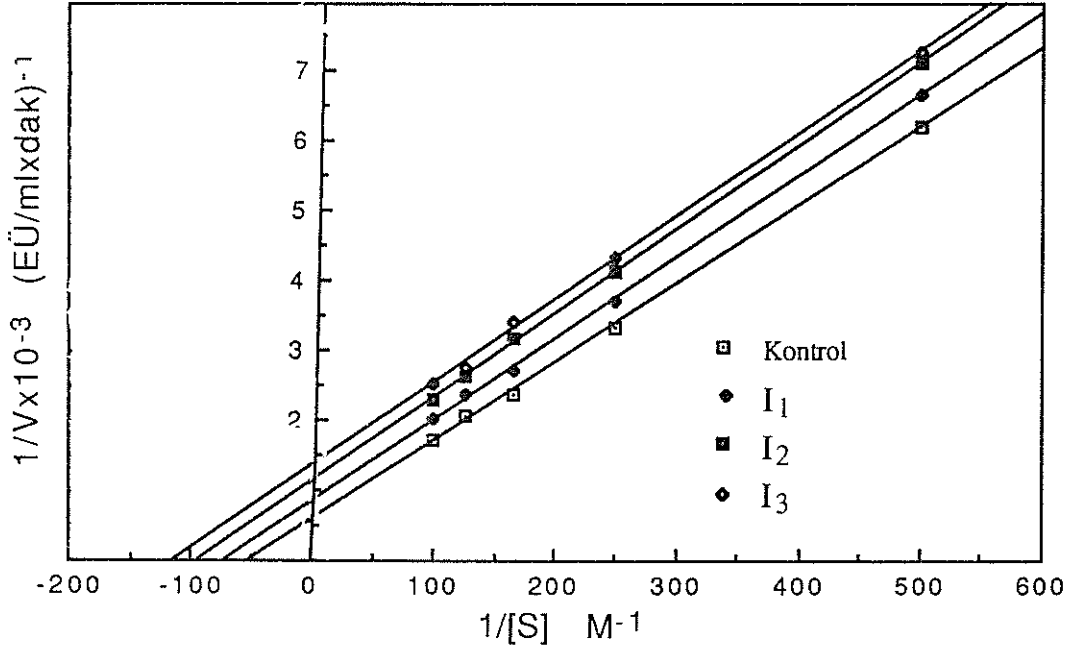
Şekil 3.42. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine tiyoürenin inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 5.0 \times 10^{-2} \text{ M} \quad [I_2] = 1.0 \times 10^{-1} \text{ M} \quad [I_3] = 1.5 \times 10^{-1} \text{ M}$$



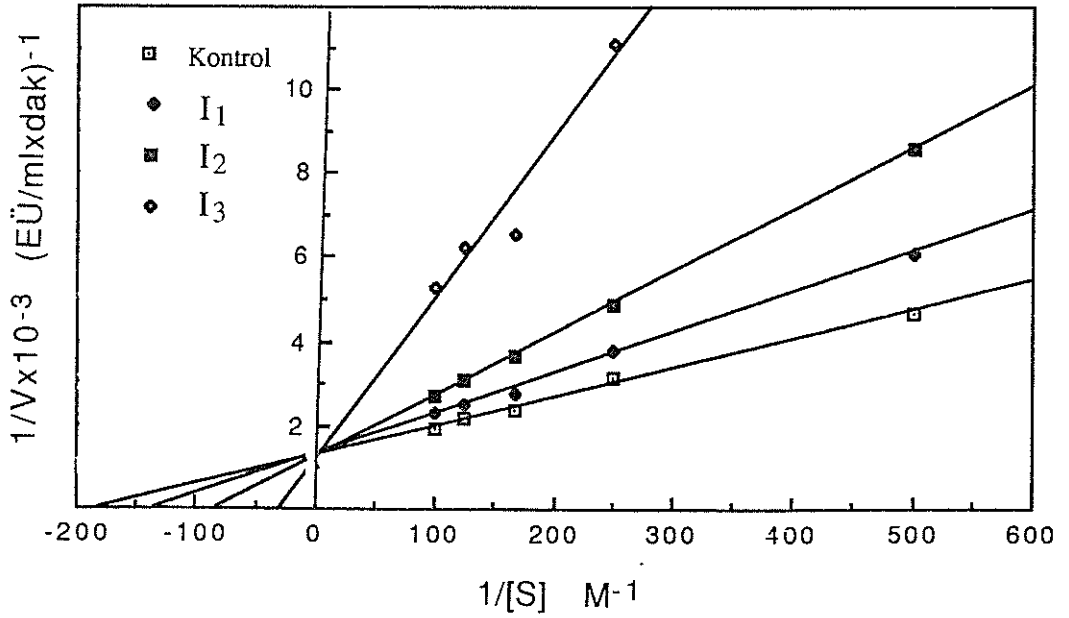
Şekil 3.43. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azotürün inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 6.0 \times 10^{-2} \text{ M} \quad [I_2] = 1.0 \times 10^{-1} \text{ M} \quad [I_3] = 2.0 \times 10^{-1} \text{ M}$$



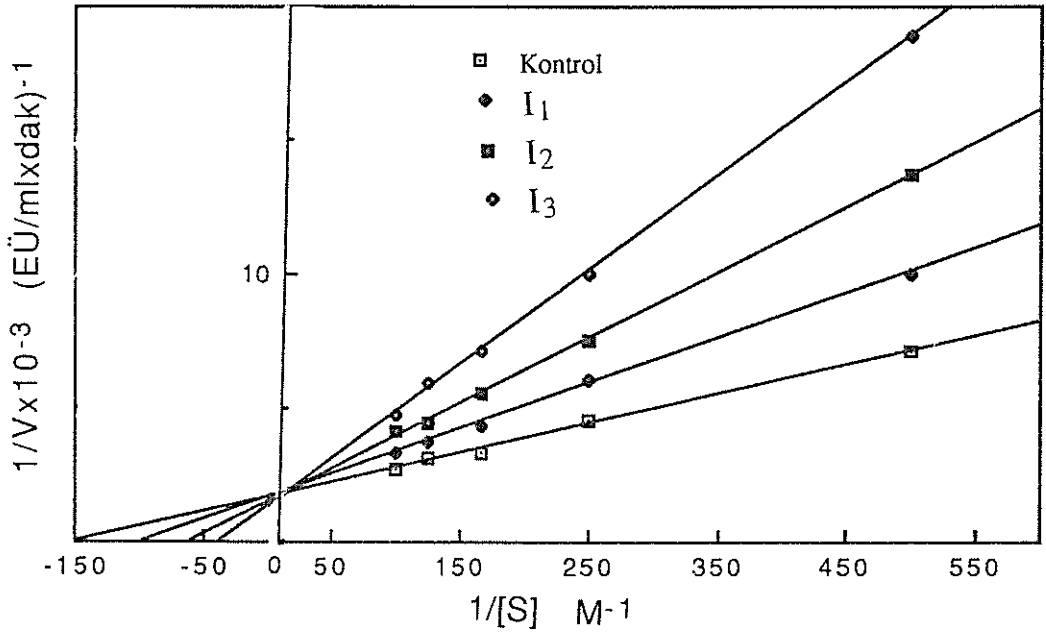
Şekil 3.44. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum dietilditiyo karbamatın inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_2] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_3] = 6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$$



Şekil 3.45 Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine ditiyoeritritolün inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_2] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_3] = 8.0 \times 10^{-5} \text{ M}$$

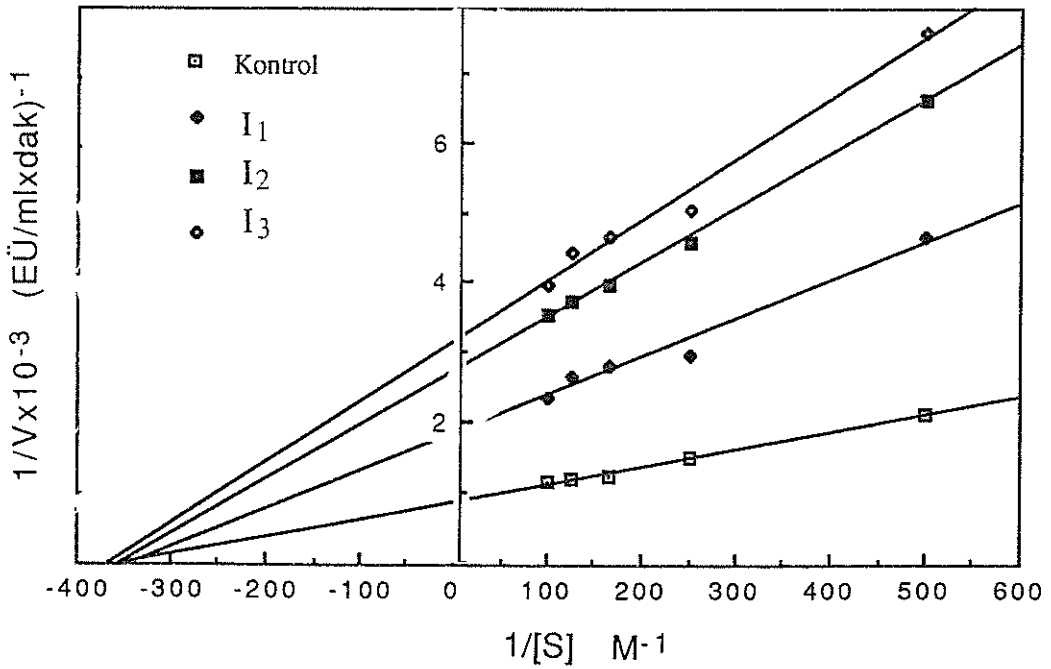


Şekil 3.46. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine tannik asitin inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 7.5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[I_2] = 1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$[I_3] = 3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$$

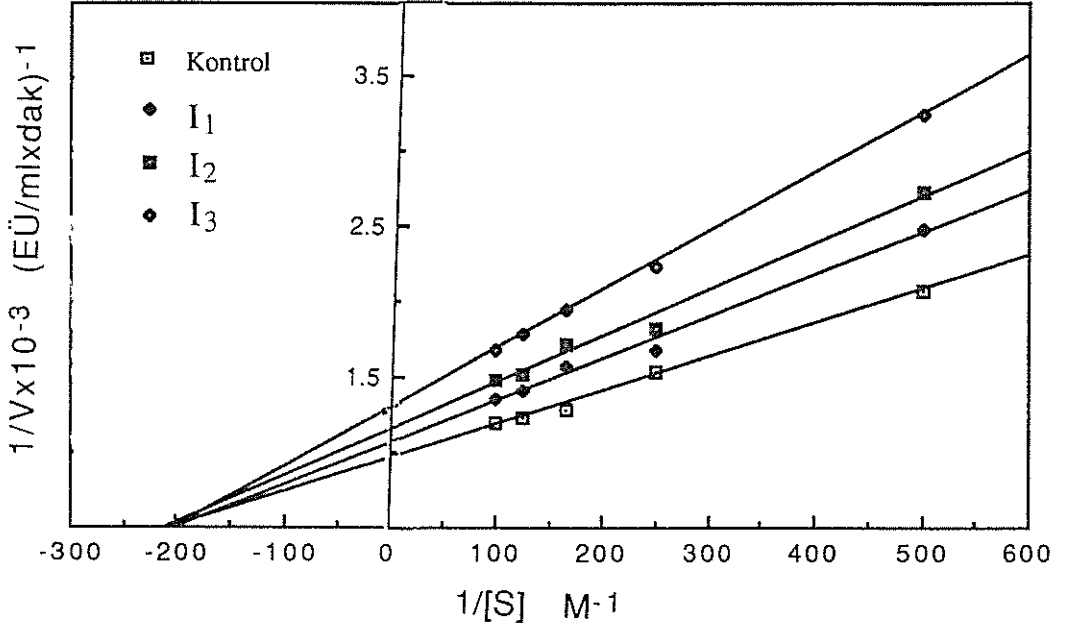


Şekil 3.47. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine benzoik asitin inhibisyon etkisi

$$[I_1] = 1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$$

$$[I_2] = 2.0 \times 10^{-1} \text{ M}$$

$$[I_3] = 3.0 \times 10^{-1} \text{ M}$$

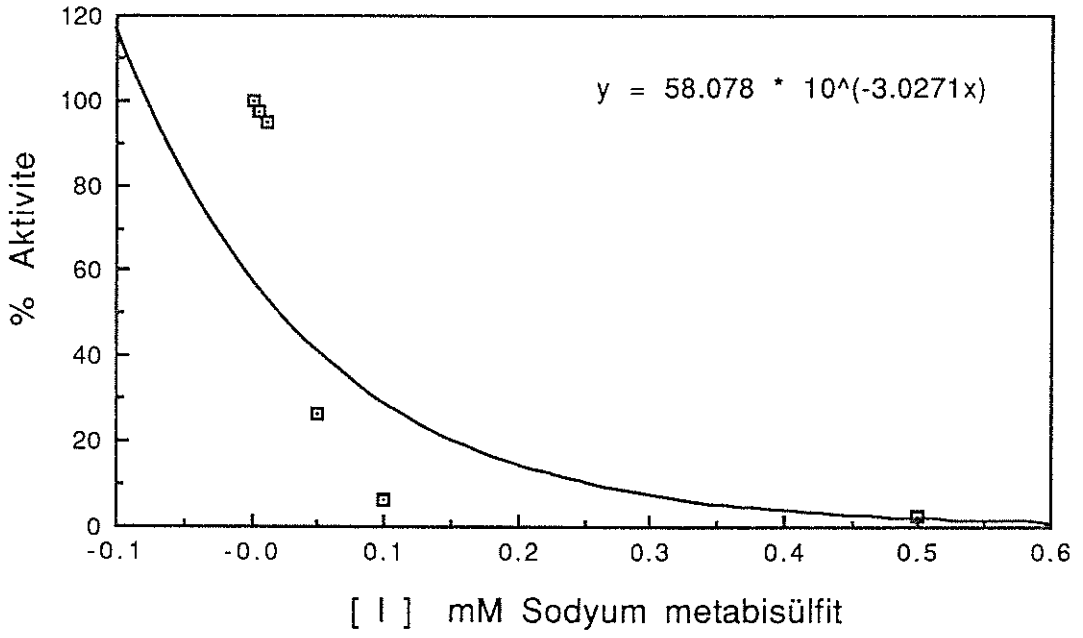


Şekil 3.48. Kuşburnu meyvası PPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkaptetanolanun inhibisyon etkisi

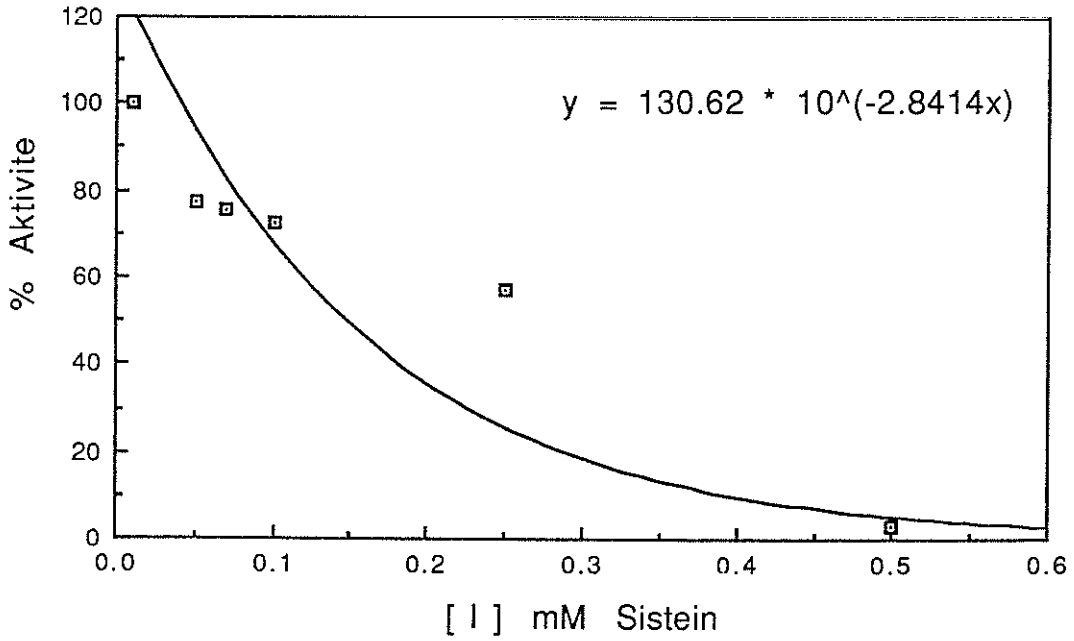
$$[I_1] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_2] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M} \quad [I_3] = 7.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

I_{50} değerlerinin tesbitinde, Bölüm 2.4.4.f'de açıklandığı gibi 10 mM sabit substrat (4-metil katekol) konsantrasyonunda tablo 3.7'de belirtilen inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Elde edilen aktivite değerlerinden yararlanarak % aktivite-[I] grafikleri çizilip (şekil 3.49-3.59) %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen I_{50} değerleri Tablo 3.8'de verildi. bu değerlerin hesaplanmasında $y=10^{-a \times b}$ denklemi kullanılmıştır.

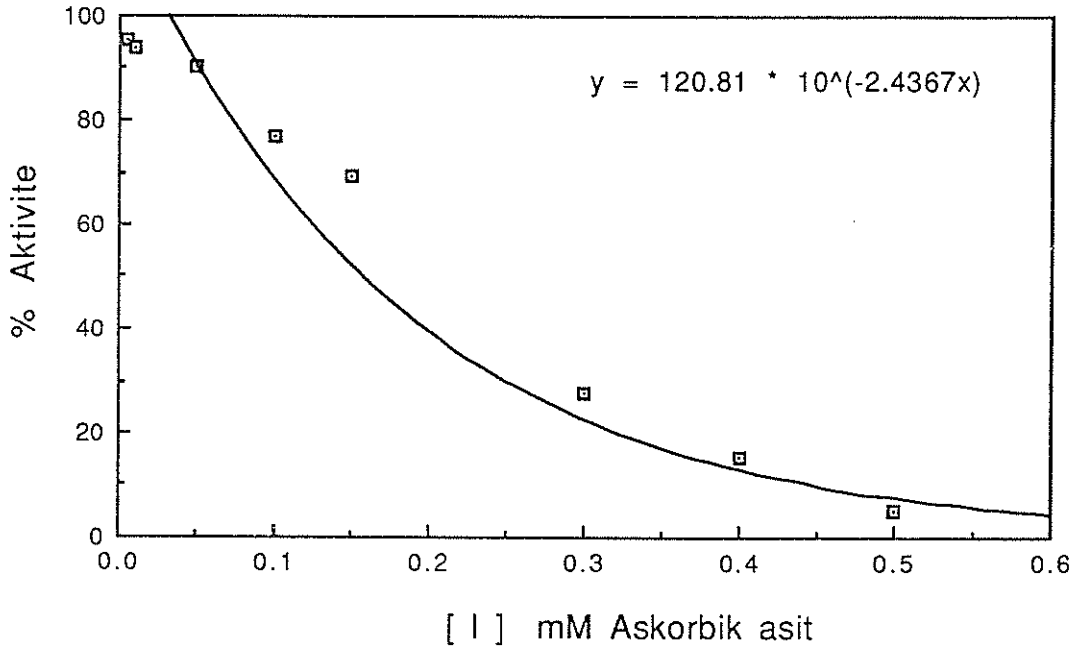
Ayrıca, Na EDTA, etilen glikol, tiyodiglikol ve sodyum klorurun inhibisyon etkileri, 10 mM 4-metil katekol substratıyla, daha önce açıklandığı gibi incelenmiş olup, tablo 3.9 da belirtilen konsantrasyonlarda aktiviteler belirlendi. İnhibisyon yüzdeleri tesbit edildi. Bu kimyasal maddelerin (Na EDTA, etilenglikol, tiyodiglikol ve sodyum klorür) inhibisyon yüzdeleri düşük olduğundan K_i değerleri tesbit edilememiştir. Ayrıca NaCl un aktivatör özelliği gösterdiği gözlenmiştir.



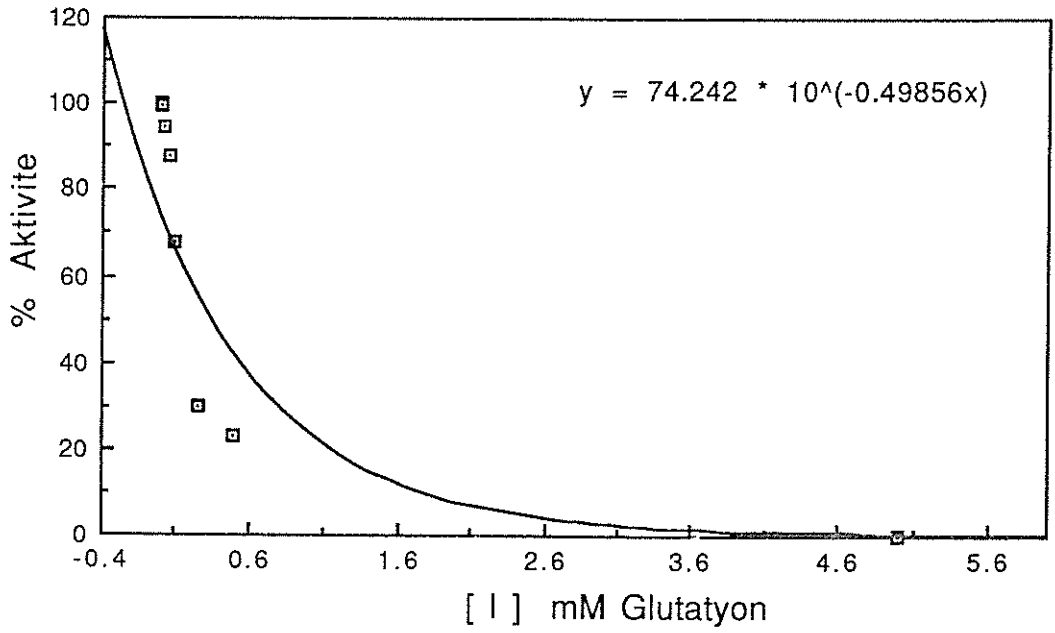
Şekil 3.49. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda sodyum metabisülfid için % aktivite - [I] grafiği



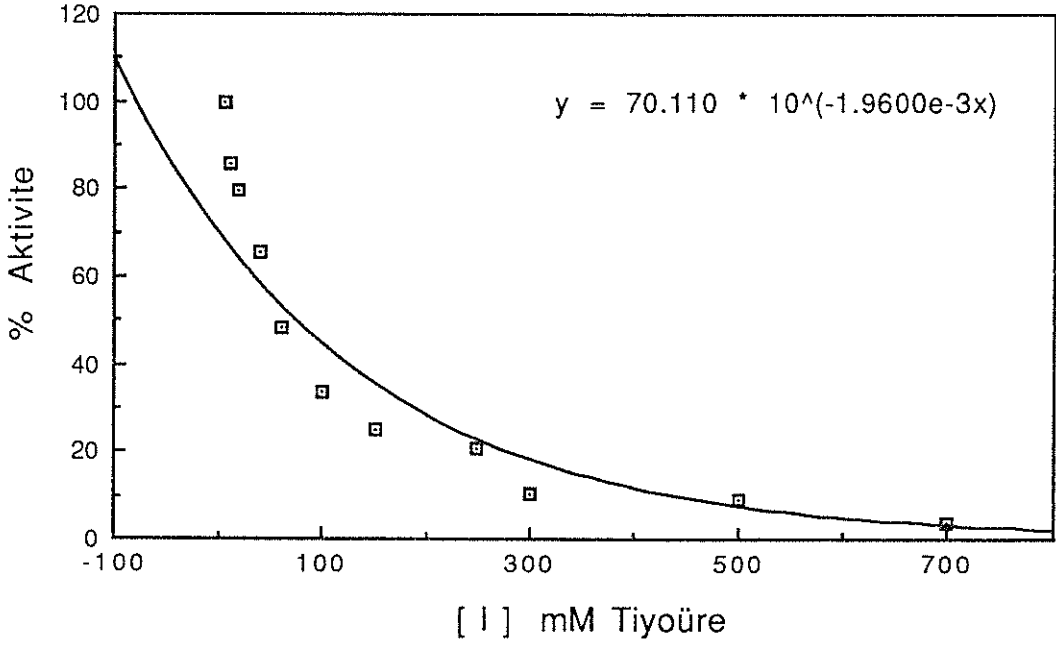
Şekil 3.50. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için % aktivite - [I] grafiği



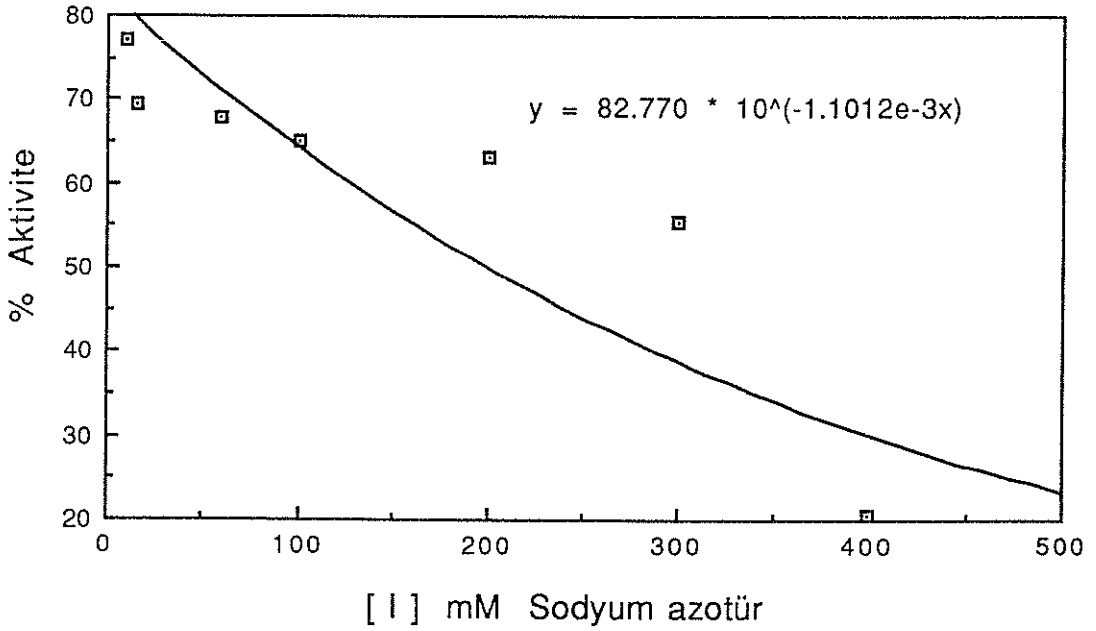
Şekil 3.51. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda askorbik asit için % aktivite - [I] grafiği



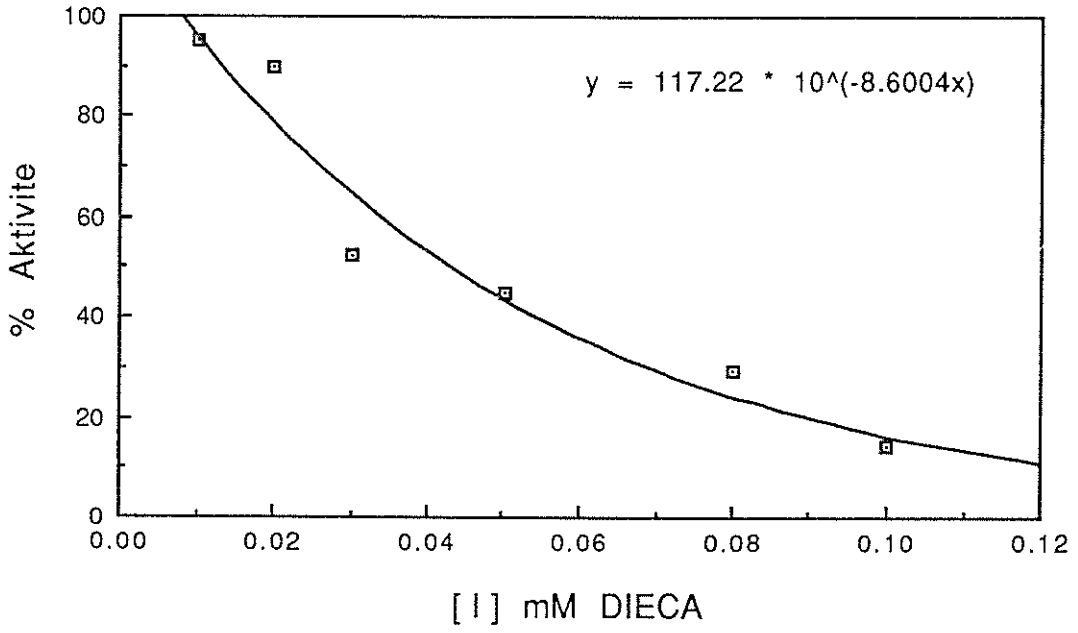
Şekil 3.52. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda glutasyon için % aktivite - [I] grafiği



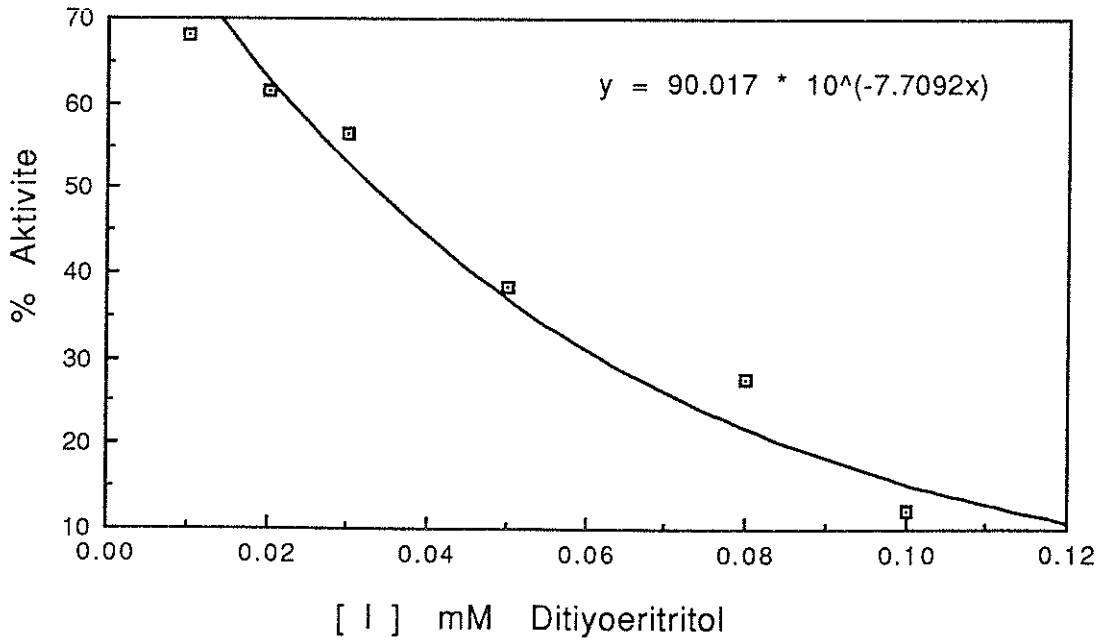
Şekil 3.53. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda tiyoüre için % aktivite - [I] grafiği



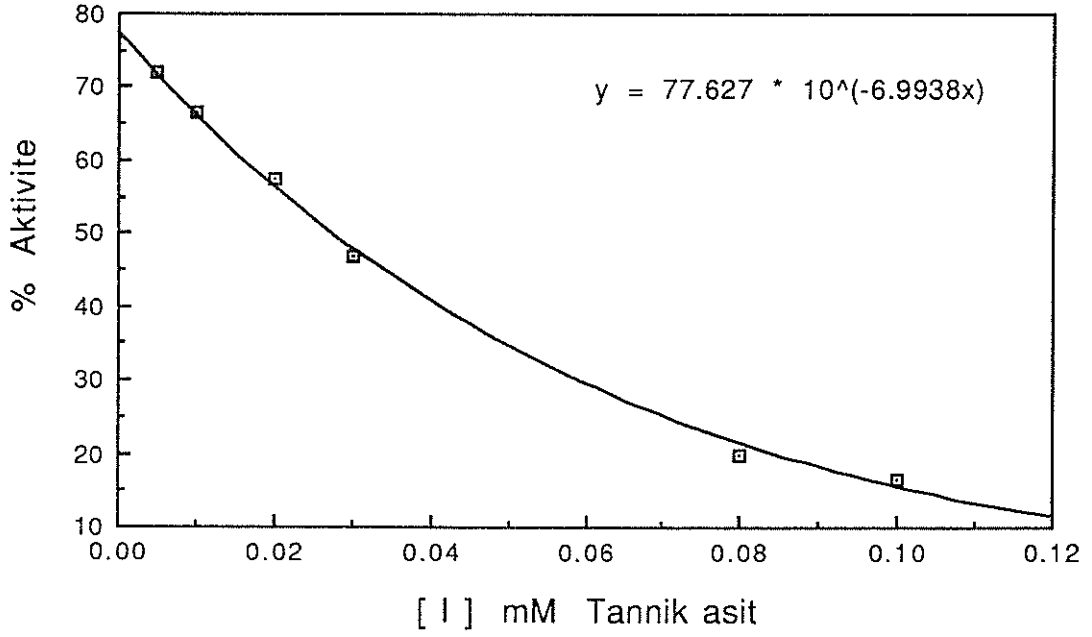
Şekil 3.54. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda sodyum azotür için % aktivite - [I] grafiği



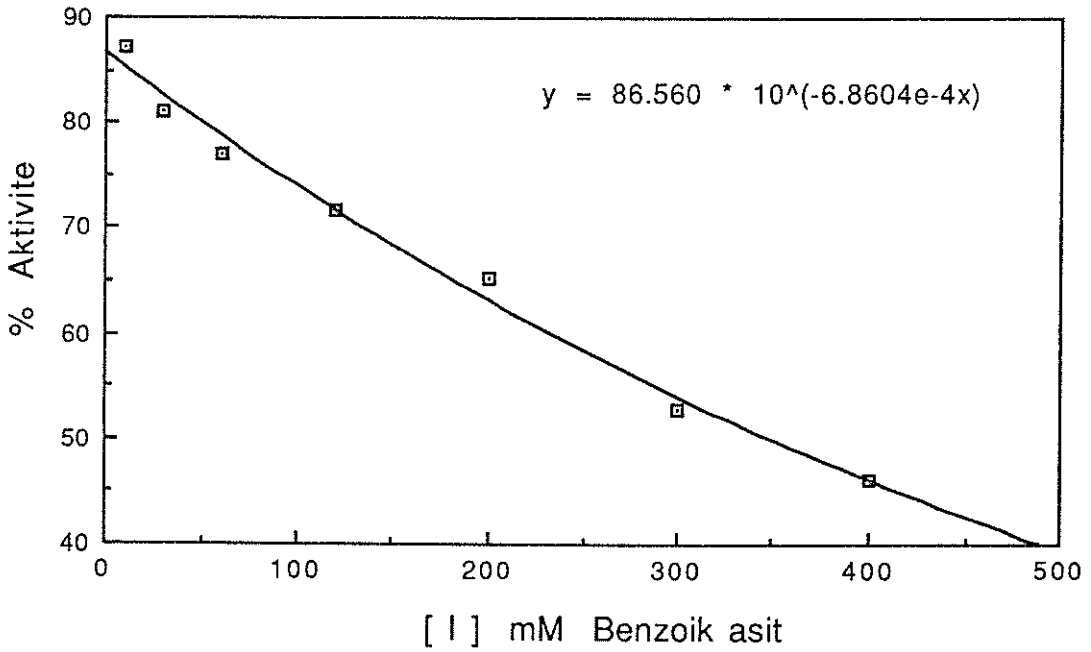
Şekil 3.55. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda sodyum dietilditiyokarbamat için % aktivite - [I] grafiği



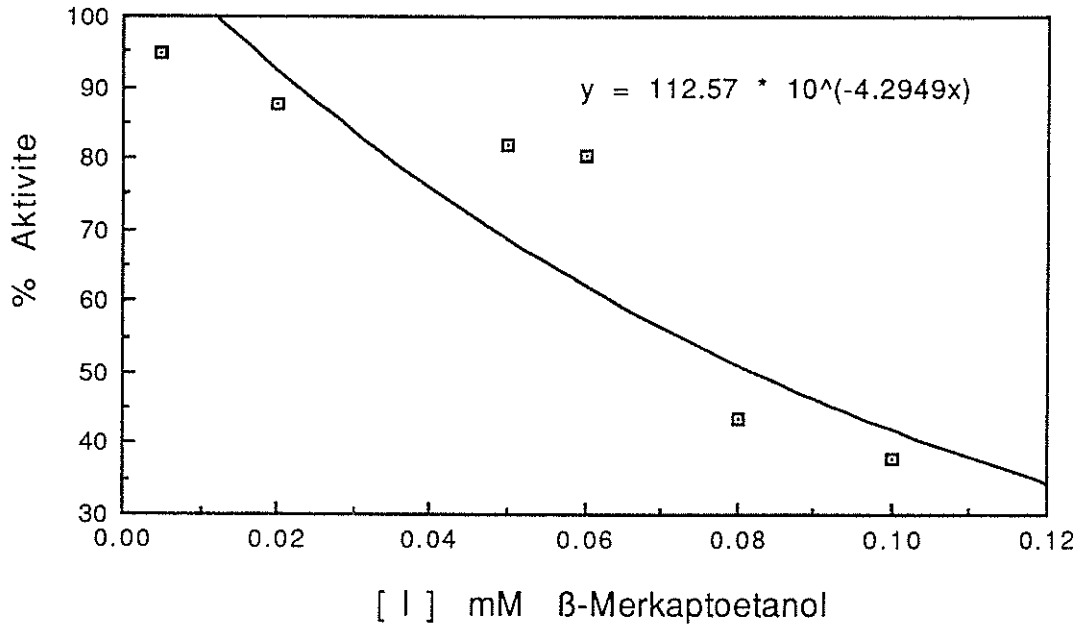
Şekil 3.56. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda ditiyoeritritol için % aktivite - [I] grafiği



Şekil 3.57. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda tannik asit için % aktivite - [I] grafiği



Şekil 3.58. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda benzoik asit için % aktivite - [I] grafiği



Şekil 3.59. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine 10 mM 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda β-merkaptetanol için % aktivite - [I] grafiği

Tablo 3.6. Kuşburnu meyvasından saflaştırılan PPO enziminin Lincweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri

Inhibitör Cinsi	[I] (M)	K_i (M)	Ortalama K_i değerleri (M)	Inhibisyon türü
Sodyum meta-bisülfid	1.5×10^{-5} 3.0×10^{-5} 4.5×10^{-5}	6.01×10^{-9} 6.12×10^{-9} 3.44×10^{-9}	5.19×10^{-9}	Kompetetiv
L-sistein	7.0×10^{-5} 1.0×10^{-4} 2.5×10^{-4}	5.28×10^{-8} 4.76×10^{-8} 7.35×10^{-8}	5.79×10^{-8}	Kompetetiv
Askorbik asit	2.0×10^{-4} 2.5×10^{-4} 3.0×10^{-4}	9.89×10^{-8} 9.67×10^{-8} 9.95×10^{-8}	9.83×10^{-8}	Kompetetiv
Glutasyon	8.0×10^{-5} 1.5×10^{-4} 3.0×10^{-4}	3.64×10^{-8} 3.59×10^{-8} 3.80×10^{-8}	3.67×10^{-8}	Kompetetiv
Tiyoüre	5.0×10^{-2} 1.0×10^{-1} 1.5×10^{-1}	2.80×10^{-5} 3.84×10^{-5} 3.92×10^{-5}	3.52×10^{-5}	Kompetetiv
Sodyum azotür	6.0×10^{-2} 1.0×10^{-1} 2.0×10^{-1}	3.98×10^{-5} 5.01×10^{-5} 8.33×10^{-5}	5.77×10^{-5}	Kompetetiv
Sodyum dietil ditiyokarbamat	2.0×10^{-5} 4.0×10^{-5} 6.0×10^{-5}	4.35×10^{-5} 4.15×10^{-5} 4.56×10^{-5}	4.35×10^{-5}	Unkompetetiv
Ditiyoeritritol	2.0×10^{-5} 4.0×10^{-5} 8.0×10^{-5}	1.29×10^{-8} 1.88×10^{-8} 1.44×10^{-8}	1.53×10^{-8}	Kompetetiv
Tannik asit	7.5×10^{-6} 1.5×10^{-5} 3.0×10^{-5}	4.89×10^{-9} 6.62×10^{-9} 10.33×10^{-9}	7.28×10^{-9}	Kompetetiv
Benzoik asit	1.0×10^{-1} 2.0×10^{-1} 3.0×10^{-1}	9.26×10^{-2} 1.17×10^{-1} 1.56×10^{-1}	1.21×10^{-1}	Nonkompetetiv
β -Merkapto-etanol	2.5×10^{-5} 5.0×10^{-5} 7.5×10^{-5}	2.67×10^{-4} 2.47×10^{-4} 2.01×10^{-4}	2.38×10^{-4}	Nonkompetetiv

Tablo 3.7. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren inhibitörlerin 10 mM 4-meil katekol substratı ile farklı inhibitör konsantrasyonlarında % aktivite değerleri

Inhibitör cinsi	I ₁ (M)	% Aktivite	I ₂ (M)	% Aktivite	I ₃ (M)	% Aktivite	I ₄ (M)	% Aktivite	I ₅ (M)	% Aktivite	I ₆ (M)	% Aktivite
Sodyum metabi- süfit	1.0x10 ⁻⁶	100	1.0x10 ⁻⁵	94.8	1.0x10 ⁻⁵	74.2	3.0x10 ⁻⁵	56.6	5.0x10 ⁻⁵	26.7	1.0x10 ⁻⁴	6.0
L-Sistein	1.0x10 ⁻⁵	100	5.0x10 ⁻⁵	77.2	7.0x10 ⁻⁵	75.7	1.0x10 ⁻⁴	72.4	2.5x10 ⁻⁴	56.7	5.0x10 ⁻⁴	3.4
Askorbik asit	5.0x10 ⁻⁶	95.3	5.0x10 ⁻⁵	90.4	2.0x10 ⁻⁴	67.9	2.5x10 ⁻⁴	59.5	3.0x10 ⁻⁴	49.1	5.0x10 ⁻⁴	5.0
Gulutatyon	5.0x10 ⁻⁶	100	2.5x10 ⁻⁵	94.4	5.0x10 ⁻⁵	87.8	1.0x10 ⁻⁴	68.0	2.5x10 ⁻⁴	30.1	5.0x10 ⁻⁴	23.0
Tiyolüre	5.0x10 ⁻³	100	1.0x10 ⁻²	85.4	4.0x10 ⁻²	65.5	6.0x10 ⁻²	48.3	1.0x10 ⁻¹	33.6	2.5x10 ⁻¹	20.5
Sodyum azotür	1.0x10 ⁻²	77.0	6.0x10 ⁻²	68.0	1.0x10 ⁻¹	65.0	2.0x10 ⁻¹	63.0	3.0x10 ⁻¹	55.4	4.0x10 ⁻¹	20.6
DIECA	1.0x10 ⁻⁵	95.4	2.0x10 ⁻⁵	89.9	3.0x10 ⁻⁵	52.2	5.0x10 ⁻⁵	44.8	8.0x10 ⁻⁵	29.2	1.0x10 ⁻⁴	14.2
Ditiyoeritritol	1.0x10 ⁻⁵	68.2	2.0x10 ⁻⁵	61.5	3.0x10 ⁻⁵	56.3	5.0x10 ⁻⁵	38.5	8.0x10 ⁻⁵	27.7	1.0x10 ⁻⁴	12.3
Tannik asit	5.0x10 ⁻⁶	72.0	1.0x10 ⁻⁵	66.6	2.0x10 ⁻⁵	57.5	3.0x10 ⁻⁵	46.8	8.0x10 ⁻⁵	20.0	1.0x10 ⁻⁴	16.4
Benzolik asit	1.0x10 ⁻²	87.1	3.0x10 ⁻²	81.1	6.0x10 ⁻²	77.1	1.2x10 ⁻¹	65.3	3.0x10 ⁻¹	52.8	4.0x10 ⁻¹	46.1
β-merkaptolanol	1.0x10 ⁻⁶	94.7	2.0x10 ⁻⁵	87.6	6.0x10 ⁻⁵	82.1	6.0x10 ⁻⁵	80.4	8.0x10 ⁻⁵	43.4	1.0x10 ⁻⁴	38.0

Tablo 3.8. Kuşburnu meyvası PPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

Inhibitör Cinsi	I ₅₀ (M)	Inhibitör Cinsi	I ₅₀ (M)
Sodyum metabisulfit	2.10×10^{-5}	Sodyum dietil-ditiyokarbamat	4.30×10^{-5}
L-sistein	1.48×10^{-4}	Ditiyoeritritol	3.31×10^{-5}
Askorbik asit	1.57×10^{-4}	Tannik asit	2.73×10^{-5}
Glutatyan	3.44×10^{-4}	Benzoik asit	3.47×10^{-1}
Tiyoüre	7.49×10^{-2}	β-Merkaptoetanol	8.20×10^{-5}
Sodyum azotür	1.98×10^{-1}		

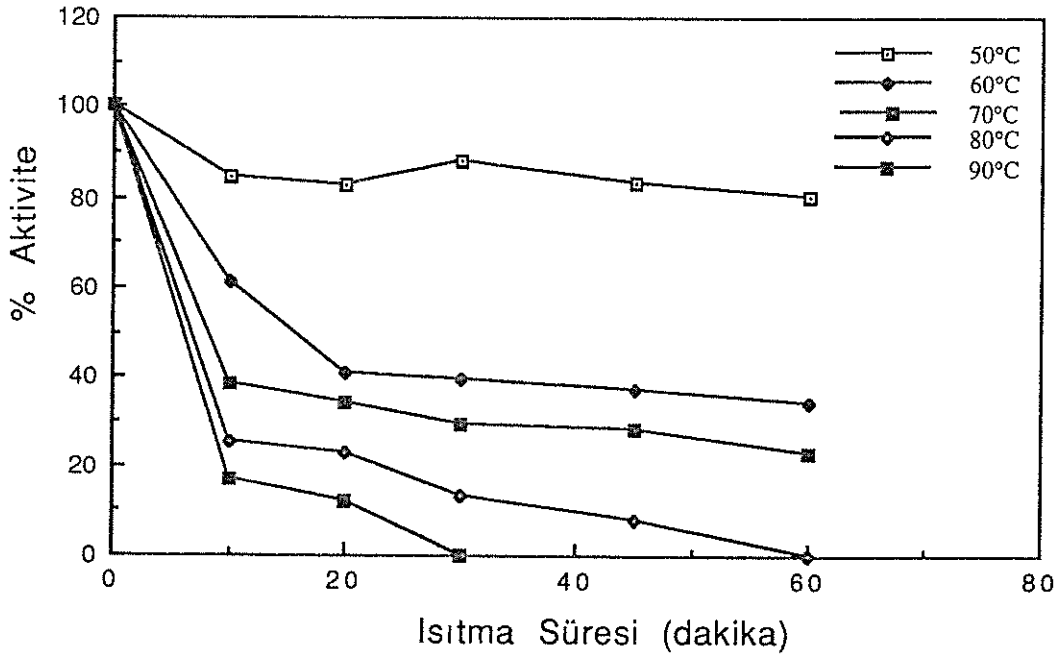
Tablo 3.9. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi

Inhibitör	Konsantrasyon (M)	Inhibisyon (%)
Sodyum klorür	0.8	-88.5
	0.4	-46.3
	0.1	-5.9
	0.05	20.9
	0.005	6.6
Na EDTA	0.4	23.5
	0.3	28.1
	0.2	31.7
	0.1	23.5
	0.02	18.9
	0.005	27.1
	0.0025	26.5
Etilenglikol	1.2	27.2
	0.8	13.3
	0.4	8.0
	0.1	4.0
Tiyodiglikol	0.5	33.4
	0.04	19.6
	0.02	16.1
	0.01	15.5
	0.005	5.0

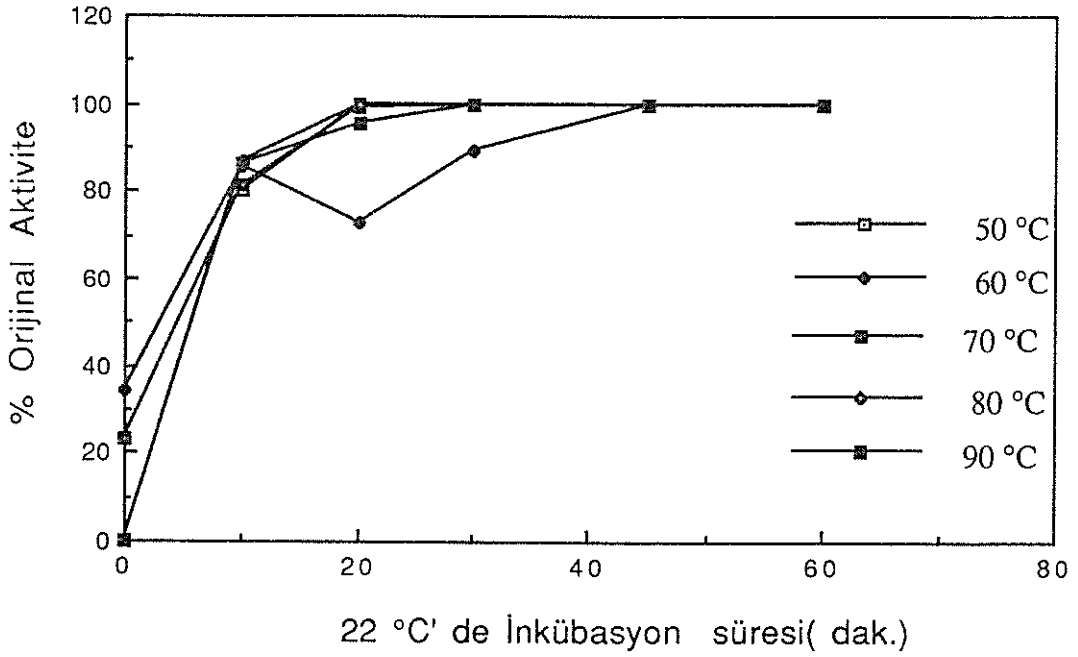
3.13. Sıcaklıkla Denetürasyon ve Renetürasyon Çalışmalarının Sonuçları

PPO enziminin sıcaklıkla denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla, 50-90°C aralığında belirli sürelerde çalışıldı. Bunun için çalışılan sıcaklığa enzim, substrat ve tampon çözeltilerinin sıcaklığı, sabit sıcaklık sirkülatörü ile ayarlandı. Her bir sıcaklık için (50,60,70,80 ve 90 °C), 10., 20., 30., 45. ve 60. dakikalarda 4-metil katekol substratıyla bölüm 2.4.2 de anlatıldığı gibi , 0.1 ml enzim çözeltisi, 2.9 ml tampon+substrat çözeltileri ilave edildi. Tampon olarak 0.2 M tris tamponu (pH=8.5) kullanıldı. 420 nm de aktiviteler okundu. % aktiviteler-ısıtma süresine karşı grafik edildi (şekil 3.60).

Renetürasyon işlemlerinde, ısıtılmış enzim çözeltisi çalışılan sıcaklıktan 22 °C ye kadar soğutulduktan sonra 10., 20., 30., 45. ve 60. dakikalarda aktiviteler yukarıda anlatıldığı gibi tayin edildi. Bulunan bu aktivitelerden yararlanarak % aktiviteler hesaplandı. 22 °C de ki inkübasyon süresine karşılık-% orijinal aktiviteler grafik halinde gösterildi (şekil 3.61). Buna göre kuşburnu meyvası PPO enziminin yüksek sıcaklıklarda denatüre olduğu, ancak sıcaklığın düşürülmesi ile yeniden aktivite kazandığı görülmüştür.



Şekil 3.60. Kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

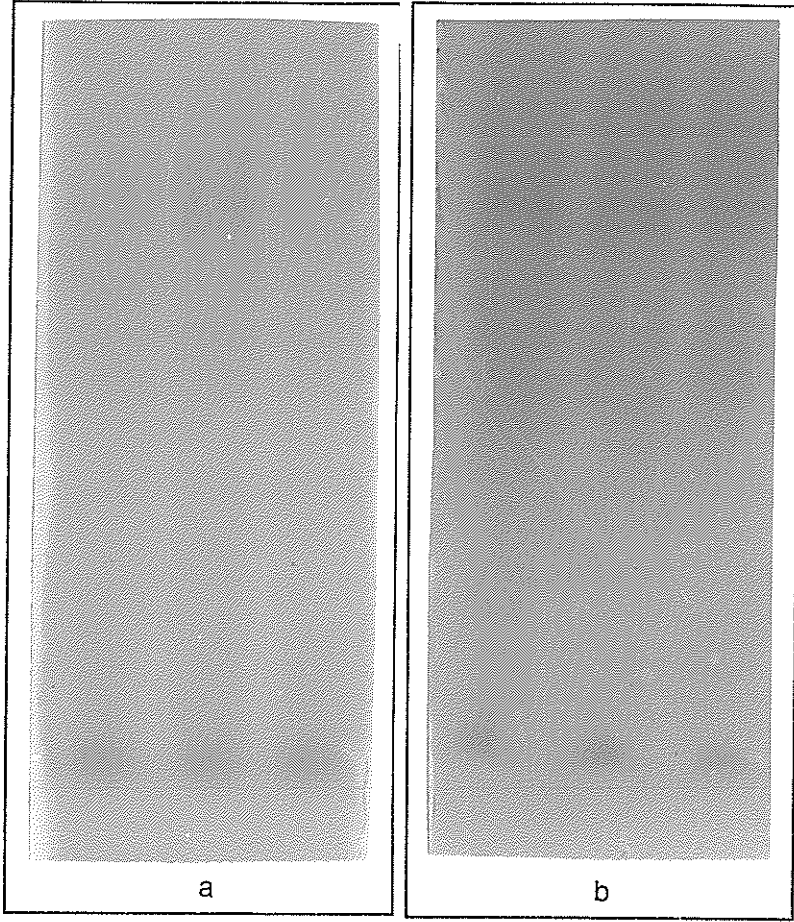


Şekil 3.61. Kuşburnu meyvası PPO enziminin denatürasyondan sonra, sıcaklığın düşürülmesi ile renatürasyonu

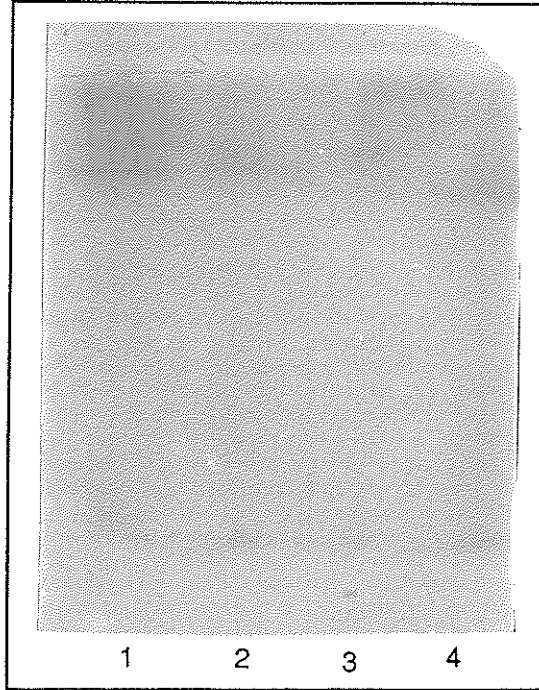
3.14. Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroföze Çalışması Sonuçları

Polifenol oksidaz izoenzimlerinin ayrılmasına yönelik çalışmalar bölüm 2.4.7 de anlatıldığı gibi yapılarak, Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası tatbik edilen elektroföze sonuçları şekil 3.62 de verildi.

Ayrıca bölüm 2.4.7'de anlatıldığı üzere, numune tatbik edilecek duruma getirilen elektroföze bu sefer, ham ekstrakt, amonyum sülfat çöktürme sonucu ve jel filtrasyon sonucu elde edilen fraksiyonlar (JF₁ ve JF₂) yeniden amonyum sülfatla %80 doygunluğa getirildikten sonra iki grup halinde (AS₁, AS₂ JF₁ ve JF₂) tatbik edildi. Yürütme işleminden sonra, çıkarılan jel iki parçaya ayrıldı biri 15 mM 4-metil katekol, %0.05 ortofenilen diamin ihtiva eden 0.2 M tris tamponuna (pH=8.5), ikincisi 1.5 mM L-dopa ihtiva eden 0.2M tris tamponuna (pH=8) daldırıldı. Daldırma işleminden 1-1,5 saat sonra bantlar belirginleşti. Daha sonra jeller 1.0 mM askorbik asitle 5 dakika kadar çalkalandı. L-DOPA içerisine daldırılan jel saf su, 4-metil katekol çözeltisine daldırılan jel %30 luk etil alkol içine alındı. 4-metil katekol substratı ile etkileştirilen jelin fotoğrafı çekildi (şekil 3.63).



Şekil 3.62. Kuşburnu PPO izoenzimlerinin tabii PAGE i fotoğrafı (Amonyum sülfat çöktürmesi sonraki numune) a)4-metil katekol substratı ile b) Dopamin substratı ile



Şekil 3.63. Kuşburnu PPO enzimlerinin 4-metil katekol substratıyla tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı. a) 1. ve 2. kanal amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, b) 3. kanal jel filtrasyon kromatografisi sonrası 1. fraksiyon, c) 4. kanal jel filtrasyon kromatografisi sonrası 2. fraksiyon.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, özellikle gıda işletmeciliğinde önemli bir faktör olan PPO enzimi, Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen kuşburnu meyvasından izole edilerek çeşitli kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla enzim kaynağı olarak, Erzurum Atatürk Üniversitesi kampüsünde yetişkin haldeki bitkilerden toplanan kuşburnu meyvaları (*Rosa dumalis*) kullanılmıştır. Elde edilen değerleri tartışmadan önce araştırmada kullanılan yöntemlerin seçiliş sebeplerini açıklayalım.

Araştırmamız sırasında kromatografi işlemlerinde elde edilen elüatlardaki muhtevaları 280 nm'de absorbanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır¹⁵¹. Kantitatif protein tayinleri, Coomassie-blue yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem; fosforik asitli ortamda proteinlerin coomassie brilliant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorban gösterir. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerinde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır¹⁵². Buna mukabil biüret yöntemi daha az hassas olup, Lowry yönteminde ise her tayin öncesinde standart çalışılmak gerekmekte ve çok uzun zaman almaktadır^{157,158}.

PPO aktivitesi, substratın kaybolma ya da ürünün oluşma hızını ölçmekle belirlenebilir. Substratın kaybolma hızının belirlenmesinde oksijenin absorpsiyonu ya Warburg respirometresiyle manometrik ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülür. Ürünün oluşma hızı, kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluklarının spektrofotometrik metodla ölçülmesiyle tayin edilmektedir. Bu metodun çok basit olmasından dolayı rutin analizlerde ve polarografik metoda göre nisbeten daha uzun aralıklarında kullanıldığından tercih edilir. Ayrıca bu metodun diğer metodlar kadar hassas ve güvenilir olduğu bildirilmektedir³⁵. Bu yüzden bu çalışmada spektrofotometrik metod ve 420 nm dalga boyu kullanıldı^{34,35,155}.

Meyvalardan PPO izolasyonu için Tampon ekstraksiyon metodu kullanıldı. Uygun tamponla ekstraksiyon işlemi aseton çöktürmesinden daha çok kullanılır. Uygun pH değerli tamponlar, enzim kaynağından ekstraksiyonu sağlarlar. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin formunu etkileyebilir.

Ekseriya enzimatik polifenol oksidasyonundan ekstraksiyon sistemini korumak için ortama indirgen reaktifler yada kinonlar gibi enzimin dönüşümlü inhibitörleri katılmaktadır. Bu amaçla ekstraksiyon tamponu olarak kullanılan fosfat tamponuna (pH=7.3) 10 mM askorbik asit katıldı.

Enzim ekstraksiyonu boyunca fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonunun önlenmesinin en etkili yolu, çözünmeyen bir polimer materyaline substratları bağlayarak ortamdaki uzaklaştırmaktır. Fenol bağlamada en yaygın kullanılan polivinil polipirrolidon (PVPP) 'dir. PVPP fenollerin iyonlaşmadığı nötral yada asidik pH da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVPP kısmi olarak PPO'nun kompetetiv bir inhibitörüdür. Ancak onun inhibitör etkisi enzim çözeltilerini yıkamakla elimine edilebilir. Polietilen glikol (PEG) bu iş için bazen daha fazla tercih edilir. Belki de bunun sebebi, PEG'nin asetondaki çözünürlüğünün, enzim çözeltisi elde edilmesinde belirli avantajlar sağlamasından dolayıdır. Bizde çalışmamızda PEG'yi kullandık.

PPO enzimini saflaştırmak amacıyla, %80 doyumlukta amonyumsulfat çöktürmesi, sephadeks G-100 üzerinde Jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanıldı.

Tablo 3.2, kuşburnu meyvasından PPO saflaştırılmasında kullanılan basamakları göstermektedir. Tablo incelendiğinde ham ekstraktın aktivitesinin ölçülemediği verim ve saflaştırma derecelerinin ham ekstrakte göre kıyaslanmadığı görülmektedir. Bununda sebebi ham ekstrakte ilave edilen inhibitör etkiye sahip bol miktardaki askorbik asitten kaynaklanmaktadır. Tablo 3.2'de verilen aktiviteler herbir fraksiyondan sonra ölçülen değerlerdir. DEAE-selüloz iyon değişim kolonu üzerinde kromatografi yapıldığında saflığı 1,5-2 kat arttırılmıştır. Ayrıca iyon değişim kromatografisinde aktiviteler çok düşük çıkmaktadır. Bunun sebebi, bakır iyonlarının DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi kolonu tarafından tutulduğu bildirilmektedir^{45,46}. Bu yüzden aktivitelerin çok düşük olduğu görülmüştür.

Ayrıca Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 incelendiğinde jel filtrasyon kromatografisinde iki pikin görülmesi ve yine iyon değişim kromatografisinde de iki pikin varlığı kuşburnu meyvası PPO'nun iki izoenzimi olduğunu göstermektedir. Jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen numunelerin aktivitelerinin çok düşük çıkmasından dolayı kinetik özelliklerinin incelenmesi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işleminden sonra elde edilen enzim

çözeltileriyle yapılmıştır. Bu yüzden total çalışılmış olup diğer saflaştırma basamakları sonucu elde edilen numuneler üzerinde kinetik çalışmalar yapılamamıştır.

Bu saflaştırma derecesi, ham ekstrakte göre yapılabilseydi çıkacak olan bu değer kiraz ve yer elmasıyla elde edilen değerlerle eşdeğer ve Yali armutundan elde edilen değerlerle de uygunluk arz etmektedir¹⁵⁶.

Kuşburnu PPO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalarından önce uygun bir substrat ve bu substrat için optimum şartların belirlenmesi gerekiyordu. Bu amaçla optimum pH, optimum sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisi incelendi.

Optimum pH çalışması, optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla, katekol, 4-metil katekol, L-DOPA, dopamin, gallik asit, pirogallol L-tirozin ve p-kresol substratları kullanılarak yapıldı. Bu substratlarla enzimin substrata doyduğu noktalarda pH=4-10 aralığında uygun tampon çözeltiler içinde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bulunan optimum pH'lar yukarıdaki substratlara göre sırasıyla 8.5, 8.5, 8.0, 8.5, 8.8, 7.0, 7.0 ve 5.0 olarak bulundu. PPO aktivitesinin optimum pH'sı Vigyazo tarafından hazırlanan bir derlemede enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle pH 4.0-7.0 arasında değiştiği bildirilmektedir^{35,70}.

Birçok kaynaklardan elde edilen PPO'nun pH 4.0'ün altında inaktif olduğu belirtilmiştir⁷¹. Bizim çalışmamızda pH 6.0 nın altında katekol ve tirozin substratları için inaktif olduğu bulunmuştur. Bir başka çalışmada pH 5.5 un üstünde O₂ nin arttırılması ile katekol substratının otooksidasyonu arttırdığını belirtilmektedir¹⁵⁹. Bu çalışmada difenoller için bulunan optimum pH değerinin pH 8 in üzerinde olması birçok literatür verileriyle tezat teşkil etmekte ise de eriklerin PPO nin maksimum aktivitesinin pH 8.0 olduğu bildirilmektedir¹³. Ayrıca difenollerin optimum pH'ların yüksek olması bu substratların yüksek pH larda otooksidasyona uğradıkları sanılmaktadır. Özellikle katekol substratında bu durum açıkça görülmektedir. Şekil 3.5 incelendiğinde optimum pH 8.5'in üstündeki pH değerlerinde aktivitede hızlı bir düşüş görülmemektedir. Belkide bu durum şimdiye kadar kuşburnu meyvasında bu çalışmanın yapılmamasının bir sebebi olabilir.

Optimum sıcaklık belirlenmesinde de yine aynı substratlarla optimum pH'larında 5°C-85°C sıcaklık aralığında aktiviteler belirlendi. Optimum sıcaklıklar; katekol, 4-metil katekol, L-dopa, dopamin, gallik asit, pirogallol, L-tirozin ve p-kresol için sırasıyla 25; 20, 45, 35, 15, 65 ve 60°C olarak tesbit edildi. PPO için optimum

sıcaklık üzerindeki araştırmalar optimum pH'ya göre oldukça azdır. Yapılan araştırmalar, enzimin sıcaklığının, optimum pH gibi aynı şartlara bağlı olduğunu göstermiştir. Stanley eriklerinden elde edilen PPO enziminin maksimum aktivitesi için 4-metil katekol substratı ile optimum sıcaklık 20°C,¹³ patatesde katekol substratı ile PPO 22°C'de maksimum aktiviteye sahipken⁷⁹ pirogallol substratı ile 15-35 °C arasında aktivitede lineer bir artış kaydedildiği bildirilmiştir⁷⁵. Bu değerler, bizim çalışmamızdaki aynı substratlarla yapılan optimum sıcaklık değerleriyle uyum içerisindedir. PPO enzimi için, şeftalide 37°C, Kaysıda 25°C ve muzda ise 37°C de maksimum aktiviteye eriştiği bildirilmiştir^{75,77}. Kuşburnu meyvasından izole edilen PPO'nun düşük sıcaklıklarda monohidroksi fenollere göre dihidroksi fenoller üzerinde daha etkili oldukları anlaşılmaktadır. Monohidroksi fenoller üzerinde ise yüksek sıcaklıklarda etkilidir. Literatürde monohidroksi fenoller için enzimin düşük sıcaklıklarda fazla etkili olmadığı belirtilmiştir.

Katekol, 4-metil katekol ve dopamin substratlarıyla, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 ve 0.50 M seri tris-HCl tamponlarıyla kendi optimum pH'larında yapılan aktivite ölçümlerinden sonra Tablo 3.4 incelendiğinde her üç substratın da 0.2 M Tris-HCl tamponunda en yüksek aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bu yüzden aktivite ölçümlerinde bu konsantrasyon kullanıldı.

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla, Enzim farklı pH'lı tamponlarda 4°C de muhafaza edildi. Aktivite ölçümleri 4-metil katekol substratı ile inkübasyonun belli zaman periyotlarında ölçüldü. Sonuçlar şekil 3.21 gösterildi. Grafik incelendiğinde zamana bağlı olarak aktivitede en az azalma pH'sı 6.2 olan fosfat tamponunda olduğu görüldü. Bu yüzden PPO enzimi ekstraksiyonu bu tamponla yapıldı.

Optimum sıcaklık çalışmasından elde ettiğimiz sıcaklık-aktivite değerleri kullanılarak her bir substrat için Arrhenius denkleminde yararlanılarak $\log k-1/T$ grafikleri çizildi.

Grafiklerin eğiminden ($-E_A/2.303 \cdot R$) yararlanılarak aktivasyon enerjileri hesaplandı. Tablo 3.5 incelendiğinde 4-metil katekol, pirogallol ve p-kresol substratları için çizilen grafiklerin eğiminin pozitif, katekol, L-dopa, dopamin gallik asit ve L-tirozin substratları için çizilen grafiklerin eğiminin ise negatif olduğu görüldü. Negatif eğim, pozitif aktivasyon enerjisini verirken, pozitif eğim ilgili substratın negatif aktivasyon enerjisine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum enzimin sıcaklıkla inaktive olduğu şeklinde izah edilebilir. Kimyasal reaksiyonların

çoğunun hızı sıcaklıkla artar. Enzim katalizli reaksiyonlarda buna uyarlar. Fakat enzimler kompleks protein moleküleridir. Katalitik etkinlikleri substrat bağlama ve katalitik merkezlere sahip, son derece düzenli bir yapıya sahip olmalarından kaynaklanır. Bu tersiyer yapı, çok sayıda zayıf kovalent olmayan bağlarla oluşur. Yani enzim çok hassas bir yapı gösterir. Eğer molekül büyük bir enerji absorblarsa tersiyer yapı bozulur ve enzim denatüre olur.

Substrat spesifikliğı; optimum pH ve sıcaklıkları belirlenen substratlar için en az beş ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V-1/[S]$ değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri bulundu.

Katekol, 4-metil katekol, L-dopa, dopamin, gallik asit, pirogallol, tirozin ve p-kresol substratları için bulunan K_M değerleri sırasıyla 7.41×10^{-3} M, 8.64×10^{-3} M, 6.06×10^{-4} M, 2.82×10^{-3} M, 2.64×10^{-3} M, 2.79×10^{-3} M, 8.27×10^{-4} M, ve 8.63×10^{-5} M olarak bulundu. Bu değerlere göre kuşburnu meyvası PPO enziminin çalışılan 8 substrattan, dihidroksi fenollerden L-dopaya, monohidroksifenollerden p-kresole ilgisinin diğerlerine göre daha büyük olduğu görülmektedir. Aynı substratlar için V_{max} değerleri ise sırasıyla, 41.66, 431.96, 45.45; 42.48, 111.11, 111.73, 142.85 ve 40.00 EÜ/ml x dak. olarak belirlendi. Bu değerlerden enzimin üzerinde en etkili olduğu substratın 4-metil katekol olduğu anlaşılmıştır. Farklı kaynaklı PPO enzimleri için katekol substratı ile 3.0×10^{-3} M dan 0.12 M'a kadar değişen K_M değerleri bildirilirken, 4-metil katekol için kayısıdan elde edilen enzimde K_M değerinin 1.4×10^{-3} M olduğu bildirilmiştir. L-dopa substratının ise patates ve şeker pancarından elde edilen enzim için sırasıyla 1.1×10^{-2} ve 2.0×10^{-3} M K_M değerlerine sahip olduğu bildirilmektedir³⁵. Pirogallol substratının Yali armutundan elde edilen PPO enzimi için 2.6×10^{-3} M K_M değeri bulunmuştur. Literatürlerde V_{max} değerlerinin genelde belirtilmediğı, görüldü. Ancak yali armutundan izole edilen PPO ı için klorojenik asit, pirogallol, katekol ve DL-dopa substratlarıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 258, 423, 766 ve 133×10^3 E U.mg⁻¹ dak⁻¹ olarak verilmiştir¹⁵⁶. 4-metil katekol ile bulunan aktivite, katekol ile bulunandan on kat daha yüksektir. Bu sonuç literatür verileriyle uyum içindedir¹⁵⁹.

İnhibitör çalışmalarında; inhibitör olarak; sodyum metabisülfid, L-sistein, askorbik asit Glutasyon, tiyoüre, sodyum azotür, sodyum dietildiyokarbamat, ditiyoeritritol, tannik asit, benzoik asit ve β -merkaptetanöl için bulunan ortalama K_i değerleri sırasıyla 5.19×10^{-9} M, 5.79×10^{-8} M, 9.83×10^{-8} M, 3.67×10^{-8} M, 5.77×10^{-5} M

4.35×10^{-5} M, 1.53×10^{-8} M 7.28×10^{-9} M, 1.21×10^{-1} M ve 2.38×10^{-4} M olarak hesaplandı. Söz konusu inhibitörlerden, sodyum dietilditiyokarbamat unkompetetiv (yarı yarışmalı), benzoik asit ve β -merkaptotanol nonkompetetiv (yarışmasız) inhibisyon etkisi gösterirken, diğer inhibitörlerin kompetetiv (yarışmalı) inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Elde ettiğimiz değerlere göre kuşburnu meyvası PPO enziminin en kuvvetli inhibitörü sodyum metabisüfit iken bunu sırasıyla tannik asit, ditiyoeritritol, glutatyan, L-sistein, askorbik asit, tiyoüre, sodyum dietilditiyokarbamat, sodyum azotür, β -merkaptotanol ve benzoik asit izlemektedir. Ayrıca, sodyum klorür, NaEDTA, etilenglikol ve Tiyodiglikol bileşiklerinin kuşburnu meyvası PPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiş, konsantrasyona bağlı olarak inhibisyon yüzdeleri tablo 3.9'da verilmiştir. Tablo incelendiğinde Benzoik asit gibi, NaEDTA da kuvvetli bir inhibitörü değildir. Tiyodiglikol'un etilen glikola göre daha etkili olduğu ancak yukarıdaki K_i değerleri tesbit edilen bileşiklere göre çok etkisiz olduğu görülmüştür. Sodyum Klorürün ise çok zayıf inhibisyon etkisi, hatta aktivatör özelliği gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu durum d'Anjou ve Yali armutları PPO için de gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışılan inhibitörlerle ilgili olarak K_i sabitleri ve inhibisyon mekanizmalarına ilişkin çalışmalara literatürde rastlanmadı.

Kuşburnu meyvası PPO enzimi için 10 mM 4-metilkatekol substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (I_{50}) Tablo 3.8'de verilmiştir. Tabloda verilen I_{50} değerleri azalan eki sırasına göre sırasıyla sodyum metabisüfit için 2.10×10^{-5} M, tannik asit için, 2.73×10^{-5} M, Ditiyoeritritol için 3.31×10^{-5} M, sodyum dietilditiyokarbamat için 4.30×10^{-5} M, β -merkaptotanol için 8.20×10^{-5} M, L-sistein için 1.48×10^{-5} M, askorbik asit için 1.57×10^{-4} M, glutatyan için 3.44×10^{-4} M, tiyoüre için 7.49×10^{-2} M, sodyum azotür için 1.98×10^{-1} M ve benzoik asit için ise 3.47×10^{-1} M dir.

Bu etki sırası K_i değerlerinin sırasıyla çoğunlukla uyuşmaktadır. Yalnız β -merkaptotanol ile sodyum dietildiyokarbamatın yerlerinde farklılık vardır. I_{50} değerlerine göre bu iki inhibitörün K_i değerlerine göre ki durumundan daha etkili olduğu tesbit edilmiştir.

Sıcaklıkla denetürasyon ve renetürasyon özelliklerinin araştırılmasında, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen kuşburnu meyvası PPO enzimi 50°C , 60°C , 70°C , 80°C ve 90°C lerde ayrı ayrı 10, 20, 30, 45 ve 60 dakika sabit sıcaklık sirkülatöründe ısıtılarak aktiviteler ölçüldü. % aktiviteler ısıtma süresine karşı

grafik edildi ve şekil 3.60 gösterildi. Grafik incelendiğinde 60 dakikada ısıtma süresinde aktivitede 50°C, de % 20, 60°C de % 67, 70°C de %78 azalma görülürken 80°C, tamamen denatüre olduğu tesbit edilmiştir. 90°C, de ise enzim 30 dakika içinde tamamen inaktif hale geçmiştir.

Isıyla aktivitesini kaybetmiş yada tamamen denatüre olmuş örneklerin sıcaklıkları 22 °C ye kadar soğutulularak 10', 20', 30', 45' ve 60' dakikalarda aktivitetler tayin edildi. 22°C deki inkübasyon süresine karşılık % orijinal aktiviteler şekil 3.61 de grafik halinde verildi. Grafik incelendiğinde 10 dakikada % 80, 20. dakikada %100 orijinal aktivitelerini kazandıkları tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar kuşburnu meyvası PPO enziminin ısıyla inaktivasyonu uygun bir metod olmadığı anlaşılmıştır.

Elektroforez çalışması; SDS-poliakrilamid jel elektroforezi PPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla, bölüm 2.4.3.e'de de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine numunelerin tatbiki ve elektroforez işleminden sonra çekilen fotoğraf (Şekil 3.4) incelendiğinde 1. ve 2. kanallardaki ham ekstrakt bantın diğer kanallarda görülmemesi enzimin saflaştığını, 3. ve 4. kanallarda amonyum sülfatla saflaştırılmış enzim çözeltisinin ikinci defa amonyum sülfatla çöktürülmesi ile protein miktarının çok fazla olmasından dolayı ayrılmanın olmadığı görülmüştür. 5. ve 6. kanallarda amonyum sülfat sonucu 7. ve 8. kanallarda jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen elüatların 1. fraksiyonu (JF₁) ve 9. ve 10. kanallarda jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen elüatların 2. fraksiyonu (JF₂) nun bantları görülmektedir. Bu kanallarda ikişer bantın görülmesi enzimin ham ekstrakta göre saflaştırıldığı ve bu bantların izoenzim olabileceği gibi enzimin alt birimleri olduğu da kanaatine varılmıştır.

Kuşburnu meyvası PPO izoenzimlerinin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi amacıyla bölüm 2.4.7'de anlatıldığı gibi enzimin denatürasyonunu önlemek için 8°C'de hazırlanan kesikli poliakrilamid jel elektroforezine amonyum sülfat çöktürmesi sonrası tatbik edilen numunenin elektroforez işlemi sonrası çekilen fotoğrafı Şekil 3.62'de ve ayrıca ikinci olarak jel kanallarından 1. ve 2. kanala amonyum sülfat çöktürmesi sonrası 3. kanala jel filtrasyon kromatografisi sonrası 1. fraksiyon ve 4. kanala ise jel filtrasyon kromatografisi sonucu (2. fraksiyon) elde edilen numunelerin tatbikinden sonra 4-metil katekol substratı ile etkileştirilen jelin çekilen fotoğrafı Şekil 3.63'de gösterilmiştir. İlgili fotoğraflar incelendiğinde jeller üzerinde ikişer bantın görülmesi kuşburnu meyvası PPO enziminin iki izoenziminin varlığını göstermektedir. Ayrıca jel filtrasyon kromatografisinde (Şekil

3.2) iki pik görülmesi ve yine DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisinde (Şekil 3.3) de iki pikin belirlenmesi kuşburnu PPO enziminin iki izoenzimi olduğunu göstermektedir. Yine bazı substratların optimum pH ve sıcaklık grafiklerinde de iki pikin görülmeside iki izoenzimin varlığını desteklemektedir.

Sonuç olarak; kuşburnu meyvası PPO enzimi için yapılan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1. Enzimin optimum pH'sı o-dihidroksi substratları için diğer kaynaklı PPO'lara göre farklı bulunmuştur (pH=8.0'ın üzerinde),
2. Optimum sıcaklık çalışmaları hemen hemen bütün çalışılan substratlar için literatürde diğer kaynaklı PPO'larla uygunluk arz etmiştir.
3. Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu enzimin en çok 4-metil katekol substratı üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır ($V_{max}= 431.96$ EÜ/ml dak),
4. İnhibitörlerle yapılan çalışmalarda, elde edilen gerek I_{50} , gerekse K_i sabitlerinden en etkili inhibitörün sodyum metabisüfitin olduğu anlaşılmıştır. Bunu sırasıyla azalan etkinliğe göre tannik asit, ditiyoeritritol, glutatyon, L-sistein, askorbik asit, tiyoüre, sodyum dietilditiyokarbamat, sodyum azotür, β -merkaptotanol ve benzoik asit takip etmiştir. Bu sonuçlar birçok literatür bilgisi ile uygunluk içindedir.
5. Sıcaklıkla enzimin denatürasyonu deneylerinde, enzimin sıcaklık artışına paralel olarak daha kısa sürede denetüre olduğu , ancak en yüksek sıcaklık olarak seçilen 90°C'de bile sıcaklığın düşürülmesi ile enzimin tekrar renatüre olduğu gözlenmiştir. Bundan dolayı kuşburnu meyvası için gıda işletmeciliğinde ısı ile inaktivasyon işleminin uygun bir metod olmadığı sonucuna varılmıştır.
6. Gerek jel filtrasyon kromatografisi, gerek iyon değişim kromatografisi ile iki pikin bulunması ve tabii elektroforez sonucu 4-metil katekol substratı ile renklendirme sonucu iki bantın gözlenmesi enzimin iki izoenzimi olduğu ancak elektroforezde bir bantın hafif renklenmesi ve dopamin substratı ile renklendirmede bu bantın ortaya çıkmaması bu izoenzim aktivitesinin düşük olduğu kanaati doğmuştur.

KAYNAKLAR

1. Matheis, G. and Belitz, H.,1983,Enzymatic browning of foods.,Z.Lebensm Unters For.,176:454-462.
2. Ponting,J.D.,1960,The control of enzymatic browning of fruits,food enzymes., H.W., Schultz, ed., Avi Publ. Co., Inc, Westport, C.T.
3. Paulson, A.T., Vanderstoep, J., and Eaton, G.W., 1979, Effect of giberalllic acid and ethepton on enzymatic browning of redhaven peaches., Hort. Science, 14 (6): 711-713.
4. Brown, B.R.,1967, Biochemical aspect of oxidative coupling of phenols in oxidative coupling of phenols.,Taylor, W. I. and Battersby A.R., eds., Marcel Dekker, New York ,Chop. 4.
5. Ragazzi,E.and Veranese,G.,1967,Ricerhe sulle fenol oksidasie sul contenuto in o-difenol Delle Olive., Ann.Chim., 57, 1476.
6. Zaprometov, N.N., 1977, Metabolism of phenolic compounds in plants., (Russ.) Biochimie ,42.3.
7. Tolbert, N.E., 1973, Activation of polyphenol oxidase of chloroplast.,Plant Physiol, 51, 234.
8. Craft, C.C., 1966, Localization and activity of phenolase in the potato tuber., Am. Potato J., 43,112.
9. Parish, R.W., 1972, The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (Beta vulgaris L.)., Z, Pflanzenphysiol, 66,176.
10. Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y., 1964, Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition., Plant Physiol. , 17,921.
11. Drawert, F. and Gebbing, H., 1967, Uber Aktiv und Latent Gebundene Phenoloxidase und Ihre Ablösung von Pflanzlichen Zellstrukturen., Naturwissenschaften, 54, 226.

12. Kenten, R.H., 1957, Latent phenolase in extracts of brood bean (*Vicia faba* L.) leaves, I. Activation by acid and alkali., *Biochem. J.*, 67, 300.
13. Siddig M., Sinha, N.K. and Cash, J.N.,1992, Characterization of polyphenoloxidase from stanley plums., *J.Food Sci.*, 57,5,1177-1179.
14. Galeazzi, M., A.M., Sgorbieri, V.C. and Constantinides, S.M., 1981, Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana., *J.Food Sci.*, 46, 150-155.
15. Voigt, J. and Noske, R., 1966, Zur Bestimmung der Polyphenoloxidase Aktivitat II. Orientierende Versuch zur Anwendbarkeit der Methode mit Besthorns Reagens in Apfeln., *Z.Lebensm. Unters, For.*, 130,9.
16. Bleslermann, W., 1956, Oxydation in obst. and obstsuften., *Mit Geb. Lebensmit Chmters., Hyg.*, 47,86.
17. Walker, J.R.L., 1962, Studies on the enzymic browning of apple fruit., *N.Z.J.Sci.*, 5, 316.
18. Vamos-Vigyazo, L., Mihalyi, K., Gajzago, I. and Nadudvari-Markus, V., 1977, Studies into the enzymic browning and the polyphenol-phenol oxidase complex of apple cultivars., *Confructa.*, 21, 24.
19. Vamos-Vigyazo, L., Mihalyi, K., Gajzago, I. and Nadudvari-Markus, V., 1976, The role of enzym-substrate ratio in the enzymatic browning of fruit tissue homogenates., *Acta Aliment Hung.*, 6, 379.
20. Vamos-Vigyazo, L., Gajzago, I., 1978, Substrate specificity of the enzymic browning of apples., *Acta Aliment Hung.*, 7, 79.
21. Sapers, G.M., 1992, Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration., *J.Food Sci.*, 57.5, 1192-1993.
22. Iliescu-Moruju, L., 1969, Activity of oxidases in sweet cherries during growth and maturation., *Stud.Cercet. Biochem.*, 12, 47.
23. Keleş, F., 1986, Amasya ve golden elmalarının polifenol oksidazları üzerine araştırmalar I. Genel Özellikler., *Doğa*, D2, 10 (2), 224-234.

24. Yankov, S.J., 1961, Activite et Localisation du Ferment Polyphenoloxydase Dans Certains Fruits., C.R. Acad. Bulg. Sci., 14, 455.
25. Mayer, A., M., 1987, Polyphenol oxidases in plants-recent progress., *Phytochemistry* ,26,1,11-20.
26. Arturo, H. J. K., Florence, C.R.P. M-G. and Jacques, J.N., 1990, Inhibition studies on apple polyphenol oxidase., *J.Agr.Food Chem.*, 38 , 4 , 926-931.
27. Ebeling, W.P. and Montgomery, M.W., 1990, Strawberry polyphenoloxidase : purification and characterization., *J.Food Sci.*, 55 , 5 , 1315-1319.
28. Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metche, M. and Rovel, B., 1993, Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activity., *Phytochemistry* ,34 , 2, 349-353.
29. Valero, E., Varon, R. and Garcia-Carmona, F., 1990, Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols., *J. Agr. Food Chem.*, 38, 1097-1100.
30. Chen, J.C., Wei, C., Rolle, R., S., et al., 1991, Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases., *J. Agr. Food Chem.*, 39, 1396-1401.
31. Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D. and White, K., 1988, Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives., *J.Food Sci.*, 53, 3, 765-771.
32. Cheynier, V. and Ricardo da Silva, J.M., 1991, Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase., *J.Agr.Food Chem.*, 39, 1047-1049.
33. Cheynier, Y., Osse, C. and Rigaud, J., 1988, Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions., *J.Food Sci.*, 53, 6, 1729-1732.
34. Rivas, N.D.J. and Whitaker, J.R., 1973, Purification and some properties two polyphenol oxidases from bartlett pears., *Plant Physiol.*, 52, 501-507.

35. Vamos-Vigyazo, L., 1981, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables a review., CRC Crit. Rev., In Food Sci. and Nutrition, 49-123.
36. Matheis, G. and Belitz, H.D., 1977, Studies on enzymic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). III. Kinetics of potato phenol oxidase., Z. Lebensm. Unters. For., 163, 191.
37. Mason, H. S, 1955, Comparative biochemistry of the phenolase complex., Adv. Enzymol. Rel. Subj. Biochem., 16, 105.
38. Heimann, W. and Adler, St., 1962, Über die Hydroxylierende Wirlung der Phenol Oxidase, I. Untersuchung des Systems Sauerstoff-Phenolase-Brenz-Catechin-Hydrochinon., Z.Lebensm. Unters.For., 118, 1.
39. Zaprometov, M.N., 1977, Metabolism of phenolic compounds in plants., Biochimie., 42, 3.
40. Padron, M.P., Lazono, J.A. and Gonzales, A.G., 1975, Properties of o-diphenol: O₂ oxidoreductase from *Musa cavendishii*., Phytochemistry, 14, 1959.
41. Whitaker, J.R., 1972, Principles of enzymology for the food sciences., Marcel Dekker, New York, Chaps 22 and 24.
42. Bendall, D.S. and Gregory, R.P.F., 1966, Purification of phenol oxidases in enzyme chemistry of phenolic compounds., Pridham, J.B, ed., Pergamon Press, Oxford, 7.
43. Robb, D.A., Magson, L.W. and Swain, T., 1965, On the heterogeneity of the tyrosinase of broad Bean (*Vicia faba*, L.), Phytochemistry, 4, 731.
44. Hyoda, H. and Uritani, I., 1965, Purification and properties of o-diphenol oxidases in sweet potato., J. Biochem., 58, 388.
45. Mathew, A.G. and Parpia, H.A.B., 1971, Food browning as a polyphenol reaction., Adv. Food. Res., 19, 75.
46. Brooks, D.W. and Dawson, Ch.R., 1966, Aspects of tyrosinase chemistry in the biochemistry of copper, peisach., J.B. Arsen, P. and Blumberg, W.E., eds., Academic Press, New York, 343.

47. Bresler, S.E., Kazbekov, F.N., Subhoolova, A.T. and Shadrin, Y.N., 1979, The mechanism of catalysis by o-diphenoloxidase., *Biochimie*, 44, 741.
48. De Amorim, H.V. and Silva, D.M., 1968, Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage., *Nature*, 219., 381.
49. Herrmann, K., 1974, Über die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes., *Erwerbsastbau*, 16, 1.
50. Baruah, P. and Swain, T., 1959, The action of potato phenolase compounds., *J. Sci. Food Agr.*, 10, 125.
51. Swain, T., 1962, Economic importance of flavonoid compounds, In "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, 513.
52. Frudenberg, K. and Weinges, K., 1962, Catechins and flavonoid compounds. In "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, 197.
53. Rosenheim, O., 1920, Observations on anthocyanins. I. the anthocyanins of young leaves of the grape vine., *Biochem. J.*, 14, 178.
54. Robinson, G. M. and Robinson, R., 1993, A survey of anthocyanins. III. notes on the distribution of leucoanthocyanins., *Biochem. J.*, 27, 206.
55. Ganguly, K. and Seshado T.R., 1958, Isolation of the more commonly occurring leucoanthocyanidins of plants., *J. Sci. Ind. Res. Sect. B.*, 17, 168.
56. Geissman, T.A., 1963, Leucoanthocyanins. In "Aspects of plant phenolic chemistry " (V.C. Reineckles ed.), Plant Phenolic Group of North America, Toronto, p 1.
57. Hayashi, K., 1962, The anthocyanins. In "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, 248.
58. Gripenberg, J., 1962, Flavones In "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, 106.
59. Harborne, J.B., 1964, "Biochemistry of phenolic compounds", Academic Press.

60. Sato, M., 1962, The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid., *Phytochemistry*, 8, 353.
61. Sandheimer, E., 1964, Chlorogenic acids and related depsides., *Bot. Rev.*, 30, 667.
62. Roberts, E.A.H., 1962, Economic importance of flavonoid substances; tea fermentation. In "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, 465.
63. Walker, J. R. L., 1964, Studies on the enzymic browning of apples II. Properties of apple polyphenol oxidase., *Aust. J. Biol. Sci.*, 17, 360.
64. Stelzig, D. A., Akhtar, S. and Riberio, S., 1972, Catechol oxidase of red delicious apple peel., *Phytochemistry*, 11, 575.
65. Gross, D. and Coombs, J., 1975, Enzymic colour of formation in beet and cane juices., paper presented at the 15 th General Assembly of C.I.T.S., Vienna.
66. Jan, J.J. and Kohler, K.R., 1974, Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the South east., *Hortscience*, 9, 590.
67. Lanzarini, G., Pifferi, P. G. and Zamoroni, A., 1972, Specificity of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits., *Phytochemistry*, 11, 89.
68. Mayer, A. M., 1962, Inhibition and substrate specificity of lettuce phenolase., *Phytochemistry*, 1, 237.
69. Wildanger, W. and Hermann, K., 1973, Die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes, II. Die Flavonole des Obstes., *Z. Lebensm. For.*, 151, 103.
70. Aylward, F. and Haisman, T.R., 1969, Oxidation systems in fruits and vegetables their relation to the quality of preserved products., *Adv. Food Res.*, 17, 1.
71. Weurman, C. and Swain, T., 1955, Changes in the enzymic browning of Bromley's seedling apples during their development., *J. Sci Food Agr.*, 6-186.

72. Fujita, S. and Sano, T., 1976, Oxidation and browning reaction of pyrogallol the polyphenoloxidase from the immature fruit of Satsuma mandarin., *Eiyo To Shokuryo*, 29, 457.
73. Cash, J. N., Sistrunk, W.A. and Stuttet, C. A., 1976, Characteristics of concord grape polyphenoloxidase. Involved in juice colorless., *J. Food Sci.*, 41, 1398-1402.
74. Augustin, M. A., Ghazali, H. M. and Hashim, H., 1985, Polyphenoloxidase from Guava., *J. Sci. Food, Agr.*, 36, 1259-1265.
75. Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo, L., Kisa-Kuts, N. and Babos-Szebeny, G., 1978, The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature., *Acta Alimentat Acad Sci. Hort.*, 5, 57.
76. Mayer, A.M. and Harel E., 1968, Laccase like enzyme in peaches., *Phytochemistry*, 5, 763.
77. Pulmer, D. K., 1963, Banana polyphenoloxidase preparation and properties., *Plant Physiol.*, 38, 508.
78. Kaldy, M. S. and Murkakis, T., 1972, The browning of parsnips can., *Inst. Food Sci. Technol. J.*, 5, 37.
79. Schaller, K., 1972, Zur Bestimmung der Polyphenol Oxidase Aktivitat in Kartoffelknollen., *Z. Lebens Unters For.*, 150, 211.
80. Ulrich, M.R., 1975, Lefroid et les qualites organoleptiques des produits alimentaires., *REV. Gen. Frond*, 12, 1025, A.
81. Anon, A., 1978, Desactivacion de polifenoloxidasas en membrillos., *Informacion Tecnica. REV. Agroquim. Tecnol.*, 18, 265.
82. Wong, T. C., Zub, B. S. and Whitaker, J.R., 1971, Isolation and purification of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach., *Plant Physiol.*, 48, 19.
83. Halim, D. H. and Montgomery, M. W., 1978, Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (*Pyrus communis*, L.), *J. Food Sci.*, 43, 603-606.

84. Kohn, V., 1977, Latency properties polyhenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning., J. Sci.Food Agr., 28, 233,
85. Lerner,H.R.,Mayer, A.H. and Harel E.,1972, Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase., Phytochemistry, 11,2415.
86. Isbiguro, R-S.R. and Anyama Y., 1970, Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in radish., Etyo To Shukoryo, 23, 13.
87. Weaver,M. L., Brown, R. C, and Steen,H. A.,1968,The association of gopper whit tyrosinase activity and internal discoloration. In Russel Burbank potatoes., Am.Potato J.,45,132.
88. Mathen, A. G. and Parpia,H. A. B., 1971, Food browning as a polyphenol reaction., Adv. Food Res., 19, 75.
89. Walker, J. R. L., 1975, Enzymic browning in food. A review.,Technol.Deg., 4(3), 89.
90. Sapers, G.M., Garzarella, L. and Pilizota, V.,1990, Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration., J.Food Sci., 55, 4,1049-1053.
91. Palmer, J. K. and Roberts, J. B., 1967, Inhibition of banana polyphenol oxidase by 2-mercaptobenzthiazole., Science, 157, 200.
92. Galeazzi, M. A. and Sgarbieri, V. C.,1978, Banana polyphenol oxidase varietal differences and partial characterization., Food Sci. Technol., 237.
93. Yosunobu, K.T. and Norris, E.R., 1957, Mechanism of borate inhibition of diphenol oxidation by tyrosinase., J. Biol. Chem., 227, 473.
94. Weser, U., 1968, Hemmeng der o-Diphenol Oxydase Aktivitat Durch Borat und Germanat, Hoppe-Seyler's., Z.Physiol. Chem., 349, 982.
95. Pifferi, P. G., Baldassari, L. and Cultrera, R., 1974, Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from prunus avium fruits., J.Sci.Food Agr., 25, 263.

96. Walker, J. R. L. and Wilson, E. L., 1975, Studies on the enzymic browning of apples-inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids., *J. Sci. Food Agr.*, 26, 1825.
97. Walker, J. R. L., 1976, The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids., *J. Food Technol.*, 11, 341.
98. Soler-Mahnez, A., Sabater-Garcia, F. and Lozona, J. A., 1965, Inhibidores estructurales de fenolase de albaricque., *Rev. Esp. Fisial.*, 21, 139.
99. Duckworth, H. and Coleman, J.E., 1970, Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase., *J. Biol. Chem.*, 245, 1613.
100. Ndubizu, T. O. C., 1976, Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot., *J. Home*, 54, 311.
101. Pierpoint, W. S., 1966, Enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced., *Biochem*, 98, 567.
102. Jones, J.D., Halme, A.C. and Waoltorton, L.S.C., 1965, Use of poly(vinyl) pyrrolidinone in the isolation of enzymes from chloroplast., *Phytochemistry*, 4, 659.
103. Khrusheva, E. P. and Krehin, N. Ya., 1965, Certain, physiological-biological indicators in the leaves of various frost resistant varieties of plums., *Agro. Biologiya*, 6, 921.
104. Mayer, A. M., Harel, E. and Shain, Y., 1962, 2,3-Naphthalenediol a specific competitive inhibitor of phenolase., *Phytochemistry*, 3, 447.
- 105-Murt, D. P and Morrin, L. L., 1974, Effect on succinic acid 2,2-dimethylhydrazide on mushroom o-diphenol oxidase., *J. Am. Sec. Home Sci.*, 3, 99.
106. Tomova, N., Sechenska, M. and Dechev, G., 1966, Phenoloxidase activity in spinach chloroplasts., *C.R. Acad. Bulg. Sci.*, 19, 653.
107. Nakamura, T., Sho, S. and Ogura, Y., 1966, On the purification and properties of mushroom tyrosinase., *J. Biochem.*, 59, 481.

108. Montedoro, G. and Cantarelli, C., 1969, Ricerche sulla polyfenol ocsidase delle uve: III-Stabilita ed inattivazione dell enzima., Ind. Agrar., 7, 323.
109. Wong, C.Y. and Mellenthin, W. M., 1974, Inhibition of friction discoloration on d-Anjou pears by 2-mercaptobenzthiazole., Hortscience, 9, 196.
110. Strübi,P.,Fischer,F.and Neukum, 1975, II, Neucre Arbeiten Über die Technologie des Apfeltectar.Herstellung Ind Obe.,Gemaseverwert., 60, 349.
111. Taufel, K. and Voigt, J., 1964, Zur Inhibierenden Wirkung von Ascorbins Auere Gegenüber der Polyhenol Oxidase des Apfels., Z.Lebensm. Unters.For., 126, 19.
- 112.Singh, K. and Ahlawati, T. R., 1974, Effect of ascorbic acid on tyrosinase of dwarf Mexican wheats., Food, Sci Technol. Abstr., 6(10), 136.
113. Krueger, R. C.,1950, The effect of ascorbic acid on the enzymatic oxidation of monohydric acid on the enzymatic oxidation of monohydric and o-dihydric phenols.,J.Am. Chem. Soc., 72, 5582.
114. Markakis, P., Embs, R.J., 1966,Effect of sulfite and ascorbic acid on mushroom phenol oxidase.,J.Food Sci. ,31, 807.
115. Ponting,J.D.and Jackson, R.,1972,Pre-treezing processing of golden delicious apple slices., J.Food Sci., 37,812.
116. Kertesz, D. and Zito, R., 1965, Mushroom polyphenol oxidase I.Purification and general properties., Biochim. Biophys., Acta.,96, 447.
- 117.Kertesz,D.and Zito,R.,1962,Phenolase.In "Oxygenases" (O.Hayaichi.ed.) Academic Press New York ,p 307.
- 118.Mason, H. S., 1956, Structures and Funckions of the Phenolase Complex., Nature (London),177,79.
119. Pierpoint, W. S., 1966, The enzymic oxidation of cholorogenic acid and some reactions of the quinones produced., Biochem. J. ,98,567.

120. Baruah, P., 1963, Role of poly-phenol oxidase in tissue browning respiration., J. Unic. Gauhati., 14, 1.
121. Mason, H. S., 1955b, Reactions between quinones and proteins., Nature (London), 175, 771.
122. Hathway, D. E. and Seakins J. W., 1957b, Enzymatic oxidation of catechin to a polymer structurally related to some phlobatannins., Biochem. J., 67, 239.
123. Flurkey, W. H. and Jen, J.J., 1978, Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches., J. Food Sci., 43, 1826.
124. Sapers, G.M. and Miller, R.L., 1992, Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates., J. Food Sci., 57, 1132-1135.
125. Loomis, W. D. and Battaile, J., 1966, Plant phenolic compounds and the isolations of plant enzymes., Phytochemistry, 5, 423.
126. Loomis, W.D., 1968, Removal of phenolic compounds during the isolations of plant enzymes., Methods Enzymol., 13, 555.
127. Luh, B. S. and Phithakpol, B., 1972, Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Cling peaches., J. Food. Sci., 37, 264.
128. Anisimov, V. D., Kastelava, T. B. and Loginovs, L. N., 1978, Isolation and some properties of potato o-diphenoloxidase., Biochimie, 43, 1616.
129. Constantinides, S. M. and Bedford, C.L., 1967, Multiple forms of phenoloxidase J. Food Sci., 32, 446.
130. Matheis, G. and Belita, H.D., 1979, Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen oxidoreductase (E.C.1.14.18.1) from potato tubers., Z. Lebensm. Unters. For., 169, 271.
131. Jolley, R. L. and Mason H. S., 1965, The multiple forms of mushroom tyrosinase interconversion., J. Biol. Chem., 240, 1459.
132. Harel, E., Mayer, A. M. and Lehman, E., 1973, Multiple forms of vitis vinifera catechol oxidase., Phytochemistry, 12, 2649.

133. Ulezlo, I. V., Uporova, T. M. and Feniksova, R. V., 1975, Study of oxidative enzymes of the lignin-degrading fungus *Pleurotus ostreatus*, *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 11, 535.
134. Mayer, A. M., Harel, E. and Ben-Shaul, R., 1966, Assay of catechol oxidase: a critical comparison of methods., *Phytochemistry*, 5, 783.
135. Heimann, W. and Andler, St., 1962, Zur Aktivitätsbestimmung der Polyphenoloxidase I. Untersuchungen über die Anwendung der Colorimetrischen Methoden., *Z. Lebensm. Unters. For.*, 117, 121.
136. Mihályi, K. and Vamos-Vigyazo, L., 1976, A method for determining polyphenol oxidase activity in fruits and vegetables applying a natural substrate., *Acta Aliment. Hung.*, 5, 69.
137. Long, T. J. and Alben, J. O., 1969, Preliminary studies of mushroom tyrosinase., *Mushroom Sci.*, 7, 69.
138. El-Bayoumy, M. A. and Frieden, E., 1957, A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4854.
139. Sussmann, A. S., 1961, A comparison of the properties of two forms of tyrosinase from *Neurospora crassa* *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 407.
140. Esterbauer, H., Schwarzer, E. and Hayn, M., 1977, A rapid assay for catechol oxidase and Laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid., *Anal. Biochem.*, 77, 486.
141. Bonner, W. D., 1957, Soluble oxidases and their functions., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 8, 427.
142. Farkas, G. L. and Kiraly, Z., 1962, Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease resistance., *Phytopathol.*, 52, 106.
143. Macrae, A. R. and Duggleby, R. G., 1968, Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase., *Phytochemistry*, 7, 855.

144. Khuruskeheva, E.P. and Krehin, N.Y., 1965, Certain, physiological-biological indicators in the leaves of various frost resistant varieties of plums., *Agro Biologiya*, 6, 921.
145. Molchanova, Z. Y., 1966, The role of oxidase in the resistance of grapevines to unfavorable conditions of wintering., *Vinodel. Vinograd, SSSR*, 26(1), 21.
146. Synge, R. L. M., 1975, Interaction of polyphenols with proteins in plants and plant products., *Qual. Plant.Plant Foods Hum. Nutr.*, 24, 337.
147. Kent, K. N., Harkin, J. N. and Cowling, E.B., 1968, Fungal degradation of lignin. II. Degradation of The lignin model compound syringyl-glycol beta quaiacyl ether by polyporus versicolor and stereum frustularum., *Biochim. Biophys. Acta*, 165, 145.
148. Gregory, R. P. F. and Bendall, D. S., 1966, The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sihensis*, L.), *Biochem. J.*, 101, 569.
149. Cemeroğlu, B., 1982, Meyva suyu üretim teknolojisi., Ankara Teknik Basım Sanayii Matbaası.
150. Walker, J. R. L., 1977, Enzymic browning in foods : It's chemistry and control., *Food Technology in New Zeland*, 12, 3, 19-25.
151. Segel, I. H., 1968, Bichemical calculation., John Wiley and Sons, Inc., New York, 403.
152. Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, 72, 248.
153. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A., 1948, Ascorbic acid oxidation and the browning in apple-tissue extracts., *Arch. Biochem.*, 19, 47-63.
154. Laemmly, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T₄., *Nature (London)*, 227-680.

155. Park, E. Y. and Luh, B. S., 1985, Polyphenol oxidase of kiwi fruit., J.Food Sci., Vol., 50, 678-684.
156. Zhou, H. W. and Feng,X., 1991,Polyphenol oxidase from Yali pear., J. Sci. Food Agr., 57,307-313.
157. Jaenicke, L., 1984, Proteinbestimmung, Einführung in The Praxis des Biochemikers.,Köln, 27.
158. Rendina, G., 1971, Quantitive determination of protein by the Biüret reaction. experimental methods in modern biochemistry., W.B. Saunders Company, London, 75.
159. Wesche-Ebeling, P. and Montgomery,M.,1990, Strawberry polyphenol oxidase : extraction and partial characterization., J.Food Sci., 56,5,1320-1324.
160. Oktay, M.,1992,Amasya elmasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin araştırılması.,(Doktora Tezi).,Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.