

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CANCUR ERİĞİNDEN (*Prunus domestica* L.) POLİFENOL  
OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE ERİĞİN ANTİOKSİDAN  
ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**HAVVA ATASEVER**

**TEZ DANIŞMANI**  
**YRD. DOÇ. DR. BARBAROS DİNÇER**

**JÜRİ ÜYELERİ**  
**YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ**  
**YRD. DOÇ. DR. HÜSEYİN ŞAHİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**RİZE- 2015**

**Her Hakkı Saklıdır**

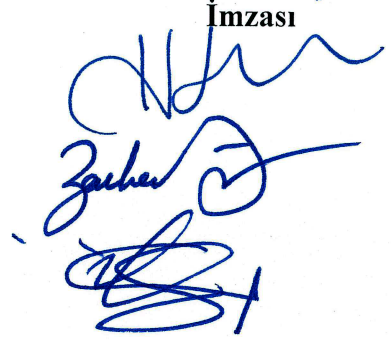
**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CANCUR ERİĞİNDEN (*Prunus domestica* L.) POLİFENOL OKSİDAZIN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE ERİĞİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN**  
**İNCELENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER danışmanlığında, Havva ATASEVER tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/06/2015 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Üyeleri</b>	<b>Ünvanı Adı Soyadı</b>
<b>Başkan</b>	: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN
<b>Üye</b>	: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER
<b>Üye</b>	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

**İmzası**





**Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ**

## ÖNSÖZ

Cancur Eriğinden (*Prunus domestica* L.) Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Eriğin Antioksidan Özelliğinin İncelenmesi amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalında “Yüksek lisans tezi” olarak hazırlandı.

Bu çalışmam süresince her türlü maddi ve manevi destek sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, her zaman örnek aldığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER’ e şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisansa başladığım süre boyunca üzerimde çok emeği olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ’ a, tez çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sevgili hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Arife Pınar EKİNCİ’ ye, değerli arkadaşım Zeynep LEVENT’ e, çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi Pelin BİRİNCİ’ ye, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü hocalarıma teşekkür ederim.

Kimya bilimini bana sevdiren, hayatın kimyasal ve biyokimyasal yanlarını en güzel şekilde öğreten maddi ve manevi destekçim babam Yrd. Doç. Dr. Ali ATASEVER’ e, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen annem Ayşe ATASEVER’ e, en büyük destekçilerim dedem Ahmet ATASEVER’ e, babanem Kudret ATASEVER’ e ve ailemin diğer fertlerine teşekkür ederim.

**Havva ATASEVER**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “CANCUR ERİĞİNDEN (*Prunus domestica* L.) POLİFENOL OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE ERİĞİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 06/15/2015

Havva ATASEVER

***Uyarı:*** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### CANCUR ERİĞİNDEN (*Prunus domestica* L.) POLİFENOL OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE ERİĞİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ

Havva ATASEVER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Polifenol oksidazlar (PFO), bakır içeren metaloenzimler olup oksijen varlığında, monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu ve *o*-difenollerin de *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler. Bu çalışmada, Ardahan İli Posof İlçesi Türkgözü Köyü'nden toplanmış olan Cancur Eriğinden (*Prunus domestica* L.) PFO, Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak saflaştırıldı. PFO, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforez ile biyokimyasal özellikleri bakımından karakterize edildi. Cancur eriği PFO' sunun elektroforez kromatogramında iki izoenzime sahip olduğu belirlendi. Cancur eriği PFO' sunun *L*-tirosin, 3,4-dihidroksihiposinnamik asit, 3,4-dihidroksifenil propanoik asit, *p*-kumarik asit, katekol ve 4-metil katekol substratları varlığında en yüksek aktiviteyi 30-40 °C ve pH 5.0-7.0 arasında gösterdiği tespit edildi. Cancur eriği PFO' sunun her bir substratının Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Kinetik veriler olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) çizilen Lineaweaver-Burk grafiği yardımıyla hesaplandı. Cancur PFO' sunun hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. En fazla katekol substratına ilgi duyduğu ve bunu sırasıyla 4-metil katekol, DHHS, *L*-tirosin, DHPPA, *p*-kumarik asitin izlediği belirlendi. Cancur eriği PFO' sunun 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit, sodyum metabisülfid, benzoik asit ve sodyum azid tarafından inhibe edildiği tespit edildi. Bu inhibitörler için  $K_i$  değerleri sırasıyla 0.02, 0.12, 6.0 ve 18.3 mM olarak tespit edildi. Cancur eriğinin sulu özütünde toplam fenol miktarı 114.6±5.0 mg GAE/100 g olarak tespit edildi. Özütte yapılan antioksidan aktivitesi CUPRAC yöntemiyle 30.19±0.96 (mg TEAK/g), DPPH yöntemiyle 1.98±0.02 (mg/mL) ve ABTS yöntemiyle 2.17±0.01 (mg/mL) olarak belirlendi.

2015, 100 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Polifenol oksidaz, Antioksidan, *Prunus domestica* L.

## ABSTRACT

### **PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM CANCUR PLUM (*Prunus domestica* L.) AND INVESTIGATION OF PLUM' S ANTIOXIDANT PROPERTIES**

**Havva ATASEVER**

**Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Master Thesis  
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER**

Polyphenol oxidases (PPO) are copper-containing metalloenzymes that catalyze the hydroxylation of monophenols to o-diphenols and the oxidation of o-diphenols to o-quinones in the presence of oxygen. In this study, PFO was purified from Cancur plums (*Prunus domestica* L.), collected from Türkgözü village in Posof, Ardahan, Turkey, using Sepharose-4B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity gel. The PPO was characterized with natural and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and in terms of biochemical properties. It was determined to have two isoenzymes by electrophoresis chromatogram on Cancur plum PPO. It was detected that the enzyme showed the highest activity at between 30-40 °C and pH 5.0-7.0 in the presence of *L*-tyrosine, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid, 3,4-propanoic acid, *p*-coumaric acid, catechol and 4-methyl catechol as substrates. Each substrate of cancure plum PPO was found to comply with Michaelis-Menten kinetics. Kinetic data as a Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and a maximum velocity ( $V_{max}$ ) calculated via the drawn-Lineaweaver Burk plot. Cancure PPO was found to have both monophenolase and diphenolase activity. It was determined that catechol is most interested in as substrate and followed by 4-methylcatechol, DHHSA, *L*-tyrosine, DHPPA and *p*-coumaric acid as substrates, respectively. The PPO was inhibited by ascorbic acid, sodium metabisulfite, benzoic acid and sodium azide in the presence of 4-methyl catechol as a substrate. The  $K_i$  values for these inhibitors were found as 0.02, 0.12, 6.0 and 18.3 mM, respectively. The total amount of phenol in aqueous extracts of Cancure plum was determined as  $114.6 \pm 5.0$  mg GAE / 100 g. The antioxidant activity of the extract was found as  $30.19 \pm 0.96$  (mg TEAC / g) with CUPRAC method, as  $1.98 \pm 0.02$  (mg / mL) with DPPH method and as  $2.17 \pm 0.01$  (mg / mL) with ABTS method.

**2015, 100 pages**

**Keywords:** Polyphenol Oxidase, Antioxidant, *Prunus domestica* L

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar.....	3
1.3. Polifenol Oksidazın Reaksiyon Mekanizması.....	7
1.4. Polifenol Oksidazın Substratları.....	16
1.5. Polifenol Oksidazın İnhibisyonu.....	20
1.6. Enzim Aktivitesinin Tayin Metodları.....	21
1.7. Polifenol Oksidaz' ın Kullanım Alanları.....	23
1.8. Serbest Radikaller.....	25
1.9. Antioksidanlar.....	26
1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	27
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1. Materyal.....	29
2.2. Yöntem.....	29
2.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	29
2.2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	30
2.2.3. Kullanılan Çözeltiler.....	31
2.2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	31
2.2.3.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	32
2.2.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	32
2.2.3.4. Gümüş Boyama Çözeltileri.....	33
2.2.3.5. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar.....	34
2.2.3.6. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	34
2.2.3.7. İnhibitör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	35

2.2.3.8.	Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanışı.....	35
2.2.3.9.	Toplam Polifenol Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	35
2.2.3.10.	CUPRAC Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	35
2.2.3.11.	ABTS* Radikali Temizleme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	36
2.2.3.12.	DPPH* Radikali Temizleme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	36
2.2.4.	Deneysel Çalışmalar.....	36
2.2.4.1.	Ham Ekstrağın Hazırlanması.....	36
2.2.4.2.	Afinite Jelinin Hazırlanması.....	36
2.2.4.2.1.	Sepharose 4B' nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması.....	37
2.2.4.2.2.	<i>p</i> -Aminobenzoik Asidin Bağlanması (Ligandın Bağlanması).....	37
2.2.4.3.	Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	38
2.2.4.4.	Protein Tayini.....	39
2.2.4.5.	Elektroforez.....	40
2.2.4.5.1.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	40
2.2.4.5.2.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE).....	41
2.2.4.5.3.	Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R- 250 Boyanması.....	42
2.2.4.5.4.	Gümüş Boyama.....	42
2.2.4.6.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini.....	42
2.2.4.7.	Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	43
2.2.4.8.	Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi.....	43
2.2.4.9.	Antioksidan Testler.....	44
2.2.4.9.1.	Toplam Polifenol Tayini.....	44
2.2.4.9.2.	Bakır İndirgeme Gücü (CUPRAC) Metodu.....	45
2.2.4.9.3.	ABTS* Radikali Temizleme Yöntemi.....	46
2.2.4.9.4.	DPPH* Radikali Temizleme Yöntemi.....	47
3.	BULGULAR.....	49
3.1.	Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	49
3.2.	Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	51
3.2.1.	Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi.....	51
3.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	54
3.2.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	57
3.2.4.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	68



3.2.5.	Cancer Eriği PFO' su İçin İnhibisyon Çalışmaları .....	69
3.2.5.1.	PFO' nun Sodyum Metabisülfid İnhibisyonu .....	69
3.2.5.2.	PFO' nun Askorbik Asit İnhibisyonu .....	70
3.2.5.3.	PFO' nun Sodyum Azid İnhibisyonu.....	71
3.2.5.4.	PFO Benzoik asit İnhibisyonu .....	72
3.2.6.	Bazı Metal İyonlarının PFO Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	73
3.2.7.	Antioksidan Testler .....	74
3.2.7.1.	Cancer Eriğinin Toplam Fenolik Madde Miktarının ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi .....	74
3.2.7.2.	Bakır İndirgeme Gücü (CUPRAC) Metodu .....	75
3.2.7.3.	ABTS* Radikali Temizleme Yöntemi .....	76
3.2.7.4.	DPPH* Radikali Temizleme Yöntemi.....	77
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	80
5.	ÖNERİLER.....	88
	KAYNAKLAR .....	90
	ÖZGEÇMİŞ .....	100

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi) .....	7
Şekil 2.	<i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi). .....	8
Şekil 3.	PFO' nun Bakır Merkezleri. ....	9
Şekil 4.	A) <i>Panulirus interruptus</i> hemosiyaninin <i>deoksi</i> -yapısı. B) <i>Octopus</i> hemosiyaninin <i>oksi</i> -formunun yapısı. ....	10
Şekil 5.	Polifenol Oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi .....	11
Şekil 6.	PFO için önerilen difenolaz çevrimi .....	12
Şekil 7.	Polifenol oksidaz' ın Ribbon resmi ....	13
Şekil 8.	PFO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu. ....	15
Şekil 9.	PFO' nun basit fenolik substratları.....	17
Şekil 10.	PFO' nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları. ....	17
Şekil 11.	Sinnamik asit ve klorojenik asit türevli PFO substratları.....	18
Şekil 12.	PFO' nun flavonoid türevli substratları.....	19
Şekil 13.	PFO' nun flavonoid türevli substratları.....	19
Şekil 14.	Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri .....	22
Şekil 15.	Afinite jeli sentezinin aşamalarında gerçekleşen reaksiyonlar.....	39
Şekil 16.	PFO'nun Cancur Eriğinden Afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların protein-aktivite profili. ....	49
Şekil 17.	Cancur eriği PFO' sunun elektroforez profili .....	50
Şekil 18.	SDS-PAGE elde edilen standart ptoein çalışma grafiği.....	51
Şekil 19.	<i>L</i> -Tirozin substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	52
Şekil 20.	DHSA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	52
Şekil 21.	DHPPA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	53
Şekil 22.	<i>p</i> -Kumarik asit substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	53
Şekil 23.	Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	54
Şekil 24.	4-Metil Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi. ....	54
Şekil 25.	<i>L</i> - Tirozin substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	55

<b>Şekil 26.</b> DHHSA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	55
<b>Şekil 27.</b> DHPPA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	56
<b>Şekil 28.</b> <i>p</i> - Kumarik asit substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	56
<b>Şekil 29.</b> Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	57
<b>Şekil 30.</b> 4-Metil Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	57
<b>Şekil 31.</b> Cancur eriği PFO'sunun L- Tirozin substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	59
<b>Şekil 32.</b> Cancur Eriği PFO'sunun L- Tirozin substratı varlığında.....	59
<b>Şekil 33.</b> L- Tirozin substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi. ....	60
<b>Şekil 34.</b> Cancur eriği PFO' sunun <i>p</i> -kumarik asit substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	60
<b>Şekil 35.</b> Cancur Eriği PFO' sunun <i>p</i> -kumarik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	61
<b>Şekil 36.</b> <i>p</i> -Kumarik asit substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi. ....	61
<b>Şekil 37.</b> Cancur eriği PFO' sunun DHHSA substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	62
<b>Şekil 38.</b> Cancur Eriği PFO' sunun DHHSA substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	62
<b>Şekil 39.</b> DHHSA substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.....	63
<b>Şekil 40.</b> Cancur eriği PFO' sunun DHPPA substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	63
<b>Şekil 41.</b> Cancur Eriği PFO' sunun DHPPA substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	64
<b>Şekil 42.</b> DHPPA substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi. ....	64
<b>Şekil 43.</b> Cancur eriği PFO' sunun katekol substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	65
<b>Şekil 44.</b> Cancur Eriği PFO' sunun katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	65
<b>Şekil 45.</b> Katekol substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.....	66
<b>Şekil 46.</b> Cancur eriği PFO' sunun 4-metil katekol substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.....	66
<b>Şekil 47.</b> Cancur Eriği PFO' sunun 4-metil katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	67
<b>Şekil 48.</b> 4-Metil katekol substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.....	67

<b>Şekil 49.</b> Cancur eriği PFO enziminin +4 °C’ deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği. ....	68
<b>Şekil 50.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum metabisülfite ile inhibisyonu. ....	69
<b>Şekil 51.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum metabisülfite ile inhibisyonu ikincil grafiği. ....	70
<b>Şekil 52.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu. ....	70
<b>Şekil 53.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği. ....	71
<b>Şekil 54.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu. ....	71
<b>Şekil 55.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu ikincil grafiği. ....	72
<b>Şekil 56.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu. ....	72
<b>Şekil 57.</b> Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği. ....	73
<b>Şekil 58.</b> Toplam fenolik madde tayini için galik asit kalibrasyon grafiği. ....	75
<b>Şekil 59.</b> CUPRAC metodu ile elde edilen standart troloksun kalibrasyon grafiği. ....	76
<b>Şekil 60.</b> BHT standartına ait ABTS’ radikali temizleme aktivitesi grafiği. ....	77
<b>Şekil 61.</b> Cancur eriği ekstraktına ait ABTS’ radikali temizleme aktivitesi grafiği. ....	77
<b>Şekil 62.</b> Troloks standartına ait DPPH• radikali temizleme aktivitesi grafiği. ....	78
<b>Şekil 63.</b> Cancur eriği ekstraktına ait DPPH• radikali temizleme aktivitesi grafiği. ....	78

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları. ....	29
<b>Tablo 2.</b> Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları. ....	30
<b>Tablo 3.</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları. ....	41
<b>Tablo 4.</b> Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları. ....	41
<b>Tablo 5.</b> Toplam fenolik madde tayini için deney şartları ....	45
<b>Tablo 6.</b> CUPRAC yöntemi için pipetleme değerleri. ....	46
<b>Tablo 7.</b> ABTS' radikal temizleme yöntemi için deney şartları. ....	47
<b>Tablo 8.</b> DPPH' radikal temizleme yöntemi için deney şartları. ....	48
<b>Tablo 9.</b> Cancur Eriğinden saflaştırılan PFO' ya ait saflaştırma tablosu. ....	50
<b>Tablo 10.</b> Cancur eriği PFO' sunun bazı substratları varlığında biyokimyasal ve kinetik verileri. ....	58
<b>Tablo 11.</b> İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyon aktivitesi üzerine etkisi. ....	73
<b>Tablo 12.</b> Bazı Metal İyonlarının Cancur eriği aktivitesi üzerine etkisi. ....	74
<b>Tablo 13.</b> Cancur Eriğinin ( <i>Prunus domestica</i> L.) Antioksidan Seviyeleri ....	79

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
BSA	Sığır serum albümin
EU	Enzim ünitesi
EU/mg	Özgül aktivite
kDa	Kilo dalton
$K_i$	İnhibisyon sabiti
$k_{kat}$	Enzim dönüşüm sayısı
$K_m$	Michaelis-Menten sabiti
MOPS	3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
PMSF	Fenilmetilsülfonoflorid
SC <sub>50</sub>	Radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren özüt konsantrasyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
$V_{maks}$	Maksimum hız

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Birçok besin dokusunda, toplama ve depolama esnasında, çarpma, kesme, dilimleme ve kabuk soyma gibi fiziksel işlemler sonucunda sarıdan kahverengine kadar gelişebilen renk değişimleri meydana gelir. Esmerleşme genellikle fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu ve takibinde bu reaktif ara ürünler enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonlarıyla hızlı ve kolay bir şekilde polimerleşerek koyu renkli ve suda az çözünen melanin olarak bilinen pigmentlerin oluşmasıyla son bulan bir takım reaksiyonlar zinciridir (Whitaker, 1972; Friedman, 1997; Laurila vd., 1998). Bu kahverengi pigmentin oluşumu bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez bu oksidasyon işlemleri istenilen seviyede durdurulamadıklarında özellikle besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında besinlerin duyuşal ve besinsel özelliklerinde değişimlere sebep olurlar. Bu özellikle besinin renk, koku ve besin değerinde istenmeyen değişimler şeklinde ortaya çıkar. Bunlar da besinin, hem besinsel değerini hem de ekonomik değerini azaltır (Whitaker ve Lee, 1995).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin olgunluğuna göre değişim gösterirken esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif polifenol oksidaz (PFO) konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir (Mayer ve Harel, 1981, 1991; Lee, 1992; Fragnier vd., 1995; Yoruk ve Marshall, 2003). Bu faktörlerden birinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla, enzimatik esmerleşme reaksiyonları durdurulabilir veya kontrol edilebilir.

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, özellikle ısı etkisi ile artan bir esmerleşmeye uğradıkları gözlenmektedir. Kurutulmuş ürünlerde renk esmerleşmesi daha çok enzimatik olmayan bir yolla meydana gelmektedir. Esmerleşme olayı, üretim sırasında uygulanan ısıl işlem sonucu oluştuğu gibi depolama sırasında da yavaş bir hızda devam etmektedir. Buna göre bu tip esmerleşme

reaksiyonları ısı ile şiddetlenen ve düşük sıcaklıklarda zamana bağlı olarak sürekli artan bir olaydır (Wetherilt vd., 1992).

Enzimatik olmayan esmerleşme diye bilinen renk değişimleri, aminoasitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi reaksiyonun sonucudur ve oksijensiz ortamda da yürüyebilir. Koku ve renkte bir iyileştirme sağlayan bu reaksiyonlar lezzet endüstrisinde oldukça önemlidir. Olayın ilk aşamasında, amino grubu, şekerin indirgen hidroksil grubuna bağlanarak N-glikozitleri oluşturmaktadır. Bunu izleyerek gelişen karmaşık polikondensasyon olayları sonucunda, esmer renkli "melanoidin" adı verilen bileşikler oluşmaktadır. Enzimatik olmayan renk bozulmaları, ısı, ışık, metaller ve oksijen gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986; Bolin ve Steele, 1987).

Besinlerde esmerleşme denildiği zaman, genellikle besinin üretiminden oluşum sürecine kadar, esmerleşmenin zararlı etkileri belirtilir. Ancak bazı enzimatik esmerleşme reaksiyonları, besin için çok faydalıdır. Çay, kahve ve kakao, birçok ülke için oldukça önemli ürünlerdir (Ensminger vd., 1995). Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi, özellikle fermentasyon ve kuruma döneminde enzimatik esmerleşmeye bağlıdır. Ayrıca, üzüm, erik, hurma ve incir gibi bazı meyvelerin kurutulmasıyla, karakteristik sarı veya kahverengini almaları da enzimatik esmerleşmenin bir sonucudur.

Polifenol oksidazların, böcek ve mikroorganizmaların bitkilere saldırmasını ve çürük oluşumunu önlemede anahtar fizyolojik rol oynadığı düşünülür. Meyve ve sebzeler olgunlaştıkları zaman, onların fenolik bileşenlerinde meydana gelen azalmadan dolayı, hastalıklara karşı hassasiyetleri artar. PFO, fenolik bileşiklerden kinonların oluşumunu katalizler ve oluşan kinonlar, polimerizasyon reaksiyonlarıyla polimerleşirler. Bu polimerleşme, antibakteriyal ve antifungal aktivite gösteren melaninlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Oluşan bu melaninler, aynı zamanda sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına yardımcı olur (Marshall vd., 2000).

Enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin, antibakteriyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olmaları, araştırmacıların enzimatik esmerleşmeye



büyük bir ilgi duymasına neden olmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için, besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işleminin meydana gelmesi mümkündür. Bu nedenle, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konulması, etkilerinin anlaşılması ve çözümler bulunması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından oldukça önemlidir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en geçerli yöntem, PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren, uygun yeni teknolojilerle birlikte, meyve ve sebzelerin kişi başına düşen tüketimindeki artış, birçok ülke için ekonomik yararlar sağlayacaktır (Labuza vd., 1992).

Bu çalışmada Ardahan İli Posof ilçesi Türkgözü Köyü' nden alınan Cancur Eriğinden (*Prunus domestica* L.) PFO'nun saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Cancur Eriği PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun reaksiyon ortamının sıcaklığının, pH'ın ve çeşitli inhibitörlerin etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda erik ekstraktında antioksidan analizleri yapılmıştır.

## **1.2. Polifenol Oksidaz ve Bulunduğu Organizmalar**

Bakır içeren proteinlerin bir grubu olan polifenol oksidazlar, oksidoredüktaz sınıfının bir üyesi olup enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (EC.1.14.18.1) (Robb, 1984; van Gelder vd., 1997; Dincer vd., 2002). PFO oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birincisi, monofenolik bileşiklerin o-difenollere hidroksilasyonu olan monofenolaz aktivitesi, diğeri ise, o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu olan difenolaz aktivitesidir (Yang vd., 2000). Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinonoid maddeler kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler şeklinde polimerleşirler (Whitaker, 1972; Friedman, 1996, 1997).

PFO, memeliler, mikroorganizmalar, meyve, sebze, mantarlar ve deniz ürünlerine kadar çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunur. Buna ek olarak, bazı toprak türlerinde, glikoz oksidaz gibi oksidoredüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO' nun varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar vd., 1989; Mos' ko vd., 1992; Gul' ko, ve Khaziyeve, 1993). Farklı bitkilerin PFO içeriği, bitkinin türüne ve yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi, meyve ve sebzelerin olgunluğuna, bitkilerin ise türüne ve yaşına, bağlıdır (Harel vd., 1964; Tolbert, 1973; Stephens ve Wood, 1974; Padron vd.,1975; Mayer, 1987).

Elmadaki PFO' nun hem monofenolaz aktivitesi hemde difolaz aktivitesi ve bu aktiviteye çok çeşitli inhibitörlerin etkisi incelenmiştir (Nicolas, 1994). Monofenolaz aktivitesi enzim izolasyonu işlemlerine duyarlı olmasından dolayı ekstraksiyon sırasında çok düşük oranlarda ve NMR spektroskopisi ya da HPLC gibi teknikler yardımıyla tespit edilmiş, ancak son yıllarda geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağımlılığı izlenebilmiştir. PFO Triton X-114 deterjanı ile izole edilip kısmen saflaştırılmış ve kinetik karakterizasyonu sonucunda enzimin tek bir aktif bölgeye sahip olduğu ve katalitik işlemler sırasında iki farklı konformasyonu halinde bulunabileceği ileri sürülmüştür (Espin, 1995).

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

Döngel (*Mespilus germanica* L.) meyvesinde ki PFO enziminin monofenolik ve difenolik subtratlar içersinde en iyi substrat olarak 4-metil katekol olduğu belirlenmiştir. Monofenolik substratlara karşı döngel meyvelerinde ki enzimin zayıf aktivite gösterdiği belirlenmiştir. PFO enzimin optimum pH' sının 7, optimum sıcaklığının 30 °C olduğu belirlenmiştir. 4-metil katekol için  $K_m$  değeri 26 mM, en iyi inhibitörün sodyum

metabisülfid olduğu,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  iyonlarının difenolaz aktivitesini kuvvetlice inhibe ettiği belirlenmiştir (Ayaz vd., 2008).

Malatya kayısı ( *Prunus armeniaca* L.), Türkiye’ de yetiştirilen kayısı türleri arasında en iyisi olan Malatya kayısı depolanma esnasında kararma olmakta ve bu da ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında ve fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Augustin vd., 1985). Değişik substratlara karşı aktivite belirlenmiş ve en iyi aktiviteyi katekol substratına karşı gösterdiği belirlenmiştir. Bu substrat için  $K_m$  değeri 6.6 mM, optimum pH’ sının 8.5 olduğu belirlenmiştir. Enzimin monofenolaz aktivitesine sahip olmadığı, askorbik asit ve 2-merkaptetanolün bu enzim için en iyi inhibitör olduğu belirlenmiştir (Arslan vd., 1998).

Çeşitli meyve kültürleri arasındaki esmerleşme derecesinin PFO aktivitesindeki farklılıklara ve fenolik içeriğine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu meyve kültürlerinden şeftalinin tanin içeriğinin ve fenolik substratların konsantrasyonunun meyvenin gelişimi sırasında düzenli bir şekilde azaldığı ve hasat dönemine kadar bu düzeylerde kaldığı tespit edilmiştir. Şeftalideki PFO aktivitesi de fenolik bileşiklerin içeriğine bezer bir şekilde değişim göstermiştir. Yüksek PFO aktivitesine sahip şeftali kültürlerinin yüksek derecede esmerleşme hızına sahip olduğu gözlenmiştir (Lee, 1990). Şeftali dışında kayısı, erik, badem ve kiraz gibi meyvelerde de PFO’ ların aktif ve inaktif formları Triton X-100 ile kısmen izole edilmiş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 4.0-5.5 değerlerinde olduğu tespit edilmiştir. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile yapılan elektroforetik çalışmalarla ve Western emdirme yöntemiyle de elma ve fasulye yapraklarına karşı geliştirilen antikolar kullanılarak bu aktif ve inaktif formlar gözlenmiş ve aktif formların temel bir formun proteolizi sonucu oluştuğu gözlemlenmiştir. Denatürasyon şartlarında temel aktif formların 63 ve 43 kDa’ luk molekül ağırlıklarına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlardan farklı türler arasında PFO’ ların biyokimyasal karakterleri açısından birçok temel benzerliklerin olduğu ortaya çıkmıştır (Fraignier, 1995).

Zeytinde görülen kararmalar fenolik içeriğe ve PFO enzimin aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Esmerleşme sonucu oluşan renk, sofralık siyah zeytin için

istenilen bir değişimdir. Polifenollerin oksidatif kararması, zeytinde bulunan enzimlerin (difenolaz) veya zeytinde bulunmayan ve dışarıdan katılan metal katyonların katalitik etkisiyle oluşmaktadır (Garcia vd., 1996; Robards vd., 1999). ukurova bölgesinde yetiştirilen Domat eşidi zeytinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan PFO enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikler araştırılmış, substrat olarak 4-metil katekol kullanılmıştır. Enzimin  $K_m$  değerinin 14.52 mM,  $V_{maks}$  değerinin ise 1.3  $\mu\text{M}/\text{dk}$  olduğu bulunmuş. PFO aktivitesi için optimum pH değeri 4.5 optimum sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuş. Çeşitli inhibitörler kullanılarak en düşük inhibisyonun askorbik asit varlığında olduğu tespit edilmiştir.

Yemeklik olarak tüketilen fasulye esmerleşme reaksiyonlarına maruz kalarak rengine değişim gösterir. Bu reaksiyonlar bitkinin besinsel değerinde bir kayba yol atığından, esmerleşme reaksiyonunun bu bitkide kontrol edilebilmesi için saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmaktadır. Yapılan alışmalar arasında İspir şeker fasulyesinden polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürülmesiyle izole edilerek biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Katekol substratı varlığında optimum pH' sı 5.5, optimum sıcaklığının 40 °C,  $K_m$  değerinin 2.4875 M,  $V_{maks}$  değerinin 3.148  $\text{EU mL}^{-1}\text{dak}^{-1}$  tespit edilmiştir.

Avokado bitkisinde monofenolaz aktivitesi tespit edilmiş ve PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980). Avokado monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan ekstraktlar kullanılarak ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Triton X-114 deterjanı kullanılarak kısmen izole edilip 4-hidroksi anisol substratı varlığında avokado PFO enzimi karakterize edilmiştir (Espin, 1997).

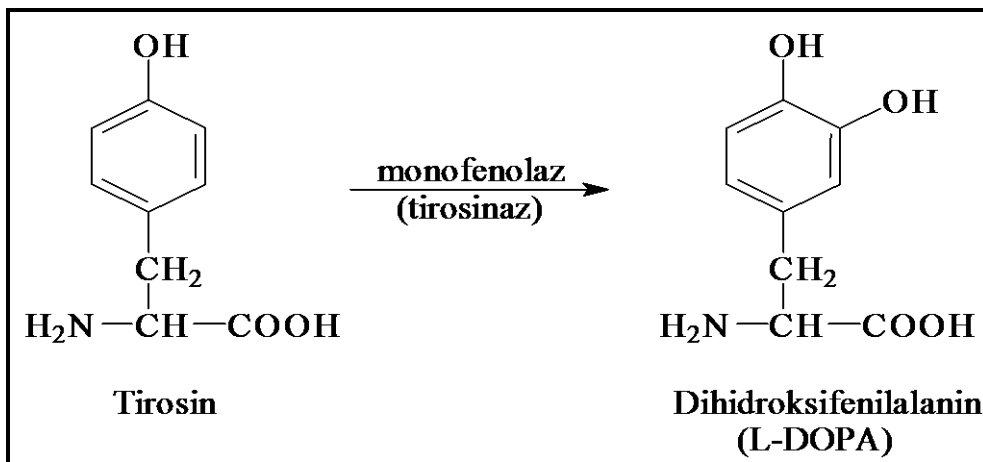
Patateste PFO aktivitesi saplarda düşük seviyede olurken özellikle yumru, kök ve hücrelerde oldukça yüksek olduğu gözlemiştir. Karakterize edilen PFO genlerinin pek çoğu fotosentetik dokulardan izole edilmiştir. Ancak bu enzimler fotosentetik olmayan dokularda da bulunmaktadır. PFO tarafından katalizlenen enzimatik esmerleşme özellikle *Solanum tuberosum* (patates) yumrularında ortaya çıkmıştır (Corsini, 1992). Patatesden izole edilen iki PFO geninin yaprak, iek ve köklerde ifade edildiği,

yumrulara ekspresyon gözlenmediği belirtilmiştir (Hunt, 1993). Bununla birlikte, doku hasarını takiben yumrulara da PFO aktivitesinin yüksek düzeylerde olduğunu ve bunun neticesinde enzimin bitki savunma sisteminde rol oynayabileceği tespit edilmiştir (Thygesen, 1994).

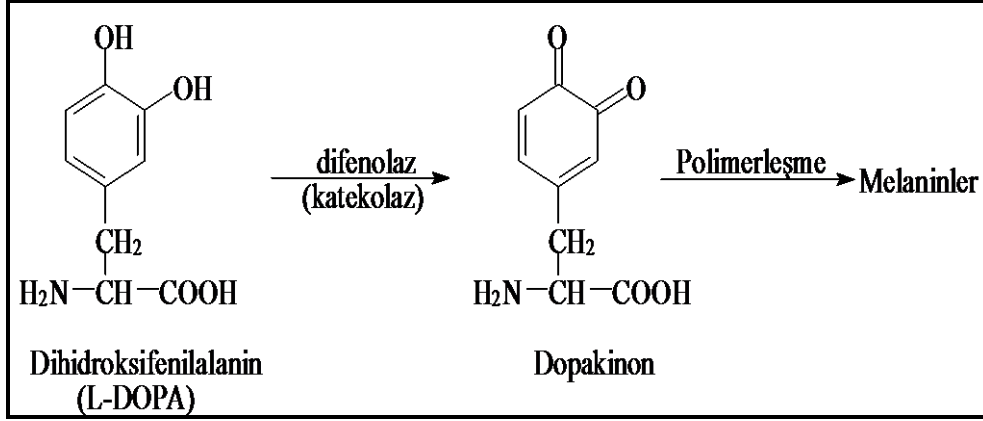
Karayemiş bitkisinin (*Laurocerasus officinalis* Roem.) henüz olgunlaşmamış meyvelerinde yapılan incelemede 3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik asit (DHPPA) substratı varlığında optimum sıcaklığın 40 °C olduğu, optimum pH'ın 5.0 olduğu ve alkali pH' larda enzimin % 80 aktivitesinin kaybolduğu bulunmuştur.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

### 1.3. Polifenol Oksidazın Reaksiyon Mekanizması

Uluslararası Biyokimya Derneği (IUB)' ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün PFO' ların yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için, birinci sınıf enzim olarak adlandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre PFO, iki farklı aktivite göstermektedir. Bunlardan ilki, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1) ve enzimin bu aktivitesi, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır. Bir diğer aktivite ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile oluşan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve bu enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Fenol vd., 200; Espin vd.,2001; Brooks vd.,2004) (Şekil 1-2).



Şekil 1. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)

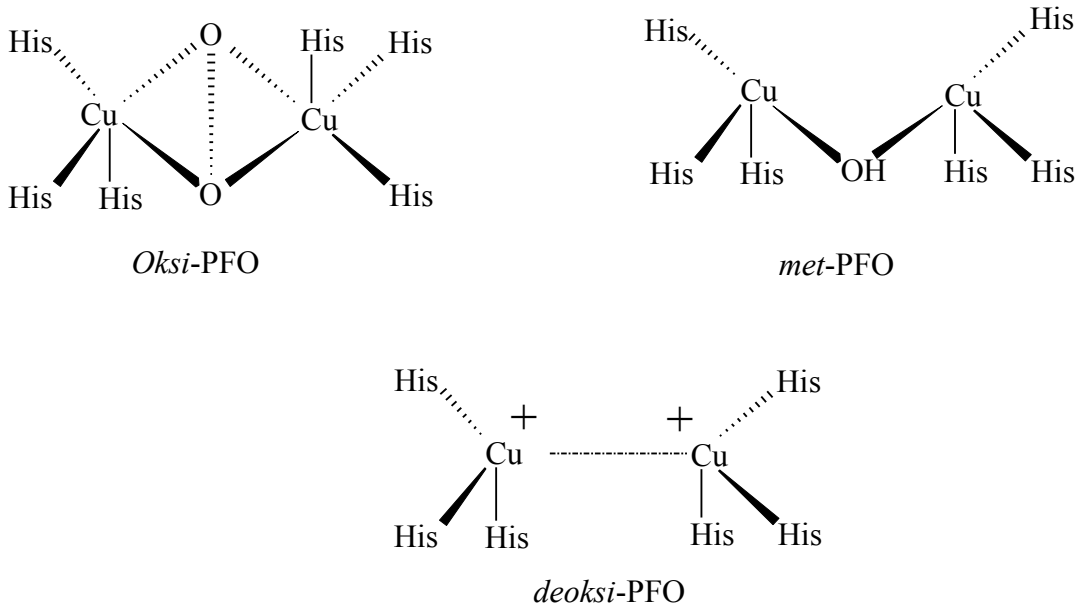


Şekil 2. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi).

PFO ortalama 55–65 kDa molekül ağırlığına sahip olup enzimde iki bağlanma bölgesinin bulunduğu belirtilmiştir. Patates, tütün ve mantarda bakır içeriklerinin % 0.2-0.3 arasında değiştiği bulunmuştur. Taze hazırlanan enzim ekstraktlarında bakırın Cu(I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu(I)' in Cu(II)' ye yavaşça okside olduğu gözlenmiş olup bu değişimin herhangi bir aktivite kaybı olmadığı tespit edilmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değilken Cu(II) ilave edilmesi ile aktivite geri kazanılabilmektedir (Kertesz, 1962). Apoenzim, saf enzimin sulu çözeltisinin potasyum siyanür içeren çözeltiliye karşı diyaliz edilmesiyle hazırlanmıştır. Saf PFO enzimi renksiz iken benzer aktivite gösteren lakkaz enzimi mavi renklidir. Konsantre edilen PFO çözeltileri nötral pH değerleri oldukça kararlı olup kısa bir süre için 60 °C ye kadar ısıtıldığında ise enzimin katalitik fonksiyonu tamamen veya kısmen kaybetmektedir (Ulrich, 1975). Bu enzimin nötral pH değerlerinde ve fosfat tamponundaki konsantre çözeltileri -25 °C de dondurulmuş olarak aktivite kaybı olmaksızın birkaç ay saklanabilir. Ancak daha uzun süreli saklamalarda aktivite kaybı olur ve aktivitede ki bu kayıp dönüşümsüzdür. Bu işlem sırasında Cu (I) okside olarak Cu (II) dönüşür ancak aktivitede ki bu kayıp oksidasyondan kaynaklanmaz. PFO aktivitesi, bakır ile kararlı kompleksler oluşturabilen H<sub>2</sub>S, KCN, CO ve *p*-aminobenzoik asit ile inhibe edilebilir.

PFO' nun fenolik bileşikler üzerindeki etki mekanizması oldukça kompleksdir. PFO prostetik grup olarak bakır iyonu ihtiva eder, bakırın valens durumu PFO aktivitesini sağlar (Kolcuoglu vd., 2007). Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu PFO' ların aktif bölgesinin binükleer bakır kompleksine sahip olduğu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığı göstermektedir (Marusek vd., 2006) (Şekil 3). PFO' ların

katalitik etki mekanizması çeşitli çalışmalarla ortaya koyulmuştur. İlk önce enzimin deoksi formu oksijen ile oksi-PFO formunu oluşturur ve fenolik substrat bu oksi-PFO formundaki bakır atomlarının birine aksiyel olarak koordine olur. Oluşan beş-koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesini takiben fenolik substratın orto-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir. Molekül içi elektron transferi sonucu orto-benzokininon ürünü oluşur ve bu esnada enzimin deoksi-PFO hali böylece yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir (Şekil 3).

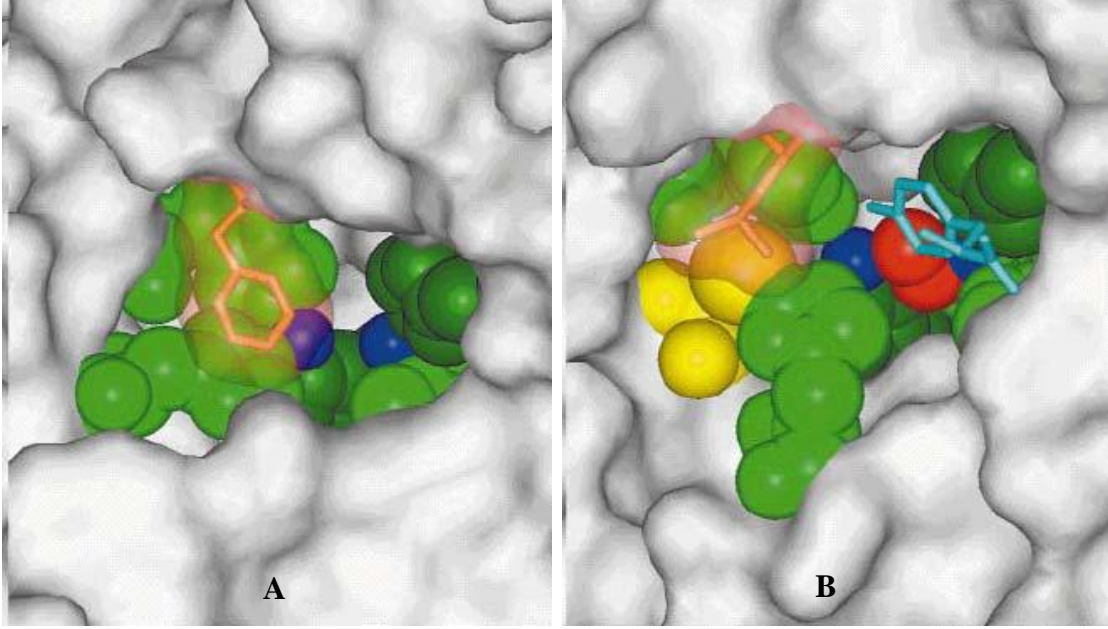


**Şekil 3.** PFO' nun Bakır Merkezleri.

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

PFO'nun aktif bölgesi hemosiyaninin aktif bölgesiyle benzerdir (Şekil 4). Hemosiyaninler, PFO' lardaki substrat-aktif bölge arasındaki ilişkiyi anlamak için bir model sistem olarak kullanılır (Decker ve Tuczek, 2000). Bu model sistemler üzerinde

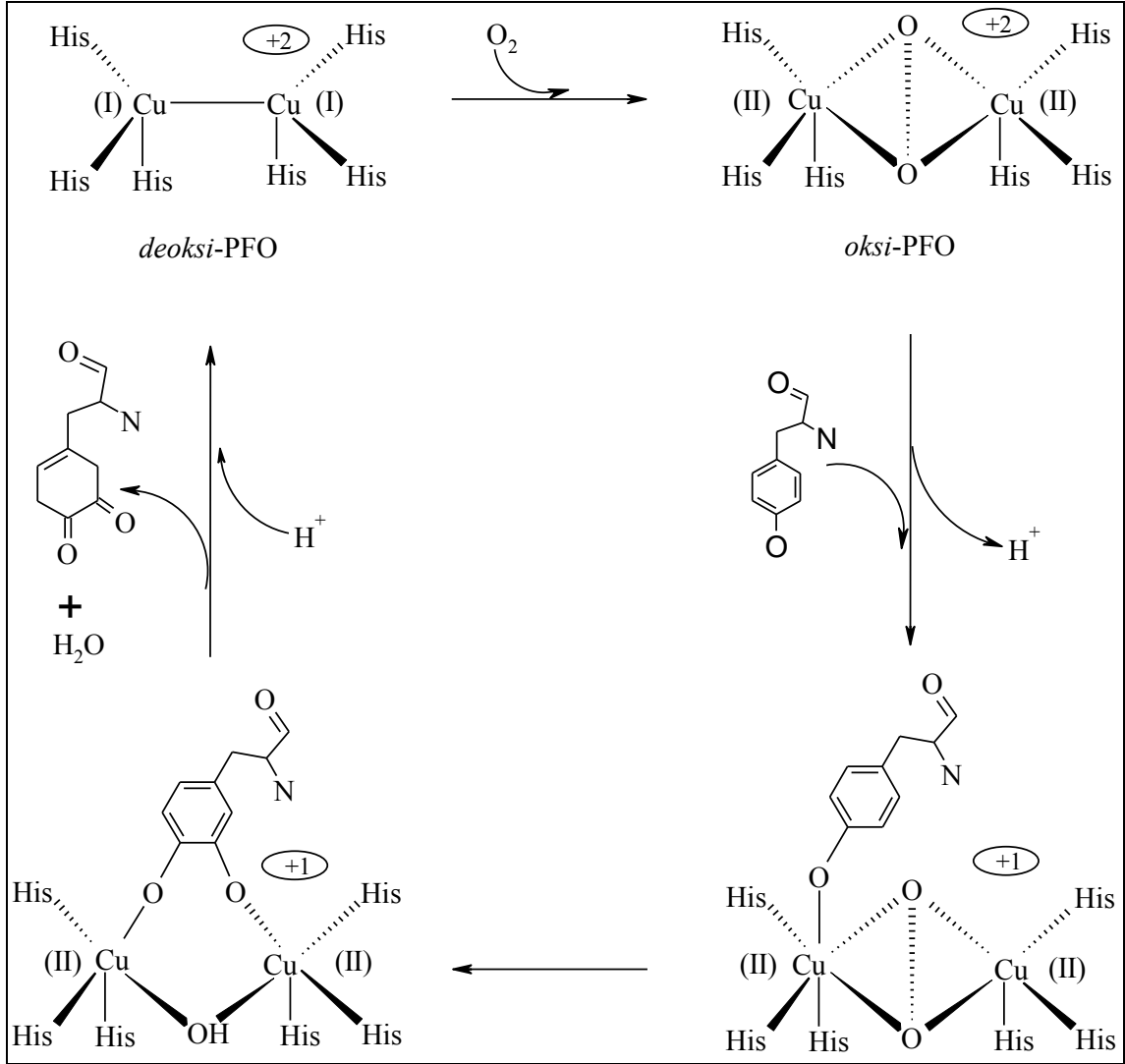
gerçekleştirilen araştırmalar, monofenollerin PFO katalizli dönüşümlerinin, substratın enzimin *oksi-* formuna bağlanması ile başladığını ortaya koymuştur.



**Şekil 4.** A) *Panulirus interruptus* hemosiyaninin *deoksi-*yapısı. Bakır atomları mavihistidinler yeşil; Phe351 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000);  
B) *Octopus* hemosiyaninin *oksi-*formunun yapısı. Açık mavi: tirosin substratı; histidin yeşil; sistein sarı; bakır mavi; oksijen kırmızı; Leu2689 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000).

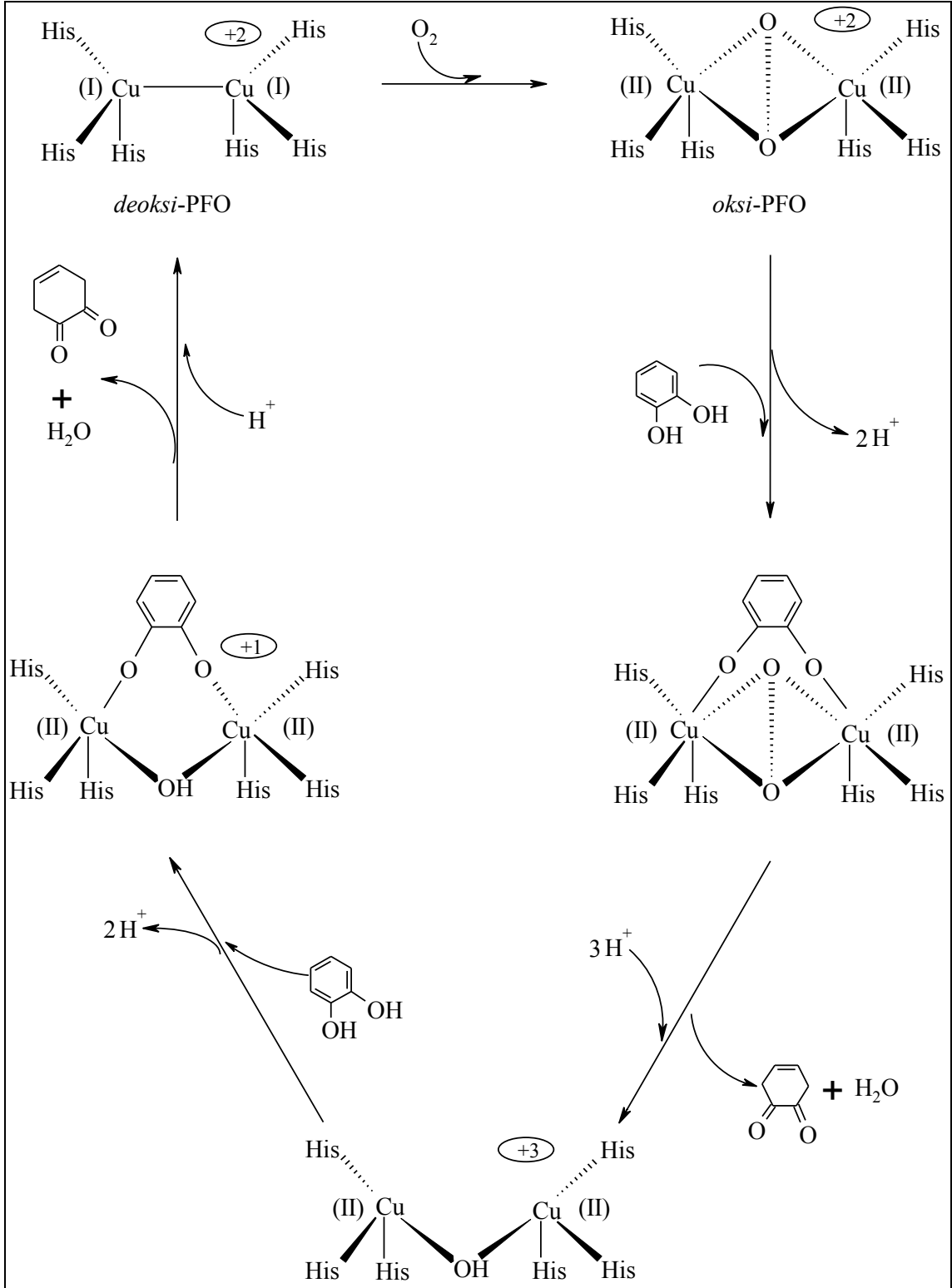
Polifenol oksidazın monofenolaz ve difenolaz çevrimlerinin, genellikle birbirlerine bağlantılı oldukları ifade edilir. Önce monofenolaz çevriminde bir difenol üretilir (kresolaz reaksiyonu) ve bundan sonra difenolaz çevriminde (katekolaz reaksiyonu) kullanılır.





Şekil 5. Polifenol Oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003).

Monofenolaz çevriminde, deoksi-formundaki enzim oksijenle oksiforma dönüşür. Bununla birlikte fenolün hidroksi grubu, oksiformundaki [Cu(I)-O<sub>2</sub>-Cu(I)] PFO' nun bir bakır atomuna aksiyal pozisyonda bağlanır. Bu bağlanmayı orto-pozisyonda bir oksijenlenme takip eder. PFO' nun bir monofenölü dönüştürebilecek tek aktif merkez formu oksiformudur. Bu form, Cu(I)-O<sub>2</sub>-Cu(I) şeklinde yazılabilir, fakat daha uygun olarak peroksid [Cu(II)-O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Cu(II)] şeklinde ifade edilir. Substratın bağlanmasından sonra oluşan bu beş koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesini takiben, fenolik substratın *orto*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir (Şekil 5).

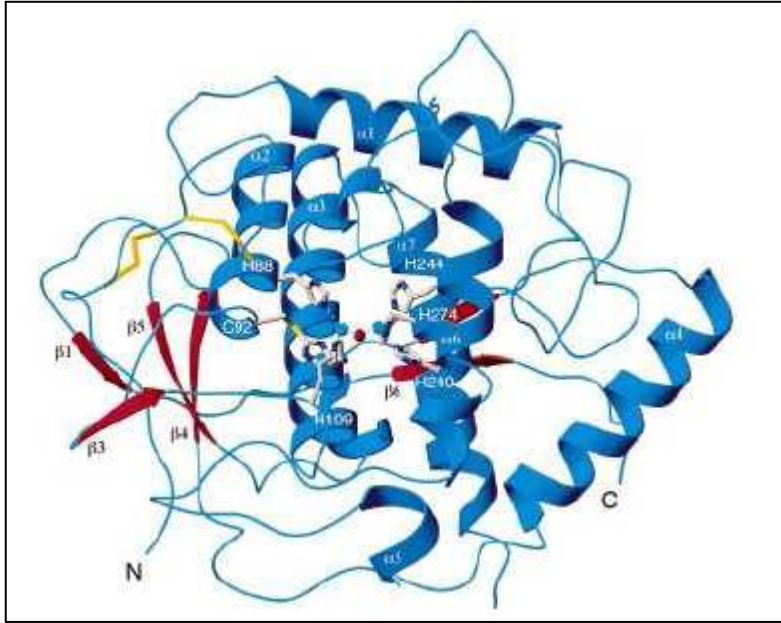


Şekil 6. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003).

Difenolaz çevriminde, oksii-formdaki PFO ya bir difenol bağlanır. Molekül içi elektron transferi sonucu *orto*-benzokinon ürünü oluşur ve bu sırada enzimin *deoksi*-formu, yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir.

Oluşturulan o-kinon bileşikleri, canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı bir şekilde kolayca polimerleşerek, koyu kahverengi suda az çözünen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşturulur. Hem monofenolaz ve hem de difenolaz çevrimlerinde görüldüğü gibi, katalitik çevrimlerin ilginç bir tarafı, net reaksiyonda dışarıdan her hangi bir protona ihtiyaç duyulmamasına rağmen, oldukça yoğun bir proton akışının var olmasıdır. Örneğin, difenolaz çevriminde (Şekil 6) O-O bağının parçalandığı sırada üç protona ihtiyaç vardır.

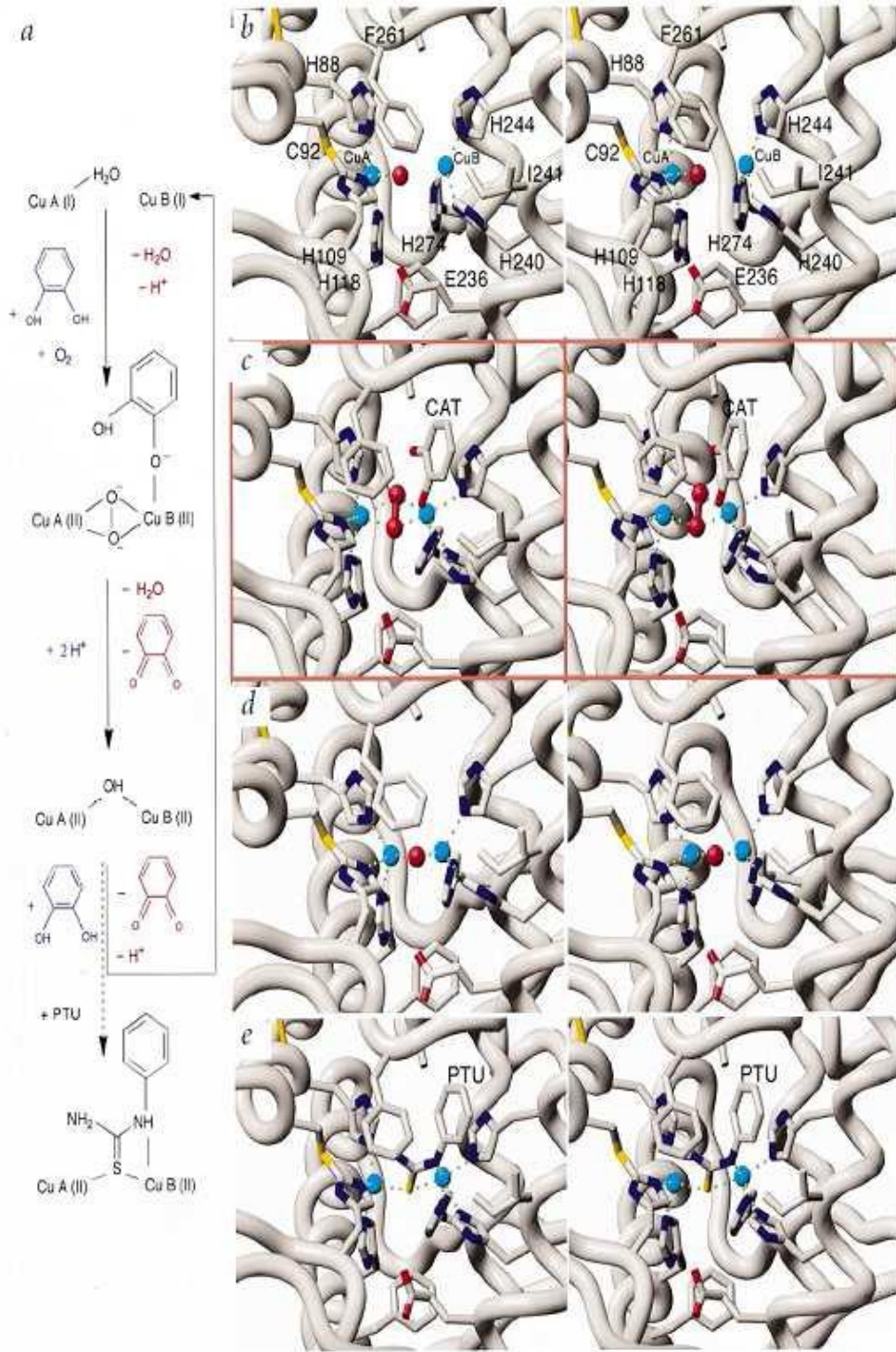
Klabunde vd. (1998) Tip 3 bakır merkezli polifenol oksidaz enziminin katalitik mekanizmasını anlamak amacıyla Cu(II)-Cu(II) yükseltgenme bölgesinde Cu(I)-Cu(I) indirgenmiş form ile feniltiyoüre (PTU) inhibitor kompleksiyle patates PFO enziminin üç boyutlu kristal yapısını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada enzimin difenolaz aktivitesini de göstermişlerdir(Şekil 7 ve 8).



**Şekil 7.** Polifenol oksidaz' ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı renkle gösterilmiştir) (Klabunde vd., 1998).

PFO' nun (katekol oksidaz, tirozinaz) iki çekirdekli bakır merkezi moleküler oksijenin dört elektronunu suya indirgemesiyle katekolün oksidasyonunu katalizler (Şekil 8). Önerilen biyokimyasal yol (Wilcoks vd., 1985; Solomon vd., 1996), spektroskopik (Eicken vd., 1998) ve sunulan yapısal verilere dayanır. Buna göre iki oksijen iki bakır içeren metal merkeze bağlanmak için indirgenmiş formdaki enzimde

CuA' ya bağlı çözücü molekülüyle yer değiştirir(şekil 8b, 8a). PFO' da Phe261 yan zincirinin rotasyonu iki bakır merkezini açar ve katekol substratının bağlanmasına izin verir.



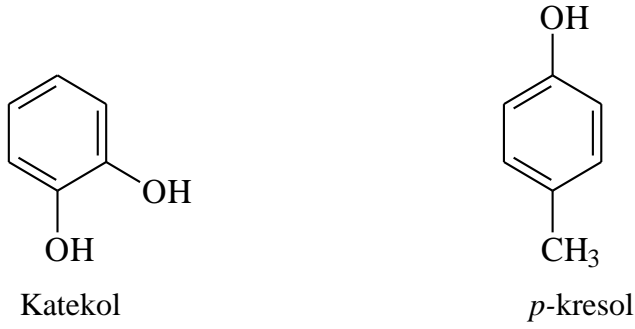
**Şekil 8.** PFO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu. *a*, üç basamakta sematik olarak gösterilen PFO tarafından katalizlenen reaksiyon yolu: yükseltgenmiş iki katekol molekülü suya indirgenmiş iki oksijen molekülüyle çiftleşir. PTU'nun bağlanması en altta gösterilmiştir. *b-d*, kristallografik analizlerden alınan üç reaksiyon basamağının üç boyutlu yapısı. PPO-O<sub>2</sub><sup>2-</sup> CAT kompleksi *c*' de *e* (inhibitör PTU'nun bağlanması) rehber alınarak gösterilmiştir (Klabunde vd., 1998).

PFO ve feniltiyoüenin (PTU) inhibitor kompleksi için bağlanma modu incelendiğinde (Şekil 8e, 8a) CAT' ün ve oksijenin aynı anda bağlanmasının mümkün olduğu söylenebilir. PPO-PTU inhibitor kompleksine dayanarak, tek dişli bağlanma modeline göre (Şekil 8c, 8a) CAT iki hidroksil grubundan birinin protonunu CuB' ya vererek bağlandığı söylenebilir. Dimetal merkeze yakın bir çözücü molekülüne hidrojen bağıyla bağlı Glu236 substratın deprotonasyonuna yardımcı olmaktadır. Glu236 ve substratın ikinci koordine olmamış hidroksil grubu bir proton vererek su çıkışına ve o-kinon çıkışına sebep olur (Şekil 8d, 8a).

#### **1.4. Polifenol Oksidazın Substratları**

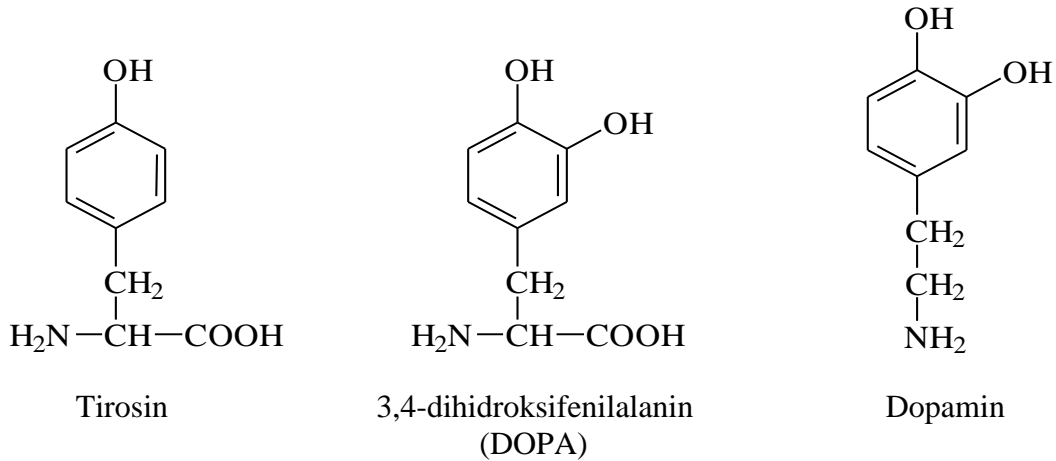
Sebze ve meyvelerde çok eşitli fenolik bileşikler içermesine rağmen bunlardan çok az kısmı PFO' ya substrat olabilmektedir. Fenolik ve polifenolik bileşikler sayısız bitki türünde ikincil metabolitler oldukları ve bu bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin, bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunma sisteminde rol oynadıkları tahmin edilmektedir. PFO ile katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Polifenolik bileşiklerin ayrıca antimutajenik, antikanserojenik, antigliserik ve antioksidatif özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir. Bu özellikler, küf oluşumunun engellenmesi ve proteinsel besin değerinin artırılması amacıyla kullanılabilir (Friedman, 1997). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, bitkini türüne, kültürünün yapılmasına, büyüme ve saklanması sırasında çevresel şartlara ve olgunlaşma derecesine göre çeşitlilik göstermekte hem de bitkinin rengine ve tadına da katkıda bulunmaktadır (Marshall vd., 2000).

PFO' nun en yaygın olan substratları basit yapılı fenoller, klorojenik asit ve türevleri flavonoid tipi fenollerdir. Basit fenoller, katekol ve kresol gibi bileşiklerin yanında trozin ve türevleri ile sinnamik asit türevleride oluşur (Şekil 9).



**Şekil 9.**PFO' nun basit fenolik substratları.

Birçok besin maddesinde bulunabilen tirosin, enzimatik oksidasyon sonucu, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan substratlardandır (Şekil 10).

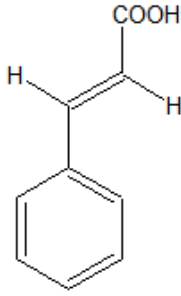


**Şekil 10.** PFO' nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları.

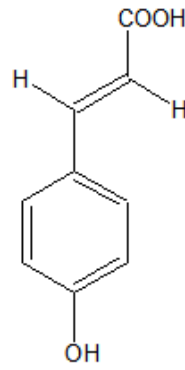
Sinnamik asit daha çok klorojenik asit türevleri ve flavonoidlerin oluşturulmasında rol oynar (Şekil 11). Bu türevlerin pek çoğu enzimatik olmayan yollarla bitkilerde esmerleşme reaksiyonlarına katılırlar. Patates klorojenik asit, patates yumrularının fenolik içeriğinin yaklaşık % 90' ını oluşturur ve bu bileşiğin birçok izomeri çeşitli teknikler yardımıyla tespit edilmiştir. Patates, şeftali ve fasulye yaprağı PFO aktiviteleri, klorojenik asit ve kafeik asit varlığında oldukça farklılık gösteriyorken, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin varlığında benzer aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Whitaker, 1972).

Flavonoidler ise bitkilerin çeşitli dokularında ve çok farklı oranlarda dağılmışlardır. Çoğunlukla kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında diğer

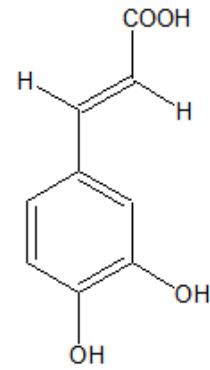
bölgelere oranla daha yoğun bulunmaktadır. Çeşitli oranlarda bulunsalar bile flavonoid yapılı bileşikler bitkide esmerleşme reaksiyonunun meydana gelmesi için yeterlidir. Birçok bitki izolatlarında bağıl oranlar açısından farklılık gösteren flavonoid sistemine sahip çok çeşitli sayıda bileşik tespit edilmiştir.



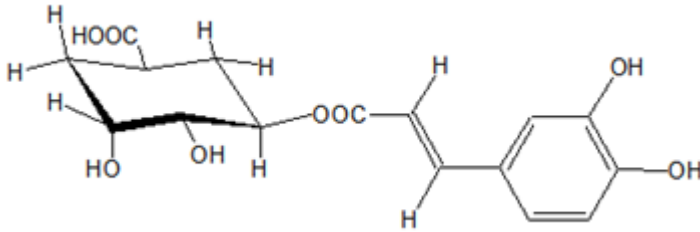
Sinnamik asit



*p*-Kumarik asit



Kafeik asit

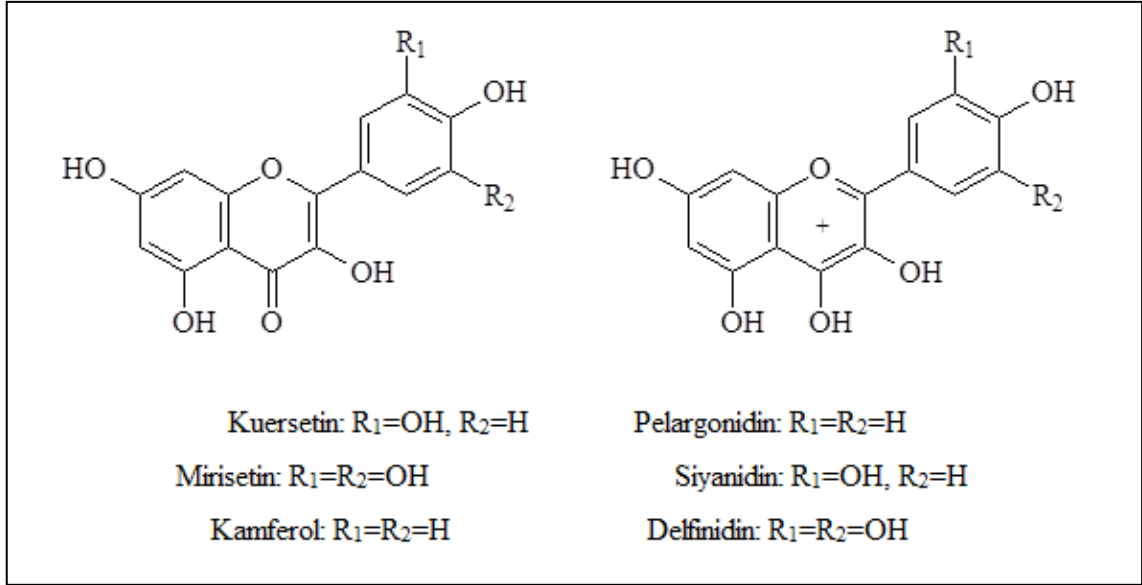


Klorojenik Asit (5-O-kafeilklinik asit)

**Şekil 11.** Sinnamik asit ve klorojenik asit türevli PFO substratları.

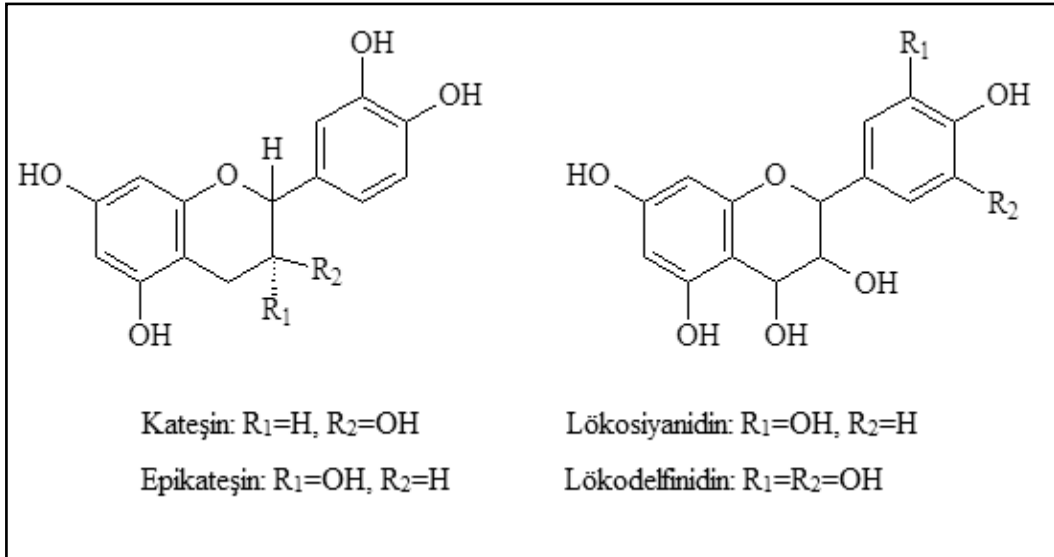
Flavonoller, antoksanin pigmentleri olarak da tanıplanıp çok çeşitli teknikler yardımıyla izole edilip karakterize edilmişlerdir. Bu yapılar birçok durumda mirisetin, kuersetin ve kamferol olarak isimlendirilen birçok türevleri halinde esmerleşme reaksiyonlarına doğrudan katılırlar. Antosiyaninler ise, pelargonidin, siyanidin ve delfinedin olarak tanımlanan türevleri halinde daha çok ikincil reaksiyonlarda rol oynarlar (Şekil 12).





**Şekil 12.** PFO' nun flavonoid türevli substratları.

Kateşinler (Şekil 13), flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olup doğada (+) – kateşin ve onun stereozomeri olan (-) epikateşin olarak bulunurlar (Ganguly ve Seshado, 1958).



**Şekil 13.** PFO' nun flavonoid türevli substratları.

Bitkilerin çeşitli dokularında mevcut bulunan fenolik bileşiklerin esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşturdukları kinonlar oldukça reaktif olup, ya diğer kinonlarla ya da aminoasitler, proteinler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi biyomoleküllerle renkli bileşikler oluştururlar. Bu fenolik bileşiklerin farklılığı, dokularda bulunma oranları ve

buldukları yer açısından kahverengi-kırmızı polimerik pigmentlerin renk şiddetleri de değişmektedir.

### 1.5. Polifenol Oksidazın İnhibisyonu

Meyvelerin olgunlaşması, depolanması ve işlenmesi esnasında enzimatik esmerleşmeden kaynaklanan ciddi ekonomik kayıplar meydana geldiği için, enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin işleme endüstrisinde oldukça önemli olup araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir (Lee ve Park, 2005). Gıda endüstrisinde PFO tarafından sebep olunan esmerleşme reaksiyonlarının ehemmiyetinden dolayı birçok bileşik potansiyel PFO inhibitörü olabilme açısından değerlendirilmiştir (Seo vd., 2003).

Esmerleşme reaksiyonlarının inhibe ettiği bilinen bileşikler sülfidler, askorbik asit ve türevleri, okzalik asit, sitrik asit ve tiyol bileşikleri olarak sıralanabilir (Altukaya ve Gökmen, 2008). PFO aktivite tayininde inhibitör olarak askorbik asit olarak kullanıldığında reaksiyon başlangıcında absorbanstaki değişim belli bir süre izlenmemektedir. Bu lag periyodu olarak bilinmektedir. Bu süre sonunda hemen hemen bütün askorbik asit dehidroaskorbik aside dönüşmekte ve bu periyoda ulaşıldıktan sonra PFO tarafından üretilen *o*-kinon miktarı artar (Çolak vd., 2007).

Sülfidler, PFO' da çok kullanılan inhibitör olmasına rağmen meyve sebzelerin taze olarak pazara sunulması, satılması durumunda kullanımına izin verilmemektedir (FDA, 1996). Enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeyi önleyen sülfidler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder, ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici madde olarak rol oynar. Sülfid kullanımının avantajlarının yanında dezavantajları da vardır. Besinlerin yıkıcı özelliği, bitki ve meyvelerin doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir (Anonymous, 1991; McEvily vd., 1991).

PFO' nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PFO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesi ile oluşan *o*-kinonlarla sisteinin tiyol-konjugatlarını oluşturulmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Sistein, oluşan *o*-kinonları onunla ilgili fenollere indirgeyerek inhibisyonu gerçekleştirmiş olur (Marshall, 2000).

PFO, prostetik grup olarak bakır ihtiva eden bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon, monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir (Laurila vd., 1998).

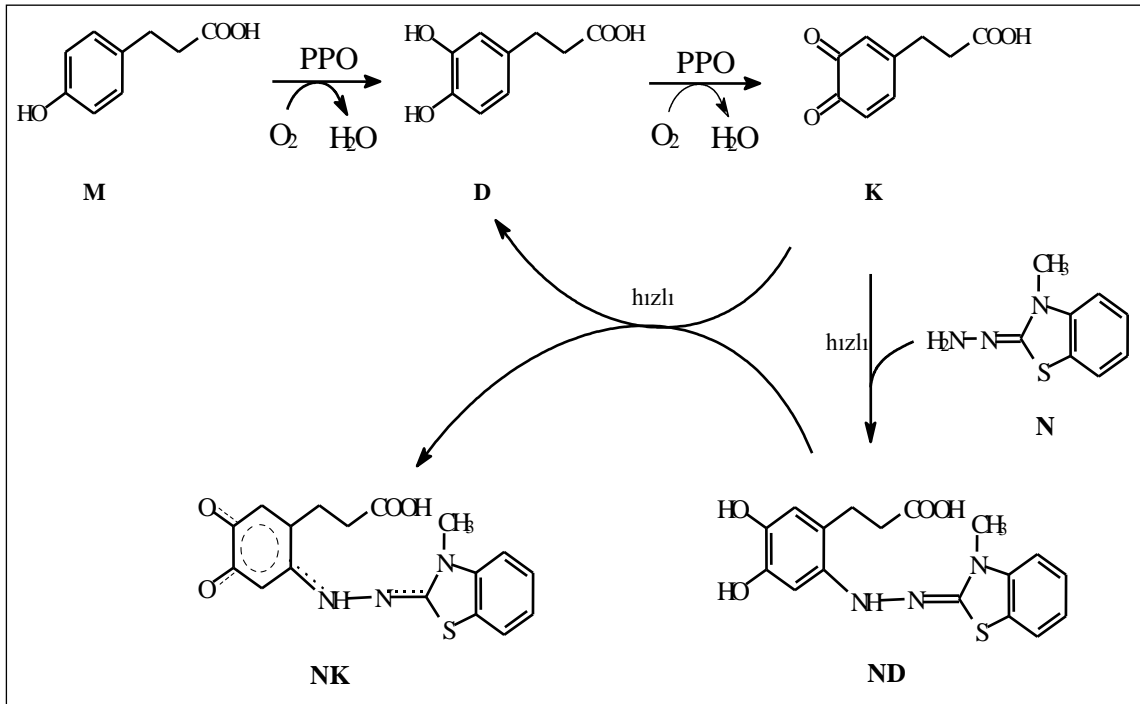
Benzoik asit ve sinamik asidi bazı türevleri elma, armut, kayısı, tatlı kiraz ve patateslerden elde edilen enzimler üzerinde yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.  $K_i$  değerleri, sinamik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *m*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve benzoik asit sırasıyla artış gösterirler. Aromatik asit inhibitörleri ya direkt benzen halkası üzerinde ya da konjüğe pozilyonda serbest bir karboksilik grup ihtiva etmeleri gereklidir. Düz zincirli asit inhibitörleri etki göstermeleri için, en az iki konjüğe etilen grubuna sahip olmaları gereklidir. Metilasyon inhibisyon ve  $K_i$  değerlerinin daha düşük olduğu bulunmuştur. İnhibitörün benzen halkasının metilasyonu ya da hidroksilasyonu aktif bölgeyi yarışmalı olarak inhibisyona neden bulunmuştur (Soler-Mahnez vd., 1965).

Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PFO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkaptometilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil- 2-merkaptimidazol)'dür (Espin ve Wichers, 2001).

### **1.6. Enzim Aktivitesinin Tayin Metodları**

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli monomerik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan  $O_2$ , bir respirometre ile sistemin oksijen harcanması esasına göre manomerik olarak ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülebilir. Kronometrik yöntemle ise askorbik asidin varlığında reaksiyon sırasında rengin ilk görüldüğü an tespit edilir. Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızının ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir.

PFO' nun monofenolaz ve difenolaz aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofilik varlığında, oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metod nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen *o*-kinonlarını esas alır. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşan *o*-kinon nükleofil ile katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm civarındaki karakteristik absorpsiyonlar ile belirlenir (Rodriguez-Lopez vd., 1994) (Şekil 14).



**Şekil 14.** Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: *o*-kinon, N: kromojenik nükleofil, ND: nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü).

Son yıllarda spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Böylece PFO aktivitesi daha doğru belirlenmesine olanak sağlayabilen substratlar tasarlanmış ve sentezlenerek difenolaz ve monofenolaz aktivitesinin doğrudan kantitatif olarak belirlenmektedir. Bunlardan biride, geleneksel substratlar yerine bunlardan yapısal olarak benzeyen diazo-türevleri olan substratların kullanılmasıyla sağlanmış olur (Haghbeen ve Tan, 2003). Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen bu yöntemler oldukça pahalı cihazları ve uzmanlığı gerektirdiği için yaygın olarak kullanılmazlar.

## 1.7. Polifenol Oksidaz' ın Kullanım Alanları

PFO' nun tabiattaki en önemli görevi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır.

Bitkilerin enfeksiyonlara karşı olan dirençlerinde PFO' nun görevi basitçe şöyle açıklanabilir: Enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek, suda çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular, enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi görürler. Bu olay, bazı araştırmacılar tarafından PFO' nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Membranların lipid içeriğinin azalması bu açıdan önemlidir. Bu durum membranların geçirgenliğini etkileyebilir ve enzimin substratıyla temasını kolaylaştırarak bariyerlerin oluşumunu arttırabilir. Diğer bir teoriye göre de, polifenollerin oksidatif polimerizasyonunun ara ürünleri, enzimi inaktif edebilir veya bazı kararsız bitki enzimlerine ve virüslere bağlanabilir (Vamos-Vigyazo, 1981).

PFO' nun *o*-dihidroksifenollerini oksidasyonu ile oluşan kinonlar, triptofan ile reaksiyona girerek, indolpirüvik asit üzerinden, indol asetik asidi oluştururlar. Bundan dolayı PFO, bitki büyüme regülasyonunda rol alabilir (Vamos-Vigyazo, 1981).

PFO etkisiyle oluşan kinonlar, humuslaşma ve enzimatik olmayan kararmaya yol açan benzer reaksiyonlara katılabilir ve bundan dolayı toprağın organik maddelerinin üretimine katkıda bulunabilir (Gul'ko ve Khaziyev, 1993).

Fermente içeceklerin koku ve tadına PFO etkisi, istenen bir durum olabilir. Elma suyu ve fermente armut suyu üretiminde, doğal olarak bulunan fenollerin polimerizasyon ve kondanese olmuş oksidasyon ürünleri çöker ve filtrasyonla uzaklaştırılır. Üzüm fenollerinden, başlıca kateşinler, enzim ile oluşturulan kinonlar, amino asitlerle reaksiyona girebilir ve son ürün olarak uçucu aldehidleri verirler (Erzengin, 2002).

Bazı un türlerinde bulunan yüksek PFO aktivitesi, ekmek veya makarna

ürünlerinde kararlamayı meydana getirir. Enzimatik olarak oluşan kinonların, kazein gibi proteinlerle reaksiyonu, makarna ürünlerinin sindirimini ve lizin içeriğini azaltır. Bu durum, besinlerin besleyici değerlerini etkileyebilir. Enzimatik renk değişimi, pancar ve şeker kamışının işlenmesi esnasında son ürünün rengine etki edebileceği gibi oluşan polimerler, şekerin kristalizasyonunu da zorlaştıracığından ve verimi düşüreceğinden dolayı da istenmeyen bir durumdur (Gross ve Coombs, 1975). En istenmeyen durum ise, PFO tarafından oluşturulan kinonların, düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler okside etmesidir ki bu bileşikler dihidroksifenollere indirgenmektedir. Bundan dolayı kinonlar, enzimin oksidatif etkisine yeni substrat sağlamayı, reaksiyon ürünleriyle inaktive oluncaya kadar veya indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler tükeninceye kadar devam ederler. Bu olay, askorbik asidin kinonlar üzerinde nasıl bir etki yaptığını ve bu bileşiğin renk değişimini nasıl önlediğini göstermektedir. Askorbik asidin tamamı tükeninceye kadar, kinonlar sürekli olarak indirgenir ve böylece, kinonlar birbirleriyle veya dönüşümsüz renkli polimerler oluşturabildikleri amino asit veya proteinlerle reaksiyon veremez. Bundan dolayı, enzimatik kararmanın oluşumu dokulardaki vitamin C' nin tamamının bittiğini gösterir. Patlıcan, vişne ve kirazda görüldüğü gibi, antosiyaninler, PFO tarafından oluşturulan kinonlar ile benzer şekilde bozundurulurlar. Askorbik asit, antosiyanin oksidasyonunu düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeli ile engeller (Vamos-Vigyazo, 1981).

Tıp ve endüstri alanlarında kullanılmak üzere, PFO tarafından sentezlenen maddeler bilinmektedir ve özellikle, PFO, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından, güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç tutuklamada miyopolimer olarak da bu melaninlerden yararlanılmaktadır. Bundan başka, bazı kanser türlerinde, kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde, enzimin melanin sentezleme özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir (Çiçek, 2000). Memelilerde tirozinazın aktif biçimi, melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunmaktadır. Dewey ve arkadaşları (1977) tirozinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün, farelerde Harding-Passey

melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Cho vd. (2003) yapılan bir çalışmada, PFO' nun biyosentetik bir reaksiyonda, enantiyomer seçici bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, PFO, sadece (+)-larreatrisini (+)-3'-hidroksilarreatrisine hidroksillerken, enantiyomeri olan (-)-3'-hidroksilarreatrisine hidroksilleyememiştir. Bu da PFO'nun yüksek substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermektedir.

PFO' nun kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan *L*-DOPA'nın üretimidir (Whitaker 1995).

### **1.8. Serbest Radikaller**

Kimyasal bileşikler, iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftlenmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftlenmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere serbest radikaller denir. Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Bu durum aslında hayatın her evresinde yaşamakta olduğumuz doğal bir süreçtir (Gökpınar vd. 2006). Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşur. Metabolizma yan ürünleri olarak süperoksit anyonları ( $O_2^-$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi mutajenler meydana gelir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda reaktif oksijen kaynakları (ROS) üretir (Kazanç 1997, Gökpınar vd. 2006).

## 1.9. Antioksidanlar

Antioksidan, bir başka molekülün oksidasyonunu yavaşlatabilen veya önleyebilen bir molekül olarak tanımlanabilir (Moon ve Shibamoto 2009). Antioksidanlar vücutta serbest radikaller ile reaksiyona girerek oto oksidasyonu önleyen savunma mekanizmalarıdır. Yaşamsal olayların devamlılığı için gerekli olan oksijen aynı zamanda birçok hastalık ve dejeneratif gelişimin nedeni olarak görülmektedir. İnsanlarda metabolik olaylar sırasında oksijen kullanımına bağlı olarak süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH^-$ ), peroksil ( $ROO^-$ ), alkoksil ( $RO^-$ ), semikuinon ( $Q^-$ ), nitrik oksit ( $NO^-$ ) 4 kökleri ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi aktif oksijen formları meydana gelmektedir. Ayrıca radyasyon, çeşitli gazlar, ağır metaller, herbisitler, pestisitler ile tedavi amaçlı kullanılan birçok ilaç, oksidatif stres nedeni olarak gösterilen aktif oksijen oluşumuna neden olurlar. Oksidatif stres, normal metabolik faaliyetler için gerekli olan aktif oksijen-antioksidan dengesini aktif oksijen lehine bozarak; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerde zararlanmaya yol açmakta ve başta koroner hastalıklar, kanser, diyabet ve karaciğer tahribatı olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır (Yücel ve Ötleş, 2001).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (Gökpınar vd., 2006).

Vitamin E ve C, karotenoidler ve fenolik bileşikler antioksidan özellikleri ile dikkat çeken maddelerdir. Vitamin C, süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil ve peroksil kökleri ile singlet oksijen formundaki aktif oksijenlerin temizlenmesinde en etkili antioksidandır. Vitamin E ise hidroksil, alkoksil, peroksil kökleri ve singlet



oksijen gibi aktif oksijen formlarının neden olduğu oksidasyonu önler.  $\beta$ -karoten antioksidan özelliğini singlet oksijen aktivitesi (vücudun ışığa hassasiyet reaksiyonu) ve peroksil köklerine karşı göstermektedir (Yücel ve Ötleş, 2001).

Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, antioksidan yapıların etki mekanizmaları ile birçok hastalığı önleyebildiği belirlenmiştir. Son zamanlarda araştırmacılar doğal antioksidan olarak değerlendirebileceğimiz, bitkilerde bulunan polifenoller ve flavonoidlere daha çok ilgi göstermektedirler (Frankel ve Finley, 2008; Moon ve Shibamoto, 2009).

### **1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi**

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılacak organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim katalizli polimerleşme reaksiyonları ile elde edilen polimerler, özel kimyasal maddelerin üretiminde, enzimlerin ne derece spesifik olduğunu göstermektedir. Bazı fenol türevlerinin, polifenollerin, polianilinlerin, polifenol oksidazlar kullanılarak ılımlı reaksiyon şartları altında yükseltgenme yoluyla polimerleştirdikleri belirtilmiştir (Ikeda vd., 1996).

Dolayısıyla, PFO' lar veya benzeri reaksiyonları katalizleyen enzimler bu açıdan son yıllarda oldukça ilgi toplamışlardır. Endüstriyel açılardan değerlendirildiğinde sadece birkaç oksidoredüktaz, çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak bu türden yeni enzimlerin saflaştırılıp karakterize edilmesi ile bazı yeni ürünlerin enzimatik sentezi mümkün olabilecektir. Bitkilerde bulunan bu tür enzimler, potansiyel kaynaklar olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Yöremizde yetişen eriklerde PFO' larının varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılp, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceği açısından önem arz etmektedir. Bu kaynaklardan PFO' ların saflaştırılması ile çeşitli ve yeni bazı polimerlerin veya diğer kimyasal maddelerin sentezi işlemlerinde kullanılabilirliklerinin araştırılması hız kazanacaktır.

Bu çalışmada, Ardahan İli Posof İlçesi Türkgözü Köyü' nden alınmış olan Cancur Eriğinden (*Prunus domestica* L.) bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO, bir tür adsorpsiyon kromatografisi olan Sepharose 4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli (Arslan vd., 2004) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu kapsamında, optimum pH ve sıcaklığı, pH kararlılığı, protein ve substrat konsantrasyonunun, metal iyonlarının ve bazı genel PFO inhibitörlerinin aktivite üzerine etkisi araştırılarak, bazı kinetik verileri incelenmiştir. Ayrıca Cancur eriğnin fenolik madde miktarı belirlenerek, sulu özütünün antioksidan kapasitesi tespit edilmiştir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak Ardahan' ın Posof İlçesi Türkgözü Köyü' nden toplanan Cancur Eriği (*Prunus domestica* L.) kullanıldı.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar marka ve modelleriyle birlikte Tablo 1' de verildi.

**Tablo 1.** Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601UV-Visible Spektrophotometer
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific	Heraeus Multifugure X3R
Protein elektroforez	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
pH metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Blendar	Sinbo	SHB-3002
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL

## 2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamımda kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 2' de verildi.

**Tablo 2.** Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.

<b>Kimyasal madde</b>	<b>Firma</b>
<b>Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan</b> Triton X- 114, PMSF, EDTA ve MgCl <sub>2</sub>	MP Biomedicals, Sigma
<b>Protein Elektrofrezinde Kullanılan</b> N, N, N' N'- tetrametilen diamin(TEMED), Amonyum persülfat (APS), Akrilamid, N, N'- metilen bisakrilamid, Gliserol, Bromofenol Mavisi, Glisin, Commansie Brillant Blue R- 250, SDS	Sigma, Fluka, Carlo Erba
<b>Substratlar</b> 4-Metil Katekol, Katekol, DHPPA, L-Trosin, <i>p</i> -Kumarik Asit, DHSA	Sigma, Merck
<b>İnhibitörler</b> Sodyum Metabisülfid, Benzoik Asit, Askorbik asit, Sodyum Azid	Sigma
<b>Lowry Protein Tayininde Kullanılan</b> Sığır Serum Albumini( BSA), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, Na-K Tartarat ve Folin Reaktifi	Sigma, Merck, Applichem
<b>Çözücüler</b> HCl, Asetik Asit ve Metanol	Merck, Tekkim
<b>Antioksidan Testlerde Kullanılan</b> ABTS, Troloks, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Gallik asit, DPPH, CuCl <sub>2</sub> , Neokuproin, CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , BHT	Sigma, Merck
<b>Tamponlar ve Diğer Kimyasallar,</b> CH <sub>3</sub> COONa, MOPS, NaHSO <sub>3</sub> , Tris, MgCl <sub>2</sub> , BaCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , NaCl, FeCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaCH <sub>3</sub> COO, Na <sub>2</sub> CO <sub>4</sub> , NaNO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , NaHSO <sub>4</sub> ,	Sigma, Merck

## 2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

### 2.2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. Asetat Tamponu (50 mM, pH 4.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M asetik asit ile 4.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
2. Asetat Tamponu (50 mM, pH 5.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M asetik asit ile 5.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
3. MOPS Tamponu (50 mM, pH 6.0): 0.52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M NaOH ile 6.0' ya ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
4. MOPS Tamponu (50 mM, pH 7.0): 0.52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M NaOH ile 7.0' ye ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
5. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M HCl ile 8.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
6. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M HCl ile 9.0' a ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
7. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M NaOH ile 10' a ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
8. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M NaOH ile 11' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
9. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 M NaOH ile 12' ye ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

### 2.2.3.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. Lowry A Çözeltisi (0.1 M NaOH içinde % 2 (a/h)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 0.4 g NaOH ve 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
2. Lowry B Çözeltisi (% 1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi): 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
3. Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K Tartarat Çözeltisi): 2 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
4. Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve lowry C karıştırılarak hazırlandı.
5. Lowry E Çözeltisi: 0.5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
6. Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1mg/mL): 5 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
7. 0.1 M NaOH içinde % 0.1 (a/h) SDS Çözeltisi: 0.4 g NaOH ve 0.1 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.

### 2.2.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

1. Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl): 5.4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH' sı 8.8'e ayarlanıp hacmi 250 mL' ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.
2. Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 0.2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH' sı 6.8' e ayarlanıp hacmi 250 mL' ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.
3. SDS Çözeltisi (% 10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı.
4. APS Çözeltisi (% 10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C' de saklandı.
5. TEMED: Satın alındığı şekliyle kullanıldı.
6. Akrlamid/Bisakrilamid Çözeltisi (% 30): 29.20 g akrilamid ve 0.80 g  $\text{N,N}'$ -metilenbisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
7. Gliserol Çözeltisi (% 80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.

8. Bromofenol Mavisi (0.1): 10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
9. SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL pH 6.8 1 M Tris-HCl, 400 µL % 10 SDS, 100 µL % 0.1 bromofenol mavisini, 250 µL % 80 gliserol ve 60 µL 2-merkaptotanol' ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C' de saklandı.
10. SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7.20 g Tris ve 1.50 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra 10 mL SDS (% 10) çözeltisi ilave edildi. pH 8.3' e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL' ye tamamlandı.
11. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL pH 6.8 1 M Tris-HCl, 100 µL % 0.1 bromofenol mavisini, 250 µL % 80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C' de saklandı.
12. Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7.2 g Tris ve 1.5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8.3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL' ye tamamlandı.
13. Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250' nin 62.5 mL glisiel asetik asit ve 93.5 mL metanol içinde çözülmesiyle hazırlandı.
14. Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glisiel asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.
15. Substrat Boyama Çözeltisi: 24 mM L-DOPA 100 ml saf suda hazırlandı.

#### **2.2.3.4. Gümüş Boyama Çözeltileri**

1. Destaining Çözeltisi: % 50 metanol, % 45 saf su, % 5 asetik asit.
2. Oksidatör: 0.05 g potasyumdikromat, 10.2 µL nitrik asit ( % 65' lik) alınarak hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.
3. Gümüş Boyası: 0.1 g gümüş nitrat saf suda çözülerek hacmi 50 mL' ye tamamlandı.
4. Developer: 1.48 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, % 1.85 p-formaldehit alınarak hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

### 2.2.3.5. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar

1. 0.1 M pH 10.0 NaHCO<sub>3</sub> Tamponu: 4.200 g NaHCO<sub>3</sub> 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH' sı 10.0' a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.
2. 0.2 M pH 8.8 NaHCO<sub>3</sub> Tamponu: 4.200 g NaHCO<sub>3</sub> 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH' sı 8.8' e ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.
3. 0.01 M pH 6.0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Tamponu: 0.71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH' sı 6.0' a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.
4. 50 mM pH 5.0 Asetat Tamponu (Afinite Jelini Yıkama ve Dengeleme Tamponu): 3.40 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH' sı 5.0' a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.
5. 50 mM pH 8.0 Fosfat Tamponu içinde 1M NaCl (Elüsyon tamponu): 3.10 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 29.25 g NaCl 450 mL saf suda çözülüp 1M HCl ile pH' sı 8.0' a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

### 2.2.3.6. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanışı

1. 100 mM 4-Metil Katekol: 0.124 g 4-metil katekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
2. 100 mM Katekol: 0.11 g katekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
3. 100 mM DHPPA(3-(3,4-dihidroksifenil)propiyonik asit): 0.182 g DHPPA az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
4. 100 mM L-Tirozin: 0.181 g L-Tirozin az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
5. 100 mM p-Kumarik Asit: 0.164 g p-Kumarik Asit az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
6. 100 mM DHHSA: 0.18 g DHHSA az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
7. 10 mM MBTH: 0.022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.



### **2.2.3.7. İnhibitor Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanışı**

1. 10 mM Askorbik Asit: 0.0177 g askorbik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
2. 10 mM Sodyummetabisülfid: 0.0199 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
3. 80 mM Benzoik Asit: 0.098 g benzoik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.
4. 100 mM Sodyum Azid: 0.065 g  $\text{NaN}_3$  az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.

### **2.2.3.8. Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanışı**

Ekstraksiyon çözeltisi: 0.84 g sodyum asetat (50 mM), % 6 (a/h) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 1 mM PMSF 80 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH' sı 5.0' a ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

### **2.2.3.9. Toplam Polifenol Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. 1 mg/mL Gallik asit: 1 mg gallik asit alınıp hacmi metanol ile 1 mL' ye tamamlandı.
2. % 10  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alınıp hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

### **2.2.3.10. CUPRAC Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. 10 mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 426.25 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  alınıp hacmi saf su ile 250 mL' ye tamamlandı.
2. 7.5 mM Alkolik Neokuproin: 390.5 mg neokuproin alınıp hacmi etanolle 250 mL' ye tamamlandı.
3. 1 M pH 7.0  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  Tamponu: 19.27 g amonyum asetat alınıp bir miktar suda çözüldükten sonra pH' sı 7.0' ye ayarlanarak hacmi saf su ile 150 mL' ye tamamlandı.

### **2.2.3.11. ABTS' Radikali Temizleme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. 7 mM ABTS: 36 mg ABTS alınıp saf su ile hacmi 10 mL' ye tamamlandı.
2. 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 3.312 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> alınıp hacmi saf su ile 5 mL' ye tamamlandı.
3. 5 mM Fosfat Tamponu: 0.34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> alınıp hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

### **2.2.3.12.DPPH' Radikali Temizleme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. 0.04 mg/mL DPPH: 4 mg DPPH alınıp hacmi metanol ile 100 mL' ye tamamlandı.
2. 0.02 mg/mL Troloks: 0.1 mg troloks alınıp hacmi metanol ile 5 mL' ye tamamlandı.

## **2.2.4. Deneysel Çalışmalar**

### **2.2.4.1. Ham Ekstrağın Hazırlanması**

Ardahan İli' nin Posof İlçesi Türkgözü Köyü' nden toplanmış olan Cancur Eriği meyveleri (*Prunus domestica* L.) soğuk zincir koşullarında (6-8 °C) içerisinde laboratuara kadar ulaştırıldıktan sonra 90 g' ı dewar içerisindeki sıvı azot ile 20 dakika ozmotik şoka tabii tutuldu. Ozmotik şoka tabii tutulan meyveler, +4 °C' de el blendırı yardımıyla 100 mL ekstraksiyon çözeltisi ilavesiyle 15 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 katlı tülbentten süzüldü. Elde süzüntü +4 °C de 20 dakika bekletildikten sonra +4 °C' de 15,000 devir/dk de 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatanta proteazları inhibe etmek amacı 1mM PMSF ilave edildi. Elde edilen bu ekstraktaki PFO aktivitesi bir ay süre ile aktivitesini koruyabilmektedir.

### **2.2.4.2. Afinite Jelinin Hazırlanması**

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B' nin serbest -OH gruplarının modifikasyonunda yaygın olarak CNBr yönteminden yararlanılmıştır (Pathak ve ark., 1992). Aynı metot üretici firma tarafından önceden aktifleştirilmiştir.

Aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B' ye *L*- tirozin bağlandı. Reaktif türevde tirozine diazolanmış *p*-amino benzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Burada, tirozin afinite jelinin uzantı spesifik olarak bağlayan kısmını (ligandını) oluşturmaktadır, *p*-amino benzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite kolonu, *p*-aminobenzoik asit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını (ligandını) oluşturmaktadır, *p*-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır.

#### **2.2.4.2.1. Sepharose 4B' nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması**

10 mL' lik yatak hacmi için 2.50 g kuru aktifleşmiş CNBr Sepharose-4B jeli tartıldı. Tartılan aktifleşmiş sepharose-4B bir miktar destile su ile iyice yıkanarak safsızlıklar uzaklaştırıldı. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi ile (pH 10.0) yıkandı. 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edildi ve 90 dakika karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4 °C' de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 420 nm' de absorbands vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH 8.8) tekrarlandı. Tirozinle modifiye Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL' si içine alındı (Yerlitürk, 2003).

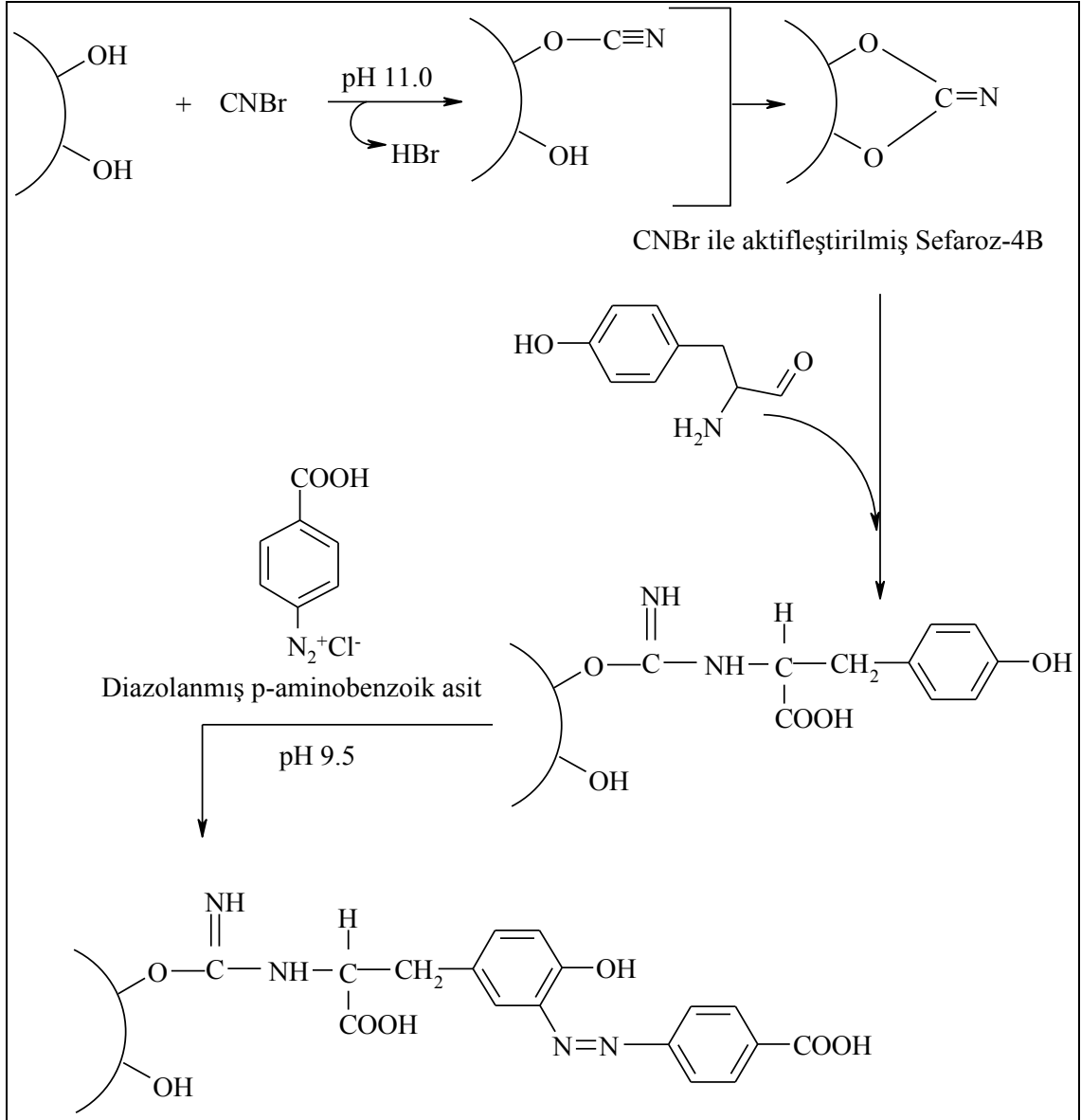
#### **2.2.4.2.2. *p*-Aminobenzoik Asidin Bağlanması (Ligandın Bağlanması)**

25 mg *p*-aminobenzoik asit, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C' deki 5 mL çözelti, *p*-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla akıtıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazonlanmış bulunan *p*-amino benzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-*L*-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5' a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve ardından 200 mL 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Yerlitürk, 2003).

#### 2.2.4.3. Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat (pH 5.0) ile dengelendi. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M fosfat tamponu (pH 6.0) ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1M NaCl tamponu (pH 8.0) ile enzim elüsyonu ve 5' er mL fraksiyonlar halinde gerçekleştirildi. Toplanan tüplerde 650 nm' de protein ve 500 nm' de enzim aktivite tayini yapıldı. (Yerlitürk, 2003).

Sepharose-4B' nin CNBr ile aktifleştirilmesi, *L*-tirozin ile modifiye edilmesi ve *p*-aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyonlar Şekil 15' de verildi.



Şekil 15. Afinite jeli sentezinin aşamalarında gerçekleşen reaksiyonlar.

#### 2.2.4.4. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak BSA kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizilebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Bu şekilde tüplerde BSA'nın nihai konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olması sağlandı. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, amonyum sülfatla çöktürülen ve amikon filtreden geçirilen protein karışımından ve saf proteinden ayrı bir deney tüpüne 5 µL ilave edildi. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL tamamlayacak şekilde 0.1N NaOH içindeki % 0.1 (a/h) SDS

çözeltisinden ilave edilip vortekslendi. Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (% 2 sodyum-potasyum tartarat, % 1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 0.1N NaOH içerisinde % 2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden 100  $\mu\text{L}$  ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. 650 nm’ de absorbanlar okundu. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

#### **2.2.4.5. Elektroforez**

Saflaşmanın derecesini belirlemek için % 10’ lik doğal-PAGE ve molekül ağırlığını belirlemek için % 12’ lik SDS-PAGE yapıldı.

##### **2.2.4.5.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

SDS-PAGE, Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre % 5’ lik yığıma jeli ve % 12’ lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3).

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Kuyucuğun birine enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile molekül ağırlıkları 10-250 kDa arasında değişen proteinleri içeren standart protein çözeltisi yüklendi. Daha sonra diğer her bir kuyucuk yaklaşık 30  $\mu\text{g}$  protein içerecek şekilde doğal SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Bu sayede üç boyutlu yapısı bozulan proteinler Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi.

**Tablo 3.** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları.

	% 5' lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	% 12' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	4,0
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6.8)	0,5	---
1.5 M Tris (pH 8.8)	---	2,5
% 10 SDS	0,04	0,1
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, proteinler, yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA' de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 25 mA' de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve 3 saat boyunca boyamaya bırakıldı. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

#### 2.2.4.5.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan % 5' lik yığıma jeli ve % 10' luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.

	% 5' lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	% 10' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,1
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1. M Tris (pH 8,8)	---	2,5
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Jel SDS-PAGE' de olduğu gibi ancak SDS içermeyecek şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırıldı ve Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez ünitesi

buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA' de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 25 mA' de yürütüldü.

#### **2.2.4.5.3. Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R- 250 Boyanması**

Doğal elektroforez sonucu sisteminden çıkartılan jel ikiye bölündü. Jelin bir tarafı substrat boyama çözeltisi (*L*-DOPA) diğer tarafı da Coomassie Brilliant Blue R- 250 boyama çözeltisi içerisinde hafifçe çalkalanarak 2 saat bekletildi. Protein bantlarının daha iyi görünmesi için coomassie brilliant blue R- 250 boyama çözeltisi ile boyanan jel % 30 metanol, % 10 asetik asit karışımıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yaklaşık 3–4 saat muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntülüne cihazında kaydedildi.

#### **2.2.4.5.4. Gümüş Boyama**

SDS-PAGE elektroforez sonucu sistemden çıkarılan jel destaining çözeltisi içerisinde hafifçe çalkalanarak 20 dk bekletildi. Bu süre sonunda jel saf su ile 1 kez yıkanarak oksidatör içerisinde 10 dk bekletildi. Oluşan sarı renk uzaklaşmaya kadar yaklaşık 15 dk saf su ile yıkandı. Sudan çıkarılan jel 25 dk gümüş boya içerisinde bekletildi. Daha sonra jel 1 dk boyunca saf su ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra protein bantları görünür hale gelinceye kadar jel developer içerisinde tutuldu. Protein bantları yeterince görünür ve net hale geldiğinde boyamayı durdurmak için jel % 5' lik asetik asit çözeltisine aktarıldı, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

#### **2.2.4.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Tayini**

Çeşitli substratlar varlığında spektrofotometrik yöntemlerle PFO aktivite ölçümleri yapıldı (Espin, 1995). Aktivite ölçümleri için  $y$   $\mu$ L enzim +  $x$   $\mu$ L substrat (100 mM) +  $x$   $\mu$ L MBTH (10 mM) + 20  $\mu$ L DMF + [980-(2x+y)]  $\mu$ L tampon (50 mM) çözeltisi ilave edilerek 500 nm'deki absorbans değerleri tespit edildi. Tampon olarak 50 mM pH: 3.0; 50 mM Asetat pH 4.0-5.0; 50 mM fosfat pH 6.0-7.0; 50 mM Tris pH 8.0-9.0 tamponlar kullanıldı. 0.1-30 mM substrat konsantrasyonlarında çalışıldı.



Absorbansdaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi. Denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Cancur eriği PFO' su *L*- tirozin, *p*-kumarik asit, 3,4-dihidroksihidrosinamik asit (DHHS), 3,4-dihidroksifenil propanoik asit (DHPPA), katekol ve 4-metil katekol substratları ve MBTH nükleofil kromojeni kullanılarak gerçekleştirilen aktivite deneylerinde verilen her bir substratın maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki molar absorplama katsayıları kullanılarak analiz edildi.

#### **2.2.4.7. Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi**

Optimum pH çalışması; *L*-Tirozin, *p*-kumarik asit, DHHS, DHPPA, 4-metil katekol ve katekol substratları varlığında pH 4.0-10 arasındaki değerlere sahip uygun tamponlarda oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bu substratlarla enzimin substrata doyduğu noktalarda uygun tampon çözeltilerde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Optimum sıcaklık değerleri yine aynı substratlarda yapıldı. Substratların optimum pH değerlerinde PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10 °C' lik artışlarla 10-80 °C aralığında incelendi. İstenilen sıcaklıklar oda sıcaklığının altında olanlar soğutmalı inkübatörde, oda sıcaklığının üzerinde olanlar ise Thermoblok' ta ayarlandı. PFO aktivitesi, karışıma tampon, MBTH, DMF ve enzim çözeltisi ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir şekilde aktivite ölçümleri yapıldı (Dinçer vd., 2003). Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

#### **2.2.4.8. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi**

Meyve özütlerindeki PFO' nun çeşitli substratlara karşı davranışını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda *L*-Tirozin, *p*-kumarik asit, DHHS, DHPPA, 4-metil katekol ve katekol substratları için 0.1- 30 mM konsantrasyonlarında değiştirilerek PFO aktivitesi 500 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Michaelis-Menten eşitliği esas alınarak değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı hiperbolik grafik (Michaelis- Menten), bu değerlerin çift resiprokları ile elde edilen

lineer grafik (Lineweaver- Burk) çizilerek enzimin substrat ile doyuma ulaştığı maksimum reaksiyon hızı ( $V_{maks}$ ) ve Michaelis sabiti ( $K_m$ ) değerleri ve dönüşüm sayısı ( $k_{kat}$ ) bu eğrilerden elde edilen veriler yardımıyla belirlendi.

PFO' nun inhibisyon çalışmasında yaygın olarak bilinen benzoik asit, askorbik asit, sodyum metabisülfid ve sodyum azid genel inhibitörleri kullanılmıştır. İnhibitörlerin PFO aktivitesine etkisi ve enzimin bu maddelere karşı davranışı yine inhibitör yokluğunda ve varlığında benzer denemeler yapılmış ve ondan sonra elde edilen veriler yukarıda belirtilen grafiklere ilave olarak Dixon eğrileri yardımıyla değerlendirilip, inhibisyon türleri ve inhibisyon sabitleri hesaplandı ve sonuçlar analiz edildi. Tüm kinetik çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

#### **2.2.4.9. Antioksidan Testler**

##### **2.2.4.9.1. Toplam Polifenol Tayini**

Slinkard ve Singleton (1977) tarafından ileri sürülen metoda göre numunedeki toplam çözülebilir fenolik madde Folin-Ciocalteu reaktifi ile 760 nm' de maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturur. Gallik asit ile standart çalışma grafiği hazırlanarak tayin yapıldı. Pipetleme işlemleri Tablo 5' de özetlenmiştir.

**Tablo 5.** Toplam fenolik madde tayini için deney şartları ( Slinkard ve Singleton, 1977)

	Reaktif Kör( $\mu$ L)	Standart( $\mu$ L)	Deney( $\mu$ L)
Standart (Değişik konsantrasyonlarda)	-	20	-
Numune	-	-	20
Destile Su	700	680	680
0.2 N Folin Reaktifi	400	400	400
Tüpler Vorteks ile karıştırıldı			
% 10 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	400	400	400
760 nm’de tanık deneye karşı absorbands okundu			

#### 2.2.4.9.2. Bakır İndirgeme Gücü (CUPRAC) Metodu

Yöntem, Cu (II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH 7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 60 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbands değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. (Apak vd., 2006).

İçerisine sırasıyla 1 mL 10 mM CuCl<sub>2</sub>, 1 mL 7.5 mM Neokuproin ve 1 mL 1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO konulup çalkalanan tüplere, eriğin sulu özütünden eklenip üzerine toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde saf su ilave edildi. Tüpler ağzı kapalı bir biçimde 60 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm’ de absorbands değerleri ölçüldü. Aynı işlemler troloks standartının farklı konsantrasyonları için de uygulandı ve sonuçlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edildi. Ardından bu kalibrasyon grafiğinin eğimi kullanılarak eriğin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasitesi hesaplandı (Tablo 6).

**Tablo 6.** CUPRAC yöntemi için pipetleme değerleri.

	Test	Renk K�r�	K�r <sub>met</sub>	K�r <sub>su</sub>
10 mM CuCl <sub>2</sub>	1 mL	-	1 mL	1 mL
7.5 mM Neokuproin (alkolik)	1 mL	-	1 mL	1 mL
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO tamponu	1 mL	-	1 mL	1 mL
Numune	x mL	x mL	-	-
Su	(1.1-x) mL	-	(1.1-x) mL	1.1 mL
Metanol	-	-	x mL	-
Etanol	-	-	-	-
Destile Su	-	(4.1-x) mL	-	-

1 saat sonra 450 nm'de absorbanlar okundu

#### 2.2.4.9.3. ABTS' Radikali Temizleme Yöntemi

Miller and Rice-Evans (1997) ile Arts vd. (2001) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemin ayrıntıları Kırca ve  zkan (2007) tarafından verilmiştir. Bu yöntem, ABTS' (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonu tarafından tutulan antioksidatif maddelerin miktarının, sentetik bir antioksidan olan Troloks' un (suda  z nen E vitamini analogu) standart miktarlarıyla kıyaslanarak bağlı ölümünü sağlamaktadır.  l mler, mavi/yeşil renkli stabil bir bileşik olan ABTS' radikalinin kayboluşunun spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle yapıldı. Mavi/yeşil ABTS' kromoforu oluşturmak için ABTS ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılmıştır.

Antioksidan aktivite tayini analizlerinde öncelikle 2.45 Mm potasyum persülfat içeren 7 mM'lık ABTS  zeltisi hazırlandı. Bu  zelti, 20  C' ye ayarlı bir inkubat rde (Sanyo MIR 253, Gunma, Japonya) 12-16 saat arasında bekletilerek, ABTS' radikalinin oluşması sağlandı. Bunun dışında; radikal  zeltisinin örneklerin ve troloks standardının seyreltilmesinde kullanılacak olan PBS ( phosphate buffer saline)  zeltisi hazırlandı.

Analize başlamadan önce ABTS' radikal  zeltisinden 1 mL alınarak 734 nm' de absorban değeri 0.700±0.02 olacak şekilde yaklaşık 90-100 mL PBS ile seyreltildi. Seyreltilmiş ABTS' radikal  zeltisinin 1 mL mikro küvete alınmış, PBS  zeltisine karşı okuma yapmak üzere spektrofotometreye yerleştirilmiş ve başlangıç absorban

değeri belirlendi. Daha sonra küvet içeriği 1 mL olacak şekilde, mikro küvete eklenen 990 µL radikal çözeltisi üzerine örnekten 10 µL eklenir eklenmez kronometre çalıştırıldı. 6 dakika boyunca, her bir dakika absorban ölçümü yapılarak sonuçlar kaydedildi. Örnekler üzerine uygulanan spektrofotometrik uygulamalar farklı konsantrasyonlarda BHT (0.3125-10 µg/mL) standartlarına da uygulandı 6 dakika sonunda saptanmış olan absorban değeri esas alınarak, başlangıç değerine göre yüzde azalma oranından numune ve standartın değeri hesaplanarak numunenin SC<sub>50</sub> değeri standartın SC<sub>50</sub> değeriyle kıyaslandı. (Tablo 7)

**Tablo 7.** ABTS<sup>•</sup> radikal temizleme yöntemi için deney şartları.

---

7 mM ABTS
2.45 mM K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
16 saat bekletildi
5 mM pH 7.4 Fosfat Tamponu ile 734 nm’de 0.7 abs verene kadar seyreltildi
200 µL erik numunesi veya Standart + 1800 µL ABTS
5 dakika beklettikten sonra 734 nm’de saf suya karşı okundu

---

#### **2.2.4.9.4. DPPH<sup>•</sup> Radikali Temizleme Yöntemi**

DPPH<sup>•</sup> radikali (2,difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerde satın alınan bu radikalın 100 µM’lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Elde edilen özüt değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750 µL) DPPH<sup>•</sup> çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı (Tablo 8). Süre sonunda DPPH<sup>•</sup> çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı (Potterat ve vd., 1997).

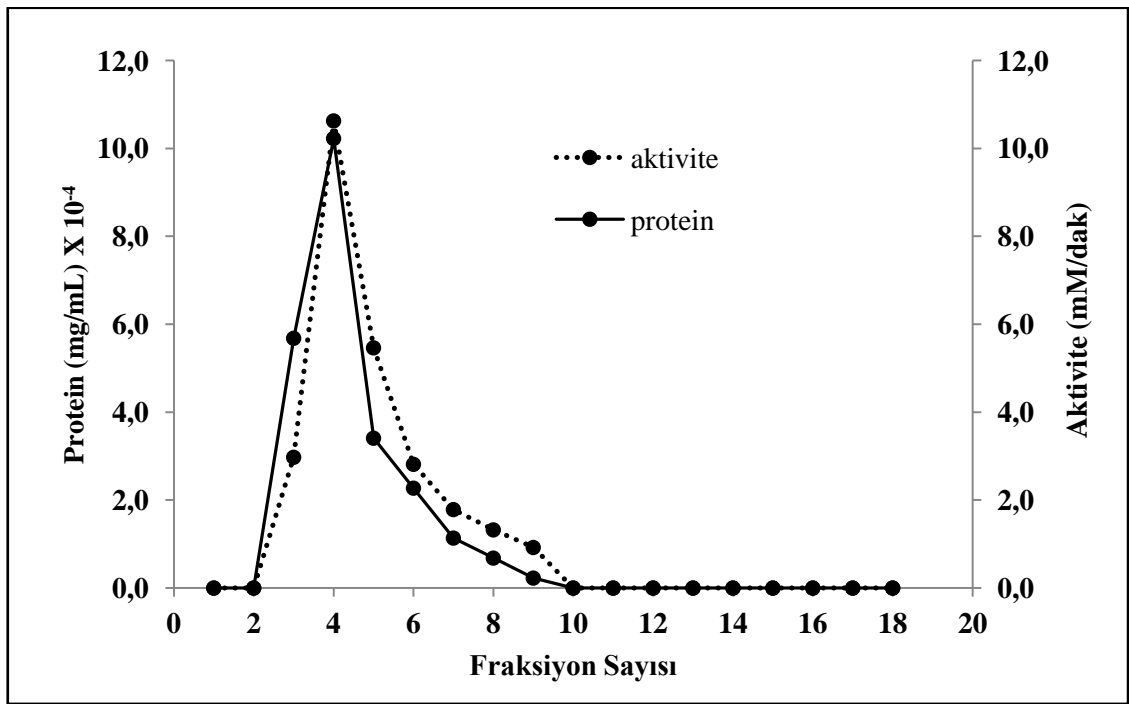
**Tablo 8.** DPPH<sup>•</sup> radikal temizleme yöntemi için deney şartları.

	<b>Reaktif Kör(μL)</b>	<b>Numune(μL)</b>
Standart ve Numune (Değişen Konsantrasyonlarda)	-	750
DPPH	750	750
Çözücü	750	-
50 dakika sonra 517 nm’de absorbands okundu		

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Polifenol Oksidazın Afinit Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sepharose-4B *L*-tirozin-*p*-aminobenzoik asit jeli sentezlenerek yapılan afinite kromatografisi sonucu, toplanan elüatlardan oluşturulan fraksiyonlarda protein ve katekol substratı varlığında aktivite tayini yapıldı (Şekil 16). PFO aktivitesi gösteren 3-9 arası fraksiyonlar birleştirilerek elektroforez yapıldı.



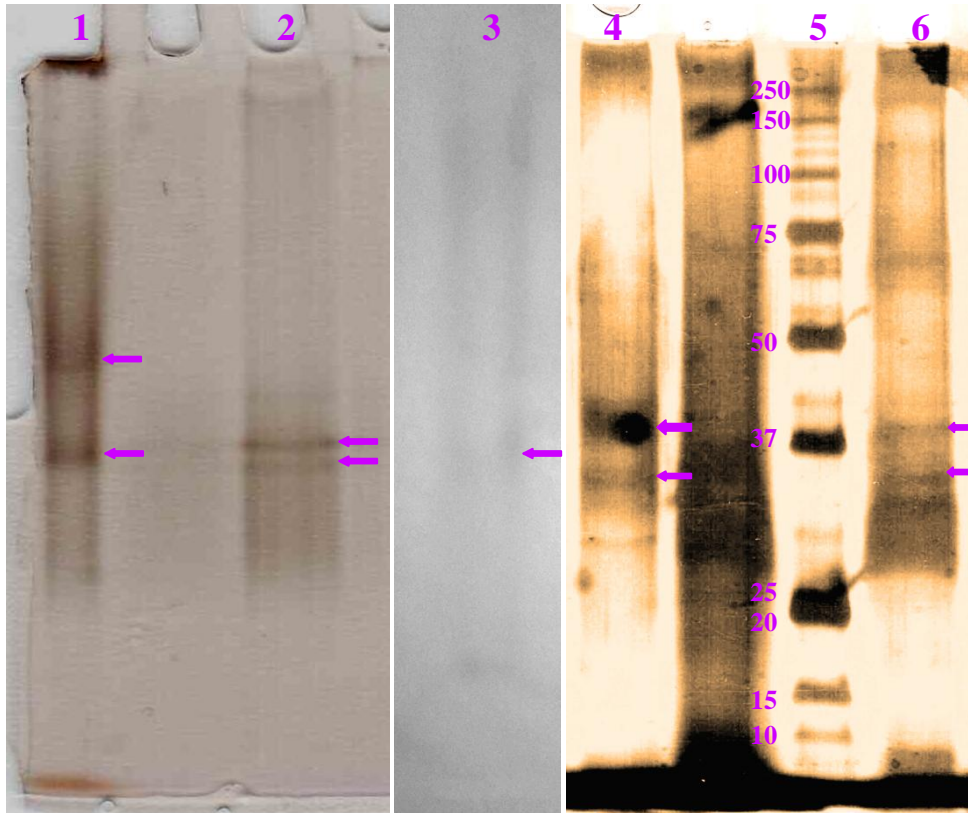
Şekil 16. PFO'nun Cancur Eriğinden Afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların protein-aktivite profili.

1 den 20' e kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine gelen elüatlar 4' er mL halinde toplandı. Saflaştırılan PFO' yu içeren fraksiyonlar birleştirilerek, elde edilen saf enzim elüatında ve ham enzim özütü çözeltisinde Lowry yöntemiyle toplam protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim elüatında 0.0023 mg/mL ve ham enzim özütünde ise 0.14 mg/mL protein miktarı tespit edildi. Ham enzim özütünde PFO' nun özgül aktivitesi 5809.5 EU/mg protein iken, saf enzimin özgül aktivitesi 375347.8 EU/mg protein olarak bulundu. Cancur Eriği özütünden PFO enzimi afinite kullanarak 65 kat saflaştırılarak elde edildi (Tablo 9).

**Tablo 9.** Cancur Eriğinden saflaştırılan PFO' ya ait saflaştırma tablosu.

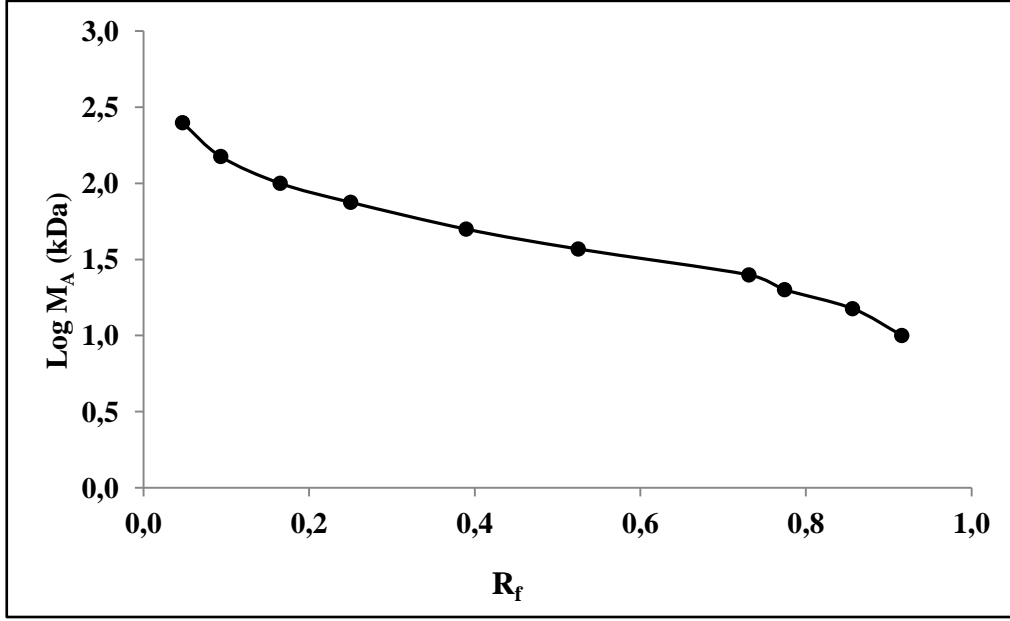
	Protein Miktarı (mg/mL)	Aktivite (EU/mL)	Özgül Aktivite (EU/ mg protein)	Saflaştırma katsayısı
Ham Enzim Özütü	0,14	813,3	5809,5	1
Saf enzim	0,0023	863,3	375347,8	65

Hazırlanan enzim özütünde ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen saf enzim elüatında, polifenol oksidazın varlığı yapılan doğal elektroforezle ve molekül ağırlığı SDS-PAGE ile ortaya konuldu. Doğal elektroforez jeli boyama çözeltisi (*L*-DOPA) ile coomassie brilliant blue R-250 boyası ve SDS-PAGE jeli gümüş boyama tekniği ile boyandı. Saf proteini içeren elektroforez kromatogramında doğal boyama sonucunda iki izoenzim tespit edildi. Oluşan bantlar tarayıcı ile taranarak görüntüledi (Şekil 17). SDS-PAGE kromatogramından elde edilen standart çalışma grafiğinde PFO bantları denk molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 32 ve 40 kDa olarak belirlendi (Şekil 18).



**Şekil 17.** Cancur eriği PFO' sunun elektroforez profili (1: Ham özütün substrat boyaması; 2: Saf enzim substrat boyaması; 3: Saf enzim doğal elektroforez coomassie brilliant blue R-250 boyaması; 4: Saf enzim SDS-PAGE gümüş boyama; 5: Standart protein SDS-PAGE gümüş boyama; 6: Ham özüt SDS-PAGE gümüş boyama).



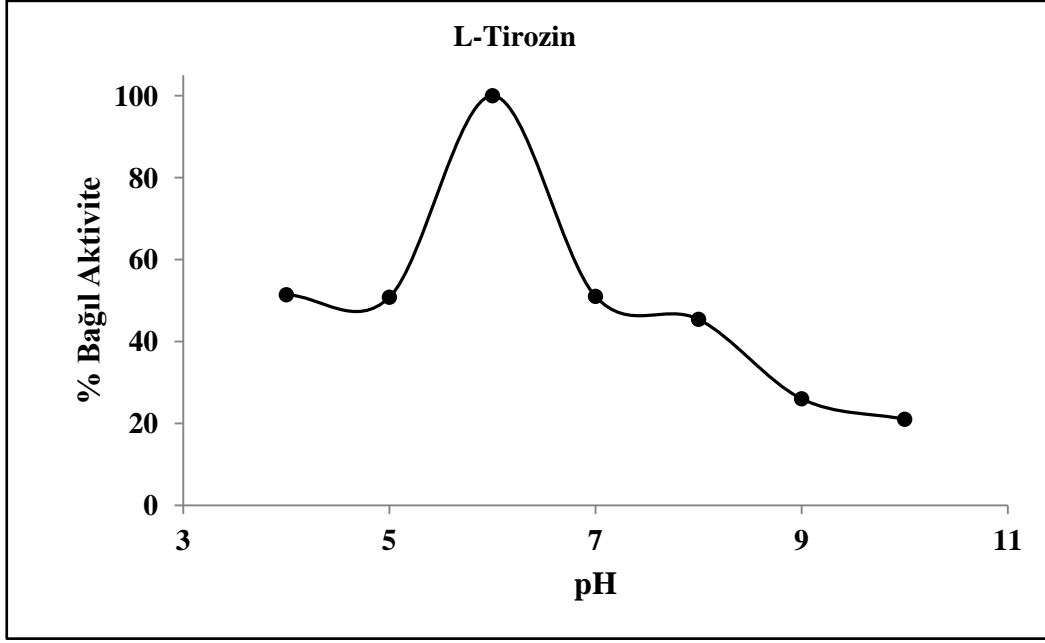


Şekil 18. SDS-PAGE elde edilen standart protein çalışma grafiği.

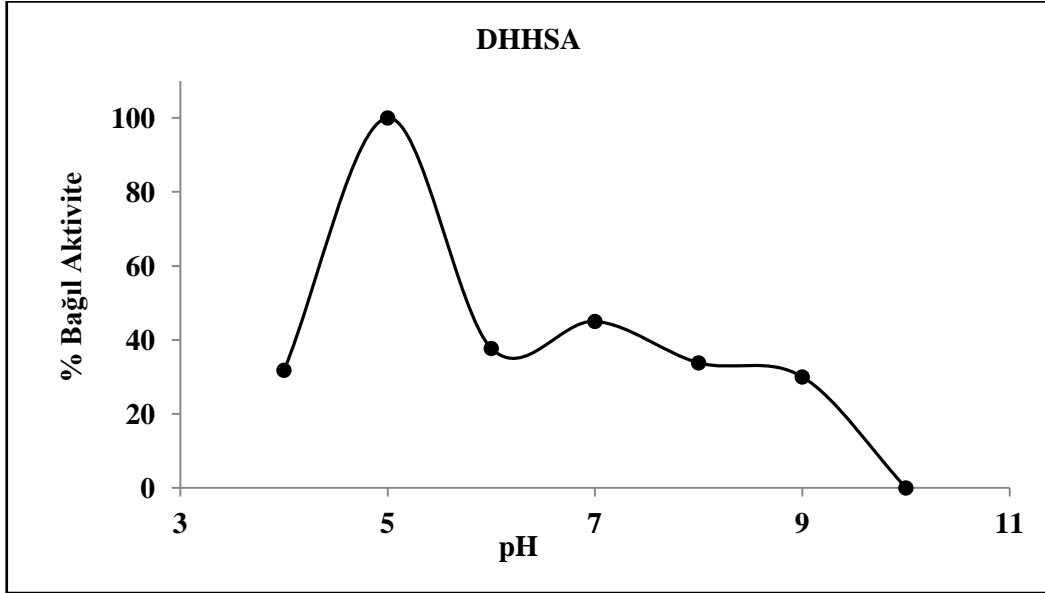
### 3.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.2.1. Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

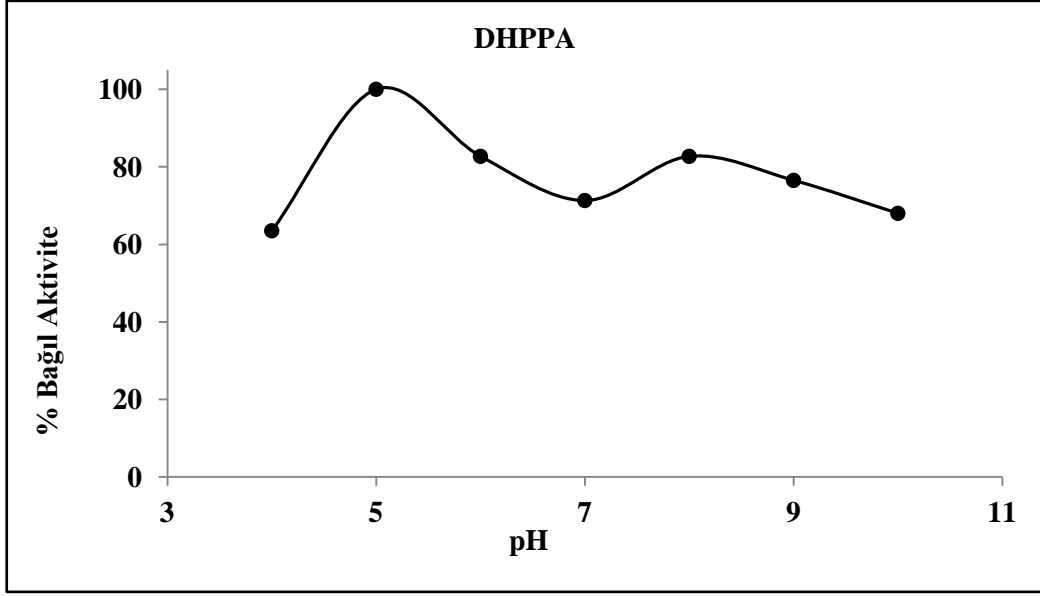
Cancur eriği PFO' sunun *L*-tirozin, dihidroksihidrosinamik asit, DHPPA, *p*-kumarik asit, katekol ve 4-metilkatekol substratları varlığında en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek üzere, pH 4.0-10.0 değerleri arasında hazırlanan tamponlar kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiklerinden enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri *L*-tirozin için 6.0, 3,4-dihidroksihidrosinamik asit (DHHSa), DHPPA, *p*-kumarik asit substratları için 5.0 ve katekol ile 4-metil katekol için 7.0 olarak belirlendi (Şekil 19-24).



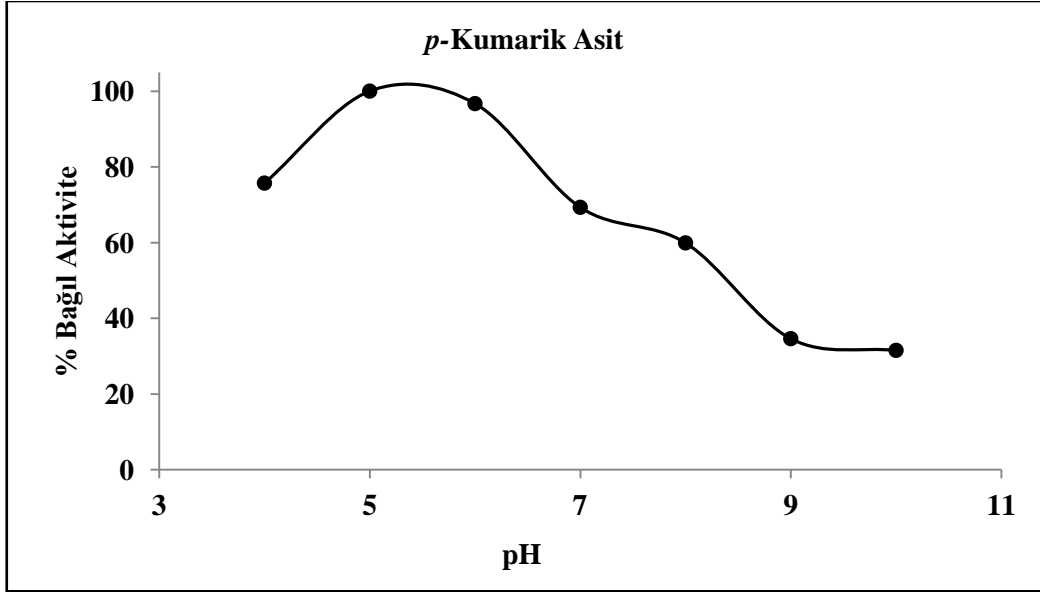
Şekil 19. L-Tirozin substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.



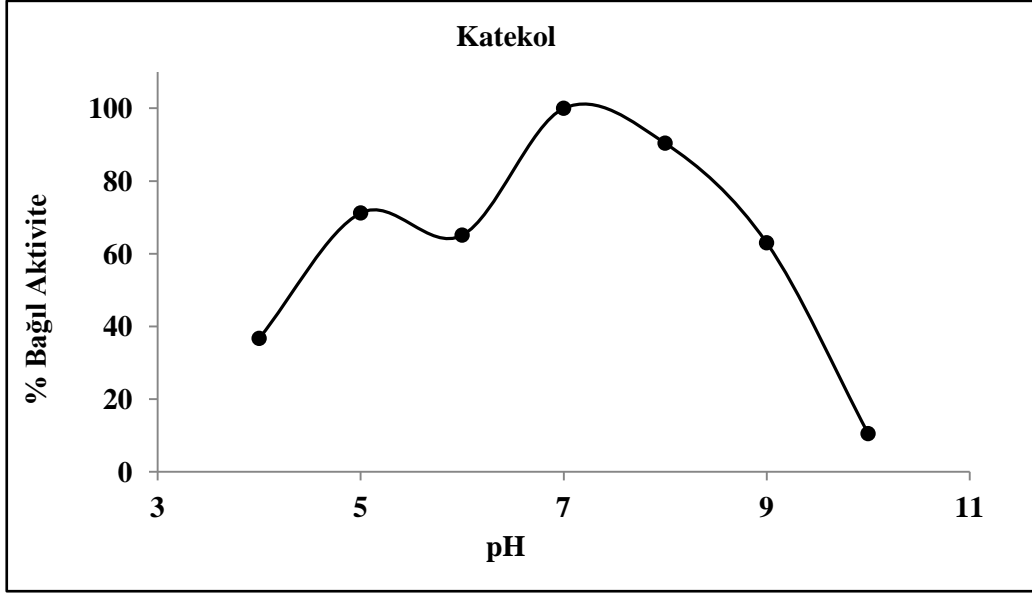
Şekil 20. DHHSA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.



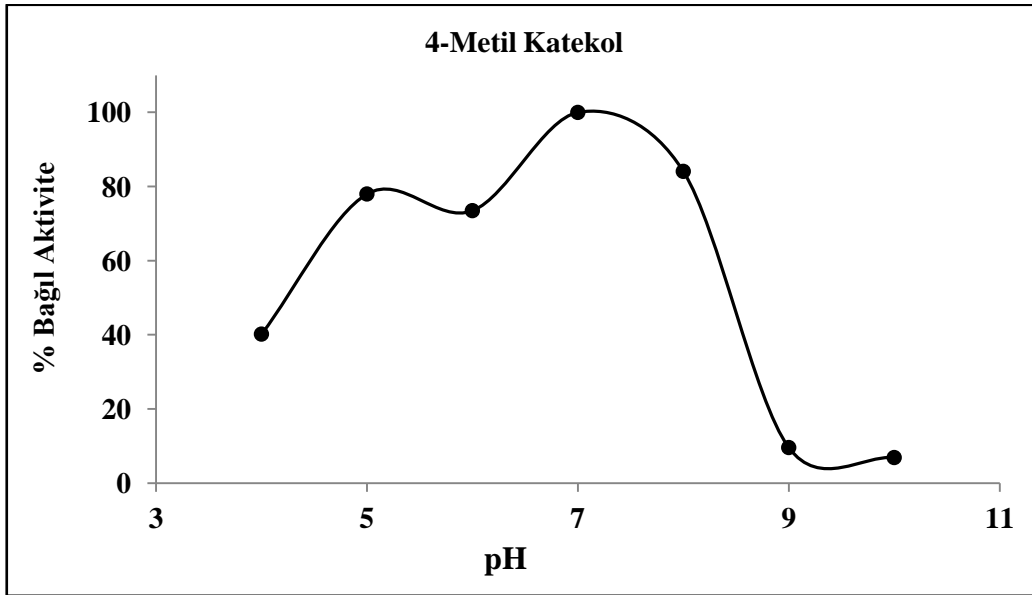
Şekil 21. DHPPA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.



Şekil 22. p-Kumarik asit substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.



Şekil 23. Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.

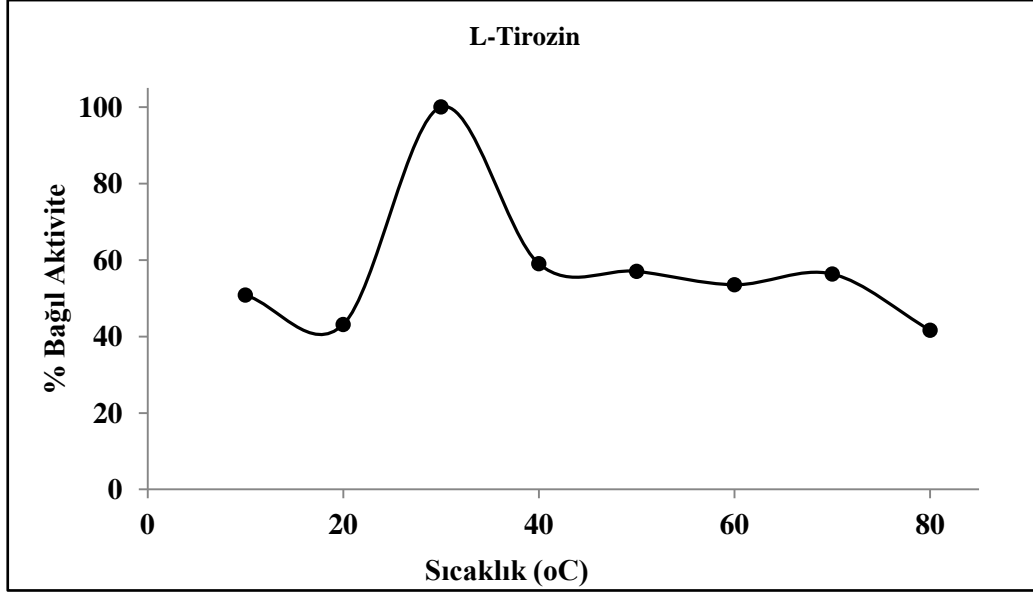


Şekil 24. 4-Metil Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.

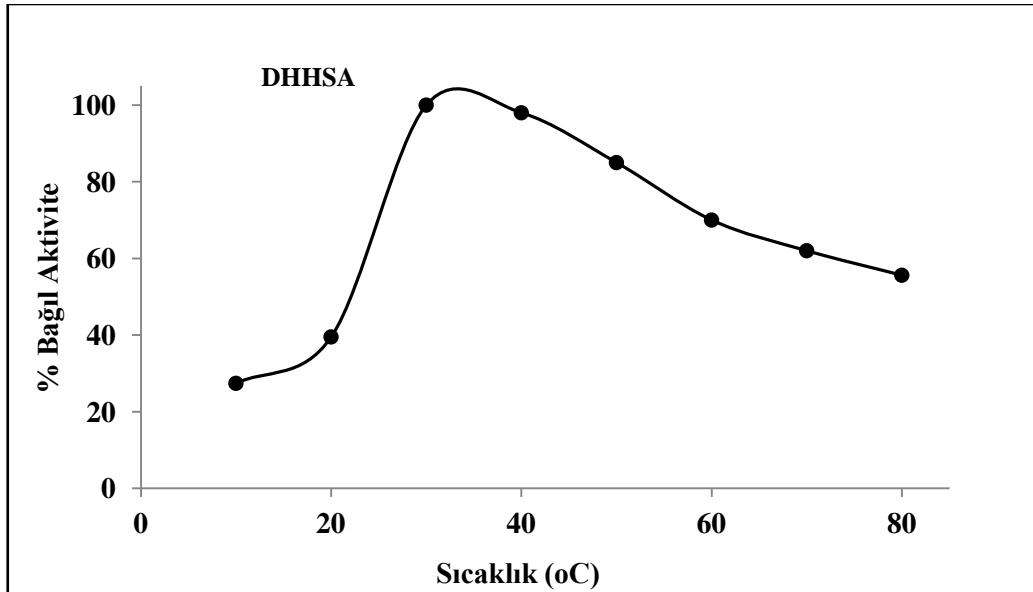
### 3.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Cancur eriği PFO' sunun, sıcaklık değişiminin aktivite üzerine etkisini incelemek suretiyle, en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek üzere,

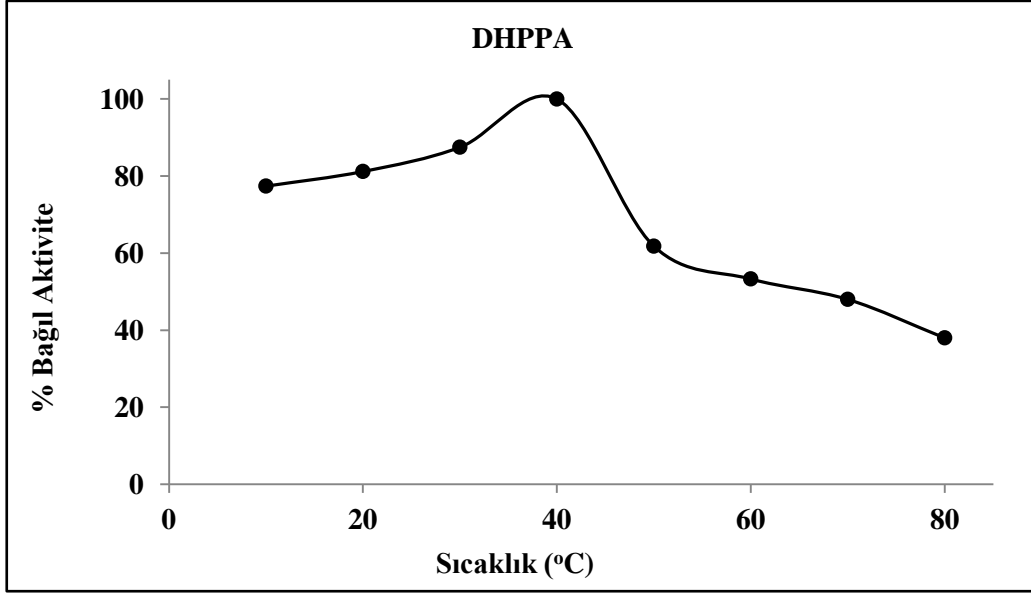
10-80 °C aralığında 10 °C' lik artışlarla enzim aktivitesi ölçülerek, sıcaklık-% bağıl aktivite grafiği çizildi. Cancur eriği PFO' sunun *L*-tirozin, 3,4-dihidroksihidrosinamik asit, DHPPA, *p*-kumarik asit, katekol ve 4-metilkatekol substratları varlığında en yüksek aktivite gösterdiği 30-40 °C arasında gösterdiği belirlendi (Şekil 25-30, Tablo 10).



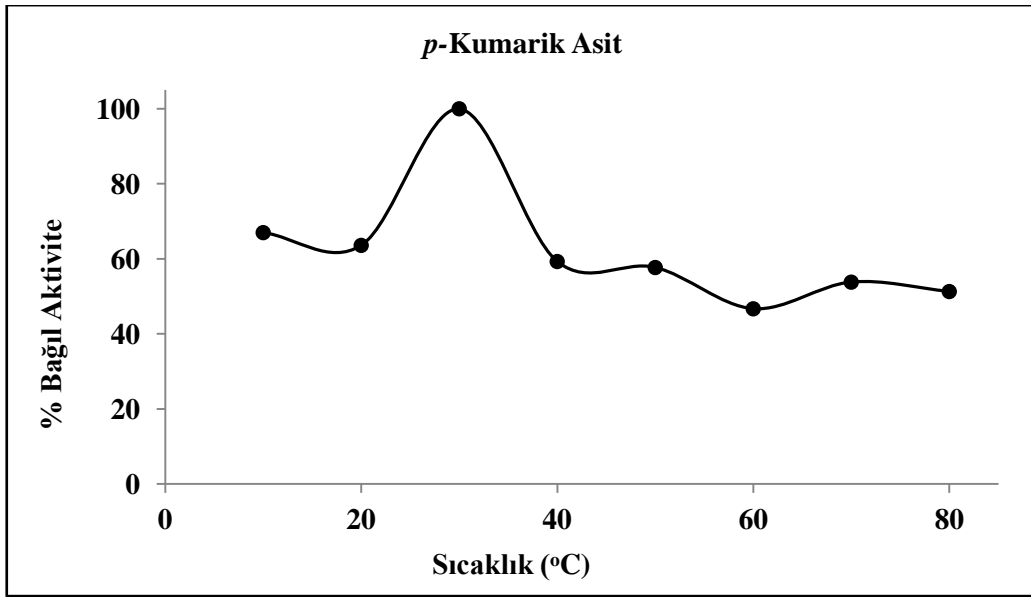
Şekil 25. *L*- Tirozin substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



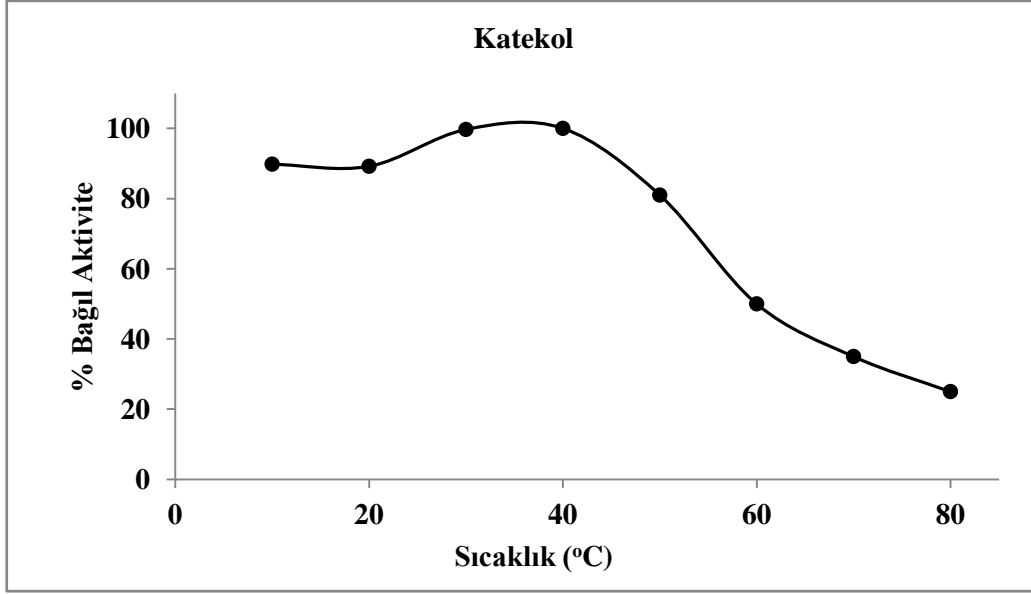
Şekil 26. DHHSA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



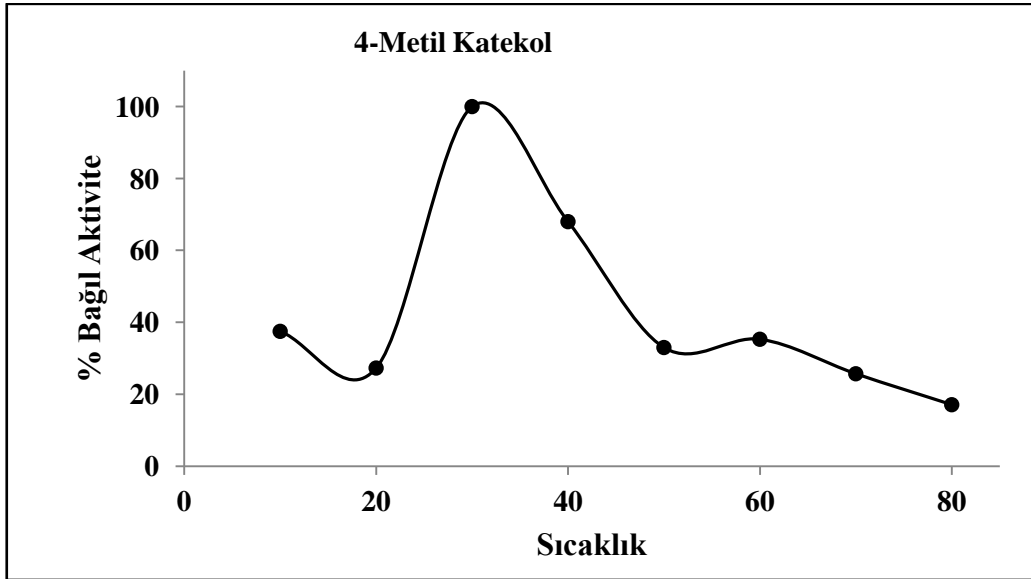
Şekil 27. DHPPA substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 28. *p*-Kumarik asit substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 29. Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 30. 4-Metil Katekol substratı varlığında polifenol oksidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

### 3.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

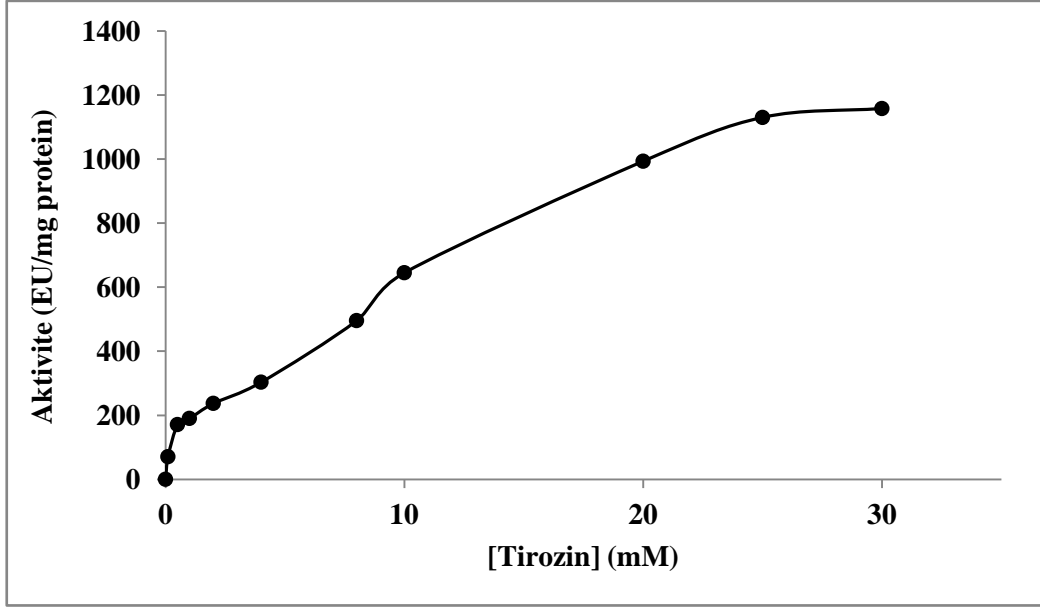
Cancur Eriği PFO' suna ait bazı kinetik verilerinin belirlenmesi amacı ile, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0.1-30 mM aralığında değişen substrat varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her bir substrat için optimum substrat

konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrileri çizildi. Çizilen bu grafiklerden, saflaştırılan PFO' nun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Kinetik veriler olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_M$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) çizilen Lineaweaver-Burk grafiği yardımıyla sırasıyla *L*-tirozin için 9.4 mM, 1250 EU/mg protein (Şekil 31-32), *p*-kumarik asit için 0.9 mM, 370.4 EU/mg protein (Şekil 34-35), DHHSA için 3.8 mM, 1364.2 EU/mg protein (Şekil 37-38), DHPPA için 1.3 mM, 417 EU/mg protein (Şekil 40-41), katekol için 5.6 mM, 3277.6 EU/mg protein (Şekil 43-44) ve 4-metil katekol için 8.1 mM, 3209 EU/mg protein (Şekil 46-47) olarak hesaplandı. Ayrıca reaksiyon katalizleme hızı olan  $k_{kat}$  değerleri hesaplanmış *L*-tirozin için 50.4 ( $dak^{-1}$ ), *p*-kumarik asit için 14.9 ( $dak^{-1}$ ), DHHSA için 55.0 ( $dak^{-1}$ ), DHPPA için 16.8 ( $dak^{-1}$ ), katekol için 132.2 ( $dak^{-1}$ ) ve 4-metil katekol için 129.5 ( $dak^{-1}$ ) olarak bulundu (Tablo 10). Bu verilere göre, Cancur Eriği PFO' sunun en fazla ilgiyi sırasıyla katekol, 4-metil katekol, DHHSA, *L*-tirozin, DHPPA, *p*-kumarik duyduğu gözlemlendi. Tüm substratlar varlığında, Hill eşitliği kullanılarak, Hill eğrileri çizildi (Şekil 33, 36, 39, 42, 45, 48). Çizilen bu grafiklerden yararlanılarak, Hill sabitleri ( $h$ ) yaklaşık 1.0 olarak bulundu (Tablo 10).

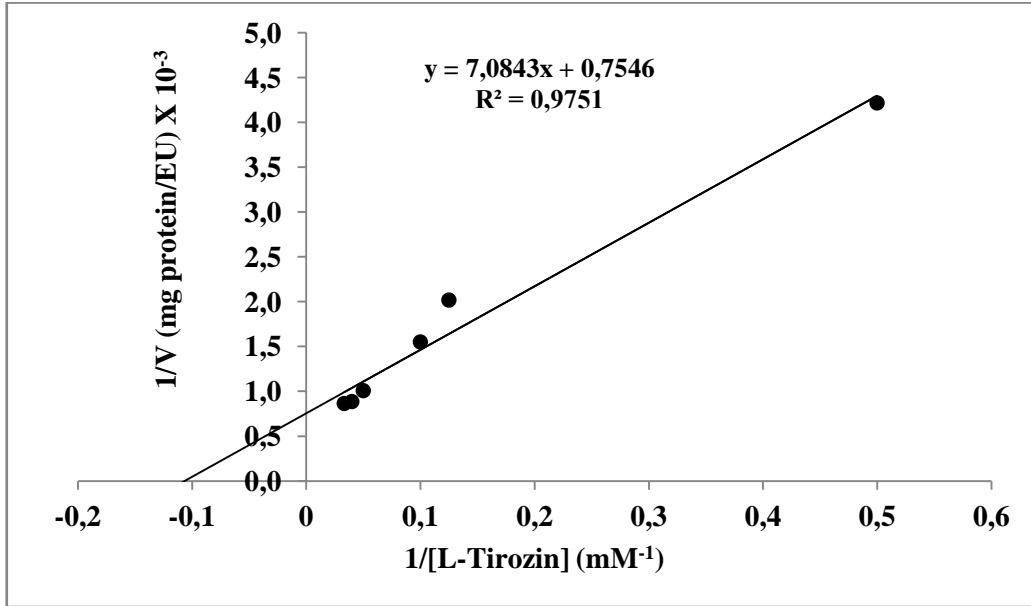
**Tablo 10.** Cancur eriği PFO' sunun bazı substratları varlığında biyokimyasal ve kinetik verileri.

Substrat	pH	Sıcaklık (°C)	$K_M$ (mM)	$V_{maks}$ (EU/mg protein)	$k_{kat}$ ( $dak^{-1}$ )	Hill Sabitleri
<i>L</i> -Tirozin	6,0	30	9,4	1250,0	50.4	1,08
<i>p</i> -Kumarik asit	5,0	30	0,9	370,4	14.9	1,06
DHHSA	5,0	30	3,8	1364,2	55.0	0,99
DHPPA	5,0	40	1,3	417,0	16.8	0,96
Katekol	7,0	40	5,6	3277,6	132.2	0,95
4-Metil katekol	7,0	30	8,1	3209,0	129.5	0,99

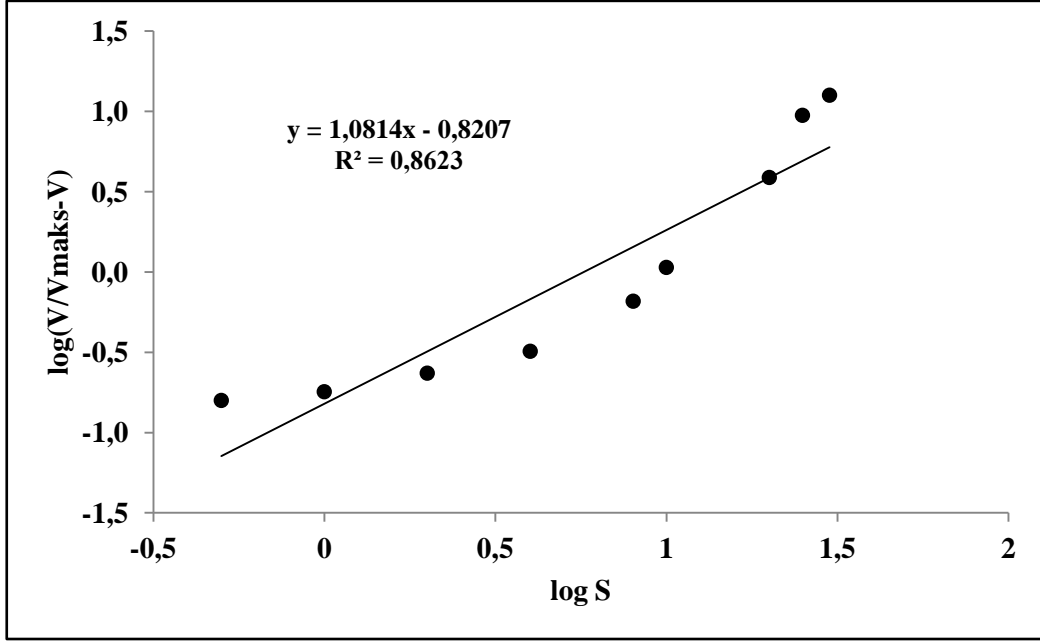




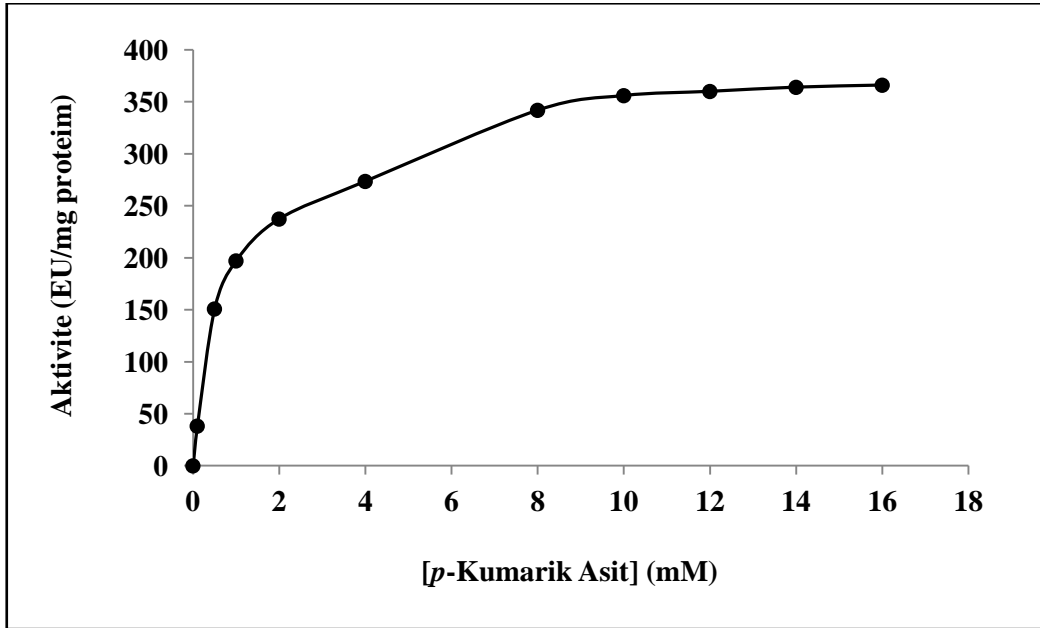
Şekil 31. Cancur eriği PFO' sunun L- Tirozin substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.



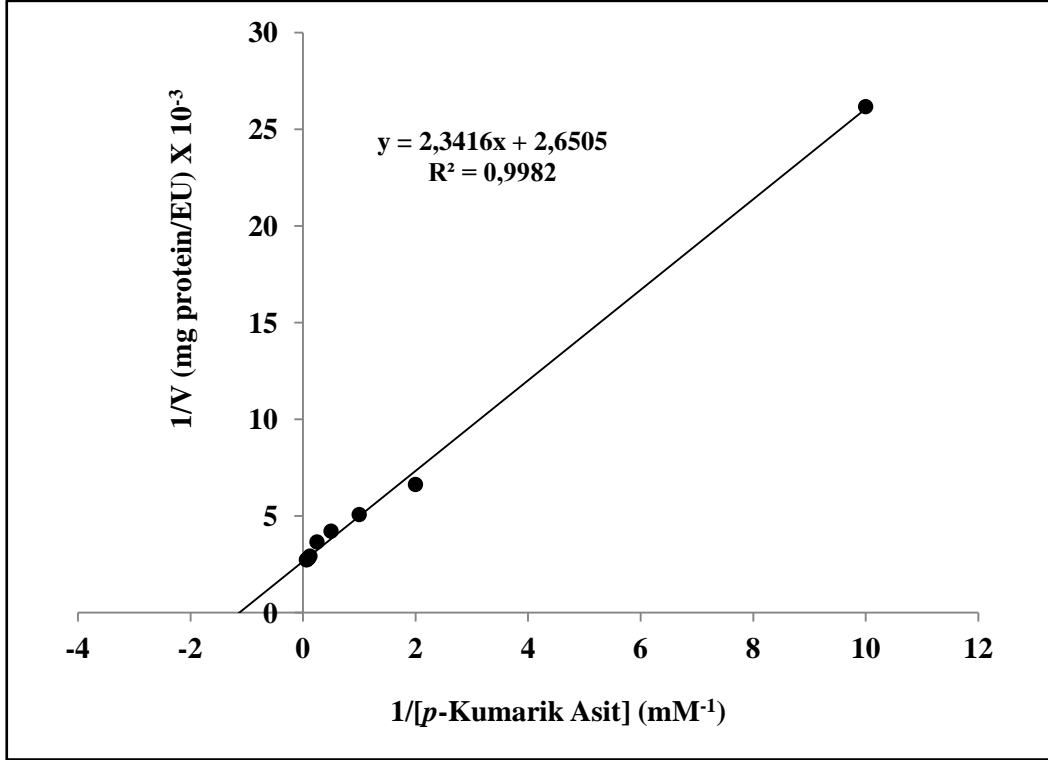
Şekil 32. Cancur Eriği PFO' sunun L- Tirozin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



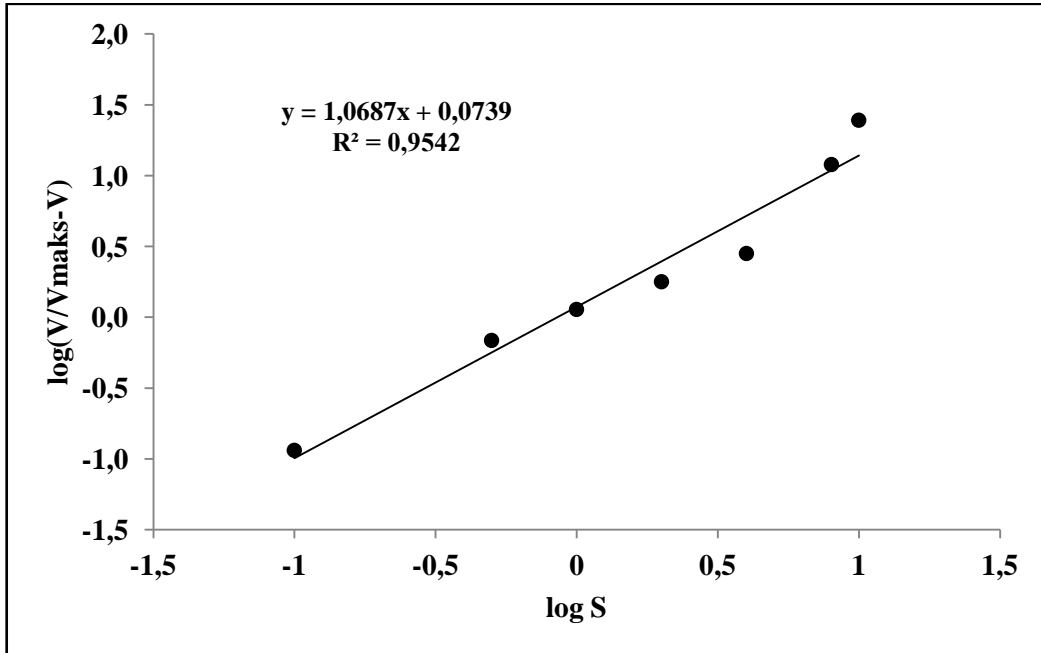
Şekil 33. L- Tirozin substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.



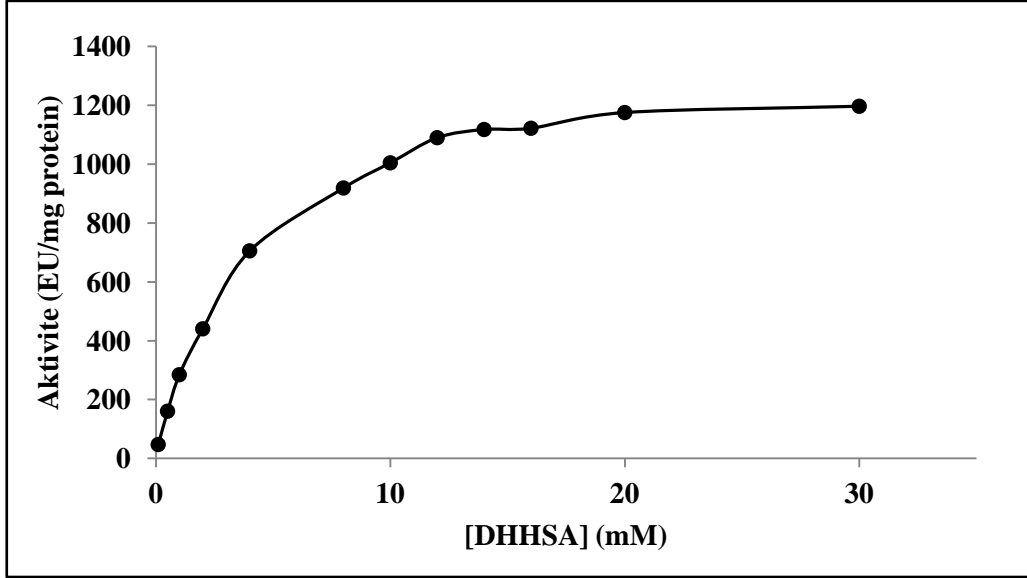
Şekil 34. . Cancur eriği PFO' sunun p-kumarik asit substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.



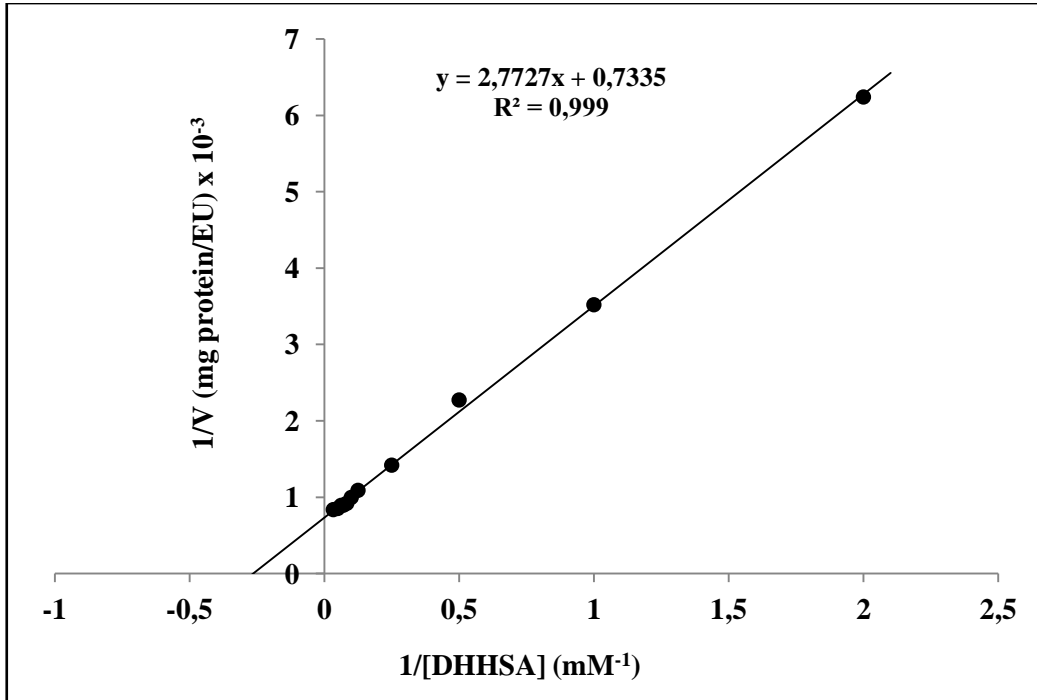
Şekil 35. Cancur Eriği PFO' sunun *p*-kumarik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



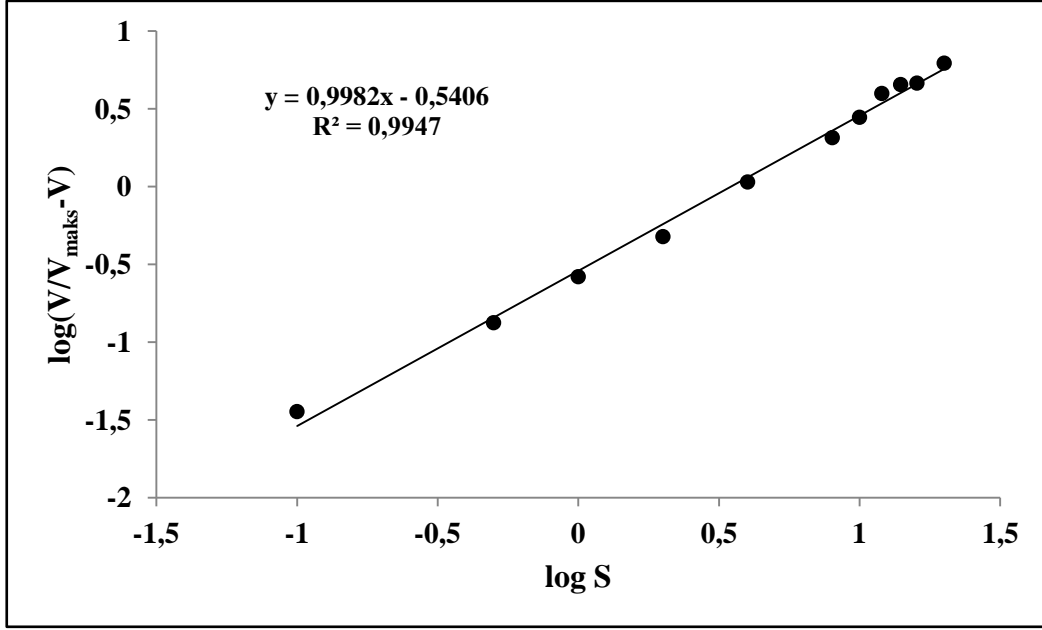
Şekil 36. *p*-Kumarik asit substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.



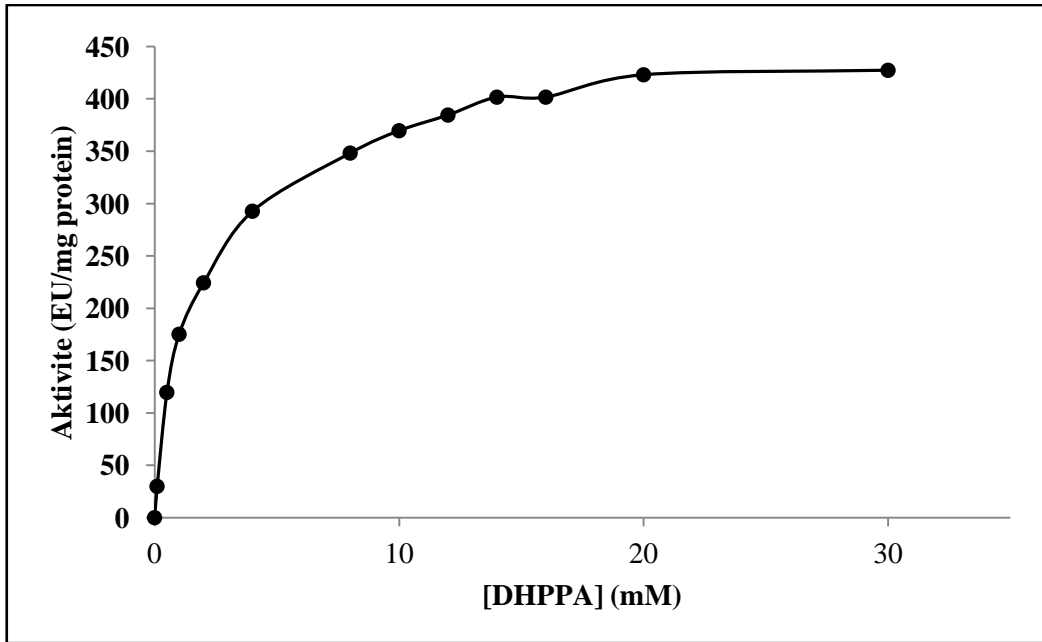
Şekil 37. Cancur eriği PFO' sunun DHHSA substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.



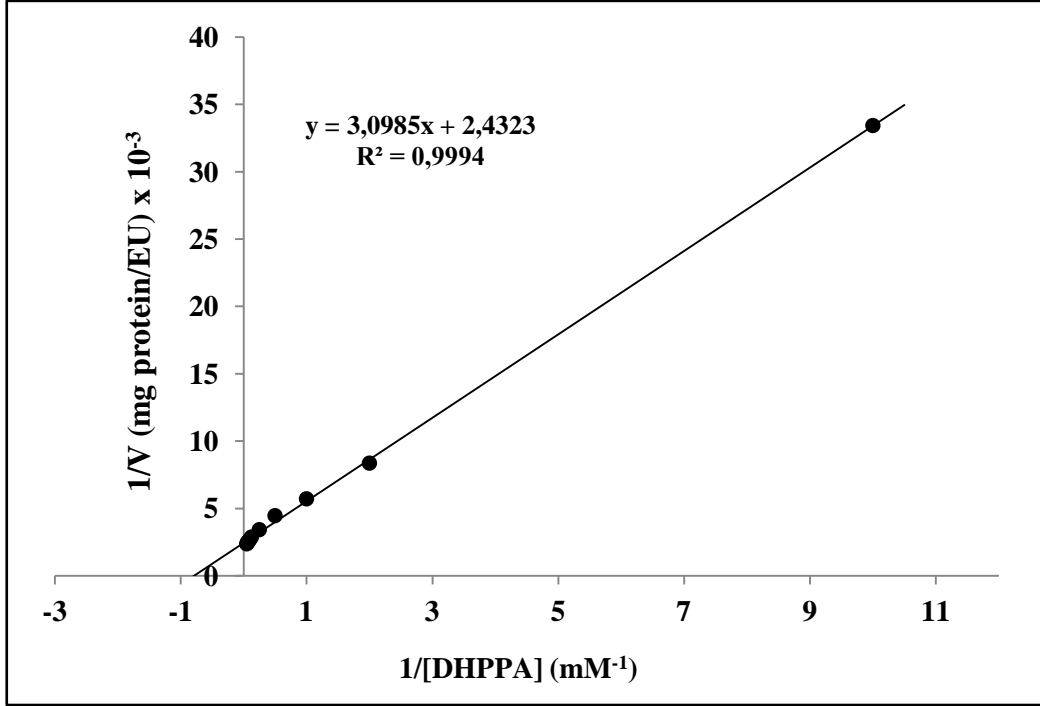
Şekil 38. Cancur Eriği PFO' sunun DHHSA substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



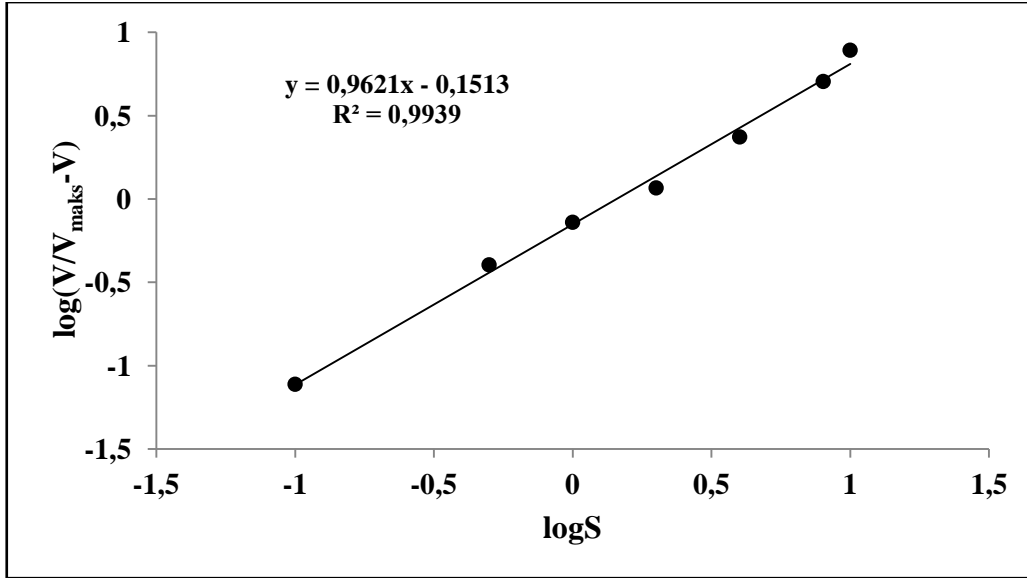
Şekil 39. DHHSA substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.



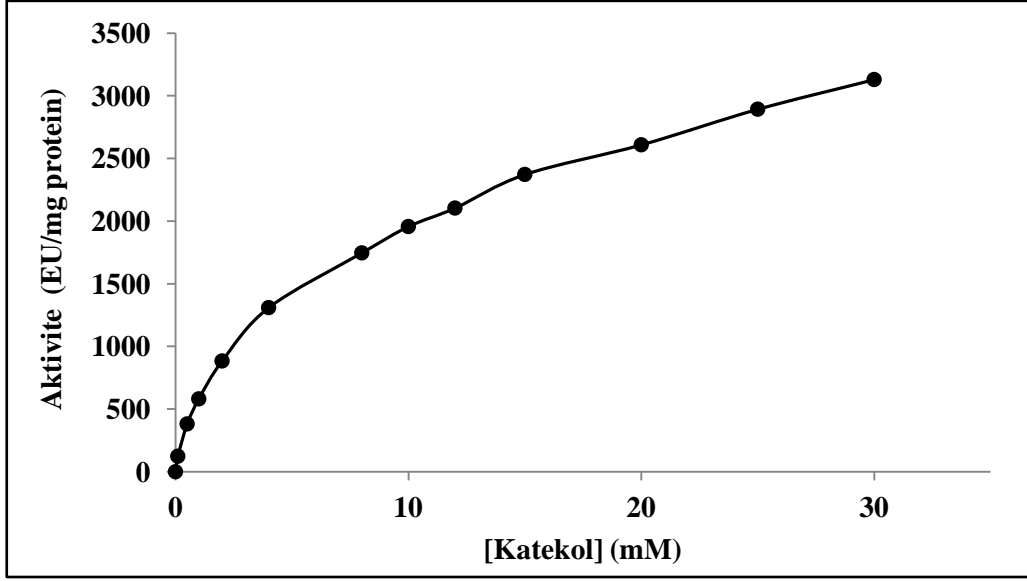
Şekil 40. Cancur eriği PFO' sunun DHPPA substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.



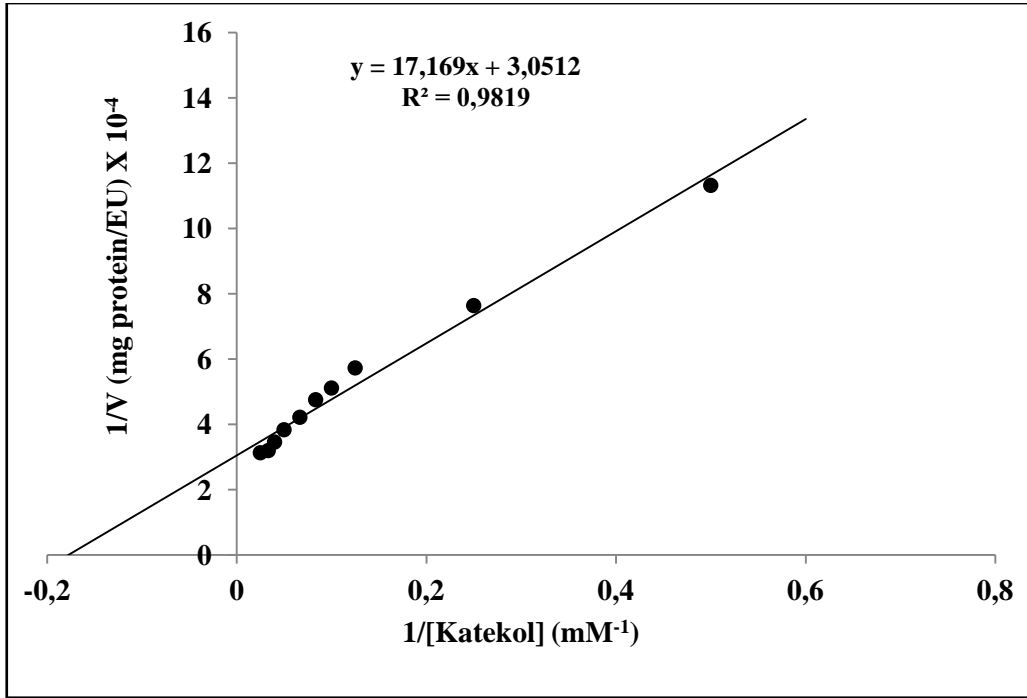
Şekil 41. Cancur Eriği PFO' sunun DHPPA substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



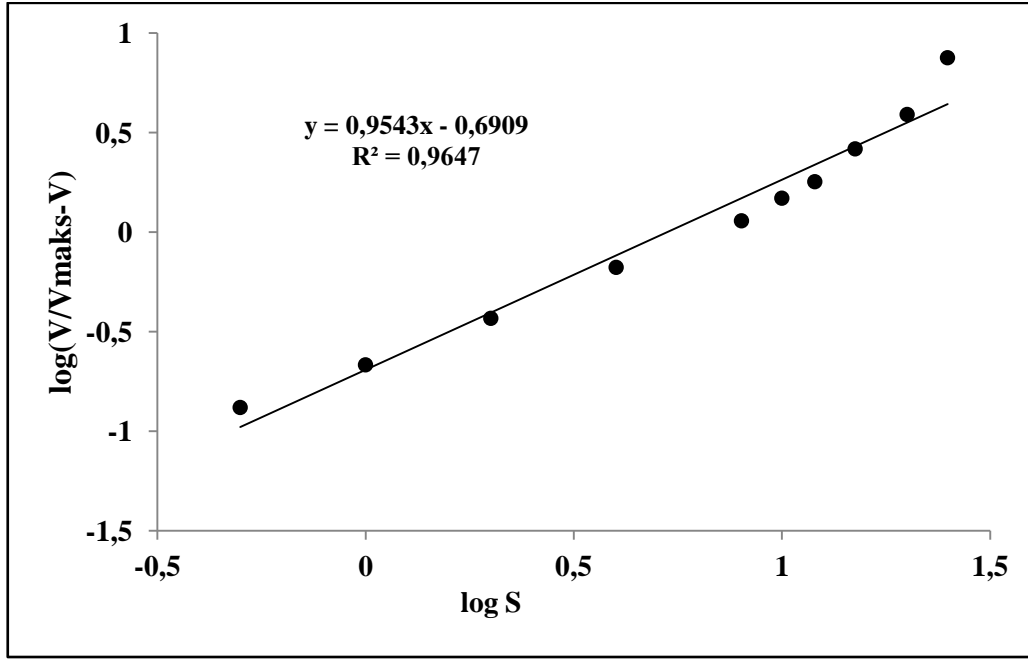
Şekil 42. DHPPA substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.



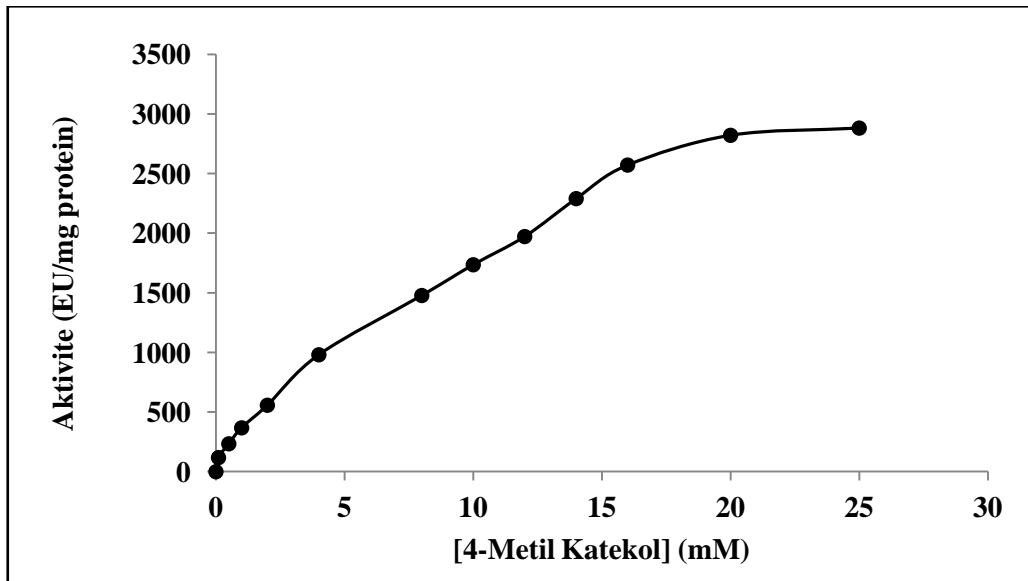
Şekil 43. Cancur eriği PFO' sunun katekol substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.



Şekil 44. Cancur Eriği PFO' sunun katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.

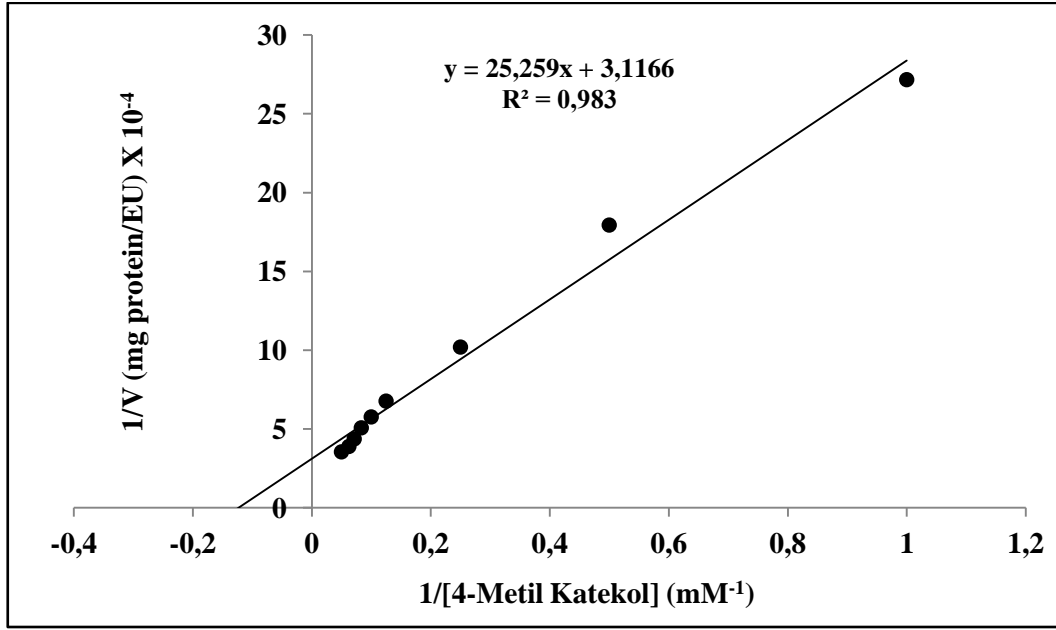


Şekil 45. Katekol substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.

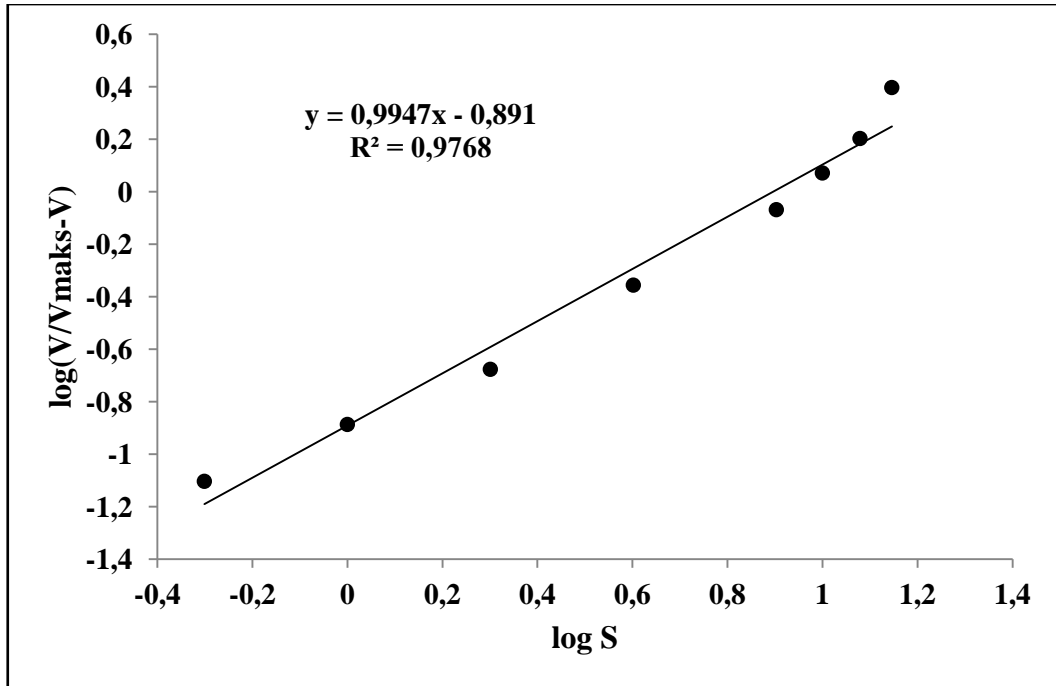


Şekil 46. Cancur eriği PFO' sunun 4-metil katekol substratı varlığında Michaelis-Menten eğrisi.





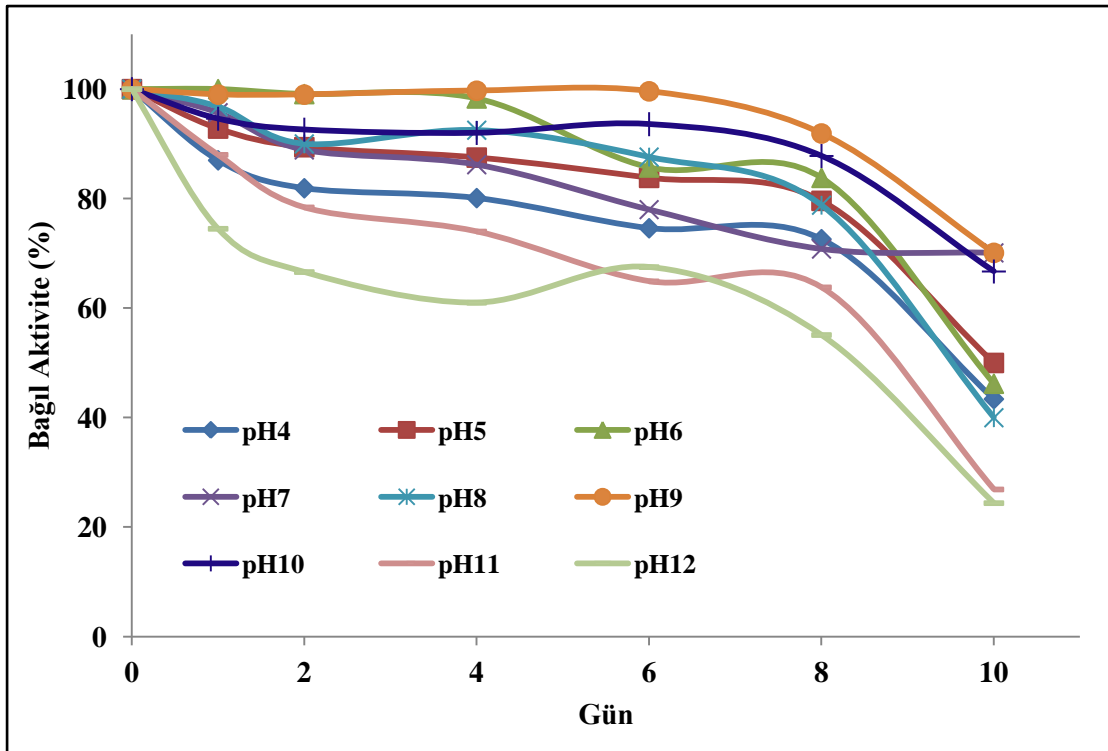
Şekil 47. Cancur Eriği PFO' sunun 4-metil katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 48. 4-Metil katekol substratı varlığında elde edilen Hill eğrisi.

### 3.2.4. pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4-12 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C’ de 10 gün boyunca inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında ve 4-metil katekol substratı varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Cancur eriği PFO aktivitesi 8 gün boyunca pH 9.0’ da kararlılık gösterirken 10. gün sonunda aktivitesinde yaklaşık % 25 oranında azalma gözlemlendi. pH 10 ve pH 6-8 arasında aktivitesini % 90 oranında muhafaza ettiği 10. Gün sonunda ise ilk gün aktivitesinin yaklaşık % 25 oranında kaybettiği tespit edildi. pH 4’ de 8 gün boyunca yapılan inkübasyonda ilk gün aktivitesini yaklaşık % 80 oranında 10. Gün sonunda aktiviteyi % 45 civarında koruduğu belirlendi. pH 11-12 arasında ise kararlılığının daha az olduğu ve 10. Gün sonunda ilk gün aktivitesini % 80 oranında kaybettiği gözlemlendi (Şekil 49).

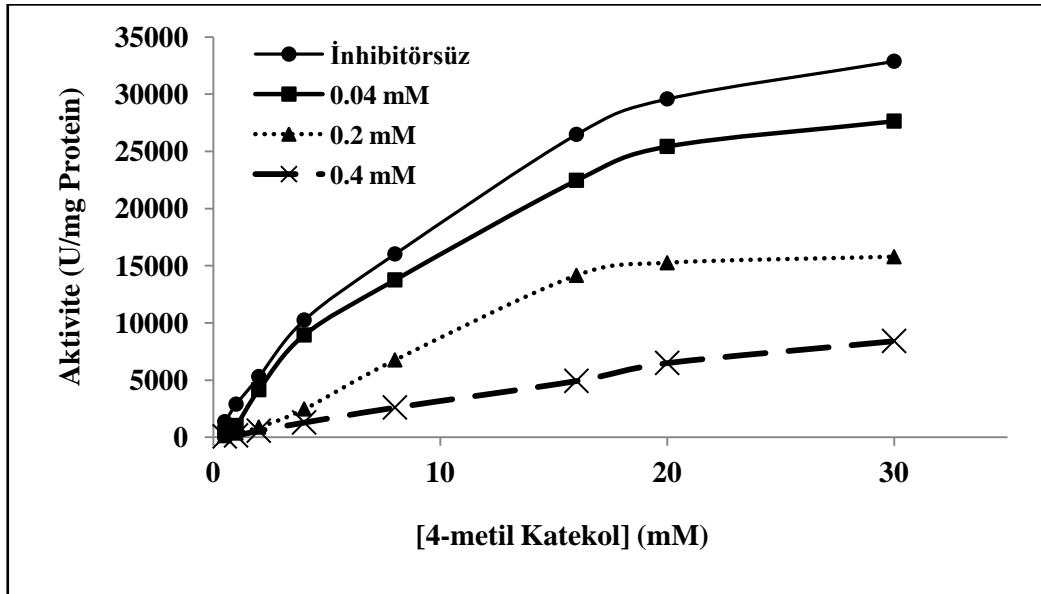


Şekil 49. Cancur eriği PFO enziminin +4 °C’ deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.

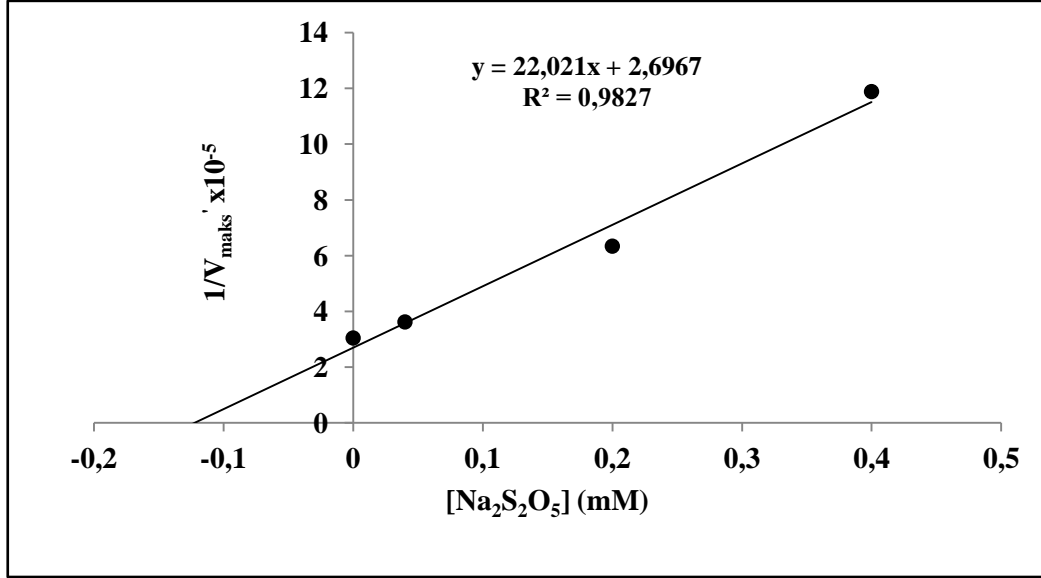
### 3.2.5. Cancur Eriği PFO' su İçin İnhibisyon Çalışmaları

#### 3.2.5.1. PFO' nun Sodyum Metabisülfite İnhibisyonu

PFO aktivitesinin 4-metil katekol substratı ile sodyum metabisülfite inhibitörü varlığında inhibe olduğu ve  $K_m$  değerinin sabit,  $V_{maks}$  değerinde düşüş olduğu tespit edildi (Şekil 50). Yarışmasız inhibisyon ikincil grafiği yardımıyla  $K_i$  değeri 0.12 mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 51, Tablo 11).



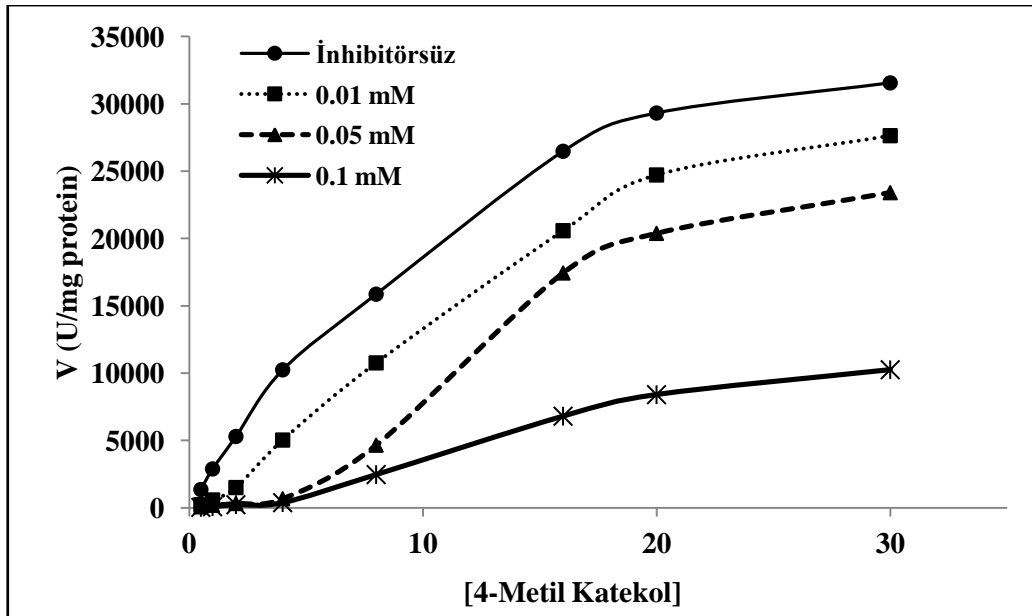
Şekil 50. Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum metabisülfite ile inhibisyonu.



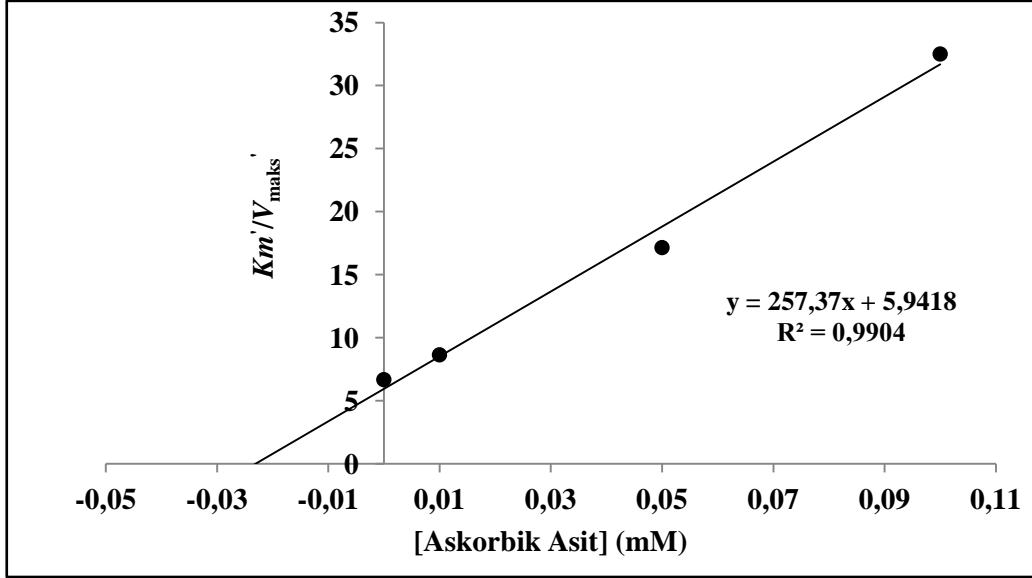
Şekil 51. Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum metabisülfid ile inhibisyonu ikincil grafiği

### 3.2.5.2. PFO' nun Askorbik Asit İnhibisyonu

Askorbik asit inhibitörü ile Cancur eriği PFO aktivitesinin inhibisyonunda,  $K_m$  değerinde artış,  $V_{maks}$  değerinde ise düşüş gözlemlenmiştir. Karışık inhibisyon özelliğini taşıyan askorbik asit için  $K_i$  değeri 0,02 mM olarak belirlendi (Şekil 52) (Tablo 11).



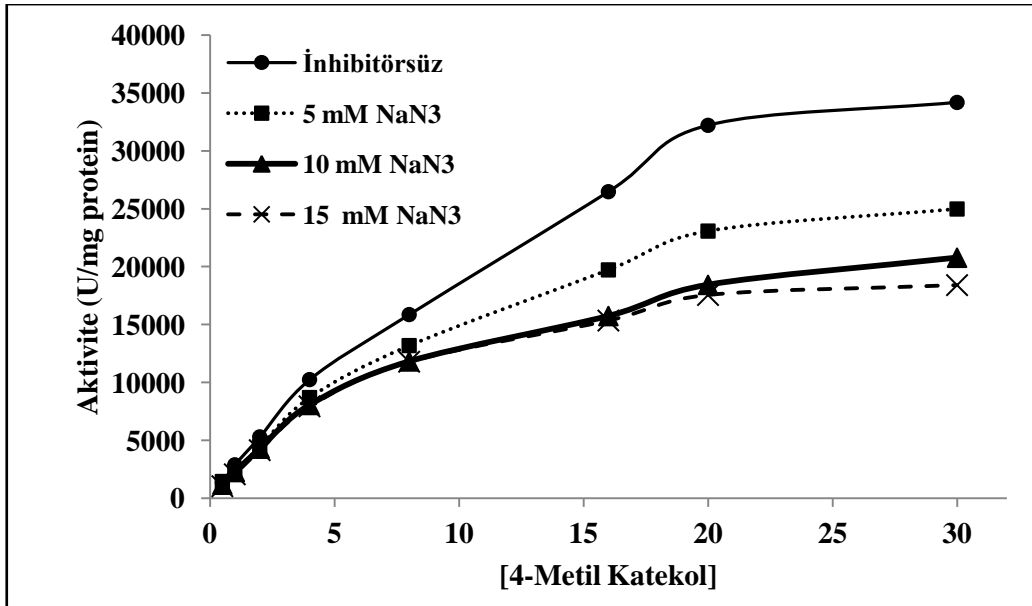
Şekil 52. Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu



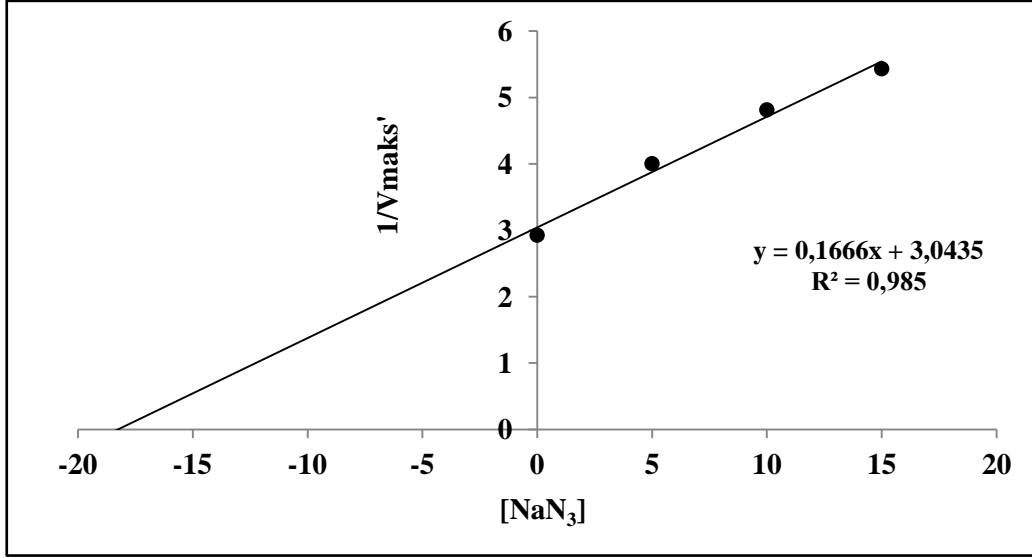
Şekil 53. Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği.

### 3.2.5.3. PFO' nun Sodyum Azid İnhibisyonu

PFO 4-metil katekol substratı ile sodyum azid inhibitörü varlığında yarışmasız inhibisyon türü gösterdiği (Şekil 54) ve  $K_i$  değerinin 18.3 mM olduğu tespit edildi (Şekil 55, Tablo 11).



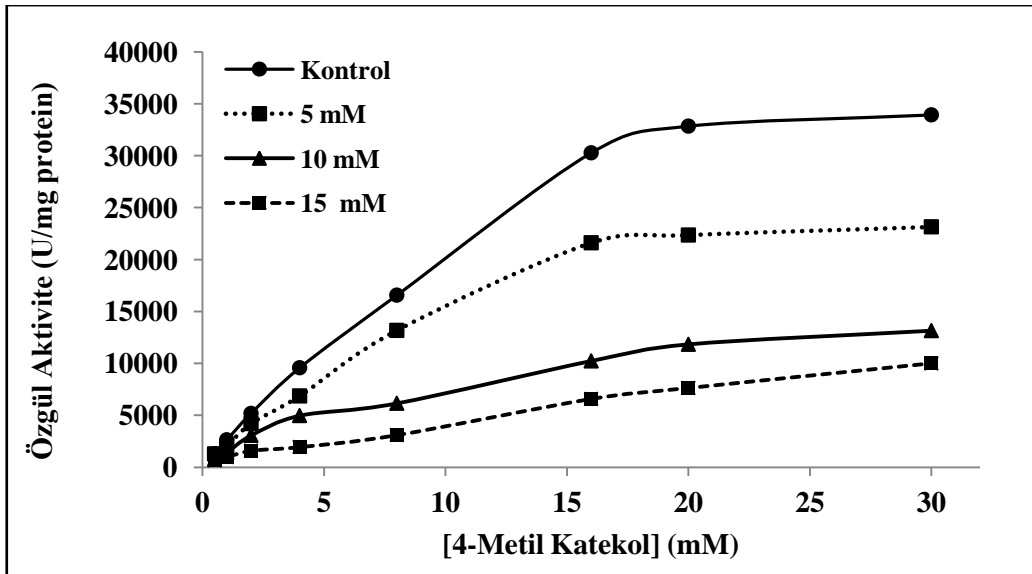
Şekil 54. Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu.



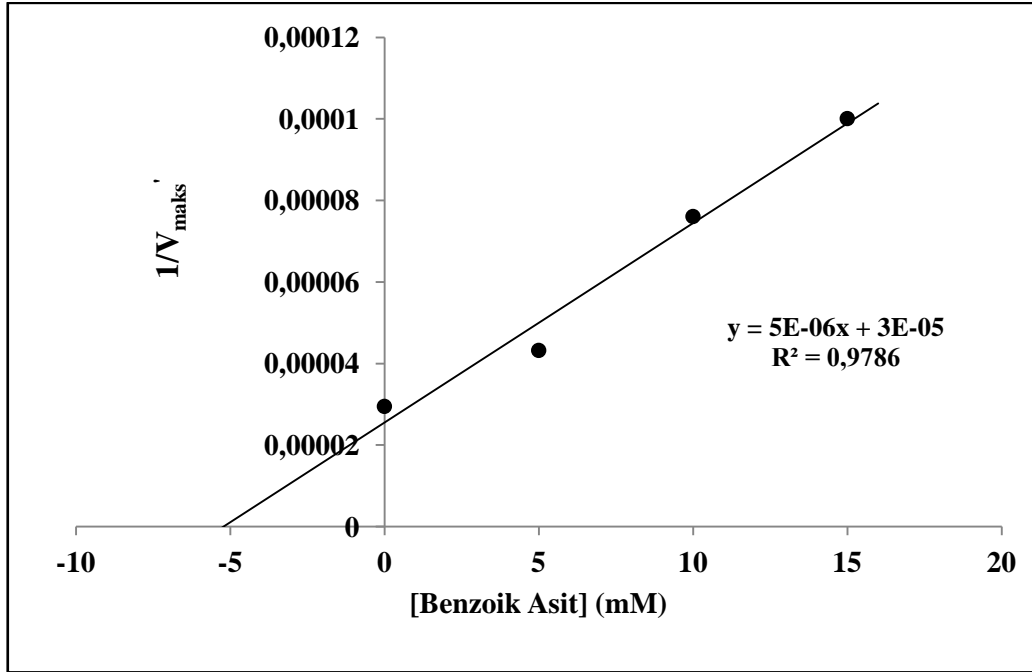
Şekil 55. Cancur eriği PFO aktivitesinin sodyum azid ile inhibisyonu ikincil grafiği.

### 3.2.5.4. PFO Benzoik asit İnhibisyonu

Benzoik asit inhibitörü varlığında ise PFO aktivitesi yarışmasız inhibisyon türü olarak belirlendi (Şekil 56) (Tablo 11). Çizilen  $1/V_{maks}' - [Inhibitör]$  ikincil grafiğinin doğru denkleminde  $K_i$  değeri 6.0 mM olarak hesaplandı (Şekil 57).



Şekil 56. Cancur eriği PFO aktivitesinin benzoik asit ile inhibisyonu.



Şekil 57. Cancur eriği PFO aktivitesinin askorbik asit ile inhibisyonu ikincil grafiği.

**Tablo 11.** İnhibitörlerin PFO ile katalizlenmiş 4-metil katekol oksidasyon aktivitesi üzerine etkisi.

İnhibitör	İnhibisyon Türü	K <sub>i</sub> (mM)
Sodyum metabisülfid	Yarışmasız	0,12
Askorbik asit	Karışık	0,02
Sodyum azid	Yarışmasız	18,3
Benzoik asit	Yarışmasız	6,0

### 3.2.6. Bazı Metal İyonlarının PFO Aktivitesi Üzerine Etkisi

Cancur eriği PFO' su aktivitesi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> ve Sr<sup>2+</sup> iyonlarının 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarında çalışıldı. Yapılan çalışma sonucunda metal katyonlarının Cancur eriği PFO' sunun aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe etmedikleri, hatta Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, ve Al<sup>3+</sup> katyonlarının aktiviteyi arttırdığı tespit edildi (Tablo 12).

**Tablo 12.** Bazı Metal İyonlarının Cancur eriği aktivitesi üzerine etkisi.

Metal iyonları	Bağlı Aktivite (%)	
	0.5 mM	1 mM
Kontrol	100	100
Na <sup>+</sup>	102	96,8
Ca <sup>2+</sup>	90	91,3
Cu <sup>2+</sup>	113	125
Ba <sup>2+</sup>	97,2	97
Co <sup>2+</sup>	153,7	167,2
Zn <sup>2+</sup>	149,8	163,4
K <sup>+</sup>	96,8	85,7
Ni <sup>2+</sup>	158,6	151,5
Mg <sup>2+</sup>	99	98,6
Cd <sup>2+</sup>	98,6	96,9
Al <sup>3+</sup>	112,5	108
Sr <sup>2+</sup>	97,5	97,7

### 3.2.7. Antioksidan Testler

#### 3.2.7.1. Cancur Eriğinin Toplam Fenolik Madde Miktarının ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

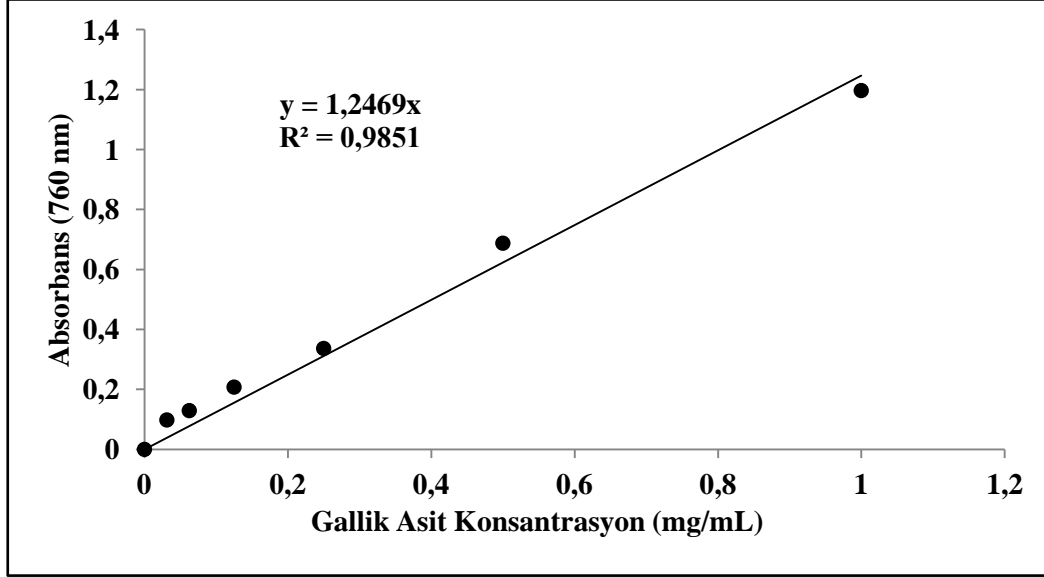
En önemli antioksidan bileşikler fenolik yapıli maddelerdir. Fenoller yapısı bakımından taşıdıkları fonksiyonel gruplar dolayısıyla elektron ve hidrojen verebilir. Bu gruplar radikalleri ve oksitleyici grupları elimine eder. Fenolik gruplar –OH grubunca zengindir. Bu gruplar onlara polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır.

Bu çalışmada toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocalteu metoduna göre yapıldı. Standart olarak kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi için bu maddelerin altı farklı konsantrasyonda metanoldeki çözeltileri hazırlandı (Şekil 58).

Cancur eriği ekstraktında bulunan toplam fenolik madde miktarı Şekil 58' de gallik asit için verilen kalibrasyon grafik eğim denkleminde gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denklemi  $y = 1.2469x$  olarak bulundu. Cancur eriğinin



suda ekstreğinde toplam fenolik madde miktarı  $114.6 \pm 5$  mg GAE/100 g olarak belirlendi (Tablo 13).

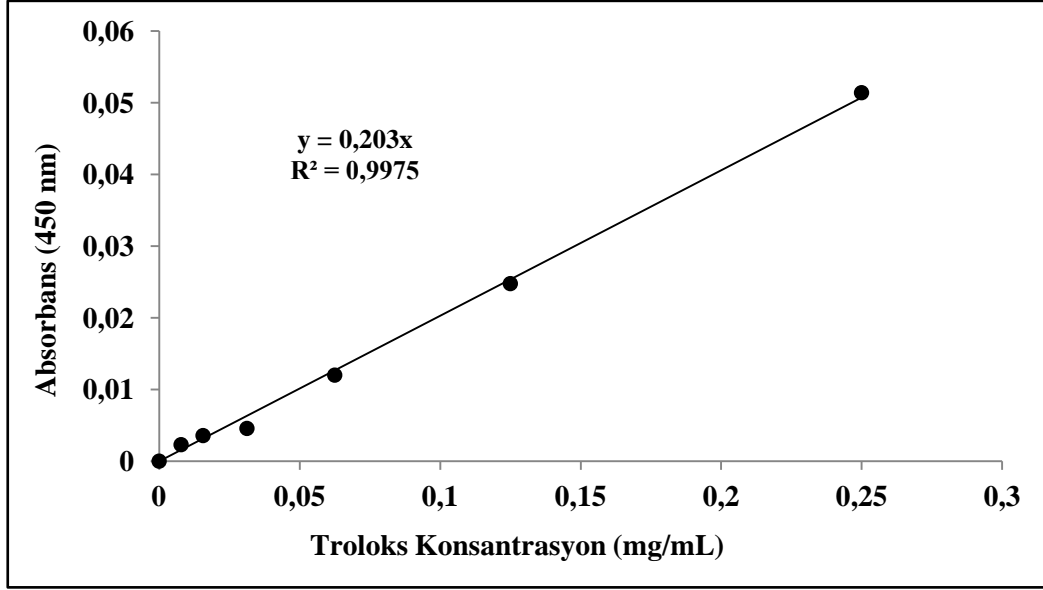


Şekil 58. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit kalibrasyon grafiği.

### 3.2.7.2. Bakır İndirgeme Gücü (CUPRAC) Metodu

CUPRAC yöntemi, Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH 7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek antioksidan çözeltilisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 60 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm' de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir.

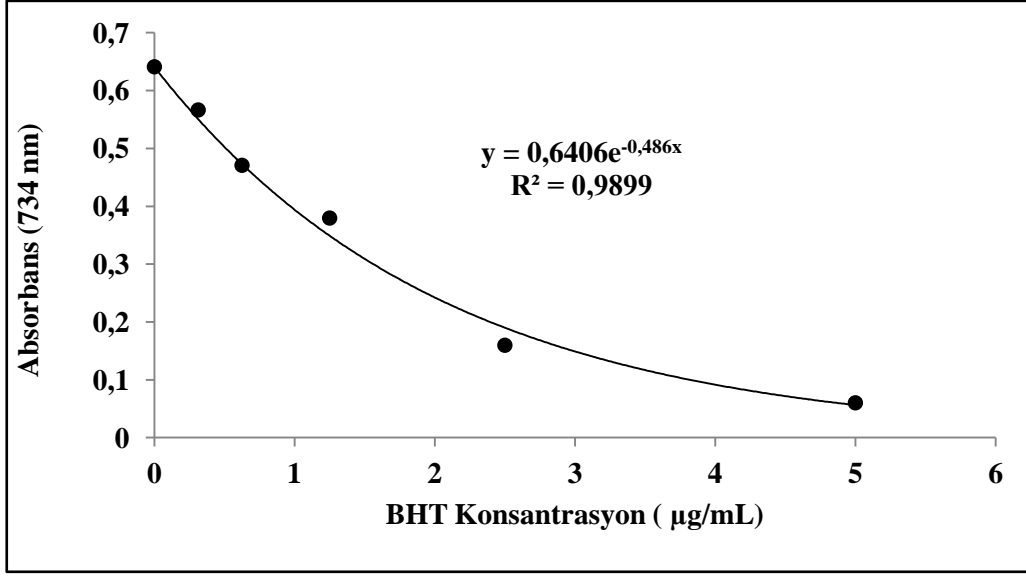
CUPRAC yöntemine göre Cancur eriğinin antioksidan kaasitesi Şekil 59' de verilen troloksa ait 450 nm' deki kalibrasyon grafiğinin eğim denkleminde troloksa eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi  $y = 0.203x$  olarak bulundu (Şekil 59). Bu yöntemle göre Cancur eriğinin ekstraktının antioksidan kapasitesi  $30.19 \pm 0.96$  mg TEAK/ g olarak hesaplandı (Şekil 59).



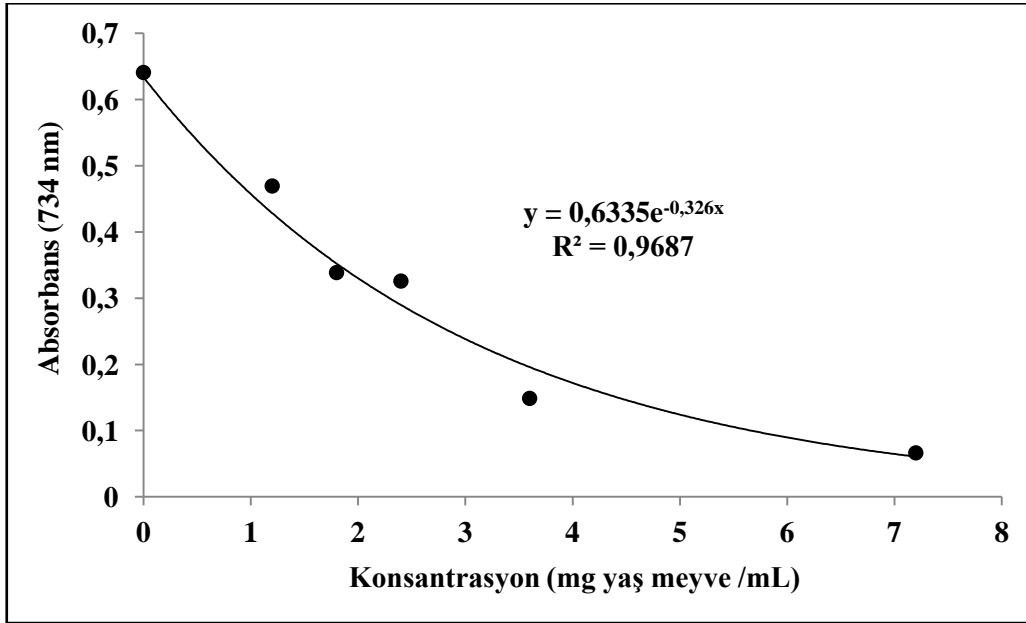
Şekil 59. CUPRAC metodu ile elde edilen standart troloksun kalibrasyon grafiği.

### 3.2.7.3. ABTS' Radikali Temizleme Yöntemi

ABTS' radikali temizleme yöntemi; 2,2'-azino-bis (etilbenziazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu gibi bir azino-bileşiğin ortamdan yok edilmesi, yani bir başka deyişle temizlenmesine dayanan bir antioksidan kapasite belirleme yöntemidir (Yu vd., 2002). Çizilen grafiklerden Cancur eriği ekstraktı ile BHT' nin SC<sub>50</sub> değeri olarak ifade edilen ABTS' radikal konsantrasyonunun yarıya düşüren özüt ya da standardın konsantrasyonu hesaplandı ve SC<sub>50</sub> değerleri BHT için 1.44±0.01 µg/mL, özüt için 2.17±0.01 mg/mL olarak belirlendi (Tablo 13).



Şekil 60. BHT standartına ait ABTS<sup>•</sup> radikali temizleme aktivitesi grafiği.

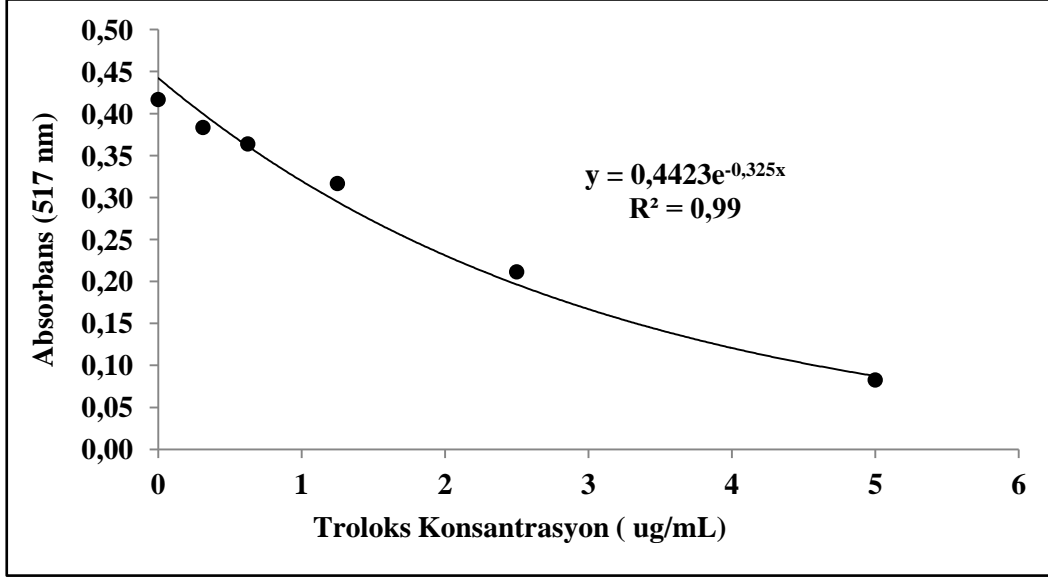


Şekil 61. Cancur eriği ekstraktına ait ABTS<sup>•</sup> radikali temizleme aktivitesi grafiği.

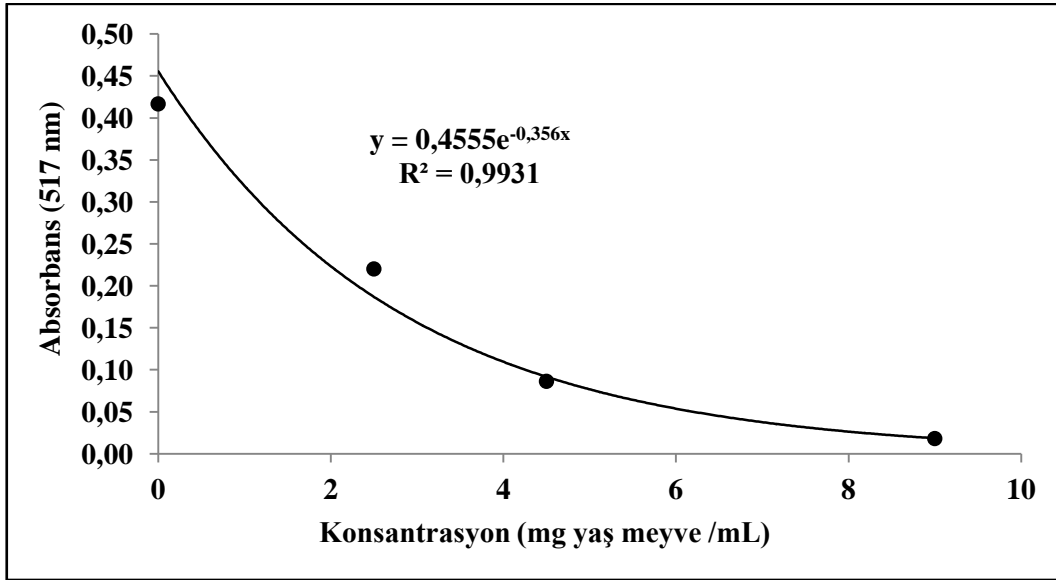
#### 3.2.7.4. DPPH<sup>•</sup> Radikali Temizleme Yöntemi

DPPH<sup>•</sup> radikali temizleme yönteminde, Cancur eriği ekstraktı ile troloks standart antioksidan bileşiğinin DPPH<sup>•</sup> radikal giderme aktivite tayini için kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 62-63). Elde edilen grafiklerden eriğin sulu özütü ile troloksun SC<sub>50</sub> değeri olarak ifade edilen DPPH<sup>•</sup> radikal konsantrasyonunun yarıya düşüren sulu özüt ya da

standardın konsantrasyonu sırasıyla  $1.98 \pm 0.01$  ve  $2.17 \pm 0.01$  mg/mL olarak hesaplandı (Tablo 13).



Şekil 62. Troloks standartına ait DPPH• radikali temizleme aktivitesi grafiği.



Şekil 63. Cancur eriği ekstraktına ait DPPH• radikali temizleme aktivitesi grafiği

**Tablo 13.** Cancur Eriğinin (*Prunus domestica* L.) Antioksidan Seviyeleri

	<b>Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g)</b>	<b>CUPRAC (mg TEAK/ g)</b>	<b>ABTS SC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>DPPH SC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
Cancur Eriği	114.6±5.0	30,19±0.96	2.17±0.01	1,98±0.02

Cancur eriği fenolik bileşik ve antioksidan kapasitesi bakımından oldukça zengin olduğu söylenebilir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Doğanın katalizörleri olan ve hayatın var olabilmesi için gerekli olan enzimler, özellikleri ve farklı organizmalardaki davranışları açısından, yaklaşık 200 yıldır incelenmektedir. Yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle, oksidoredüktaz sınıfı enzimler üzerinde, diğer enzimlere göre daha az çalışılmıştır. Ancak, son yıllarda PFO, araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir (Seo vd., 2003). PFO, hem katalizlediği reaksiyonlar hem de fizyolojik görevleri açısından, içinde bulunduğu organizmaya ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak, aynı organizmanın farklı çeşitlerinde bile farklı oranlarda aktivite gösterebilir.

Yapılan bu çalışmada, Ardahan İli Posof İlçesi Türkgözü Köyünden toplanmış olan Cancur Eriğinde (*Prunus domestica* L.) PFO' nun varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konuldu. Bu amaçla; Cancur eriğinden hazırlanan enzim özütünden PFO, sentezlenen bir afinite jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisiyle saflaştırıldı. Enzimin varlığı, saf enzim elüatında ve ham enzim özütünde elektroforetik olarak belirlendi. Elde edilen saf PFO' nun biyokimyasal ve kinetik özellikleri ayrıntılı olarak incelendi. Ayrıca Cancur eriğinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi belirlendi.

Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli (Arslan vd., 2004) sentezlenerek, PFO' nun Cancur eriğinden saflaştırılması gerçekleştirildi. Ham enzim elüatında enzimin spesifik aktivitesi 5809.5 EU/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO' nun spesifik aktivitesi 375362.3 EU/mg protein olarak bulunduğu ve enzimin 65 kat saflaştığı tespit edildi. Aynı afinite jeli ile PFO' nun dut meyvelerinden 74 kat (Arslan vd., 2004), *B. erythropus*' tan 28.5 kat (Özen, 2008) ve *L. piperatus*' tan 13.9 kat (Öz, 2013) saflaştırıldığı belirtilmiştir. Ayrıca, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel flitasyon kromatografisi, PFO' nun çeşitli organizmalardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler kullanılarak yapılan PFO saflaştırma çalışmalarında, PFO, fasulye tohumlarından 34 kat (Paul ve Gowda, 2000), aysberg marulundan 44.8 kat (Chazarra vd., 2001), *Lactuca sativa* var. *capitata* L.'den 19.4 kat (Gawlik-Dziki vd., 2007), yenedünya meyvesinden 39.9 kat (Selles-Marchart vd., 2006), bir çeşit kestaneden 36.87

kat (Xu vd., 2004), armuttan 10.8 kat (Zhou ve Feng, 1991), bir tür patatesten 6.5 kat (Martin ve Ruberte, 1976) ve *Ferula* sp. saplarından 25.78 kat (Erat vd., 2006) saflaştırılmıştır.

Kromatografik ayırma işleminden sonra, elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edildi. Ham enzim özütünün ve saf enzim elüatının tatbik edildiği % 10' luk doğal poliakrilamid jel elektroforezinde, *L*-DOPA substrat boyaması sonucunda, PFO' nun varlığını gösteren iki bant gözlemlendi. Ayrıca, aynı jel üzerine uygulanan saf enzim elüatında, yapılan coomassie brilliant blue R-250 boyama ile, aynı protein bantlarının varlığı ve bu bandın da PFO' ya ait olduğu ortaya konuldu (Şekil 17). Daha önce farklı bitki, sebze ve diğer organizmalarda yapılan çalışmalar sonucunda, birden fazla PFO izoenzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları, kuşburnu (Şakiroğlu vd., 1996), papaya (Cano vd., 1996), döngel (Dincer vd., 2002), Trabzon hurması (Özen vd., 2004), karayemiş (Colak vd., 2005), *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4 (Yildirim vd., 2004) ve *Macrolepiota mastoidea* mantarı (Kolcuoglu vd., 2007) olarak sıralanabilir.

Ham enzim özütü, saf enzim elüatı ve standartların birlikte yüklendiği % 12' lik SDS poliakrilamid jel elektroforezinde, gümüş nitrat boyama sonucunda, ham enzim özütünde var olan çok sayıdaki protein bantlarına karşılık, saflaştırılan protein kısmında iki izoenzime ait bantların varlığı belirlendi (Şekil 17). Bu iki izoenzime ait proteinlerin yaklaşık 32 ve 40 kDa alt birim molekül ağırlına sahip oldukları tespit edildi. *B. erythropus*' tan ve *Lactarius piperatus*' tan saflaştırılan PFO' ların yaklaşık 40 kDa (Öz vd., 2013), fuji elması PFO'su 67.3 kDa (Liu 2015), Ataulfo mango ekstreğinde 53 and 112 kDa molekül ağırlıklarında sahip iki PFO izoenziminin (Cheema vd., 2015) olduğu belirtilmiştir.

Cancur eriği PFO' sunun monofenolaz aktivitesinin belirlenmesinde *L*-Tirozin ve *p*-kumarik asit monofenolik substratları kullanıldı. *L*-Tirozin ise en yüksek aktivitesini pH 6.0' de ve 30 °C' de *p*-kumarik asit ise pH 5.0' da ve 30 °C gösterdiği belirlendi (Tablo 10). Değişik organizmalardan hazırlanan ham özütlerdeki veya saflaştırılmış PFO' ların monofenolaz aktivitelerini en yüksek aktivitenin patlıcan için pH 5.5' da (Perez-Gilabert ve Carmona, 2000), Avokado için pH 6.8' de (Espin vd., 1997),

Kuşburnu meyvesinde 7.0' da (Şakiroğlu vd., 1996) olduğu belirtilmektedir. Cancur eriği PFO' sunun monofenolaz aktivitesi için *L*-tirozin substratı varlığında  $K_m$  9.4 mM,  $V_{maks}$  1250 EU/mg protein ve  $k_{kat}$  50.4 dak<sup>-1</sup>, *p*-kumarik asit varlığında  $K_m$  0.9 mM,  $V_{maks}$  370.4 EU/mg protein ve  $k_{kat}$  14.9 dak<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. PFO' nun monofenolaz aktivitesi tüm meyve sebzelerde gözlenmediği için literatürde detaylı monofenolaz kinetik çalışmalar oldukça az olduğu görülmektedir. *Pseudomonas putida* F6 dan elde edilen tirozinazın *L*-tirozin substratı varlığında  $K_m$  değeri 0.23 mM ve  $V_{maks}$  değeri 386 EU/mL olarak belirlendiği belirtilmektedir (McMahon vd., 2007).

Difenolaz aktivitesi 3,4-dihidroksihidrosinamik asit, 3,4-dihidroksifenil propiyonik asit, katekol ve 4-metil katekol substratları varlığında karakterize edildi. Difenolaz aktivitesinin 3,4-dihidroksihidrosinamik asit için pH 5.0, 30 °C; 3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit için pH 5.0, 40 °C; 4-metil katekol için pH 7.0, 30 °C ve katekol için ise pH 7.0, 40 °C' de en yüksek olduğu tespit edildi. Enzimlerde, optimum pH ve sıcaklıklar değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ham enzim özütü hazırlama yöntemine ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir (Aylward ve Haisman, 1969; Jiang, 1999). Değişik organizmalardaki difenolazların, 4-metil katekol varlığında karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, PFO için optimum pH, dutta 5.0 (Arslan vd., 2004), bir tür avakadoda 4.5 ve 5.0 (Gomez-Lopez, 2002), bir tür elmada 5.0 ve 7.5 (Rocha ve Morais, 2001), fasulye tohumlarında ve yaban mersininde 4.0 (Paul ve Gowda, 2000; Kader vd., 1997), ahudududa 8.0 (Gonzales vd., 1999) ve kuşburnunda 8.5 (Şakiroğlu vd., 1996) olarak belirlenmiştir. Ayrıca Amasya Elmasından elde edilen PFO' nun katekol substratıyla en yüksek aktivitesini pH 7.0' de gösterdiği (Oktay vd., 1995), döngel meyvelerinden elde edilen PFO' un katekol substratıyla pH 8.5' de 55 °C' de, 4-metil katekol substratıyla pH 6.5' de 35 °C' de, DHPPA substratıyla pH 5.5' de 35 °C' de en yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Dinçer vd., 2002), Trabzon hurmasından elde edilen PFO'nun katekol substratıyla pH 7.5' de 20 °C' de, 4-metil katekol substratıyla pH 7.5' de 40 °C' de, DHPPA substratıyla pH 5.5' de 60 °C' de en yüksek difenolaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Özen 2004).

Enzim konsantasyonu sabit tutularak, değişen substrat konsantrasyonlarında çizilen substrat-doygunluk grafiklerinden, Cancur eriği PFO' sunun basit Michaelis-



Menten kinetiğine uyduğu açıkça görüldü (Şekil 31, 34, 37, 40, 43, 46). Enzimin, difenolik substratları varlığındaki kinetik verileri olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerleri, çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden sırasıyla, DHHSa varlığında 3.8 mM ve 1364.2 EU/mg protein, DHPPA varlığında 1.3 mM ve 417.0 EU/mg protein, katekol varlığında 5.6 mM ve 3277.6 EU/mg protein ve 4-metil katekol substratı varlığında 8.1 mM ve 3209.0 EU/mg protein olarak tespit edildi (Tablo 10). 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesi için  $K_m$  değerlerinin, kekikte 9.8 mM, Amasya elmasında 3.1 mM (Dogan ve Dogan, 2004), patlıcanda 3.24 mM (Concellon vd., 2004), *Euterpe edulis*' te 2.0 mM (Lourenço vd., 2006), ayvada 4.54 mM (Yagar ve Sagiroglu, 2002), *Portabella* mantarında 2.1 mM (Xiaodong ve Flurkey, 1997) ve *Ferula* sp. saplarında 6.78 mM (Erat vd., 2006) olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte döngel meyvelerinden elde edilen PFO' nun  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla, katekol için 5.7 mM, 88  $\mu$ M/dak, 4-metil katekol için 7.5 mM, 130  $\mu$ M/dak, DHPPA için 1.9 mM, 7.2  $\mu$ M/dak olduğu belirtilmiştir (Dinçer vd., 2002), Trabzon hurmasından elde edilen PFO' nun, katekol için 12.4 mM, 55.2  $\mu$ M/dak, 4-metil katekol için 14.6 mM, 49.5  $\mu$ M/dak, DHPPA için 12.8 mM, 17.2  $\mu$ M/dak  $K_m$  ve  $V_{maks}$  kinetik değerlerine sırasıyla sahip olduğu bildirilmiştir (Özen 2004). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bazı farklı kaynaklarda gözlenen difenolazlar için, katekol ve 4-metil katekol gibi küçük moleküler ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar olduklarını gösteren sonuçlarla uyumludur (Palmer, 1995; Walker, 1995; Cano vd., 1996; Perez-Gilabert ve Garcia-Carmona 2000; Özen vd., 2004). Ayrıca, bu enzimin 4-metil katekol gibi küçük substrata ilgi duyması, enzimin, küçük substrat bağlanma bölgesine sahip olduğunu gösterir.

Difenolaz aktitesi için yapılan kinetik çalışmalar sonucunda Cancur eriği PFO' sunun en fazla katekol substratına ilgi duyduğu bunu sırasıyla, 4-metil katekol, DHHSa ve DHPPA' nın izlediği tespit edildi. Birçok benzer çalışmada PFO' nun katekol ve 4-metil katekol substratlarına daha çok ilgi duyduğu belirtilmektedir (Dinçer vd., 2002; Özen vd., 2005).

Substratları varlığında, Hill eşitliği kullanılarak, Hill eğrileri çizildi. Çizilen bu grafiklerden yararlanılarak, Hill sabitleri ( $h$ ) yaklaşık 1.0 olarak bulundu. Hill sabitinin

1' e eşit olması, Cancur eriği PFO' sunun tek bir bağlanma bölgesinin olabileceğini ve bu enzimin bir kooperativiteye sahip olmadığını gösterebilir (Chilaka vd., 1993).

Birçok organizmada enzimatik esmerleşme, oksijen veya fenolik reaktantların uzaklaştırılmasıyla veya PFO inhibitörünün kullanılmasıyla azaltılabilir veya durdurulabilir. Organizmadan oksijenin tamamen uzaklaştırılması zordur (Dogan ve Dogan, 2004). Enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından kullanılan birçok inhibitör vardır (Dogan vd., 2004; Şakiroğlu vd., 1996; Yang vd., 2001). Meyve ve sebzelerin depolanması veya işlenmesi esnasında ciddi ekonomik kayıplara yol açan, enzimatik esmerleşmenin önlenmesi için, en sık başvuru olan yol, inhibitörlerin kullanımınıdır. Yakın zamana kadar, bu amaçla, en çok kullanılan inhibitör SO<sub>2</sub> olmuştur. Ancak, bu bileşiğin insan sağlığına vermiş olduğu zararlardan dolayı, tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada da, birçok bitki PFO' su için inhibitör olarak denenmiş, askorbik asit, sodyummetabisülfid, sodyum azid ve benzoik asit denenmiş ve her bir inhibitör için inhibisyon türü ile  $K_i$  değeri belirlendi (Tablo 11). Elde edilen veriler, kullanılan inhibitörler arasında, enzimi en etkin inhibe eden inhibitörün askorbik asit ( $K_i=0.02$  mM) ve bunu sodyummetabisülfid ( $K_i=0.12$  mM), benzoik asit ( $K_i=6.0$  mM) ile sodyum azidin ( $K_i=18.3$  mM) takip ettiği tespit edildi. Sodyummetabisülfidin gözlenen etkili inhibisyonu, daha önce belirtildiği gibi, tiol bileşiklerinin PFO' lar için etkili inhibitörler olduklarını desteklemektedir (Friedman ve Bautista, 1995; Ding vd., 1998; Duangmal ve Owusu-Apenten, 1999; Yang vd., 2000). Sülfhidril grubu içeren bileşiklerin inhibisyon mekanizmasının iki şekilde olabileceği ileri sürülmüştür. Bunlardan birincisi, kinon bileşikleri ve kükürt grupları arasında konjugat meydana gelerek, bu bileşiklerin çökmesi ve dolayısıyla, melanin pigmentlerinin oluşmamasıdır. İkincisi ise, bu bileşiklerin içerdiği kükürdün yüksek bir ilgiyle, enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır atomuna ve histidin birimlerine dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla inhibisyonun gerçekleşmesidir (Ding vd., 2002). Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Sapers ve Ziolkowski, 1987; Hsu vd., 1988; Dudley ve Hotchkiss, 1989; Ros vd., 1993; Paul ve Gowda, 2000; Aydemir, 2004). Askorbik asit, ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden, enzim aktivitesini azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Daha çok bir antioksidan olarak etki eden askorbat, esmerleşmeye neden olan pigmentlerin

oluşmasına izin vermeden, PFO tarafından difenolden oluşturulan kinonu indirger (Aydemir, 2004). Ayrıca, askorbat, PFO tarafından üretilen kinonoid bileşiklerin üretimini, bu bileşiklerle veya enzimin bakır merkezli aktif bölgesiyle şelat oluşturarak kısıtlayabilmektedir (Martinez ve Whitaker, 1995; Sapers, 1993; Zawistowski vd., 1991).

Enzimlerin çoğu, aktivitelerini yerine getirebilmeleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları, farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı geometriye ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu yüzden, proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). Cancur eriği PFO aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , ve  $\text{Al}^{3+}$  katyonlarının enzim aktivitesini arttırdığı,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Sr}^{2+}$  katyonlarının ise aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı gözlemlendi (Tablo 12). Aktivasyona veya inhibisyona sebep olma gibi durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu, enzimin yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabilir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). *Boletus erythropus*' tan izole edilen PFO aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından,  $\text{Al}^{3+}$ ' ün enzim aktivitesini % 27 arttırdığı,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Cd}^{2+}$ ' un aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı belirtilmiştir (Özel, 2008).

Yaptığımız analizlerde Ardahan İli Posof İlçesi Türkgözü Köyü' nden toplanmış olan Cancur Eriğinde (*Prunus domestica* L.) bitkisinin meyvesinin sulu özütünde toplam fenolik madde miktarı tayini, ABTS' ve DPPH' radikalinin süpürme etkisi, CUPRAC yöntemi, indirgeme gücü aktiviteleri belirlendi. Cancur eriğinin sulu özütünde toplam fenolik madde miktarı 114.6 mg GAE/100 g olarak belirlendi (Tablo 10). CUPRAC yöntemine göre Cancur eriği sulu özütünün antioksidan kapasitesi 30.19 mg TEAK/ g olarak hesaplandı . ABTS' radikal temizleme yöntemi ile Cancur eriği sulu özütünün  $\text{SC}_{50}$  değeri  $2.17 \pm 0.05$  mg/mL olarak belirlendi (Tablo 13). DPPH radikal temizleme metodunda,  $\text{SC}_{50}$  değeri  $1.98 \pm 0.02$  mg/mL olarak hesaplandı (Tablo 13). Cancur eriği fenolik bileşik ve antioksidan kapasitesi bakımından oldukça zengin olduğu tespit edildi.

Toplam fenolik madde tayini ile ilgili ilk çalışmayı 1965 yılında Singleton ve arkadaşları Folin Ciocalteu metodunu kullanarak yapmışlardır. Atanassova ve arkadaşları *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Mentha piperita* bitkilerinin toplam fenolik madde içeriğini incelemişler. *Melissa officinalis* için 48.86 mg GAE/100g, *Salvia officinalis* için 27.94 mg GAE/100g ve *Mentha piperita* için ise 45.25 mg GAE/100g değerlerini elde etmişlerdir (Atanassova vd., 2011). Javanmardi ve arkadaşları *Ocimum basilicum* adlı bitkinin farklı türlerinin toplam fenolik madde içeriğini çalışmışlar, sonuç olarak 22.9 mg GAE/g' dan 65.5 mg GAE/g' a kadar değişen değerler bulmuşlardır (Javanmardi vd., 2003). Yomra Elmasının sulu özütünden yapılan toplam fenolik madde miktarı 252.7 mg GAE/ 100 g olarak belirtilmiştir (Can vd., 2014). Mirolava, Iasi, Romanya' dan elde oniki erik türünde yapılan toplam fenolik madde mikarı 60-364 mg GAE/ 100 g olarak tespit edilmiştir (Mihalache Arion vd., 2014).

DPPH radikal temizleme yöntemi ilk olarak 1958 yılında Blois tarafından yapılmıştır. Blois' ten sonra işlemin kısa süreli ve kolay olması nedebiyle metot sıklıkla uygulanmıştır. Reguia ve arkadaşları *Ammi visnaga* bitkisinin antioksidan aktivitesini tayin etmek için DPPH radikali temizleme yöntemini uygulamışlardır. Bitkinin SC<sub>50</sub> değerini 8.77±0.2 µg/mL ve bir standart olan Rutin' in SC<sub>50</sub> değerini 3.01±0.2 µg/mL olarak bulmuşlar ve birbirleriyle kıyaslamışlardır. Yomra elması özütünün DPPH radikalini süpürme gücü SC<sub>50</sub> değeri 3.83 mg/mL olarak bildirilmiştir (Can vd., 2014). Mirolava, Iasi, Romanya' dan elde oniki erik türünde yapılan DPPH radikali temizleme yöntemi ve troloks standardıyla yapılan antioksidan aktivitesi 146-1040 mmol troloks/100 g olarak tespit edilmiştir (Mihalache Arion vd., 2014).

CUPRAC metodunu ilk olarak 2004 yılında Apak ve arkadaşları uygulamıştır. Metot bileşiklerde antioksidanlar varlığında kuprik iyonlarının kupröz iyonlarına indirgenmesini esas almaktadır. Çıkrıkçı vd. (2008) *Curcuma longa* bitkisinin antioksidan aktivitesini belirlemek için CUPRAC yöntemini uygulamışlardır. Tayinde curcumin ve turmerik kullanmışlardır. Curcumin için CUPRAC TEAC değeri 0.8 mg TEAC/g iken, turmerik için CUPRAC TEAC değeri 0.7 mg TEAC/g' dır.

ABTS antioksidan yöntemiyle yapılan çalışmada İtalyan eriğinin kapasitesi 328 mg askorbik asit/100 g, normal erik için 299 mg askorbik asit/100 g olarak belirtilmiştir (Kaulmann vd., 2014).

Sonuç olarak, Cancur eriğinden saflaştırılan PFO' nun, kinetik bazı parametreler ve genel PFO inhibitörlerine karşı gösterdiği inhibisyon ve metal iyon etkisi profilleri çeşitli organizmalardaki PFO' lara oldukça benzer davranışlar gösterdiği belirlendi. Ayrıca bu eriğin iyi bir doğal antioksidan kaynağı olduğu söylenebilir.

## 5. ÖNERİLER

Değişik organizmalarda PFO etkinliğine bağlı olarak gelişen pigment oluşumu ve enzim katalizli reaksiyondan bağımsız olan esmerleşme reaksiyonlarıyla meydana gelen renk değişimleri, bir dereceye kadar istenir. Özellikle besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında, çoğu kez bu reaksiyonlar ve dolayısıyla renk değişimleri, arzu edilen seviyede durdurulamadıklarından, besinlerin fiziksel özellikleri, yani görünüşlerindeki değişimler yanında, duyuusal ve besinsel özelliklerinde değişimlere de yol açar. Bu durum, aynı zamanda ciddi ekonomik kayıplara da neden olur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimindeki değişmelerinin, besinsel ve toksikolojik açılarından tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin engellenmesine ihtiyaç vardır. Bu da, ancak esmerleşmeyi sağlayan PFO aktivitelerinin kapsamlı karakterizasyonu ile sağlanabilir.

Özellikle son yıllarda enzimlere olan talebin artmasıyla, oldukça öneme sahip olan PFO enzimi de değişik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır. Ham enzim özütünden PFO' nun saflaştırılması için, istenen saflık derecesine ve enzim kaynağına göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları, farklı doyunlukta amonyum sülfat veya organik bir çözücü ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir. PFO saflaştırma işlemlerinde, genellikle bu üç kromatografik teknik, arka arkaya kullanılır. PFO' nun saflaştırılması için uygulanan metotlardan biri de, afinite kromatografisidir. Bu teknikle, saflaştırma, çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemlerine gerek olmadan, kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir. Bu nedenle, PFO için afinite kromatografisinde kullanılabilecek alternatif afinite jelleri, ilgili sentez reaksiyonları göz önünde bulundurularak sentezlenebilir. Ayrıca, ileriki çalışmalarda, Cancur eriğiden saflaştırılan PFO' nun, altbirim içerip içermediği ve böylece dördüncül yapısı ile toplam molekül ağırlığının belirlenebilmesi için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri uygulanabilir. Saflaştırılan PFO' nun, çeşitli kimyasal maddeler varlığındaki davranışları incelenerek, yeni inhibitörlerin araştırılması ve bu inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde

ortaya konulması, özellikle gıda sektörü için önemli yararlar sağlayacaktır. Bununla birlikte cancur eriğinden izole edilen PFO' nun monofenolaz ve difenolaz izoenzimleri farklı tekniklerle birbirinden ayrılarak karakterize edilebilir.

Ticari yollarla sentezlenmesi oldukça güç olan ve toksik maddeler kullanılmadan elde edilen fenolik bileşiklerin fonksiyonel polimerlerinin PFO ile sentezi, bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli tehlikeler oluşturan fenolik bileşiklerin, özellikle monofenollerin, atık sularla kirlenen akarsularda ve bunlarla sulanan topraklarda varlığını tespit etmek amacıyla, çevreye ekstra kirlilik vermeyen ve oldukça hassas olan biyosensörler dizaynedilebilir.

Cancur eriğinin farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktlarıyla antioksidan kapasiteleri daha detaylı olarak belirlenebilir.

## KAYNAKLAR

- Altunkaya, A. and Gökmen, V., 2008.** Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). Food Chemistry, 107, 1173- 1179.
- Anonymous, 1991.** Sulphites banned. Food Ingredients Processing International, 11, 11.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, E.S. and Erçağ, E., 2006.** The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57, 292-304.
- Arion, C.M., Tabart, J., Kevers, C., Niculaua, M., Filimon, R., Beceanu, D. and Dommes J., 2014.** Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. Food Chemistry, 146, 485-491.
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., 2004.** Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. Food Chemistry, 88, 479-484.
- Arslan, O., Temur A. and Tozlu, İ., 1998.** Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1239-1241.
- Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H.P. and Bast, A., 2001.** Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. Food and Chemical Toxicology, 39, 787-791.
- Atanassova, M., Georgieva, S. and Ivancheva, K., 2011.** Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. Journal of University of Technology and Metallurgy, 46(1), 81-88.
- Augustin, N.A., Hasnah, M.G. and Hasimah, H., 1985.** Polyphenol oxidase from guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 1259- 1265
- Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. and Colak, A., 2008.** Characterization of polyphenol oxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. Food Chemistry, 106, 291- 298.
- Aydemir, T., 2004.** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. Food Chemistry, 87, 59-67.
- Aylward, F. and Haisman, D.R., 1969.** Oxidation systems in fruits and vegetables- Their relation to the quality of pressured products. Advances Food and Nutrition Research, 17, 1-7
- Bock, W.C., Katz, A.G., Markham, G.D. and Glusker, J.P., 1999.** Manganese as a



replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions. Journal of the American Chemistry Society, 121, 7360-7372.

- Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W. and O'Conner, K.E., 2004.** Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 486-492.
- Can, Z., Dinçer, B., Şahin, H., Baltaş, N., Yıldız, O. and Kolaylı, S., 2014.** Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29(6), 829-835.
- Cano, M.P., Lobo, M.G. and Galeazzi, M.A.M., 1996.** Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3075-3079.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J., 1986.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6, Ankara, 508s.
- Cheema, S. and Sommerhalter, M., 2015.** Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. Food Chemistry, 171, 382-387.
- Chilaka, F.C., Anosike, E.O. and Egbuna, P.C., 1993.** Purification and properties of polyphenol oxidase from oil bean seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 61, 125-127.
- Cho, M.H., Moinuddin, S.G.S., Helms, G.L., Hishiyama, S., Eichinger, D. and Davin, L.B., 2003.** (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantiospecific polyphenol oxidase from creosote bush (*Larrea tridentata*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 10641-10646.
- Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A. and Dincer, B., 2007.** Comparative Characterization of Diphenolases from Two Mulberry Fruits (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). Asian Journal of Chemistry, 19, 2961-2972.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. and Ayaz, A.F., 2005.** Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation. Food Chemistry, 90, 801-807.
- Concellon, A., Anon, M.C. and Chaves, A.R., 2004.** Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. Food Chemistry, 88, 17-24.
- Corsini, D.L., Pavek, J.J. and Dean, B., 1992.** Differences in free and protein-bound tyrosine among potato genotypes and their relationship to internal blackspot resistance. Journal of the American chemical society, 69, 423-434.
- Çıkrıkçı, S., Mozioglu, E. and Yılmaz, H., 2008.** Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*. Records of Natural Products, 2:1, 19-24.

- Çiçek, H., 2000.** Beyaz-çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu. Bilim Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 68s.
- Decker, H. and Tuczek, F., 2000.** Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 392-397.
- Dewey, D.L., Butcher, F.W. and Galpine, A.R. 1977.** Hydroxyanisole-induced regression of the Harding-Passey melanoma in mice. *The Journal of Pathology*, 122, 117-128.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., Mc Call, K. A., Fierke, C.A. and Toone, E.J., 2001.** Thermodynamics of metal ion binding: 1. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 40, 5338-5344.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. and Güner, S., 2002.** Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae). *Food Chemistry*, 77, 1-7.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Imahori, Y., 1998.** Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4144-4149.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Wang, C.Y., 2002.** Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry*, 76, 213-218.
- Dogan, S. and Dogan, M., 2004.** Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69-77.
- Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R.K., 1999.** A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry*, 64, 351-359.
- Dudley, E.D. and Hotchkiss, J.H., 1989.** Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 65-75.
- Eicken, C., Zippel, F., Büldt-Karentzopoulos, K. and Krebs, B., 1998.** Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Letters*, 436, 293-299.
- Ensminger, A.H., Ensminger, M.E., Kolande, J.E. and Robson, J.R.K., 1995.** Sweet potato, the concise encyclopedia of foods and nutrition. Chemical Rubber Company Pres, 1001-1002.
- Erat, M., Sakiroglu, H. and Kufrevioglu, O.I., 2006.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chemistry*, 95, 503-508.

- Erzengin, M., 2002.** Farklı Kaynaklardan Afinite Kromatografisi ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 251s.
- Espin, J.C. and Wichers, H.J., 2001.** Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, 289-300.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J. and Garcia-Canovas, F., 1997.** Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1084-1090.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Garcia-Canovas, F., 1995.** A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 43, 2807-2812.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F.A. and Wichers, H.J., 2001.** Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1187-1193.
- FDA, 1996.** Chemical preservatives, Food and Drug Administration. The Office of Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Varon, R., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Canovas, F. and Tudela, J., 2000.** Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biological Chemistry*, 381, 313-320.
- Fraignier, M.P., Marques, L., Fleuriert, A., and Macheix, J.J., 1995.** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruit of (*Prunus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2375- 2380.
- Frankel, E.N. and Finley, J. W. 2008.** How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4901–4908.
- Friedman, M. and Bautista, F.F., 1995.** Inhibition of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 69-76.
- Friedman, M., 1996.** Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Friedman, M., 1997.** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Ganguly, K. and Seshado, T.R., 1958.** Isolation of the more commonly occurring leucoanthocyanidins of plants. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 17, 168- 173.
- García, J. M., Gutiérrez, F., Castellano, J.M., Perdiguero, S., Morilla, A. and Albi,**

- M.A., 1996.** Influence of storage and temperature on fruit ripening and olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 264–267.
- Gomez-Lopez, V.M., 2002.** Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry*, 77, 163-169.
- Gonzales, E.M., Ancos, B. and Cano, M.P., 1999.** Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4068.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. and Durmaz, Y., 2006.** Algal Antioksidanlar. *Ege Üniversitesi. Su Ürünleri Dergisi*. 23, 85-89.
- Gross, D. and Coombs, J., 1975.** Enzymatic colour formation in beet and cane juice. Paper presented at the 15th General Assembly of C.I.T.S., Vienna.
- Gul'ko, A.Y. and Khaziyev, F.K., 1993.** Soil polyphenol oxidase; their production, immobilization and activity. *Eurasian Soil Science*, 25, 101.
- Haghbeen, K. and Tan, E.W., 2003.** Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Analytical Biochemistry*, 312, 23-32.
- Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y., 1964.** Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Plant Physiology*, 17, 921.
- Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D. and White, K., 1988.** Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. *Journal of Food Science*, 53, 765-767.
- Hunt, M.D., Eanetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M. and Steffens, J.C., 1993.** cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 21, 59-68.
- Ikeda, R., Uyama, H. and Kobayashi, S., 1996.** Novel Synthetic Pathway to a Poly (phenylene oxide) Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid. *Macromolecules*, 29, 3053-3054.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M., 2003.** Antioksidant activity and total phenolic of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.
- Jiang, Y.M., 1999.** Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry*, 66, 75-79.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. and Metche, M., 1997.** Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. *Journal of Science of the Food and Agriculture*, 73, 513-516.
- Kahn, V. and Pomerantz, S. H., 1980.** Monophenolase activity of avocado polyphenol

- oxidase. *Phytochemistry*, 19, 379-385.
- Kaulman, A., Jonville, M.C., Schneider, Y.J., Hoffmann, L. and Bohn, T., 2014.** Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 155, 240-250.
- Kazanç, M.B., 1997.** Antioksidan vitaminler. *Sendrom*, 9, 14-23.
- Kertesz, D. and Zito, R., 1962.** Phenolase In: *Oxygenases*. Academic Press, New York, Hayaishi, O. (Ed.), 307.
- Kırca, A. ve Özkan, M. 2007.** Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri, Gıda Analizleri. Bizim Büro Basımevi, Cemeroglu, B. (Ed.), 463-486.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., and Krebs, B., 1998.** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*. 12, 1084-1090.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. and Saglam, N., 2007.** Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101, 778-785.
- Labuza, T.P., Lillemo, J.H. and Taoukis, P.S., 1992.** Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes. *Fruit Processing*, 2, 9-13
- Laurila, E., Kervinen, R. and Ahvenainen, R., 1998.** The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News and Information*, 9, 53.
- Lee, C.Y., 1992.** Enzymatic oxidation of phenolic compounds in fruits. American Chemical Society, ACS symposium series, Washington, 506 s., Ho, C.T., Lee, C.Y. and Huang, M. T. (Ed.), *Phenolic compounds in food and their effects on health I*, 305–317.
- Lee, C.Y., Kagan, V., Jaworski, A.W. and Brown, S.K., 1990.** Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 99.
- Lee, K.M. and Park, I., 2005.** Inhibition of potato polyphenol oxidase by Millard reaction products. *Food Chemistry*, 91, 57- 61.
- Lourenço, E.J., Leao, J.S. and Neves, V.A., 2006.** Heat inactivation and kinetics of polyphenoloxidase from palmito (*Euterpe edulis*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52, 249-259.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Marshall, M.R., Kim, J. and Wei, C., 2000.** Enzymatic Browning in fruits, Vegetables

- and Seafoods. Journal of Food and Agriculture Organization, 41, 259-312
- Martinez, M. and Whitaker, J.R., 1995.** The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science and Technology, 6, 195-200.
- Marusek C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey W.H., Inlow J.K., 2006.** Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. Journal of Inorganic Biochemistry, 100, 108-123.
- Mayer, A.M., 1987.** Polyphenol oxidases in plants-recent progress. Phytochemistry, 26, 11-20.
- Mayer, A.M. and Harel, E., 1981.** Polyphenol oxidases in fruits, Changes during ripening, Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic Press, Friend, J. and Rhodes, M.J.C. (Ed.), 161–180.
- Mayer, A.M. and Harel, E., 1991.** Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: Food Enzymology, Elsevier Science Publishers, Vol 1, Fox, P.F. (Ed.), 373- 398.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, S., 1991.** Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. Food Technology, 45, 80-86.
- McMahon, A.M., Doyle, E.M., Brooks, S. and O'Connor. K.E., 2007.** Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. Enzyme and Microbial Technology 40 (5):1435-1441.
- Miller, N.J. and Rice-Evans, C.A., 1997.** Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. Free Radical Research, 26, 195-199.
- Moon, J.K. and Shibamoto, T., 2009.** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J. Agric. Food Chem, 57, 1655–1666.
- Mos'ko, A.A., Shcherbakova, T.A., Glushko, N.A. and Klenitskaya, I.A., 1992.** Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus. Eurasian Soil Science, 5, 60.
- Nicholas, J.J., Richard- Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. and Aubert, S.Y., 1994.** Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Critical Reviews in Food Science Nutrition, 34, 109- 157.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., Sakiroğlu, H., 1995.** Polyphenoloxidase from Amasya apple. Journal of Food Science, 60, 494-496.
- Öz, F., Colak, A., Özel, A., Ertunga, N.S. and Sesli, E., 2013.** Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. Journal of Food Biochemistry, 37(1), 36-44.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B. and Güner, S., 2004.** A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). Food Chemistry, 85, 431-437.

- Padron, M.P., Lorano, J.A. and Gonsales, A.G., 1975.** Properties of o-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*. *Phytochemistry*, 14, 1959.
- Palmer, T., 1995.** Kinetics of single-substrate enzyme catalyzed reactions. In *Understanding Enzymes*, 4, 107-127.
- Pathak, S.U., Karyekar, Ghole, V.S. and Hedge, M.V., 1992.** Effect of activation methods affinity chromatography of potato polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 31(5):1481.
- Paul, B. and Gowda, L.R., 2000.** Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3839-3846.
- Perez-Gilabert, M. and Garcia-Carmona, F., 2000.** Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 695-700.
- Potterat, O., 1997.** Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*, 1, 415-440.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover. W., 1999.** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 66, 401-436.
- Robb, D.A., 1984.** Copper proteins and copper enzymes. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2, Lonnie, R., 207-240.
- Rocha, A.M.C.N. and Morais, A.M.M.B., 2001.** Characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, 12, 85-90.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Escribano, J. and Garcia-Canovas, F., 1994.** A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 216, 205-212
- Ros, J.R., Rodriguez-Lopez, J.N. and Garcia-Canovas, F., 1993.** Effect of ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochemical Journal*, 295, 309-312.
- Sapers, G.M. and Ziolkowski, M.A., 1987.** Comparison of erythorbic acid and ascorbic acid as inhibitors of enzymatic browning in apple. *Journal of Food Science*, 52, 1732-1733.
- Sapers, G.M., 1993.** Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technology*, 47, 75-81.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A. and Bollog, J.M., 1989.** Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 223.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. and Sharma, N., 2003.** Mushroom tyrosinase: Recent

- prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. and Sharma, N., 2003.** Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.
- Siegbahn, P.E.M., 2003.** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 567-576.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16, 144-158.
- Slinkard, K., and Singleton, V.L., 1977.** Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Soller-Mahnez, A., Sabater-Garcia, F. and Lozona, J.A., 1965.** Inhibidores estructurales de fenolasa de albaricque., *Rev.Esp.Fisil.*, 21,139.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E., 1996.** Multi copper-peroxidaes and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.
- Stephens, G.J. and Wood, R.K.S., 1974.** Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase. *Nature*, 251, 358.
- Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, Ö.I., Kocacaliskan, I., Oktay, M. and Onganer, Y., 1996.** Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2982-2986.
- Tolbert, N.E., 1973.** Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Pathology*, 51, 234.
- Tygesen, P.W., Dry, I.B. and Robinson, S.P., 1994.** Polyphenol oxidase in potato tubers. Belknap, W.R., Vayda, M.E., Park, W.D. (Eds.), *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, Ed 2. CAB International, Wallingford, UK, 151-159.
- Ulrich, M.R., 1975.** Le Froid et les qualites organoleptiques des produits alimen. Aires. *REV. Gen. Frond.*, 12, 1025.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981.** Polyphenol oxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 9, 49-127.
- van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. and Wichers, H.J., 1997.** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.
- Walker, J.R.L., 1995.** Enzymatic browning in fruits: Its biochemistry and control, In *Enzymatic Browning and Its Prevention*. American Chemical Society, Chang, Y.L. and Whitaker, J.R. (Ed), ACS Symposium Series 600, 8-22.



- Wetherilt, H., 1992.** Evaluation of urtica species as potential sources of important nutrients. *Food Science and Human Nutrition*, 29, 15-26.
- Whitaker, J.R., 1995.** Polyphenol oxidase, *Food enzymes: Structure and Mechanism*. Chapman and Hall, Wong, W.S. (Ed.), 271-307.
- Whitaker, J.R. and Lee, C.Y., 1995.** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. American Chemical Society, ACS Symposium Series 600, DC, 2-7.
- Whitaker, J.R., 1972.** Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, New York, USA, 636p.
- Wilcox, D.E., Porras, A. G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., and Solomon, E.I., 1985.** Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *Journal of the American Chemical Society*, 107, 4015-4027.
- Xiaodong, Z. and Flurkey, W.H., 1997.** Phenoloxidasen in Portabella Mushrooms. *Journal of Food Science*, 62, 97-100.
- Yagar, H. and Sagiroglu, A., 2002.** Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 97-103.
- Yang, C.P., Fujita, S., Kohno, K., Kusaboyashi, A., Ashafuzzaman, M.A. and Hayashi, N., 2001.** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. *Journal of Agricultural Chemistry*, 49, 1446-1449.
- Yang, C.P., Shuji, F., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N. and Hayashi, N., 2000.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural Chemistry*, 48, 2732-2735.
- Yerlitürk, F.Ü., 2003.** *Pyrus elaeagnifolia* Meyvesinden Polifenol Oksidaz Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye, 53s.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. and Beldüz, A. O., 2005.** Diphenolases from Anoxybacillus kestanbolensis strains K1 and K4T. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 501-507.
- Yoruk, R. and Marshall, R.M., 2003.** Pysicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal Food Biochemistry*, 27, 361- 422.
- Yücel U. and Ötles S., 2001.** Sarabın bileşimi ve beslenmedeki önemi. *Dünya Gıda*, 6, 5, 79-82.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. and Eskin, N.A.M., 1991.** Oxidative Enzymes in Foods. Elsevier, London, Robinson, D.S. and Eskin, N.A.M. (Eds.), 217-273.

## ÖZGEÇMİŞ

Havva ATASEVER, 22/01/1990 yılında Rize' de doğdu. İlköğretimini 2003 yılında İspir ilçesinde 25 Şubat İlköğretim Okulu' nda ve Orta öğrenimini 2006 yılında İspir ilçesi İspir Lisesi' nde tamamladı. 2008 yılında başladığı lisans eğitimini 2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nde tamamladı. Aynı yıl RTEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı' nda tezli yüksek lisans programına başladı ve halen devam ettirmektedir. Havva ATASEVER' in yabancı dili İngilizce' dir.