

**T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN POLİFENOL OKSİDAZ (PPO)
ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Osman ÖZBEY
(163101002)**

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

**Haziran-2019
SİİRT**

TEZ KABUL VE ONAYI

Osman ÖZBEY tarafından hazırlanan "BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN POLİFENOL OKSİDAZ (PPO) ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması 21/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ercan BURSAL

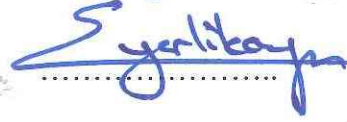
Danışman

Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emrah YERLİKAYA

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Doç. Dr. Fevzi HANSU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 2017-SİÜFEB-89 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmalarımın her aşamasında desteğini benden esirgemeyen, bir danışmandan ziyade ağabey şefkati ile yol gösteren ve rehberlik eden çok değerli danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA'ya en kalbi duygularıyla minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım esnasında her türlü desteği vermekten çekinmeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ebru AKKEMİK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emrah YERLİKAYA'ya, Dr. Öğretim Görevlisi Oğuzhan ÖZDEMİR'e ve maddi desteklerinden dolayı Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer Yüksek Lisans arkadaşlarım; Ercan ALPINAR ve Abdalbaki EYBEK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Deneyisel çalışmalarım esnasında gerek madde ve materyal gerekse de manevi desteklerini hep yanımda hissettiğimiz Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ARSLAN'a ve kendilerinin şahsında tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak; Yüksek Lisans çalışmalarım süresince ve her zaman benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli ailem; eşim Aysel ÖZBEY ve ikizlerim Argeş Abdullah ÖZBEY ve Dilgeç Çuhadar ÖZBEY'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Osman ÖZBEY
SİİRT-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ixii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sülfonamidler	1
1.2. Enzimler	3
1.2.1. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	5
1.2.2. Enzim İnhibisyonu	5
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	8
2.1. Polifenol Oksidaz (PPO; EC: 1.14.18.1) Enziminin Biyokimyası.....	8
2.1.1. PPO'un Adlandırılması	8
2.1.2. PPO'un Doğada Bulunuşu.....	8
2.1.3. PPO'un Molekül Yapısı	9
2.1.4. PPO'un Substratları.....	9
2.1.5. PPO Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmalar	10
2.2. PPO Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	13
2.2.1. pH'nın Etkisi.....	13
2.2.2. Basıncın Etkisi	14
2.2.3. Sıcaklığın Etkisi.....	14
2.2.4. Askorbik Asidin Etkisi	14
2.3. Enzimatik Kararma	15
2.3.1. PPO Enziminin İnhibitörleriyle Enzimatik Kararmanın Önlenmesi	18
2.4. PPO'nun Saflaştırılması.....	20
2.5. PPO'nun Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	21
2.6. Muz Hakkında Genel Bilgi	22
2.6.1. Muz Nedir.....	23
2.6.2. Muzun Özellikleri Nelerdir	23
2.6.3. Muzun Çeşitleri Nelerdir.....	24
2.6.4. Muzun Faydaları Nelerdir	24
2.7. PPO ile İlgili Yapılan Çalışmalar	24
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyaller	26

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	28
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	29
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	32
3.2.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme.....	32
3.2.3. Diyaliz.....	33
3.2.4. PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	33
3.2.4.1. Afinite Jelinin Hazırlanması.....	33
3.2.4.1.1. Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması.....	33
3.2.4.1.2. p-aminobenzoik Asidin Bağlanması.....	34
3.2.4.2. Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzim Elüsyonu.....	35
3.2.5. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	36
3.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	37
3.2.7. PPO Enziminin Aktivite Tayini.....	38
3.2.8. İnhibitörler için IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması.....	38
3.2.9. Muz PPO Enziminin Moleküller Ağırlığının Tespiti.....	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	409
4.2. Kantitatif Protein Tayini İle Tespit Edilen PPO Enzimi Protein Miktarı.....	40
4.3. PPO Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi İle Safsızlık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi.....	40
4.4. PPO Enzimine Ait Aktivite Çalışmaları ve Elde Edilen Veriler.....	41
5. SONUÇ.....	68
5.1. Sonuçlar.....	68
6. KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	79

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Orijinal sülfonamid türevlerinin kodları ve isimleri.....	26
Tablo 3.2. Kullanılan bileşiklerin açık formülleri.....	28
Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	31
Tablo 4.1. PPO enzimi protein miktarı.....	40
Tablo 4.2. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-1 bileşiğinin etkisi.....	42
Tablo 4.3. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-2 bileşiğinin etkisi.....	44
Tablo 4.4. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-3 bileşiğinin etkisi.....	46
Tablo 4.5. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-4 bileşiğinin etkisi.....	48
Tablo 4.6. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-5 bileşiğinin etkisi.....	50
Tablo 4.7. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-6 bileşiğinin etkisi.....	52
Tablo 4.8. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-7 bileşiğinin etkisi.....	54
Tablo 4.9. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-8 bileşiğinin etkisi.....	56
Tablo 4.10. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-9 bileşiğinin etkisi.....	58
Tablo 4.11. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-10 bileşiğinin etkisi.....	60
Tablo 4.12. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-11 bileşiğinin etkisi.....	62
Tablo 4.13. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S-12 bileşiğinin etkisi.....	64
Tablo 4.14. Muz PPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez sülfonamid türevlerinin IC ₅₀ değerleri ve Cheng&Prusoff denklemine göre hesaplanmış K _i değerleri.....	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. 4-Aminobenzoikasit (PABA) yapısı	2
Şekil 1.2. Sülfanilamid molekülünün yapısı	3
Şekil 1.3. Sülfonamidlerin Genel Yapısı	3
Şekil 1.4. Prontosil molekülünün yapısı	3
Şekil 1.5. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.....	6
Şekil 1.6. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	6
Şekil 1.7. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	7
Şekil 1.8. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	7
Şekil 2.1. Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı ve oksijen kırmızı renkle gösterilmiştir)	11
Şekil 2.2. PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	11
Şekil 2.3. PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	12
Şekil 2.4. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar	13
Şekil 2.5. Melanin pigmentinin oluşum mekanizması	17
Şekil 2.6. Enzimatik kararmada Polifenol Oksidazın rolü	18
Şekil 3.1. N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10-decahydroacridin-9yl)phenyl)benzene sulfonamide bileşiklerinin sentez prosedürü.....	27
Şekil 3.2. ethyl 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-(4-(phenylsulfonamido)phenyl)- 1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline 3-carboxylate bileşiklerinin sentez prosedürü	27
Şekil 3.3. diethyl 2,6-dimethyl-4-(4-(phenylsulfonamido)phenyl)- 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate bileşiklerinin sentez prosedürü.	26
Şekil 3.4. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları	35
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan PPO enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforez görüntüsü. (Soldan sağa sütun-A); moleküler markerlar [(baştan sona);70kDa, 57kDa, 40kDa, 28kDa, 18kDa, 13.5kDa, 8.5kDa], (sütun B); Muz PPO enzimi (35 kDa).....	40
Şekil 4.3. Muz PPO enzimi için SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 4.4. DT-F-S-1 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-1] grafiği	43
Şekil 4.5. DT-F-S-2 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-2] grafiği	45
Şekil 4.6. DT-F-S-3 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-3] grafiği	47
Şekil 4.7. DT-F-S-4 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-4] grafiği	49
Şekil 4.8. DT-F-S-5 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-5] grafiği	51
Şekil 4.9. DT-F-S-6 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-6] grafiği.....	53
Şekil 4.10. DT-F-S-7 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-7] grafiği	55
Şekil 4.11. DT-F-S-8 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-8] grafiği	57
Şekil 4.12. DT-F-S-9 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-9] grafiği	59
Şekil 4.13. DT-F-S-10 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-10] grafiği	61
Şekil 4.14. DT-F-S-11 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-11] grafiği	63
Şekil 4.15. DT-F-S-12 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S-12] grafiği.....	65
Şekil 4.16. DT-F-S-1 kodlu bileşikten DT-F-S-12 kodlu bileşiğe kadar %Aktivite- [DT-F-S-1 → DT-F-S-12] Grafiği	67

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Acıklama</u>
E.C.	: Enzim Kod Numarası (Enzyme Commission)
PPO	: Polifenol Oksidaz Enzimi
PABA	: p-amino benzoik asid
DOPA	: 3,4-dihidroksifenil alenin
DOPAMİN	: 3,4-dihidroksifenil etilamin
ATP	: Adenozin trifosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	: Maksimum hız
SDS- PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: N, N, N', N', -tetrametil etilendiamin
IC₅₀	: Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
PEG	: Polietilen glikol
TCA	:Trikloro asetik asit
M	: Molarite
N	: Normalite
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
kDA	: Kilodalton

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Osman ÖZBEY

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2019, 79 + x Sayfa

Bu çalışmada; Polifenol oksidaz enzimi (PPO), muz (*Musa cavendishii*) meyvesinden Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak saflaştırılmıştır. Çalışmada enzim kaynağı olarak kullanılan ithal muz meyveleri, Siirt ilindeki manav ve marketlerden temin edilmiştir. Spektrofotometrik deneysel çalışmalar, 420 nm’de 0. ve 1. dakikadaki absorbans değerleri belirlenerek yapılmıştır. DT-F-S1 kodu ile başlayıp DT-F-S12 kodu ile son bulan 12 farklı orijinal sentez sülfonamid türevli bileşiklerin PPO enzimine karşı *in vitro* etkileri deneysel olarak araştırılmıştır. Deneysel verilerle % aktivite-[İnhibitör Konsantrasyonu] grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerin regresyon analizi yapılarak, her bir orijinal Sülfonamid türevinin inhibisyon sabiti olan IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Diğer inhibisyon sabiti olan K_i ise Cheng&Prusoff denklemi yardımıyla matematiksel olarak hesaplanmıştır. İçerisinde DT-F-S8 maddesi 39,375 µM IC₅₀ değeri ile en iyi inhibisyon etkisi gösteren yapı olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol Oksidaz, afinite kromatografisi, sülfonamid, inhibisyon, K_i, IC₅₀

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF SOME SULFONAMIDE COMPOUNDS *in vitro* EFFECTS ON POLIFENOL OXIDASE ENZYME

Osman ÖZBEY

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
In Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2019, 79 + x Pages

In this study; Polyphenol oxidase enzyme (PPO) was purified from the fruit of bananas (*Musa cavendishii*), using the affinity gel with the chemical structure of Sepharose 4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid. In the study, imported banana fruits, used as enzyme source, were obtained from the grocery stores and markets in Siirt province. Spectrophotometric experimental studies were carried out by determining the absorbance values at 0 and 1st min at 420 nm. The *in vitro* effects of 12 different original synthesis sulfonamide derived compounds, starting with DT-F-S1 code and ending with DT-F-S12 code, against PPO enzyme were investigated experimentally. % Activity- [Inhibitor Concentration] graphs were generated by experimental datas. The regression analysis of these graphs was performed to determine the inhibition constants, IC₅₀ values, for each original sulfonamide derivatives. The other inhibition constant, K_i, was calculated mathematically with the help of the Cheng&Prusoff equation. In the sulfonamide group, DT-F-S8 substance was found to be the best inhibition effect with IC₅₀ value of 39,375 µM.

Keywords: Polyphenol Oxidase, affinity chromatography, sulfonamide, inhibition, K_i, IC₅₀

1. GİRİŞ

1.1. Sülfonamidler

Sülfonamidler sistemik kullanıma giren ilk antibiyotiklerdir. Prontosil kırmızısı adlı boyanın antibakteriyel etkisini keşfeden Alman farmakolog Domagk, başka sülfonamid ilaçlarının keşfine yol açmış olup bu çalışmaları ona 1939 yılında Nobel Tıp Ödülü kazandırmıştır [Campbell, 1999].

Sülfonamid bileşikleri beyaz renkte olup genellikle toz halindedirler. Protonlanmış halleri oldukça aktif olup serbest asitleri suda çözünmezler. Ancak aseton ve etanolda kısmende olsa çözünürler. Sülfonamid tuzlarının su, safra ve serum gibi sıvılarda çözünürlükleri ise fazladır. Kimyasal olarak kararlı olan bu bileşiklerin asit-baz özellikleri, pH'a bağımlı çözünürlüğünü, farmakokinetik özelliklerini ve antibakteriyel aktivitesini etkilemektedir [Doğu, 1994].

Sülfonamidler, antibakteriyel ilaçlar olup geniş spektrumlarından dolayı uzun yıllardır çok sayıda endikasyonda tek başına kullanılırlar. Bakterilerin direnç kazanması, penisilin ve antimikrobiyal ilaçların üretilmesiyle enfeksiyon tedavisinde kullanımları azalmıştır [Özalp, 2002].

Sülfonamidlerin keşfedildikten sonra yaygın bir şekilde kullanılmaları bakterilerin yol açtığı hastalıkları da önemli ölçüde azaltmıştır [Kayaalp, 1984]. Enfeksiyöz hastalıkların dağıtımında geniş ölçüde kullanılan sülfonamidlerin önemleri, penisilinler ile diğer kemoterapötiklerin bulunması ve uygulama alanına sokulmaları sonucu zaman içinde giderek azalmıştır. Buna rağmen trimethoprim ve ormethoprim gibi maddelerle hazırlanan kombinasyonları bugün bile birçok bakteriyel ve protozoal enfeksiyonların kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır [Kaya ve ark., 1997]. Sülfonamidler aynı zamanda ucuz tedaviye olanak veren ilaçlardandır [Samuelson ve Ervik, 1997].

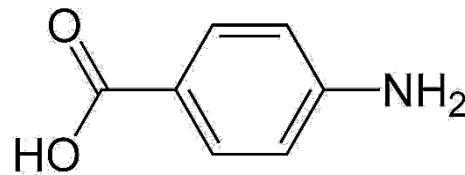
Anilin boya kökenli sülfonamidler p-aminobenzensülfanilamid kimyasal yapısında ve sentetik olarak hazırlanan antimikrobiyal maddeler olup bakteriyostatik etkiye sahiptirler. Bu etkiyi sağlayan aktif kısmı ise aminobenzen halkasıdır [Brander ve ark., 1982]. Sülfonamidler suda az eriyen ve ışıktan kararlı beyaz renkte kokusuz, lezzetsiz, kristalize toz halinde olup ışığa duyarlı olmaları dışında genellikle dayanıklıdır. Toz ve çözelti halinde ısıtılarak sterilize edilebilirler. Amfoterik özellik

taşıyan sülfonamidler asit ve bazik maddelerle tuz oluştururlar. Ortamın pH'sı yükseldikçe sudaki çözünürlükleri de artar [Kaya ve ark., 1997].

Sülfonamidlerin patojen mikroorganizmalar üzerine etki mekanizmaları tam olarak belirlenmiş olup bakterilerin üreme veya gelişmesini engellediği tespit edilmiştir. Üremesi duran bakteriler de vücudun savunma sistemleri tarafından yok edilirler. Sülfonamidler özellikle bakterilerin gelişme dönemlerinde daha çok etkilidirler. [Kaya ve ark., 1997].

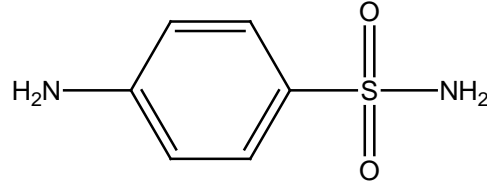
Sülfonamid grubu antibiyotiklerden; sülfadimetoksin, sülfameter, sülfasalazin, sülfametoksipridazin, sülfamethizol, sülfamaksol, sülfisimidin, sülfadiazin ve sülfametoksazolün hepatotoksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir [Vial ve ark., 1997]. Sülfonamidler asetilasyon ve P450 enzimine bağımlı oksidasyonla metabolize olurlar. Bu yollardan birinde bozukluk olması durumunda ise metabolizma başka bir yola kayar ve toksik etki oluşur [Ulutan, 1992].

Birçok mikroorganizmada nükleik asitlerin sentezinde rol oynayan bazı enzimlerin faaliyeti folik aside bağlıdır. Bakteriler, folik asidi memeliler gibi dışardan almayıp kendileri sentezlerler. Folik asidin sentezlenebilmesi için bakteriler p-aminobenzoikasite (PABA) ihtiyaç duyarlar. PABA'nın kimyasal yapısı incelendiğinde sülfonamidlerin yapısı ile büyük bir benzerliğin olduğu görülmektedir. Bu benzerlikten dolayı ortamda yeteri kadar sülfonamid varsa PABA'nın yerini alır ve folik asit yapılamaz. Böylece hücrenin üremesi durur ve sülfonamid bakteriostatik etki gösterir. Bu nedenle vücudun savunma mekanizmasının etkili olabilmesi için sülfonamidle yapılan tedavinin yeteri kadar uzun süre devam etmesi gerekir [Droy ve ark., 1990].

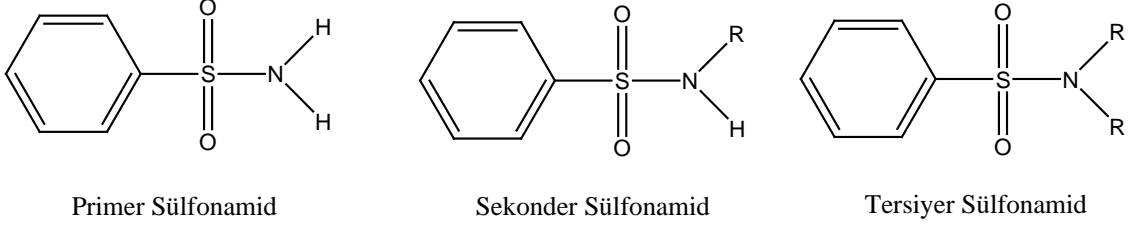


Şekil 1.1. 4-aminobenzoikasit (PABA) yapısı

Sülfonamidler esas olarak p-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) maddesinin türevleridir. Bu maddenin sülfonamid (-SO₂NH₂) grubundaki azot atomunda hidrojen atomlarından birinin yerine uygun radikaller bağlanarak çeşitli sülfonamid türevleri sentezlenmiştir [Kayaalp, 2002].

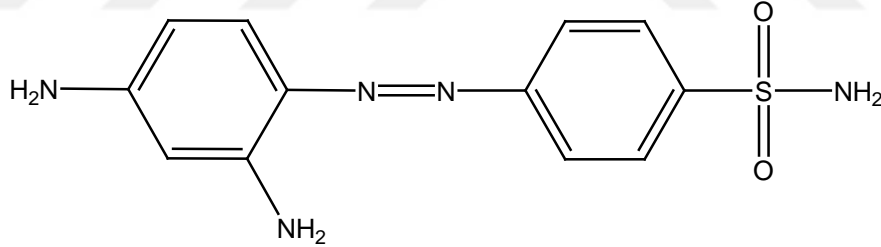


Şekil 1.2. Sülfanilamid molekülünün yapısı [Dökmeci, 1992].



Şekil 1.3. Sülfonamidlerin genel yapısı [Sethi ve ark., 2013]

Sülfonamidler, antimikrobiyal kemoterapinin başladığı yıllar olan 1932’de Domagk tarafından farelerdeki streptokokal infeksiyonların tedavisinde sülfakrizoidinin (prontosilin) etkili olduğunun bildirilmesi üzerine geliştirilmeye başlanmış ve otuzlu yılların sonlarında sülfonilamid halkasının geliştirilmesi ile insanlarda kullanılmaya başlanmıştır [Bowden ve ark., 1993].



Şekil 1.4. Prontosil molekülünün yapısı [Domagk ve ark., 1935]

1.2. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleri olup biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Vücuttaki tüm reaksiyonlar, tüm işlem sonunda kendileri değişmeden reaksiyonların hızını artıran protein yapılı katalizörler olan enzimler tarafından yürütülür.

Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} , ye kadar arttırırken, diğer katalizörler

$10^2 - 10^4$ kadar arttırabilmektedir. Enzimlerle katalizlenen, tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırır. Substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler. Sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH durumları altında fonksiyon gösterirler.

Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna -az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır [Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997]. Enzimler günümüzde altı ana başlıkta sınıflandırılmış olup bu başlıklar şu şekildedir;

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu büyük ve önemli olan grup dehidrogenazlar veya oksidazlar olarak bilinmektedir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında H^+ dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Ester, eter, peptit, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizma ile grupların substratlardan uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir.
- 6. Ligazlar:** ATP veya GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji yardımıyla iki bileşiğin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan gruplara kofaktör denilmektedir. Kofaktörler bir metal iyonu olabilecekleri gibi, koenzim adı verilen kompleks, organik bir bileşik de olabilirler. Bazı durumlarda aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksine haloenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine ise apoenzim adı verilmektedir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu

nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar [Ziyan, 1998].

1.2.1. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimatik reaksiyonların hızları bazı faktörler tarafından etkilenebilmektedir.

Bu etkenler sırasıyla;

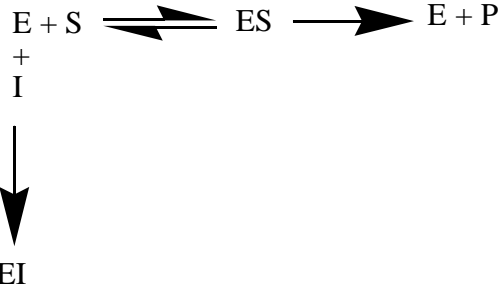
- 1) Substrat konsantrasyonu
- 2) Enzim konsantrasyonu
- 3) pH
- 4) Sıcaklık
- 5) İyonik şiddet
- 6) Kofaktör konsantrasyonu (varsa)
- 7) İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu

Bu etkenler enzim aktivitesi üzerine değişik oranlarda etki etmektedir.

1.2.2. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin hem “*in vivo*” (hücre içi) hem de “*in vitro*” (hücre dışı) aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması veya yok edilmesine “inhibisyon” denir. Bu olayı gerçekleştiren bileşiklere “inhibitör” adı verilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır [Kuzucu, 2011].

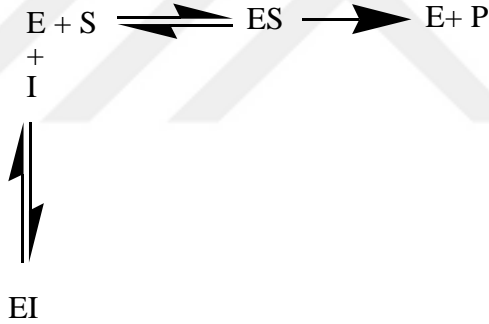
Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşen veya enzimin aktivitesi için temel olan bir işlevsel grubu bozan veya özellikle kararlı bir yapı meydana getiren bileşiklerdir. Dönüşümsüz inhibitör ve enzim arasında sıklıkla kovalent bağlanmanın oluşumuna rastlanır (Şekil 1.5) [İnan ve Gül, 2001; Lehninger, 2005].



Şekil 1.5. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

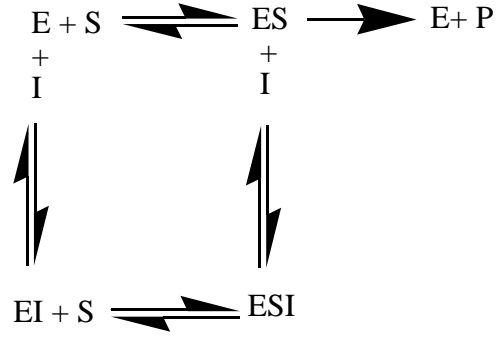
Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitörün etkileşmesi arasında bir denge söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon ve lineer karışık tip inhibisyon olmak üzere dört çeşittir [Keha ve Küfrevioğlu, 2004].

Yarışmalı inhibitör (I), molekül yapısı bakımından substrata (S) benzer ve substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını engelleyecek tarzda, sağlanarak enzimin aktivitesini azaltır (Şekil 1.6) [Ziyan, 1998]. Reaksiyon mekanizması:



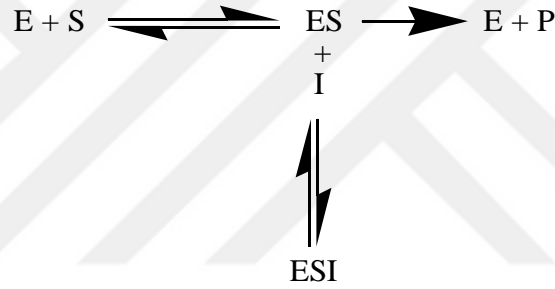
Şekil 1.6. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Bu tür inhibisyonda substrat ve inhibitör geliş güzel bir tarzda birbirinden bağımsız ve tersinir olarak farklı merkezlere bağlanırlar. Sonuçta ES ve EI komplekslerini oluşturabilirler. Ayrıca ES, I ile ve EI, S ile birleşerek ESI üçlü kompleksini meydana getirirler, oluşan ESI üçlü kompleksi katalitik olarak inaktiftir. (Şekil 1.7) [Ziyan, 1998]. Mekanizması:



Şekil 1.7. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Yarı yarışmalı enzim inhibisyonunda ise inhibitör inaktif ESI kompleksi vermek üzere enzim-substrat kompleksine dönüşümlü olarak bağlanır, serbest enzime bağlanamaz. Tek reaktantlı sistemlerde nadir görülür. Daha çok birden fazla reaktant içeren sistemlerde görülür (Şekil 1.8) [Segel, 1976].



Şekil 1.8. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Lineer karışık tip inhibisyon türü yarışmasız inhibisyonun özel bir tipidir. Bu inhibisyon substratın EI kompleksine bağlanabildiği zaman gerçekleşir. Her iki durumda da inaktif ESI kompleksi oluşur.

Bu çalışmada, muz meyvesinden PPO enziminin saflaştırılması için Arslan ve ark. (2004)'larınca sentezlenen afinite jeli kullanılmıştır [Arslan ve ark. 2004]. Saflaştırılan muz PPO enzimi üzerine orijinal sentez bazı sülfonamid türevli bileşiklerin etkileri araştırılarak PPO'nun % aktivitesi, her bir sülfonamid için IC_{50} ve Cheng-Prusoff denkleminde yararlanılarak K_i değerleri belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Polifenol Oksidaz (PPO; EC: 1.14.18.1) Enziminin Biyokimyası

2.1.1 PPO'nun Adlandırılması

Polifenol oksidaz (EC: 1.14.18.1), yapısında kofaktör olarak bakır iyonu (Cu^{+2}) içeren oksido redüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir. PPO tirozinaz, fenolaz, katekoloksidaz, katekolaz, o-difenoloksidaz, mono fenoloksidaz ve kresolaz olarak da bilinir. İlk olarak Schoenbein tarafından 1856'da keşfedilmiştir. PPO Uluslararası Biyokimya Birliği'nin sınıflandırmasına iki kez girmiştir: EC: 1.14.18.1 (monofenol, L-dopa:oksijen oksidoredüktaz) monohidroksifenolü o-pozisyonuna hidroksile eder. EC: 1.10.3.1 (1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) o-dihidroksifenolleri okside edip, hidroksil grubundan hidrojenleri uzaklaştırarak benzokininleri oluşturur [Mayer ve ark., 1979].

2.1.2. PPO'nun Doğada Bulunuşu

Polifenol oksidaz enzimi ilk olarak Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda 1856 tarihinde bulunmuştur [Whitaker, 1972]. PPO enzimi doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, kabuklu deniz hayvanlarında ve bazı hayvansal organlarda da bolca bulunan bir enzimdir. Ayrıca bazı toprak türlerinde de varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir [Sarkar, 1989; Mos'ko, 1992]. Bitkilerde tüm kısımlarda bulunabilirken, gelişmiş hayvanlarda deri, saç, tüy ve gözlerde bulunur. Bitkisel dokularda öncelikle inaktif formda sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, proteazlar ve etilen gibi bir takım solunum metabolitlerince aktif hale gelmektedir [Mayer ve ark., 1979].

PPO; birçok bitki ve hayvansal organizmalar ile bazı mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunun bir enzimdir. PPO hayvansal organizmalar içerisinde koyu pigmentlerin oluşması, gelişmesi, melanin pigmentinin biyosentezinin başlatılması ve polifenolik grupların korunması gibi görevlerde bulunur [Bao, 1999].

PPO birçok farklı kaynaktan saflaştırılmıştır, bunlardan bazıları; çay, muşmula, enginar, Cassava bitkisi, ananas, Napoleon üzümü, patlıcan, Anamur muz, elma, zambak, çilek, ejderha gözü ağacı meyve kabuğu, kahve, tütün, şeftali, patates, vanilya tohumu, yeşil fasulye, dut, armut, elma, domates, Barbados kirazı, kaju fıstığı, brokoli,

göbek marul ve nane olarak sayılabilir [Arslan ve ark., 2004; Spille, 1997; Kavrayan ve Aydemir, 2004]. Bitkilerdeki PPO miktarı çeşit, kültürel işlemler, olgunluk ve yaşa bağlıdır [Spille, 1997]. Şeker pancarında PPO, kloroplastta ve çeşitli dokusal yapılarda aromatik olmayan aminoasitlere peptid bağlarıyla bağlı olarak bulunur. PPO'nun serbest kalması için bu dokunun parçalanması gerekir. Yapılan çalışmalarda en yüksek enzimatik aktivite üzüm kabuklarında, bazı elma kültürlerinde, hıyarda ve diğer bazı meyvelerde görülmüştür. Bunların dışında, mantarın sap ve epidermis kısımlarında yüksek PPO aktivitesi gözlenmiştir. Istakozda epidermis veya kütikul PPO'nun en çok bulunduğu yer olarak saptanmıştır. Bitkilerde ve kabuklu deniz ürünlerinde PPO dağılımının türe, yaşa, olgunluğa göre değişmesi çok önemli bir noktadır [Marshall ve ark., 2000]. Çayda ise enzim yaprak epidermisinde yoğundur [Spille, 1997]. Yapılan başka bir çalışmada ise daha spesifik olarak enzimin kloroplast içinde bulunduğu tespit edilmiştir [Halder ve ark., 1998]. Birçok kaynaktan elde edilen PPO enziminin farklı moleküler yapılarda olduğu bildirilmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara bağlıdır [Vamos-Vigyazo, 1981]. Muz ve şeker kamışı kloroplastlarından elde edilen PPO'lar oldukça düşük molekül kütlelerine (12000 ve 10000) sahip iken, genelde PPO monomerinin 30000 dalton civarında molekül kütlelerine sahip olduğu ve bir bakır atomu ihtiva ettiği kabul edilir [Palmer, 1963].

2.1.3. PPO'nun Molekül Yapısı

PPO enzimi, birden fazla alt birimden oluşan oligomerik yapıda bir enzimdir. PPO enziminin içerdiği alt birim sayısı enzimin izole edildiği kaynağa ve substrata bağlı olarak değişmektedir. PPO, moleküler oksijenin ko-substrat olduğu bakır içerikli bir metalo enzimdir. Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi Şekil 2.1'te gösterilmiştir [Eicken ve ark., 1999].

2.1.4 PPO'nun Substratları

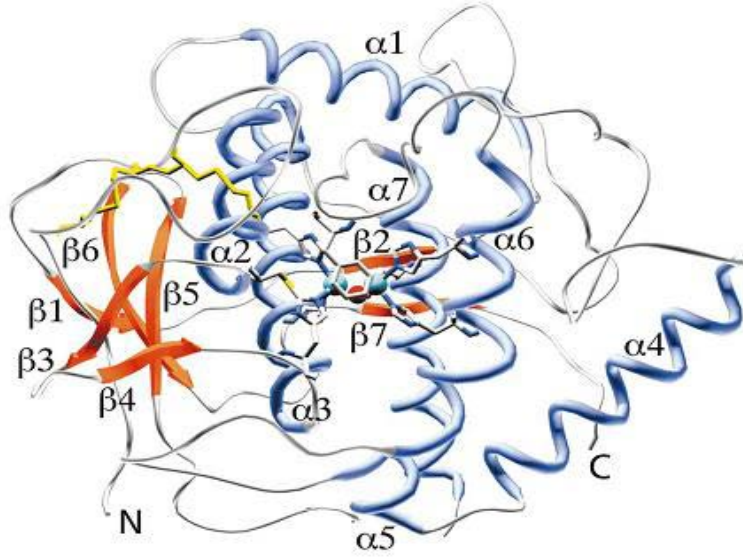
Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı PPO enzimine substrat olabilmektedir. Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyonlar sonucu sebze ve meyvelerde renk bozulmalarına sebep olmalarının yanı sıra, meyvelerin tatlarına da etkileri vardır. Polifenol bileşikler, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına sebep olurlar. Bu bileşiklerden

bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden oto oksidasyona uğrarlar ve oluşan bileşikler polimerleşerek koyu renkli makro molekülleri oluştururlar [Hermann, 1973; Matheis, 1977].

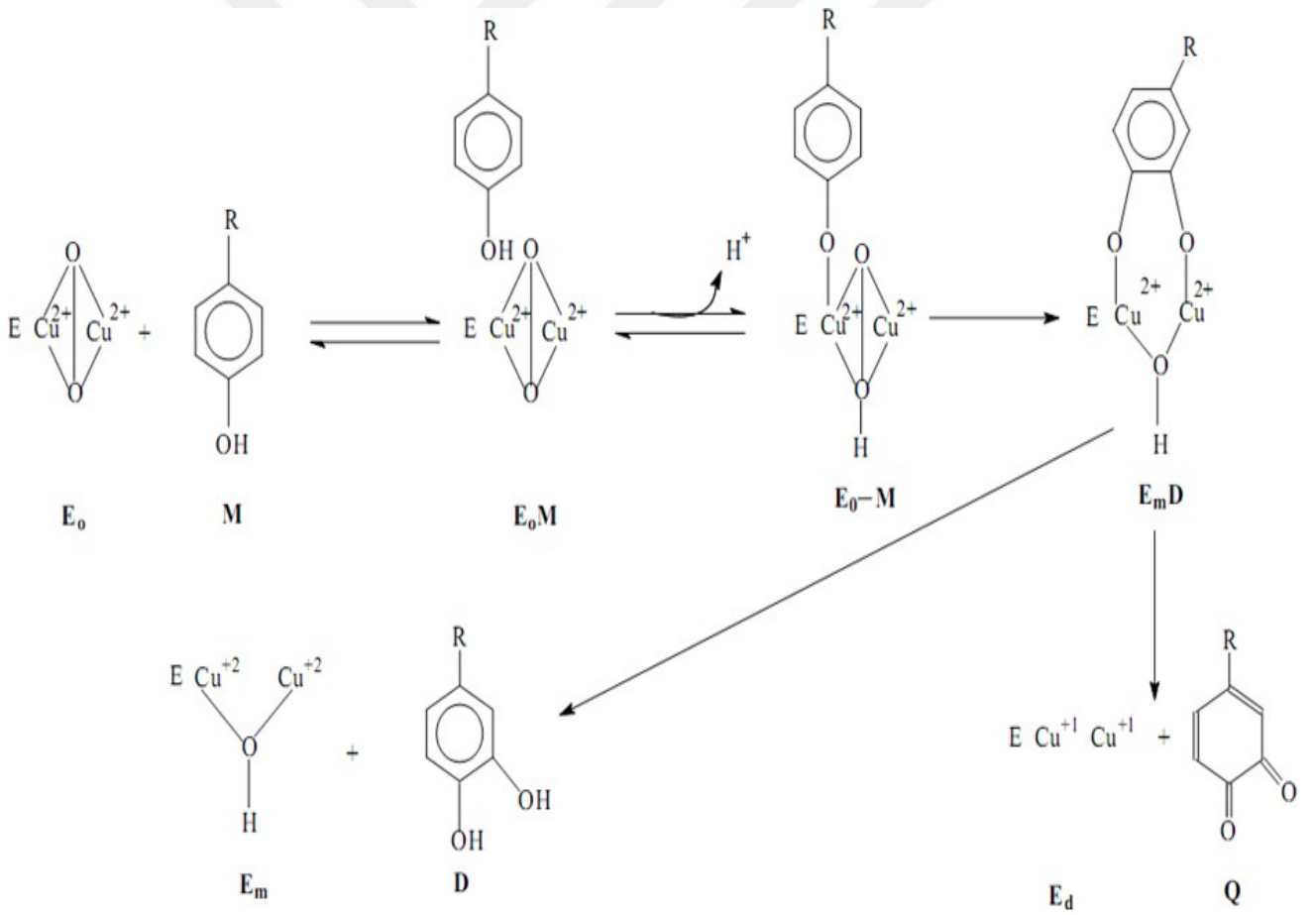
PPO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenil alenin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir [Şakiroğlu, 1994]. PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorogenik asittir [Sato, 1962]. Klorogenik asidin doğada bulunan izo-klorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudoklorogenik asit ve "Band 510" izomerleri de PPO'nun substratlarıdır [Sondheimer, 1964]. Bazı meyve ve sebzelerde PPO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde çoğunlukla bulunmayan fenolik bileşiklerdir [Gross ve Coombs, 1975].

2.1.5. PPO Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmalar

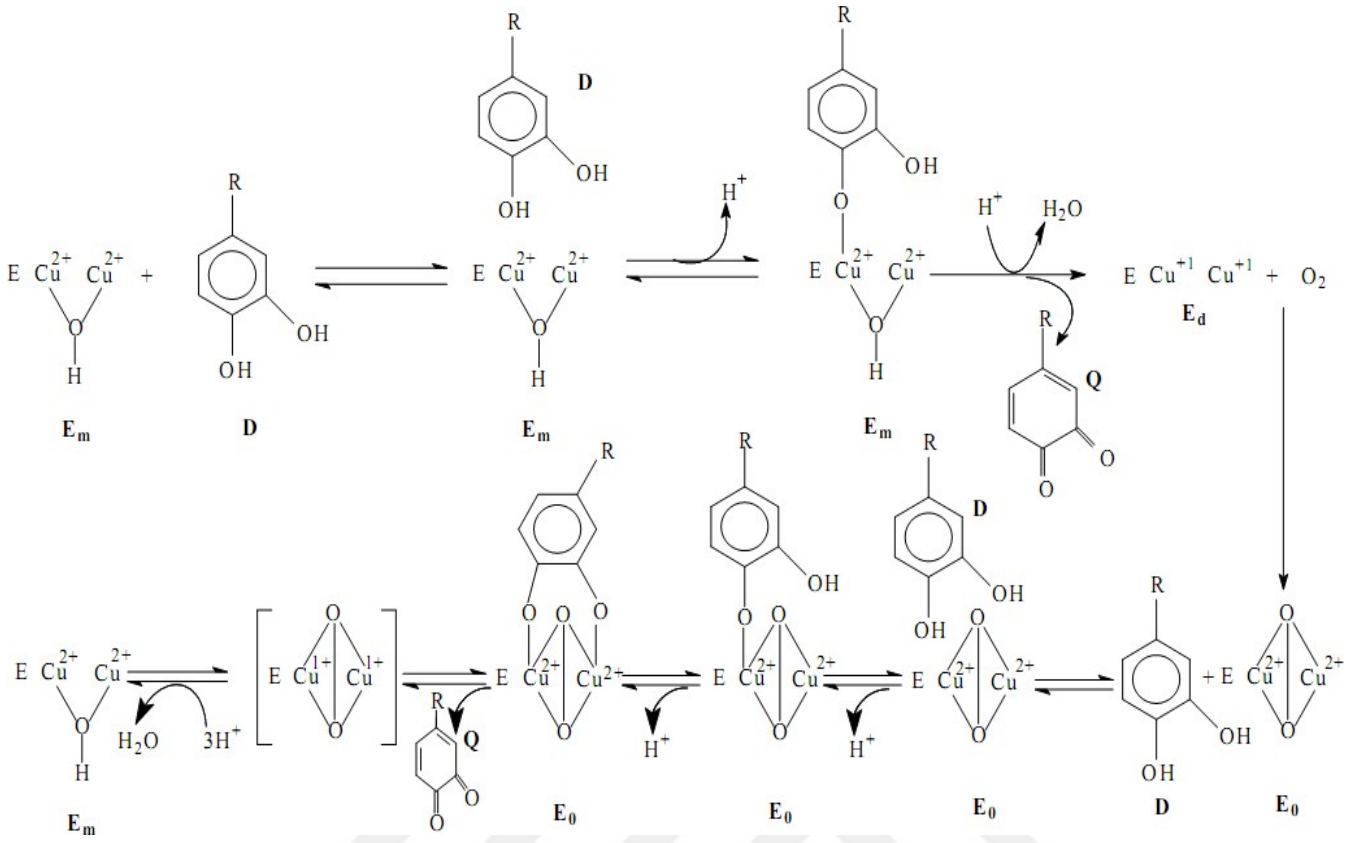
PPO; siyah, kahverengi veya kırmızı pigmentler oluşturarak (polifenolere) hızlıca polimerize olduğu monofenollerin o-difenollere hidroliz (EC: 1.14.18.1, monofenol monooksijenaz, krezolaz aktivitesi) ve difenollerin o-kinonlara oksidasyonu reaksiyonlarını (EC: 1.10.3.2, o-difenoloksidaz, katekolaz aktivitesi) katalizler [Vaughn ve Duke, 1984]. PPO tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 2.2. ve Şekil 2.3'de verilmiştir [Espin ve ark. 1998].



Şekil 2.1. Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür, atomları sarı ve oksijen kırmızı renkle gösterilmiştir). [Eicken ve ark., 1999].



Şekil 2.2. PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması



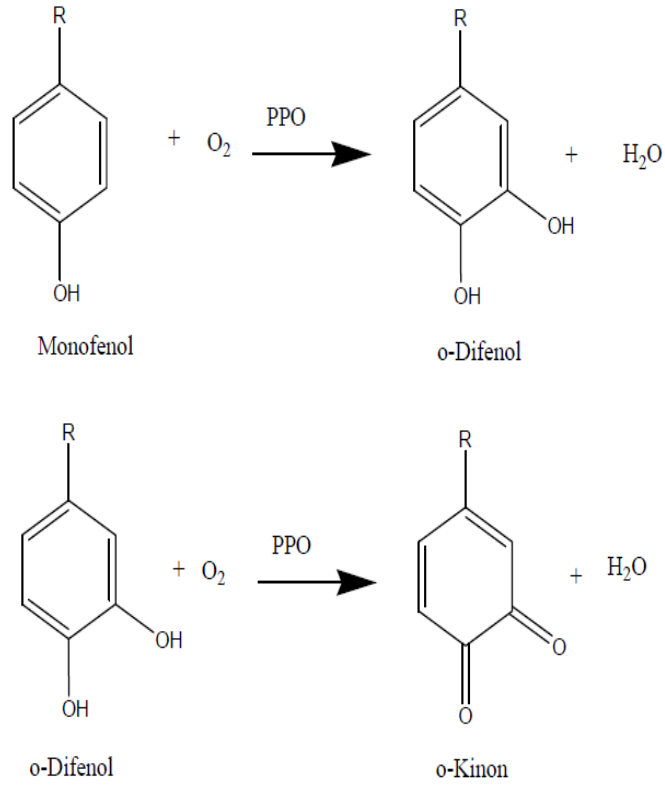
Şekil 2.3. PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması

Pek çok bitkisel kaynaktan ve son zamanlarda mikroorganizmal kaynaktan PPO enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış ve böylelikle yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Polifenol Oksidazlar doğada hemen hemen bütün bitkilerde bulunur. Bitkilerdeki PPO miktarı bitkinin türüne, yaşına, olgunluk durumuna ve yetiştirilmesine bağlıdır [Wissemann, 1981].

Muz, patates, şeftali ve tütün yaprağından izole edilen polifenol oksidazlar özellikle o-difenolik gruplar üzerine etkilidir ve monofenollerin hidroksilleme etkileri yoktur. Mantar, üzüm, elma ve şeker pancarı yaprağından elde edilen polifenol oksidazlar ise iki tür aktiviteyi gösterir [Valero ve Varon, 1988].

o-kinonlara oksitlenme olmadan önce monofenollerin oksitlenmesi gerekir. Hız belirleyici basamak monofenollerin hidroksillenmesidir [Richardson ve Hyslop, 1985].

PPO enzimi öncelikle oksijenin bulunduğu ortamda Şekil 2.4.'te monofenolleri hidroksilasyon ile o-difenollere daha sonra o-difenolleri dehidrojenasyon ile oksijenin hazır bulunduğu ortamda o-kinonlara katalizler.



Şekil 2.4. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar

2.2. PPO Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

2.2.1. pH'nın Etkisi

Ortamın pH'sının enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerine önemli etkisi olduğu için enzim inaktivasyonundaki rolü de büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup, işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formlarını koruması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları da etkileyebilir. Ancak bu değişimlerin büyük bir çoğunluğu tersinirdir ve enzimin tersinir olmayan denatürasyonundan ayırt edilmesi gerekir [Segel, 1976; Tipton ve Dixon, 1983]. Tersinmez bir denatürasyon için ortamın pH'sının, substratın dayanıklılık ve kararlılığını da etkilemesi gerekir.

Elmadan izole edilen PPO için optimum pH 4.2-7.3 arasındadır [Ponting, 1948; Walker, 1964; Stelzig 1972]. Üzümden ve mantardan elde edilen PPO için optimum pH ise 5.5-7 arasındadır [Dawson, 1962; Cash, 1976]. Optimum pH'lar arasındaki farklılık, değişik kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların değişik formlarınının

bulunması, enzim kaynağının olgunluk durumu, enzimin saflaştırma derecesi ve substrat tipi ile yakından ilgilidir [Vamos, 1981].

2.2.2. Basıncın Etkisi

Meyvelerdeki enzimler üzerine basıncın etkisi henüz fazla çalışılmamış bir konudur. Yeterli bir inaktivasyon için basıncın süresi ve miktarı, ortamın kimyasal bileşimi, ortamdaki iki değerlikli kationların konsantrasyonu, substratları, ortamın pH'sı ve sıcaklık gibi şartların iyi ayarlanması gerekir.

2.2.3. Sıcaklığın Etkisi

PPO enziminin inaktivasyonunda kullanılan en yaygın yöntemdir. PPO'nun meyvelerde aktivasyon gösterdiği optimum sıcaklık 25°-35 °C arasındadır [Cash ve Sistrunk, 1976; Yokotsuko ve Mahino, 1981]. 90 °C de ise hızla inaktive olduğu belirtilmiş ve 82.2 °C de inaktivasyon hızında belirgin bir artış gözlenmiştir. [Ponting, 1960]. Valero ve arkadaşları 1988'de Airen üzümlerinden elde edilen PPO'nun 65 °C de 20 dakika sonra tamamının inaktive olduğu belirtmişlerdir. Meyve ve sebzelerdeki enzimlerin ısı ile denatüre edilmesinde en önemli konu, ortamdaki enzimin hangi cins olduğunun bilinmesidir. Şayet PPO ortamdaki tek enzim ise, enzimi kısa bir süre yüksek sıcaklıkta tutma işlemi tercih edilir. Isı ile enzimlerin inaktivasyonu yaygın kullanımına rağmen, Strecker degradasyonu gibi reaksiyonlar sonucu lezzet ve vitamin kaybı olmaktadır [Wister ve Daniel, 1980]. Bu yöntemin meyvelerdeki doğal aroma ve lezzeti yok ettiği bildirilmiştir [Ponting, 1960].

2.2.4. Askorbik Asidin Etkisi

Ponting, elma suyuna ilave edilen askorbik asidin, esmerleşme reaksiyonlarını kısmen önlediğini 1960 yılında bildirmiştir [Ponting, 1960]. Askorbik asit oluşan o-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir ve sonuçta kendisi oksitlenir. Askorbik asidin tamamı oksitlendikten sonra esmerleşme reaksiyonu devam eder. Bu nedenle kullanılan askorbik asit konsantrasyonu önem taşımaktadır.

2.3. Enzimatik Kararma

PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle

olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir [Önez, 2006].

Meyve ve sebzelerde ürünün dayanıklı hale getirilmesinde mikroorganizmaların olduğu kadar enzimlerin de inaktive edilmesi gerekmektedir. Enzimlerin aktivitesi ürünlerde çeşitli kalite bozukluklarına (renk, aroma v.b.) sebep olmaktadır. Meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşmenin başlıca etmenlerinden biri PPO enzimidir. Bu enzim gıdalarda doğal olarak bulunur. Enzimin substratı fenolik bileşiklerdir. Gıdalarda doğal olarak bulunan bu enzim; dilimleme, çarpma, kesme, ezme gibi mekanik etkilerle aktif hale geçmektedir. PPO, substratı olan polifenollerle etkileşerek üründe pembeden mavimsi siyaha kadar renk değişimlerine sebep olmaktadır. Pembeden mavimsi siyaha kadar olan bu renk değişimlerine “esmerleşme” denir [Laurila ve ark., 1998].

Termal uygulamalar, oksijenin uzaklaştırılması, esmerleşmeyi engelleyen ajanların kullanılması ve kimyasalların eklenmesi en etkin metodlar arasındadır. Gıda endüstrisinde PPO'nun termal yolla inhibisyonu sayesinde enzimatik esmerleşme engellenebilir. Fakat geleneksel ısı uygulamaları renk bozulmaları, tat hasarı, vitamin ve besin değeri kayıpları gibi istenmeyen etkilere neden olabilir. Oksijen, meyve ve sebzelerin su, şurup ya da tuzlu suya daldırılması veya vakumlanması yoluyla uzaklaştırılabilir. Ancak bu tür uygulamalar kesin sonuç vermez. Vakumlanan paketler açıldığında, oksijenin tekrar içeri girmesi ile esmerleşme yeniden başlar. Esmerleşme karşıtı ajanların kullanılması ise gıda endüstrisinde tat, lezzet, renk, doku ve maliyet üzerine etkileri ve toksisite düşüncesiyle kısıtlanmaktadır. Kimyasal katkı maddeleri (bisülfıt, askorbik asit ve analogları) enzimatik esmerleşmeyi engellemek için kullanılabilir. Araştırmalara göre farklı etkileyicilerin enzimatik esmerleşmeyi kontrol edebildiği bilinmekte ve bu bileşikler inhibisyon mekanizmasına dayanan indirgeme ajanları, şelat ajanları, asitlik düzenleyici, enzim inhibitörleri, enzim uygulamaları ve kompleks yapıcılar olarak sınıflandırılmaktadır [Özoğlu ve Bayindirli, 2002].

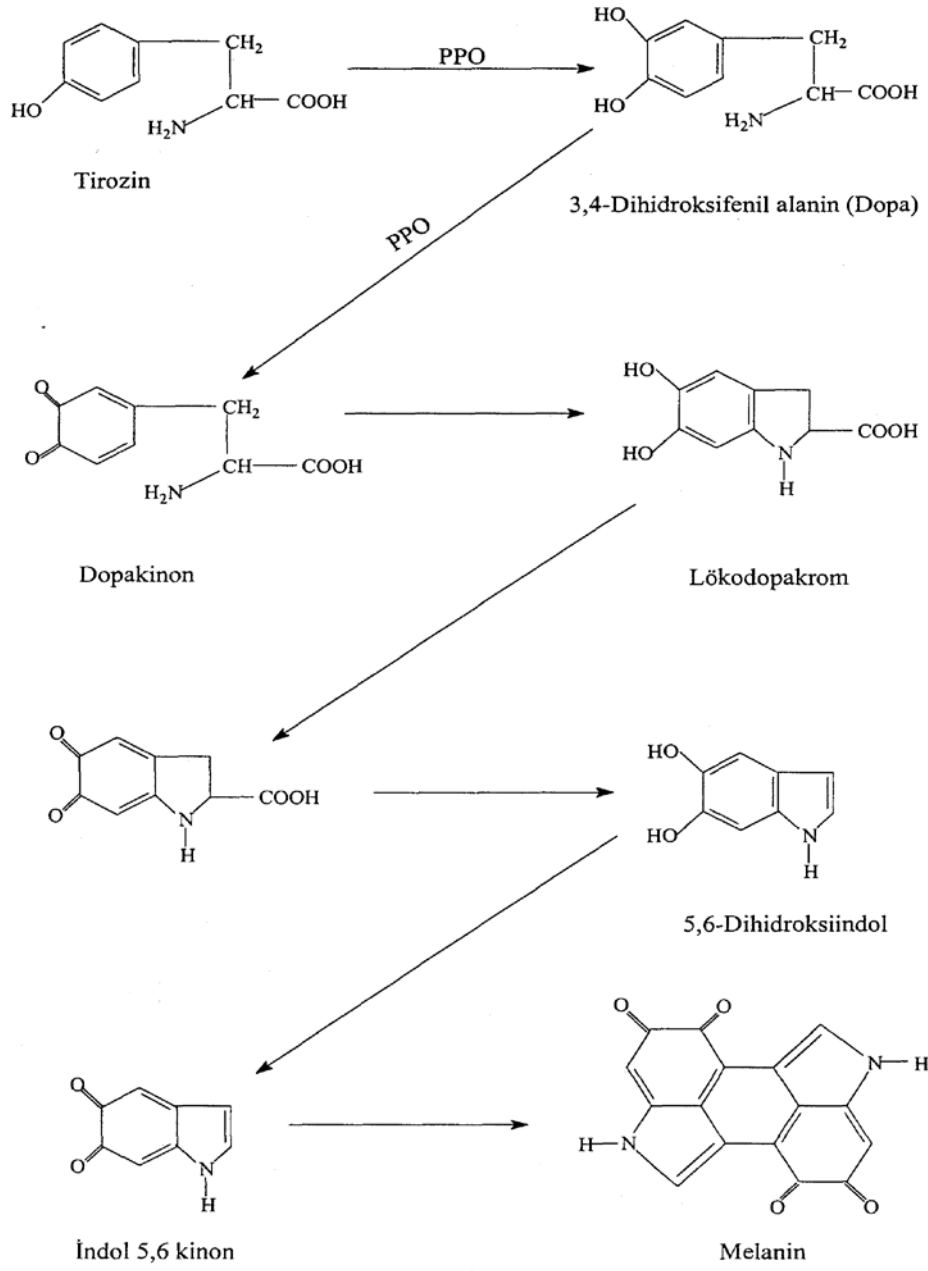
Esmerleşme geleneksel olarak sülfıtlerin kullanılmasıyla engellenmekle birlikte, toksisitesi nedeniyle bu uygulama giderek kısıtlanmaktadır [Iyengar ve McEvily, 1992].

Enzimatik esmerleşme, esas olarak oksijenin varlığında fenollerle polifenol oksidazlar arasındaki ilişkidenden kaynaklanmaktadır [Nicolas ve ark., 1994]. Bu reaksiyonlarda oluşan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve herhangi bir renk bozulmasına

neden olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimer oluşmakta ve bunlar daha büyük moleküllü bileşiklere polimerize olmaktadır. Renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir. Reaksiyon sonunda oluşan renk tonu ve yoğunluğu, çevresel faktörlerin ve ortamdaki fenollerin türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir [Yang ve ark., 2001].

PPO enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır [Laurila ve ark., 1998].



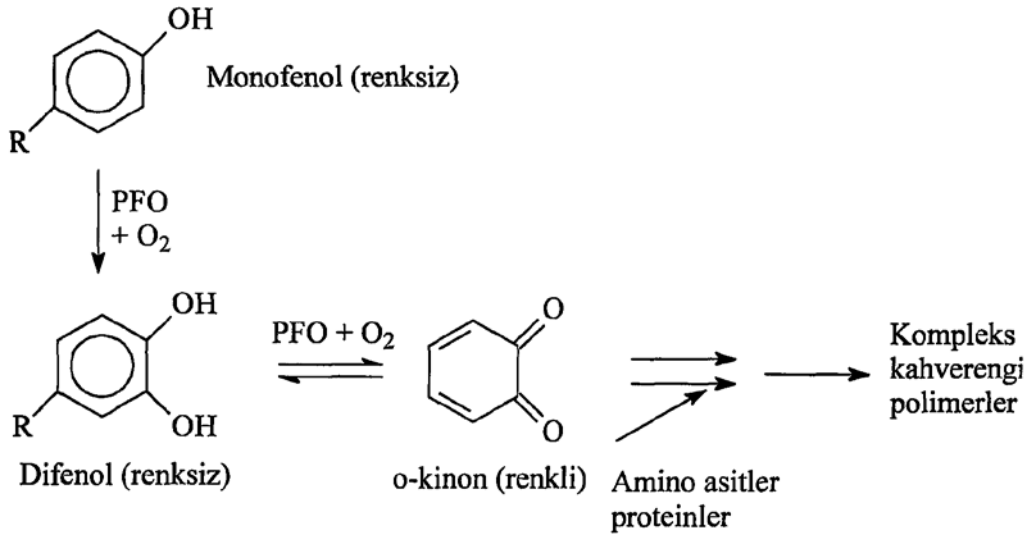


Şekil 2.5. Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması

Enzimatik kararım reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve nihayet bunlar daha büyük molekülü bileşiklere polimerize olurlar. İşte, renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir [Labuza ve ark., 1997].

Diğer enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır [Labuza

ve ark., 1997]. Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlardır.



Şekil 2.6. Enzimatik kararmada Polifenol oksidazın rolü

2.3.1. PPO Enziminin İnhibitörleriyle Enzimatik Kararmanın Önlenmesi

PPO enziminin inhibisyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi genelde aynı başlık altında incelenir. Ancak kararmanın önlenmesi, yalnızca enzimin inhibe edilmesiyle değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli olan iki substrattan (O_2 ve fenolik substrat) birinin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilebilir. Gıda teknolojisinde kararma inhibitörleri kullanılacaksa, bu inhibitörün toksik olmaması, tadı ve görünüşü bozmaması gerekmektedir. [Walker, 1975].

Meyve sularının ve dondurulmuş sebze ve meyvelerin endüstriyel amaçla hazırlanmaları sırasında ortaya çıkan bu tür reaksiyonlar kaliteyi düşürerek, ürünün pazar değerini de azaltır. Ayrıca karides, istakoz ve yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarının hazırlanmaları ve depo edilmeleri sırasında kabukta meydana gelen ezilmeler sonucu, PPO enziminin etkisiyle ortaya çıkan melanozis sonucu oluşan siyah renkli lekeler ürünün değerini düşürür [Pekyardımcı, 1992]. Enzimatik esmerleşme sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan PPO enziminin sebep olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenden temassız bir halde bulunur. Fakat, meyve veya sebze kesildiği yada zedelendiği zaman enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikleri oluşturur [Mathewson, 2000; Yang ve ark., 2001]. Enzimatik esmerleşmenin olabilmesi için PPO enzimi, bunun etkilediği polifenolik madde ve

moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların uygun bir seviyede olması gerekir. Enzimatik esmerleşme fenolik madde, moleküler oksijen ve PPO enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenir [Pekyardımcı, 1992]. PPO'nun birçok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır [Ferrar ve Halker, 1996]. Sülfidler çok kullanılan bir PPO inhibitörüdür. Ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda kullanımına izin verilmez [FDA, 1996]. PPO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PPO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan o-kinonlarla sisteinin tiyol-konjugatlarını oluşturmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca sistein, oluşan o-kinonları ilgili fenollerine indirgeyerek de inhibisyon sağlamış olur [Cilliers ve Singleton 1990; Marshall ve ark., 2000]. PPO, prostetik grup olarak bakır iyonu içeren bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir [Laurila ve ark., 1998]. Bazı potansiyel PPO inhibitörleri; kompferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir [Kubo ve Yokokava, 1992; Chen ve Kubo, 2002]. 2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, kumik asit gibi çok sayıda aldehid ve türevlerinin, PPO için inhibitör madde olabilecekleri belirlenmiştir [Kubo Kinst-Hori, 1998; Lee, 2002]. Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PPO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkaptio-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkaptioimidazol)'dür [Andrawis ve Kahn, 1996; Espin ve Wichers, 2001]. Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asitler gibi bir çok kimyasalın da inhibitör olarak PPO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [Kubo Kinst-Hori, 1998].

2.4 PPO'nun Saflaştırılması

Bazı bitkisel özütlerden PPO içeren dokuların homojenizasyonu sırasında, doku hasarına bağlı olarak oluşan ve fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ortaya çıkan esmerleşme reaksiyonları dolayısıyla oluşan ve suda çözünürlüğü az olan pigmentler, işlem sırasında problem olabilir. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda çalışmak bu problemi bir miktar azaltabilir. Sıvı azot ortamında böyle bir homojenizasyon işlemi uygun tampon çözeltiler varlığında gerçekleştirilebilir [Sanchez-Ferrer ve Garcia-Carmona, 1990; Jimenez-Atienzar ve Garcia-Carmona, 1996]. Homojenizasyon çözeltilerinin pH değerinden enzimin aktivitesi etkilenebileceğinden, tampon çözeltinin seçimi de enzimin izolasyonunda önem taşır. Bazı durumlarda, homojenizasyon çözeltilerine, çeşitli indirgenme-yükseltgenme olaylarını önlemek ve böylece enzim aktivitesini korumak amacı ile indirgen reaktifler ya da enzim inhibitörleri katılabilir. Sodyum azid, askorbik asit, glutatyon, ditiyotritol, sistein, sodyum metabisülfid veya tiyoüre gibi çeşitli bileşikler bu amaçla kullanılmıştır [Friedman, 1997]. Homojenize edilen enzim özütlerinden PPO'nun saflaştırılması, genellikle amonyum sülfat veya aseton ile çöktürmeyi takiben, kromatografik basamakları içerir. Bu kromatografik işlemlerde santrifüjlenip hazırlanan berrak çözelti, dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex veya DEAE-selüloz gibi anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemlerine tabi tutulur [Mayer, 1987]. Afinite kromatografisinin de biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve izolasyonunda güçlü bir teknik olduğu ispatlanmıştır. 1953 yılının başlarında Lerman, selüloza bağlanmış mantar PPO'sunun fenolik ve substitüye benzoik asit türevi inhibitörlerinin etkili bir afinite adsorbantları olabileceğini göstermiştir [Lerman, 1953]. Daha sonra, Gutteridge ve Robb (1973), mantar PPO'sunun, yarışmalı bir inhibitör olan 4-amino benzoat'ı Sepharose-4B'ye bağlayarak, bu afinite adsorbantının enzimin saflaştırılmasında kullanışlı olduğunu göstermiştir [Gutteridge ve Robb, 1973]. Aynı dönemlerde, O'Neill ve arkadaşları (1973), Sepharose-4B'ye, aminofenol taşıyan camlara ve p-amino benzil selüloza fenolik, katekolik ve benzoil gruplarını bağlayarak, hangi adsorbantın mantar PPO'suna spesiflik gösterdiğini araştırmışlardır. Bu adsorbantlardan dopamin afinite kolonları, ham enzim özütünden enzimi bağlamayı başarmıştır. Ancak bu kolonlar, kendiliğinden oksidasyona uğradığından dolayı, tekrar tekrar kullanılamamıştır [O'Neill ve ark., 1973]. Katı desteklere bağlanmış inhibitörler, fenolikler alkil grupları ve antibadiler ile

mantar PPO'sunun saflaştırılması, bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [Flurkey ve Jen, 1980; Wissemann ve Montgomery, 1985]. Pathak ve arkadaşları (1992) yaptıkları bir çalışmada, afinite kromatografisi üzerine aktivasyon metotlarının etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, patates PPO'sunun afinite kromatografisinde kullanılmak üzere, CNBr veya divinilsülfon (DVS) ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye değişik uzantı kolları ve uzantı kollarına da ligand olarak p-aminobenzoik asitin bağlanmasıyla çeşitli afinite jelleri hazırlanmıştır. Bu çalışma neticesinde, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye p-amino benzoik asitin bağlanmasıyla oluşturulan afinite jelinin, PPO adsorbsiyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir [Pathak ve ark., 1992]. Arslan ve çalışma ekibi (2004) tarafından yapılan çalışmada, Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildikten sonra, uzantı kolu olarak L-tirozin ve ligand olarak p-aminobenzoik asit bağlanmıştır. Böylece, Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak PPO enzimi, dut meyvelerinden tek adımda ve 74 kat saflaştırılmıştır [Arslan ve ark., 2004].

2.5. PPO'nun Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

PPO enzim aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Enzimin reaksiyon inaktivasyonu kısa zamanda o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu yavaşlattığından dolayı her iki metotta da, reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesine dikkat edilmelidir. Substratın tükenme hızı, genel olarak, O₂ absorpsiyonu Warburg respirometresi ile manometrik olarak ya da bir oksijen elektrodu ile polarografik olarak ölçülür. Bu iki metot aynı sonuçları vermez. Aynı şartlar altında elde edilen O₂ absorpsiyon değerleri polarografik metotta daha yüksek çıkmaktadır [Mayer ve ark., 1966]. Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik densesitesinin ölçümüyle spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Katekol, pirogallol veya klorogenik asit gibi doğal substratlar spektrofotometrik metotlarda kullanılabilir [Mihalyi ve Vamos-Vigyazo, 1976]. Aktivite ölçümleri esnasında PPO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen hidrokinon ve askorbik asit gibi daha negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir. Bundan dolayı, bu reaktiflerin konsantrasyonları sabit kaldığı sürece, substratın katalitik miktarı yeterlidir. Sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bu prensibe dayanan diğer

uygulamalarda, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorpsiyon verdiği 265 nm'deki konsantrasyonundaki azalma ölçülür [Heimann ve Andler, 1962]. Askorbik asidin tükenme hızı enzim aktivitesi ile direkt olarak orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon↔substrat transformasyonudur. Askorbik asit oksidaz elde edilen sonuçlara tesir eder. Bu metodun diğer bir uygulamasına göre, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki askorbik asidin tamamının tükenmesi için gereken zaman yerine, renkli kinon ürünlerinin oluşumu ölçülür. Bu kronometrik metot olarak isimlendirilir. [Vamos-Vigyazo, 1981]. Askorbik asit yerine 420 nm'de absorbans veren $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin varlığı veya 265 nm'de absorbans veren bitki materyalleri sonucu etkilemez. Bu metodun diğer avantajları ise, ferrosiyanürün özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre daha az hassas olması ve çözültide de daha kararlı olmasıdır. Aynı substrat konsantrasyonu kullanıldığı zaman, ferrosiyanür metodu askorbik asit prosedürüne oranla yarı yarıya daha az hassastır [Vamos-Vigyazo, 1981]. Reaksiyon inaktivasyonunu önlemek için çeşitli yöntemler tasarlanmıştır. Bu yöntemler, reaksiyon karışımından kinonların uzaklaştırılmasına dayanır. 3-metil-2-benzotiyazon hidrazon hidroklorik kinonlarla kondenzasyon ürünleri oluşturur. Bu ürünler daha sonra kloroform ile reaksiyon karışımından ekstrakte edilir ve organik fazın absorpsiyonu 500 nm'de okunur. Kondansasyon ürünlerinin ekstraksiyonu yerine asetonda çözülmesi daha hassas sonuçlar vermektedir [Mazzocco ve Pifferi, 1976]. Diğer bir metotta ise her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz bileşikler oluşturan sarı bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit anyonu kullanılır. Enzim aktivitesi sarı bileşiğin 412 nm'deki absorbansındaki azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle takip edilir [Esterbauer ve ark., 1977].

2.6. Muz Hakkında Genel Bilgi

Çok severek tüketilen ve en lezzetli meyvelerden biri olan muzun, besleyici değerinin yüksek olması özellikle çocukların beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Muz içeriğinde yoğun miktarda potasyum bulunmaktadır. Potasyum açısından en zengin besinler arasında yer alır.

Ülkemizde ithal ve yerli olmak üzere satılan muzları farklı çeşitleri vardır. Muzun tüketimi birçok şekilde yapılabilir. Doğrudan meyve olarak yenebileceği gibi süt içine katılarak, tatlı tariflerinde kullanılarak da faydalanılabilir. Muz dalından koparıldığında çok hızlı olgunlaşan bir meyvedir. Bitkiden yeşil olarak kopartılan bir muz kümesi kısa sürede sarararak tatlanmaya başlar.

Kabuk kısımlarında kahverengiler oluşmaya başlamış muz aşırı olgunlaşmış seviyededir. Eğer muzunu hemen tüketmeyecekseniz; hafif yeşil renkte olanlardan tercih etmeniz, daha uzun süre dayanmasını sağlar. Kolay kolay çürümeyen ve kurtlanmayan bir meyve olduğundan evlerde bulundurulması kolaydır.

2.6.1. Muz Nedir

Muz, tropikal bölgelerde doğal olarak yetişebilen, ağaca benzer bitkiye ve bitki üzerinde yetişen yeşil, pembe, kırmızı kabuklu uzun meyvelere verilen isimdir. Lezzetli olması sebebiyle her yaştan insanın severek tükettiği muz, ülkemizde genellikle yeşil olarak oluşmaya başlar ve olgunlaştıkça sarı bir renk alır. 8-9 metreyi bulan boyu nedeniyle ağaç olarak nitelendirilen muz aslında çok yıllık bir bitkidir. Muz ağacının tıpkı meyveleri gibi yaprakları da uzun bir formdadır. Muzun adının, meyvenin dikimini teşvik eden Antonius Musa isimli doktordan aldığı bilinmektedir. Muzun salkım haline hevenk denir. Ortalama 26 °C sıcaklıkta verimli yetişen muz, yaklaşık 125-150 gün arası hasat edilecek hale gelir.

2.6.2. Muzun Özellikleri Nelerdir

Sıcak ve tropikal alanlarda yetişmesi mümkün olan muz, Musaceae familyasındandır. Yetiştirilmesinde herhangi özel bir bakıma gereksinim görülmez. Ancak özel olarak yetiştiriciliğini yapanlar, bitkinin bakımını yapmaktadır. Yaz aylarının başında bitki üzerinde yeşil olarak oluşmaya başlayan meyveleri toplansa bile zaman içinde olgunlaşabilir. Ağacimsi bitkinin boyu ortalama olarak 7 metre civarında olmakla birlikte daha kısırları ve uzunları görülebilir. Bitki üzerindeki meyve, büyük oranda sarıya dönüşse de muz çeşitleri arasında kırmızı, pembe hatta mor olanları bile vardır. Bitki üzerinde görünen muz topluluğuna muz küresi ya da el adı verilir. Her kümede yaklaşık 10-15 adet muz bulunur. Muz dünyada en çok tüketilen meyvelerden biridir.

2.6.3. Muzun Çeşitleri Nelerdir

Muz çeşitleri genellikle boyuna göre sınıflandırılmıştır. Kısa, orta ve uzun boylardaki muz çeşitlerinin farklı isimleri vardır. Kısa boylu çeşitlerde dwarf cavendish adı verilen ortalama 1,5 metrelik bitkisi olan bir tür vardır. Orta boylu çeşitte ise grand nain, şimşek bilinen muz türleridir. Uzun boylu muz çeşitleri içinde bilinenler williams ve azmandır. Gross michel ise Chiquita (Çikita) muz diye bildiğimiz türün içerisinde bulunduğu muz çeşitidir. Muz çeşitlerinde görsel ve tatsal açıdan ciddi farklar yoktur. Muz çeşitlerine bakıldığında parmak uzunluğundaki boyutlarda ve ortalama 20 cm boyutlarında olduğu görülmektedir. Bilinen diğer muz çeşitleri; pembe muz, bulanık muz, tüylü muz, tohumlu muzdur.

2.6.4. Muzun Faydaları Nelerdir

Muz besleyici özelliği ile tanınmaktadır. Hatta yumurta ile yaklaşık besin değerine sahip olduğu bilinir. İçeriğinde protein, lif ve karbonhidrat vardır. Ancak şeker oranı da yüksek olan bir meyve olduğu unutulmamalıdır. Orta boy bir muzun kalorisi yaklaşık olarak 125 kj (kilojoule) civarındadır. Meyvenin içinde ayrıca bolca A, C, E ve B12 vitaminleri ile potasyum, kalsiyum, magnezyum bulunmaktadır. Enerji verici bir meyve olan muz özellikle iştahsızlık durumunda vücudun enerji ve besin alması için ideal bir seçimdir.

Lif bakımından zengin olduğundan doyurucudur ve bağırsak problemlerinde dengeleyici özelliği vardır. Özellikle ishal durumunda lifli yapısıyla ishalin sonlanmasına katkıda bulunur. Kalp ve damar sağlığına iyi gelir. Ancak çok tüketildiğinde kabızlığa neden olabilir. Göz ve kemik sağlığında faydalıdır. Vücuda serotonin yüklemesi yaparak mutluluk sağlar. Bu yüzden depresyona iyi gelir. İçeriğindeki yoğun magnezyum ve potasyum sayesinde kalp hastalıklarına karşı koruyucudur. Mide ülseri ve asidine muz en iyi çözümlerden bir tanesidir. Bu özelliği ile de reflü tedavisinde faydalıdır. Muzu meyve olarak tüketerek vitaminlerini almak dışında çeşitli kür tariflerinde kullanarak cilt ve saç bakımınızı yapabilirsiniz.

2.7. PPO ile İlgili Yapılan Çalışmalar

PPO enzimi ile ilgili son zamanlarda sebze ve meyvelerdeki enzimatik kararmaları önlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Elma (Oktay ve ark., 1992; Murata

ve ark., 1995), muz (Kahn,1985; Yang ve ark., 2000), şeftali (Flurkey ve Jen, 1980), üzüm (Wissemann ve Lee, 1981; Lamikanra ve ark., 1992), kivi (Park ve Luh, 1985), armut (Wissemann ve Montgomery,1973), ahududu (Gonzales ve ark., 1999), çilek (Ebeling ve Montgomery, 1990), erik (Siddiq ve ark., 1992), turp (Arslan ve ark., 1997), ıspanak (Golbeck ve Cammarata,1981), bakla (Flurkey, 1989; Hutcheson ve Buchanan, 1980), tarla fasulyesi (Paul ve Gowda, 2000) yabancı patates (Kowalski ve ark., 1992), ferula sp (Erat ve ark., 2006), Anamur muzunda (Ünal, 2005), Ankara armudunda (Ziyan ve Pekyardımcı, 2004), *Cynara scolymus L* 'dan (Aydemir, 2004), Van elmasında (Demir ve ark., 2006) ve yer elması (Zawitowski ve ark., 1988) olmak üzere pek çok bitki dokusunda çalışılmıştır. Enzim, moleküler oksijen içeren iki farklı reaksiyon katalizlemektedir. Birincisi monofenollerini o-difenollere dönüştüren hidroksilasyon, ikincisi o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (Vamos-Vigyazo, 1981). Oksidasyon, yiyeceklerin güvenliğini, rengini, lezzetini ve yapısını etkilediği için gıdaların bozulmasında en önemli etkidir (Kinsella ve ark., 1993).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

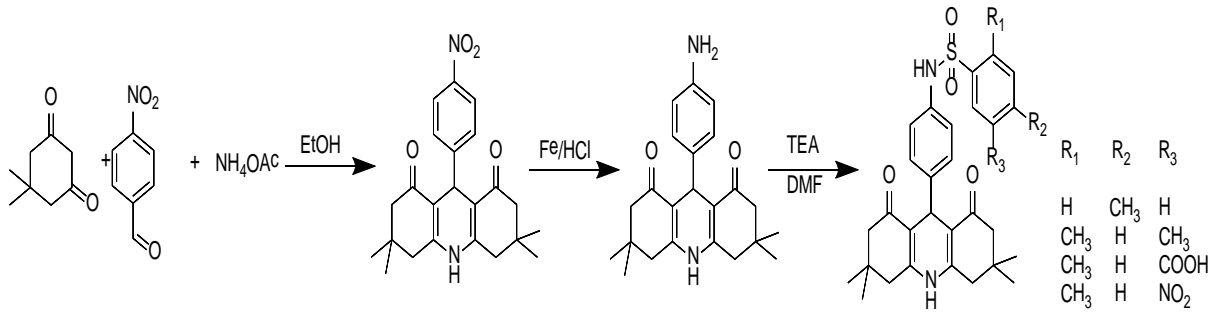
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, p-aminobenzoik asit, L-tirozin, standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den; trikloro asetik asit (TCA), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum karbonat, sodyum sitrat, trihidroksimetil aminometan (Tris), siyanojen bromür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, metil alkol, hidroklorik asit, sodyum azodür, sodyumnitrat, sodyumdihidrojen fosfat, sodyum bikarbonat, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), katekol Merck A.G'den; akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, SDS, bromtimol mavisi, gliserol, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250 Fine Chemical'dan sağlandı.

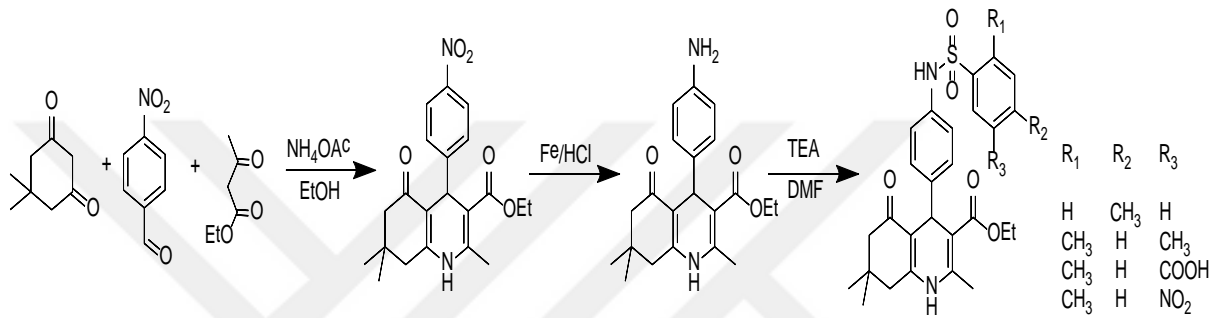
Bu çalışmalarda kullanılan organik bileşikler, Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ARSLAN ve laboratuvar çalışanlarınca, Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenen orijinal sülfonamid türevleridir. Bileşiklerin kodları ve isimleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Orijinal sülfonamid türevlerinin kodları ve isimleri

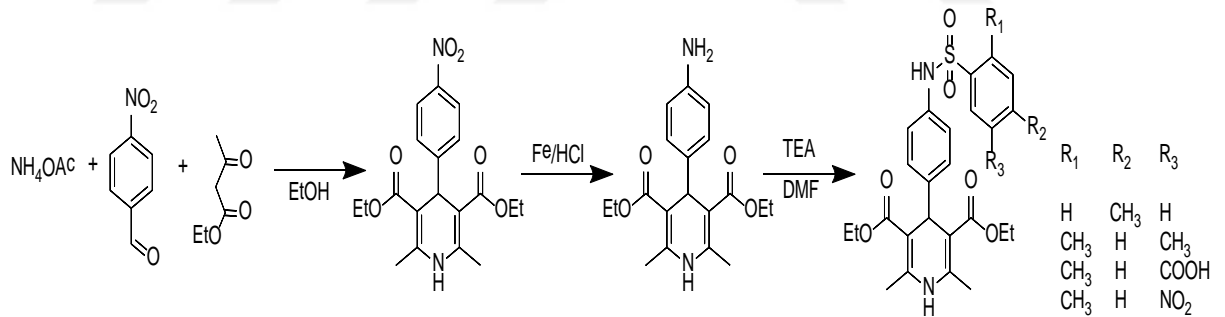
Bileşik Kodu	Bileşiğin Adı
DT-F-S1	Ethyl 2,7,7-trimethyl-4-(4-(4-methylphenylsulfonamido)phenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8 hexahydroquinoline-3-carboxylate
DT-F-S2	Ethyl 4-(4-(2,5-dimethylphenylsulfonamido)phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3 carboxylate
DT-F-S3	Ethyl 2,7,7-trimethyl-4-(4-(2-methyl-5-nitrophenylsulfonamido)phenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquino line-3 carboxylate
DT-F-S4	3-(N-(4-(3-(ethoxycarbonyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinolin-4-yl)phenyl)sulfamoyl)-4-methylbenzoic acid
DT-F-S5	4-methyl-N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-9-yl)phenyl)benzene sulfonamide
DT-F-S6	2,5-dimethyl-N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-9-yl)phenyl) benzenesulfonamide
DT-F-S7	2-methyl-5-nitro-N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-9-yl)phenyl) benzenesulfonamide
DT-F-S8	4-methyl-3-(N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-9-yl)phenyl) sulfamoyl)benzoic acid
DT-F-S9	Diethyl 2,6-dimethyl-4-(4-(4-methylphenylsulfonamido)phenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
DT-F-S10	Diethyl 4-(4-(2,5-dimethylphenylsulfonamido)phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
DT-F-S11	Diethyl 2,6-dimethyl-4-(4-(2-methyl-5-nitrophenylsulfonamido)phenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxy late
DT-F-S12	3-(N-(4-(3,5-bis(ethoxycarbonyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-4-yl)phenyl)sulfamoyl)-4-methylbenzoic acid



Şekil 3.1. N-(4-(3,3,6,6-tetramethyl-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-9-yl)phenyl)benzene sulfonamide bileşiklerinin sentez prosedürü

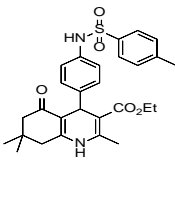
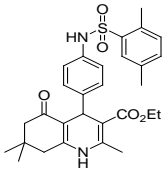
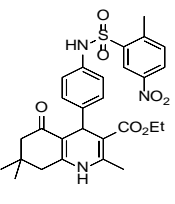
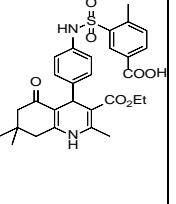
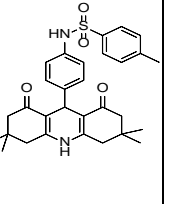
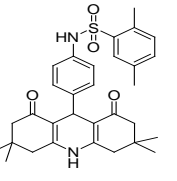
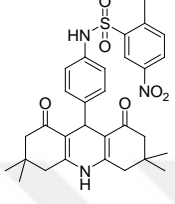
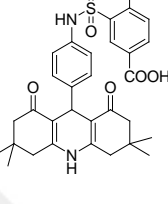
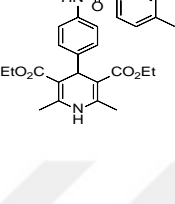
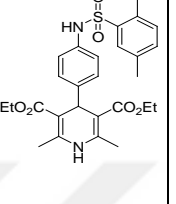
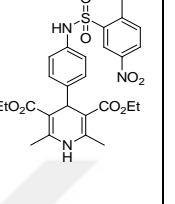
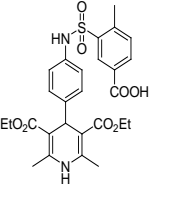


Şekil 3.2 ethyl 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-(4-(phenylsulfonamido)phenyl)-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline 3-carboxylate bileşiklerinin sentez prosedürü



Şekil 3.3 diethyl 2,6-dimethyl-4-(4-(phenylsulfonamido)phenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate bileşiklerinin sentez prosedürü

Tablo 3.2. Kullanılan bileşiklerin açık formülleri

	DT-F-S1	DT-F-S2	DT-F-S3	DT-F-S4	DT-F-S5	DT-F-S6
B i l e ş i k l e r						
	DT-F-S7	DT-F-S8	DT-F-S9	DT-F-S10	DT-F-S11	DT-F-S12
						

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı santrifüj: Hettich zentrifugen,

EBA-12R pH metre: Orion- model 920A

UV-Spektrofotometre: CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN

Manyetik karıştırıcı: IKA Combimag RCO

Peristaltik Pompa: Pharmacia Fine Chemicals

Kronometre: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr

Terazi: Libror, AEG-220 (Shimadzu)

Otomatik pipetler: Fischer

Homojenize Edici: Ev tipi blender

Elektroforez tankı: Hofer, HIS

Kromatografi Kolonu: Pharmacia Fine Chemicals

Derin dondurucu: Sanio Medical Freezer

Etüv: Elektromag

Çalkalayıcı: Clifton

Sabit sıcaklık sirkülatörü: Techne-Tempette Junior TE-8J

Vortex: Fisons Whirli Mixer

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

1) Ekstraksiyon tamponu: % 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit, pH: 7.3, 0.5 M fosfat tamponu; 8.7 gr (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 gr polietilen glikol(PEG), 0.176 gr (0.0018 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH. 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi. Çözelti daha sonra saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

2) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözeltiye alındığı ve diyaliz yapıldığı tampon: 5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3; 0.87 gr (0.005 mol) K_2HPO_4 950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.3'e kadar titre edildi ve saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

3) Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:

0.1 M $NaHCO_3$, pH: 10.0 tamponu; 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M $NaHCO_3$, pH: 8.8 tamponu; 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 450 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Na_2HPO_4 , pH: 6.0 tamponu; 1.42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 Lt'ye tamamlandı.

4) Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar:

0.05 M fosfat tamponu, pH: 5.00; 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.05 M fosfat tamponu, pH: 6.00; 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 6.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

5) Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti: 0.05 M Na_2HPO_4 / 1 M NaCl, pH: 8.00 fosfat tamponu; 3.55 gr

(0.025 mol) Na_2HPO_4 ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 8.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

6) Aktivite Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 6.80 fosfat tamponu; 7.1 gr (0.05 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 6.80'e getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

7) Substrat Çözeltisi: Substrat çözeltisi 10 mL, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 gr (1×10^{-3} mol) katekol son hacim 10 mL olacak şekilde destile su ile çözüldü.

8) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'lük SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Destile su	0.5 mL

9) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Tris-HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır

10) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 3.3'de verilmektedir.

Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u> Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> Tris-HCl 11.82 gr pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 gr pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400µL

10) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

11) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Enzim kaynağı olan muzlar, Siirt ilindeki manav ve marketlerde satılan ithal muzlar alınarak temin edilmiştir. +4 °C'de muhafaza edilerek aynı gün içerisinde kullanılmıştır. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g muz 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M, pH: 7.30, fosfat tamponu içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzüldü. Süzüntü 20000 x g'de + 4°C'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

3.2.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme, işlemleri %0-80 arasında doygunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formülle tespit edildi.

$$\text{gr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 \times S_2}$$

V: süpernatant hacmi

S₁: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Çöktürme işleminde kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı yukarıdaki formüle göre tespit edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş ve azar azar katıldı, her ilave sonrasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra %80 doygunluğa getirilen suspansiyon 20000 x g'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Tüm ekstrakt bu şekilde santrifüj edildikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı kısımlar atıldı. Oluşan çökelek ise, 5 mM fosfat tamponunun (pH: 6.3) çözünmediği en az miktarında çözüldü

3.2.3 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune, diyaliz torbası (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) içine alınarak, tampona (5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi.

3.2.4 PPO Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması

PPO enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan birisi de afinitive kromatografisidir. Afinitive kromatografisi, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede, çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemleri kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [Cuatrecasas, 1970].

3.2.4.1 Afinitive Jelinin Hazırlanması

Afinitive jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4'nin serbest -OH guruplarının modifikasyonunda yaygın olarak CNBr yönteminden yararlanılmıştır [Pathak ve ark., 1992]. Aynı metot tarafımızdan kullanılarak, Sepharose-4B, CNBr ile aktiveleştirildikten sonra, tirozinle kovalent modifiye edildi. Reaktif türevde tirozine diazolanmış p-aminobenzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Burada, tirozin afinitive jelinin uzantı kolunu, p-aminobenzoik asit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. p-aminobenzoik asit PPO enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinitive jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinitive jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

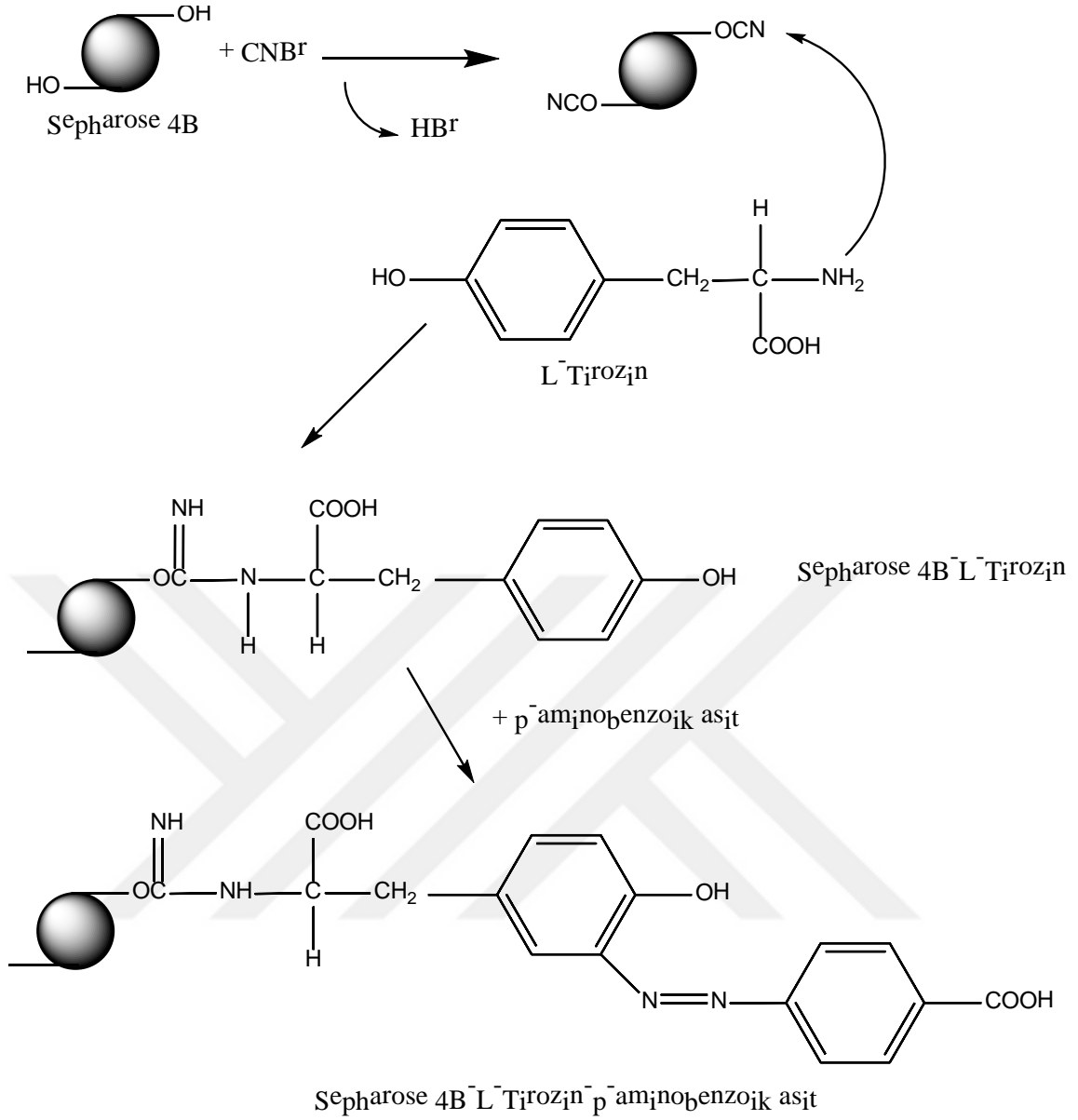
3.2.4.1.1. Sepharose-4B'nin Aktiveleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g toz haline getirilmiş CNBr'ün hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. 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 NaHCO₃ tampon çözeltisi ile (pH: 10) ile yıkandı 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek, yavaşça karıştırılan süspansiyondan, bağlanma derecesini belirleme amacıyla, her 15 dakikada içinde jel

bulunmayan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimi izlendi. 90. dakikadan sonra absorbansda önemli bir farklanma olmadığı için, bağlanma reaksiyonu 90 dakika olarak belirlendi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH: 8.8) tekrarlandı. Tirozinle modifiye Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

3.2.4.1.2. p-aminobenzoik Asidin Bağlanması

25 mg p-aminobenzoik asit, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan p-aminobenzoik 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 Na₂HPO₄ (pH: 6) tamponu ile yıkanarak aynı tamponda muhafaza edildi. Reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları

3.2.4.2 Enzim Çözeltilisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hemolizat yüklenmeden önce +4 °C'de muhafaza edilen afinite jeli dengeleme tamponu ile dengelenmiştir. Ardından hemolizat kolona yüklenerek, yıkama tamponu vasıtasıyla safsızlıkların ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında, Muz PPO enzimi elüsyon tamponu yardımı ile afinite jelinden saflaştırılarak 3 mL'lik tüplere alınıp aktivite çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat tamponu (pH: 6.0) ile, üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun pH değerleri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH:5.0) ile yıkanarak 2'şer mL halinde tüplere alındı. Böylece PPO'nun büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Toplanan tüplerde 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Daha sonra 0,05 M pH=7,00 Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve 2'er mL halinde tüplerde fraksiyonlandı. Elüatlarda Coomassie Brilliant blue metoduyla kantitatif, 280 nm'de kantitatif protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı.

3.2.5 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Afinite jeliyle saflaştırılan PPO enziminin protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [Bradford ve ark., 1976]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün yanı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 100 mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri (Tablo 4.1.) ile standart grafik hazırlandı (Şekil 4.1.).

Hazırlanacak enzim çözeltilerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Muz PPO (MPPO) enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [Laemelli, 1970]. Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Tablo 3.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığıma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki 26 yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi. (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Lizozim (14.3 kDA), β-laktoglobulin (18.4 kDA), tripsinojen (24 kDA), pepsin (34.7 kDA) , ovalbumin (45 kDA) ve sığır serum albumin (66 kDA) içeren standart protein çözeltisi, içerisinde her birinden 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra

akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 30 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

3.2.7 PPO Enziminin Aktivite Tayini

PPO enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 30 µL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 372 µL tampon + substrat (0.1 M katekol) + saf su çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (U), reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0,001'lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak 1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişim kullanıldı.

3.2.8 İnhibitörler için IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 0.1 M sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite kabul edilerek kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.9 Muz PPO Enziminin Moleküller Ağırlığının Tespiti

Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoikasit kimyasal yapısına sahip afinite jeli: PPO enziminin moleküler ağırlığı Andrews metoduna göre yapılmıştır [Andrews, 1965].

Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak logMa-R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra numunenin R_f değeri hesaplandı ve

standart grafikte yerine konularak Muz PPO enziminin \log_{Ma} 'sı belirlendi. Bu değerin antilogaritması alınarak numunenin moleköl kütlesi tespit edildi.

Proteinlerin Rf değerleri:

$$Rf = \frac{Xe}{Xboya}$$

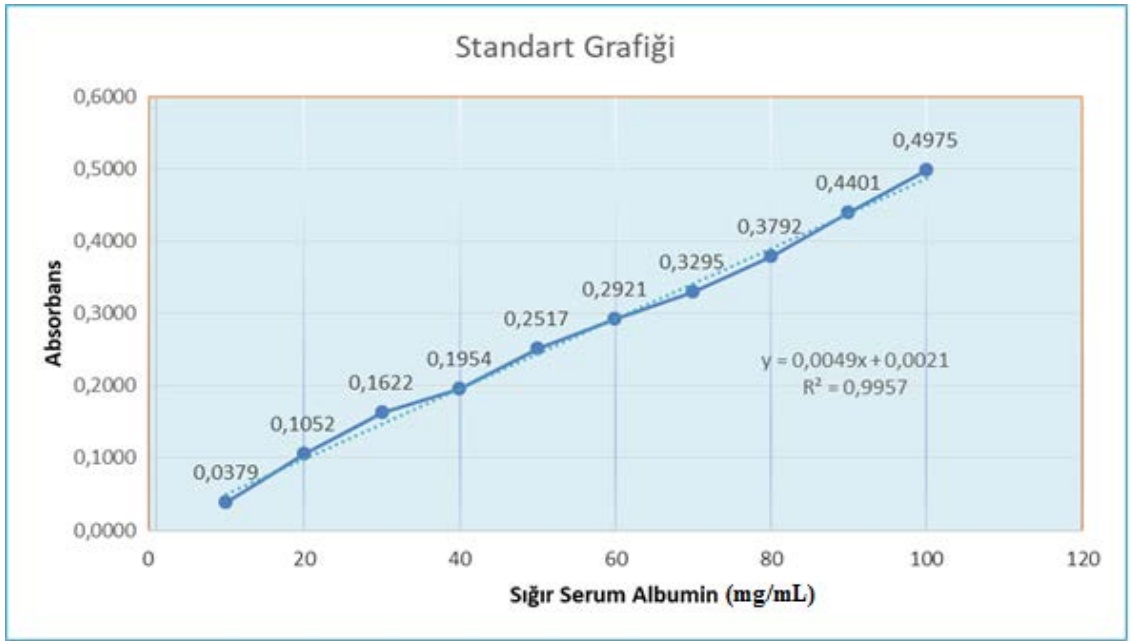
Formölü ile belirlendi. Burada Xe: proteinin yürütme mesafesi, Xboya: boyanın yürütme mesafesidir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 3.2.5.'de açıklandığı gibi hazırlandı. Saflaştırma sonrası elde edilen enzim çözeltisinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

4.2. Kantitatif Protein Tayini İle Tespit Edilen PPO Enzimi Protein Miktarı

Tablo 4.1. PPO enzimi protein miktarı

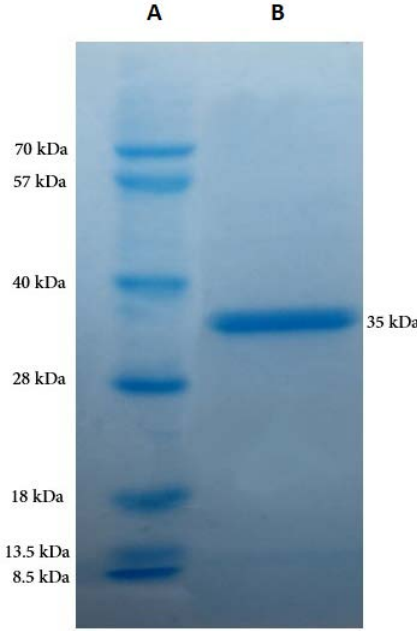
	BSA türünden
PPO Enzimi	0,000005 mg/mL

(100 µl enzim kullanılmıştır.)

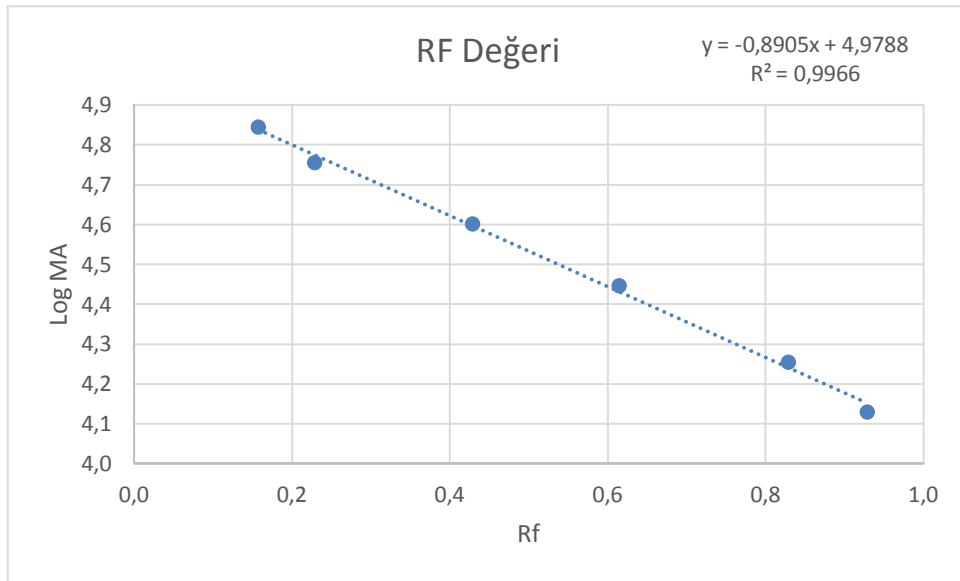
4.3. PPO Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi İle Safsızlık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

Afinite kromatografisi kolonundan saflaştırılan PPO enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel

elektroforezine muzdan saflaştırılan PPO enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan PPO enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforez görüntüsü. (Soldan sağa sütun-A); moleküler markerlar [(baştan sona);70kDa, 57kDa, 40kDa,28kDa, 18kDa, 13.5kDa, 8.5kDa], (sütun B); Muz PPO enzimi (35 kDa).



Şekil 4.3. Muz PPO enzimi için SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik

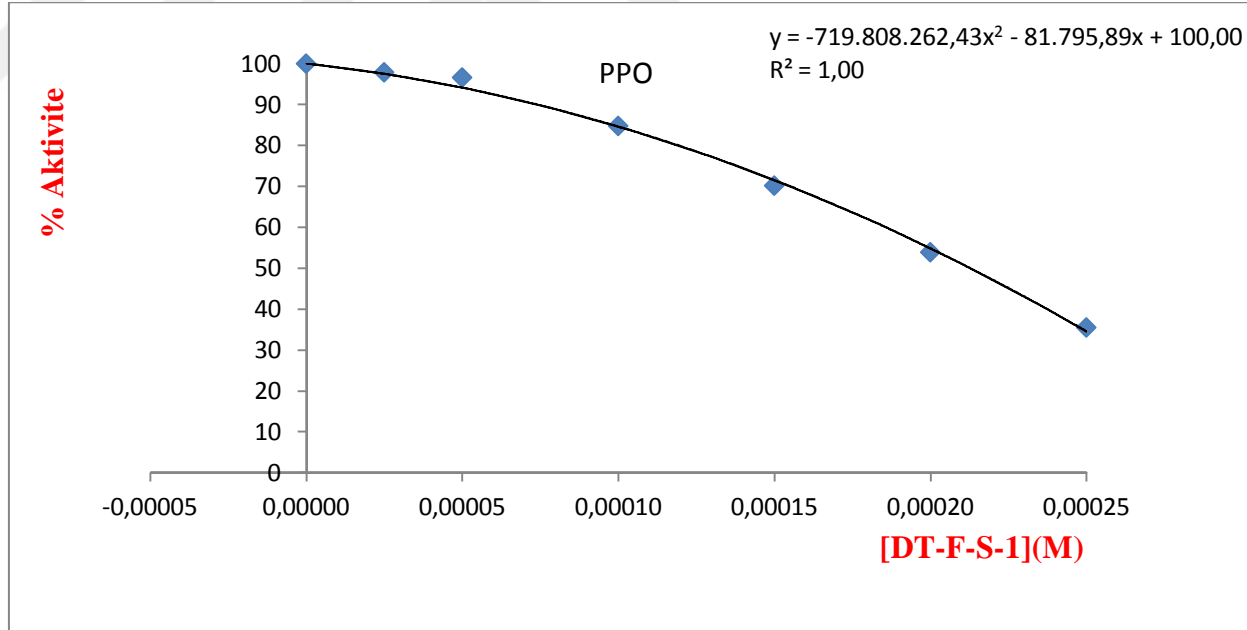
Enzimin moleküler ağırlığının oluşturulmasına ek olarak, enzim ve standart proteinler için Rf değerleri de hesaplanmış ve Laemmli yöntemine göre Rf-LogMA grafiği elde edilmiştir[Laemmli, 1970]. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 35,2 kDa olarak belirlendi.

4.4. PPO Enzimine Ait Aktivite Çalışmaları ve Elde Edilen Veriler



TABLO 4.2. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S1 bileşiminin etkisi

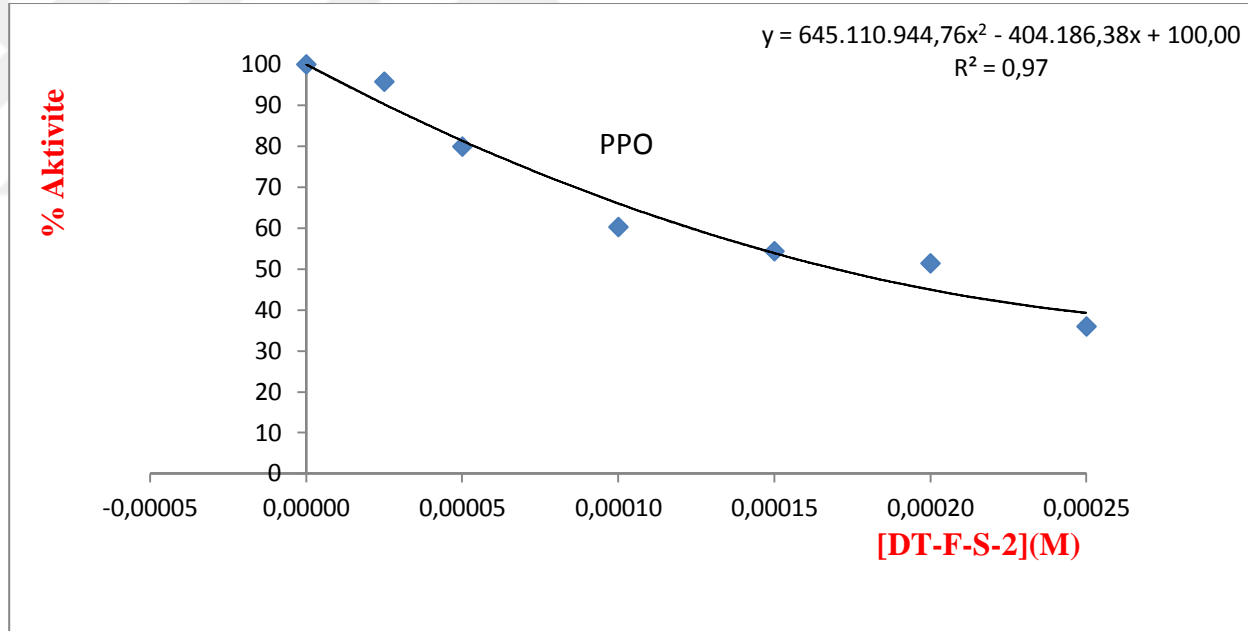
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	DT-F-S1 Bileşiminin Hacmi (μL)	Küvetteki DT-F-S1 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 m)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,463	11575	97,886
372			200	50	0,000050	0,457	11425	96,617
372			150	100	0,000100	0,401	10025	84,778
372			100	150	0,000150	0,332	8300	70,190
372			50	200	0,000200	0,255	6375	53,911
372			0	250	0,000250	0,168	4200	35,518



Şekil 4.4. DT-F-S1 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S1] grafiği

TABLO 4.3. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S2 bileşiminin etkisi

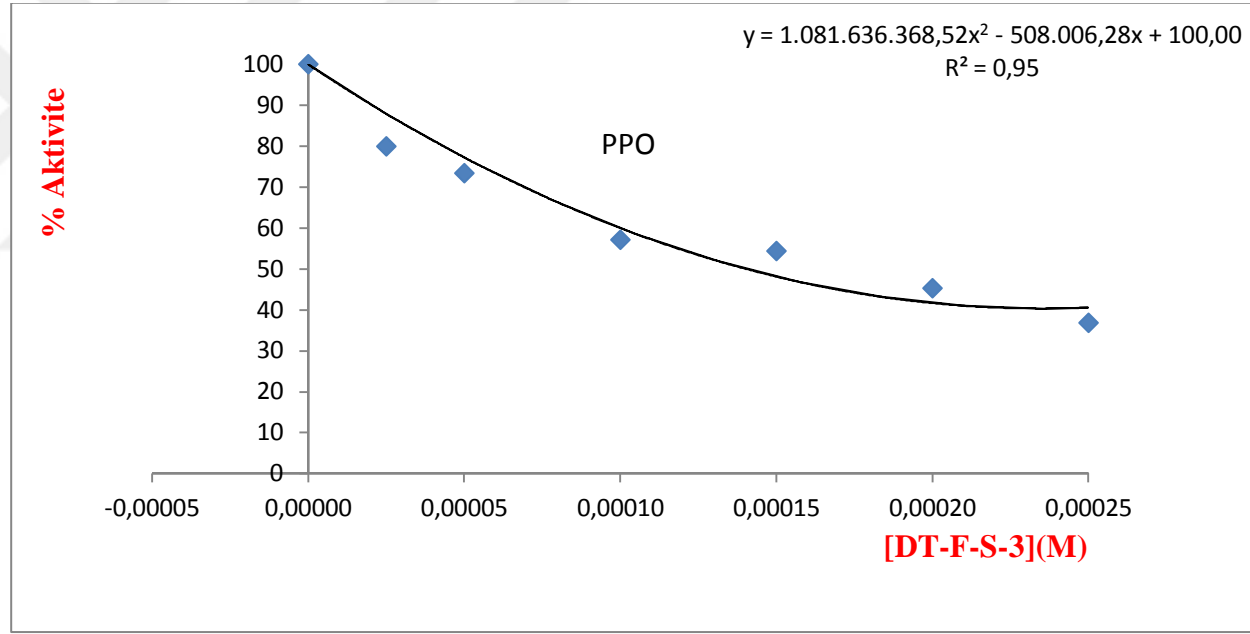
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	DT-F-S2 Bileşimin Hacmi (μL)	Küvetteki DT-F-S2 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,453	11325	95,772
372			200	50	0,000050	0,378	9450	79,915
372			150	100	0,000100	0,285	7125	60,254
372			100	150	0,000150	0,257	6425	54,334
372			50	200	0,000200	0,243	6075	51,374
372			0	250	0,000250	0,170	4250	35,941



Şekil 4.5. DT-F-S2 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S2] grafiği

TABLO 4.4. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S3 bileşiminin etkisi

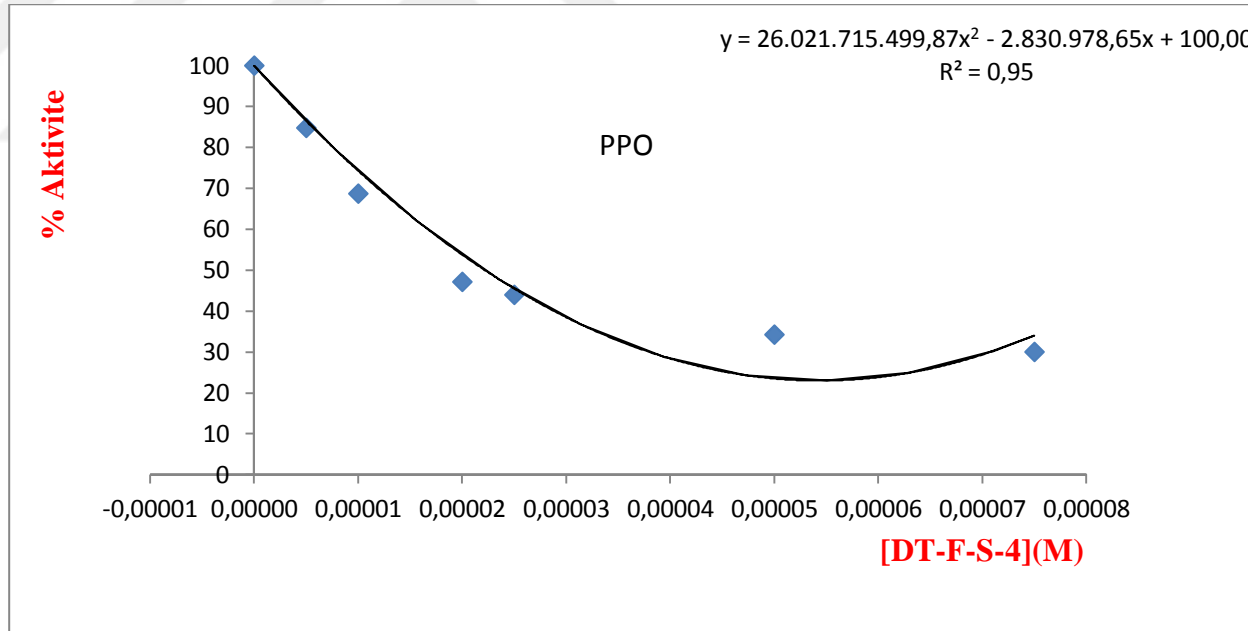
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	DT-F-S2 Bileşimin Hacmi (μL)	Küvetteki DT-F-S2 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,378	9450	79,915
372			200	50	0,000050	0,347	8675	73,362
372			150	100	0,000100	0,270	6750	57,082
372			100	150	0,000150	0,257	6425	54,334
372			50	200	0,000200	0,214	5350	45,243
372			0	250	0,000250	0,174	4350	36,786



Şekil 4.6. DT-F-S3 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S3] grafiği

TABLO 4.5. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S4 bileşiminin etkisi

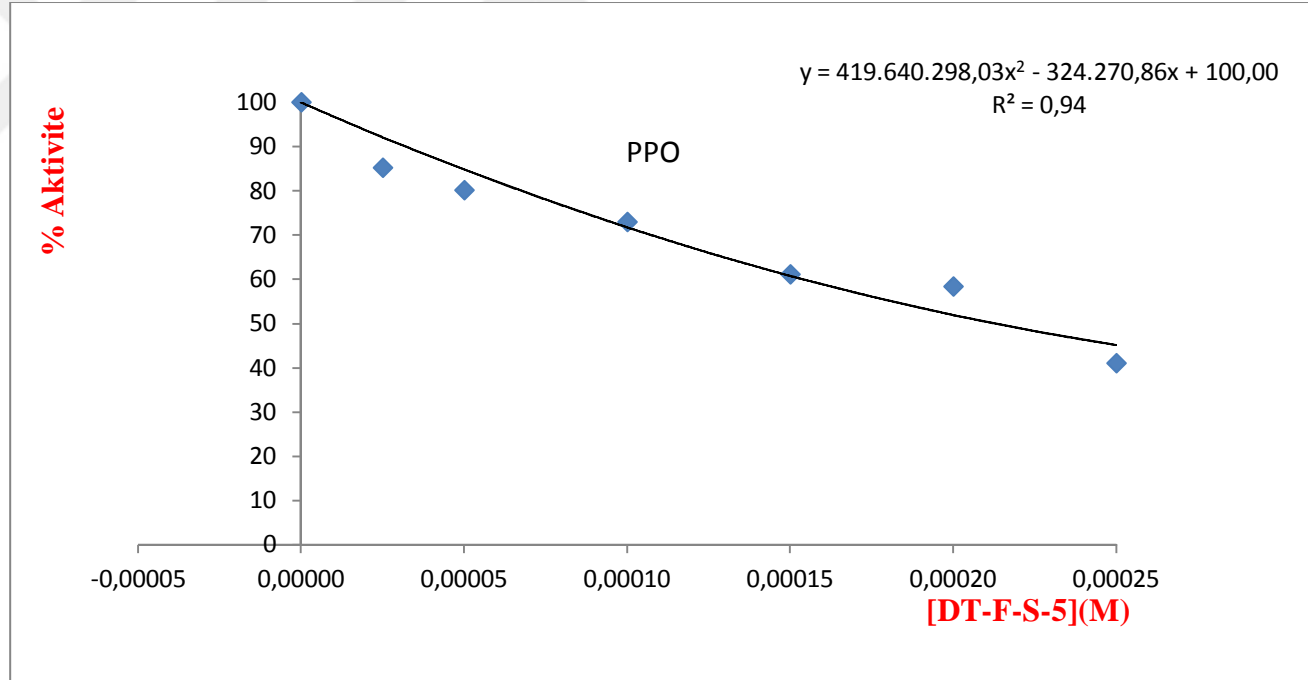
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S4 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S4 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,401	10025	84,778
372			200	50	0,000050	0,325	8125	68,710
372			150	100	0,000100	0,223	5575	47,146
372			100	150	0,000150	0,208	5200	43,975
372			50	200	0,000200	0,162	4050	34,249
372			0	250	0,000250	0,142	3550	30,021



Şekil 4.7. DT-F-S4 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S4] grafiği

TABLO 4.6. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S5 bileşiminin etkisi

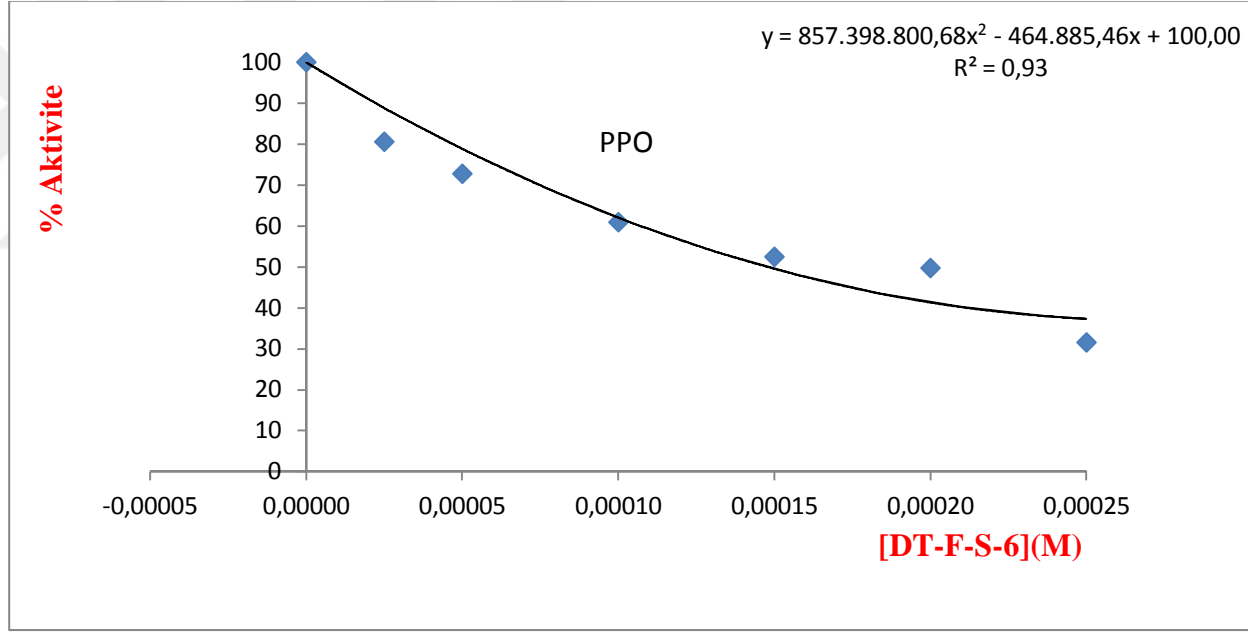
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S5 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S5 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,403	10075	85,201
372			200	50	0,000050	0,379	9475	80,127
372			150	100	0,000100	0,345	8625	72,939
372			100	150	0,000150	0,289	7225	61,099
372			50	200	0,000200	0,276	6900	58,351
372			0	250	0,000250	0,194	4850	41,015



Şekil 4.8. DT-F-S5 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S5] grafiği

TABLO 4.7. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S6 bileşiminin etkisi

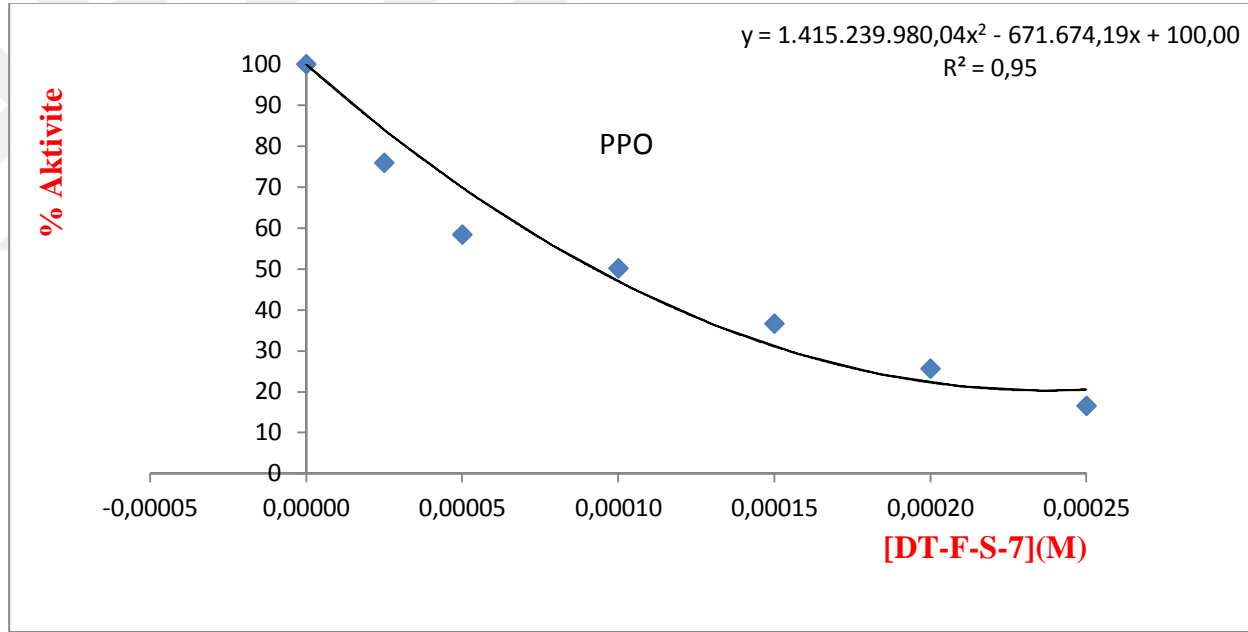
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S6 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S6 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,381	9525	80,550
372			200	50	0,000050	0,344	8600	72,727
372			150	100	0,000100	0,288	7200	60,888
372			100	150	0,000150	0,248	6200	52,431
372			50	200	0,000200	0,235	5875	49,683
372			0	250	0,000250	0,149	3725	31,501



Şekil 4.9. DT-F-S6 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S6] grafiği

TABLO 4.8. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S7 bileşiminin etkisi

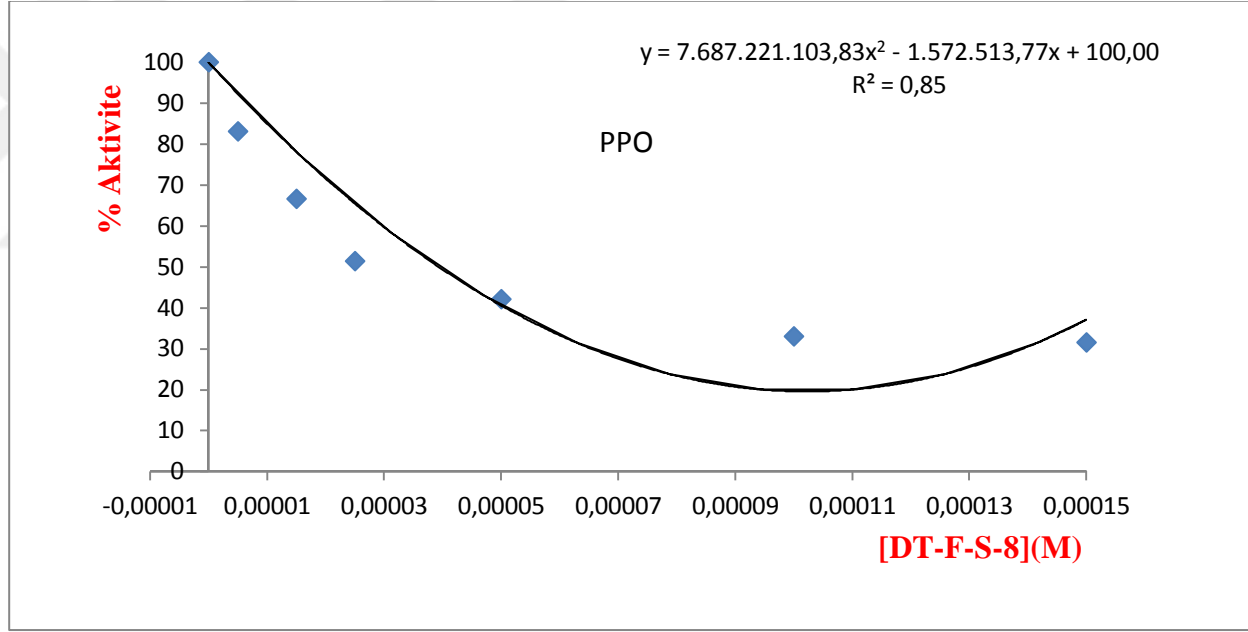
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S7 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S7 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,359	8975	75,899
372			200	50	0,000050	0,276	6900	58,351
372			150	100	0,000100	0,237	5925	50,106
372			100	150	0,000150	0,173	4325	36,575
372			50	200	0,000200	0,121	3025	25,581
372			0	250	0,000250	0,078	1950	16,490



Şekil 4.10. DT-F-S7 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S7] grafiği

TABLO 4.9. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S8 bileşiminin etkisi

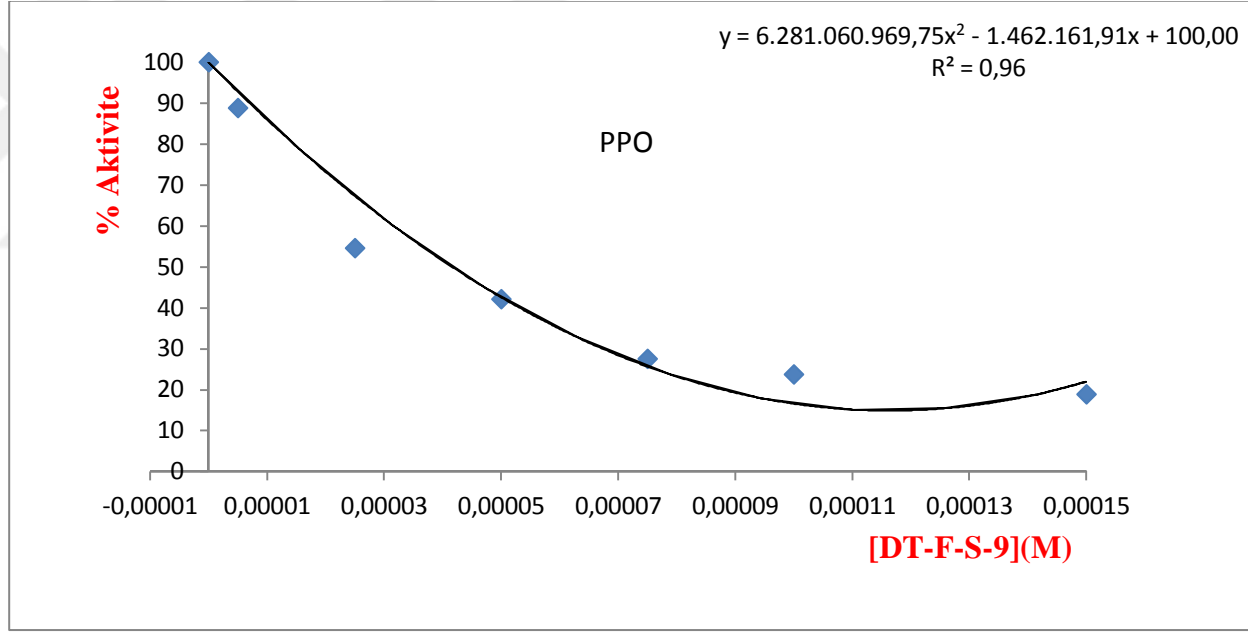
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S8 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S8 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,393	9825	83,087
372			200	50	0,000050	0,315	7875	66,596
372			150	100	0,000100	0,243	6075	51,374
372			100	150	0,000150	0,199	4975	42,072
372			50	200	0,000200	0,156	3900	32,981
372			0	250	0,000250	0,149	3725	31,501



Şekil 4.11. DT-F-S8 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S8] grafiği

TABLO 4.10. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S9 bileşiminin etkisi

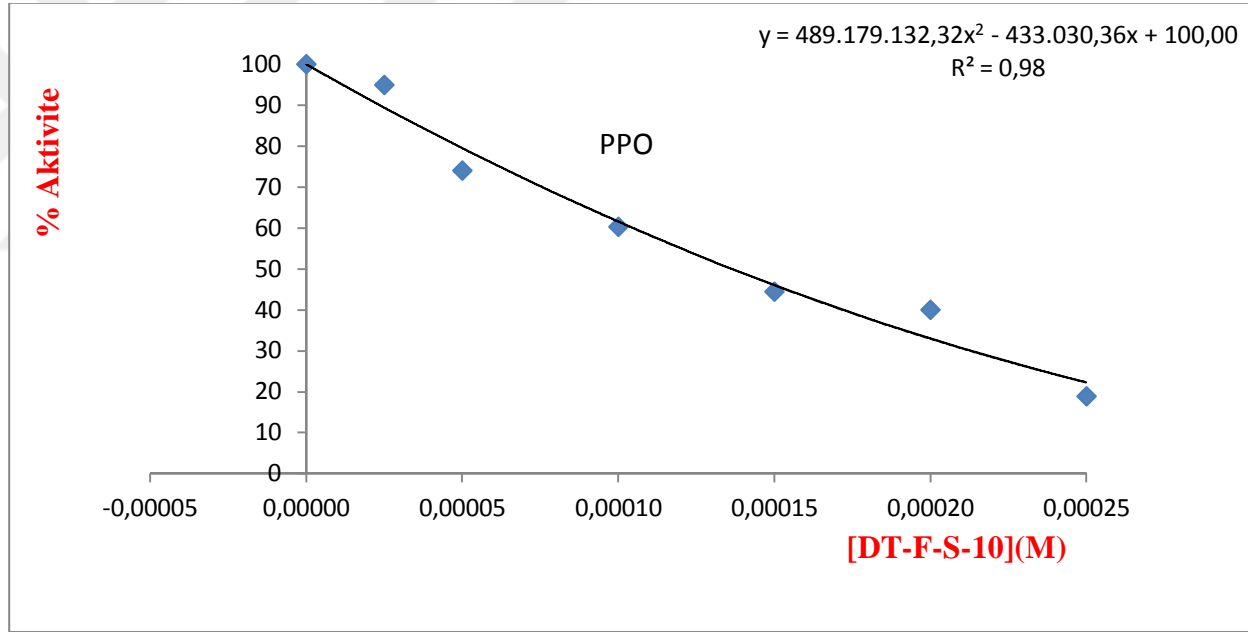
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S9 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S9 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,420	10500	88,795
372			200	50	0,000050	0,258	6450	54,545
372			150	100	0,000100	0,199	4975	42,072
372			100	150	0,000150	0,130	3250	27,484
372			50	200	0,000200	0,112	2800	23,679
372			0	250	0,000250	0,089	2225	18,816



Şekil 4.12. DT-F-S9 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S9] grafiği

TABLO 4.11. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S10 bileşğinin etkisi

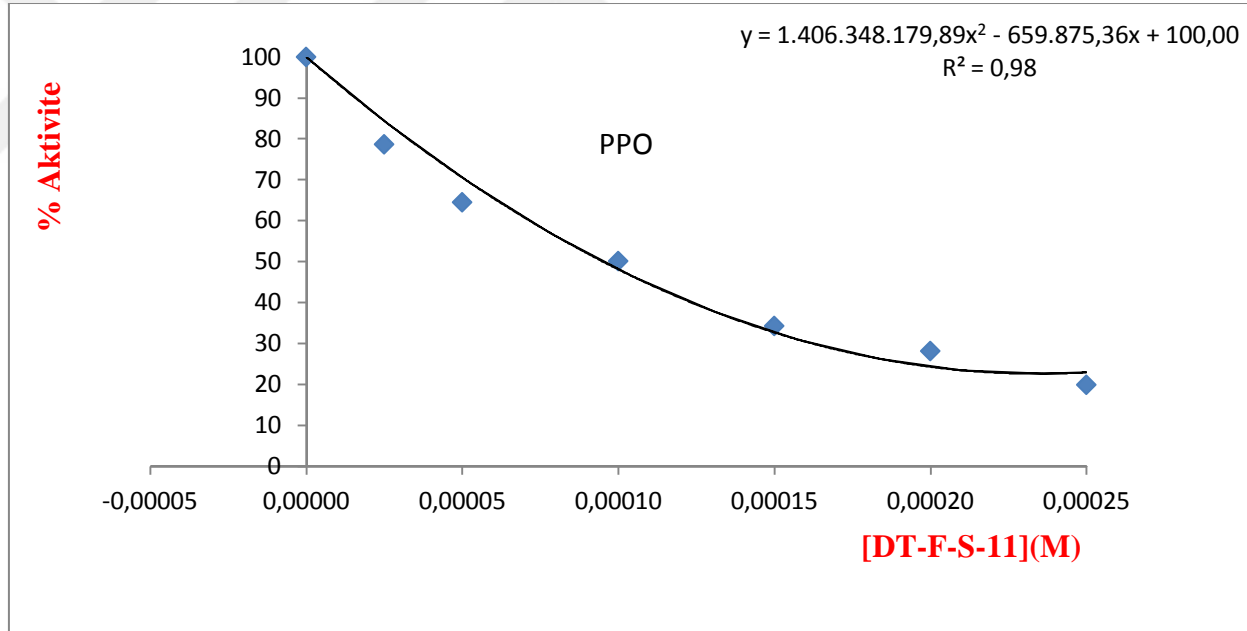
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	DT-F-S10 Bileşğinin Hacmi (μL)	Küvetteki DT-F-S10 Bileşğinin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,449	11225	94,926
372			200	50	0,000050	0,35	8750	73,996
372			150	100	0,000100	0,285	7125	60,254
372			100	150	0,000150	0,21	5250	44,397
372			50	200	0,000200	0,189	4725	39,958
372			0	250	0,000250	0,089	2225	18,816



Şekil 4.13. DT-F-S10 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S10] grafiği

TABLO 4.12. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S11 bileşiminin etkisi

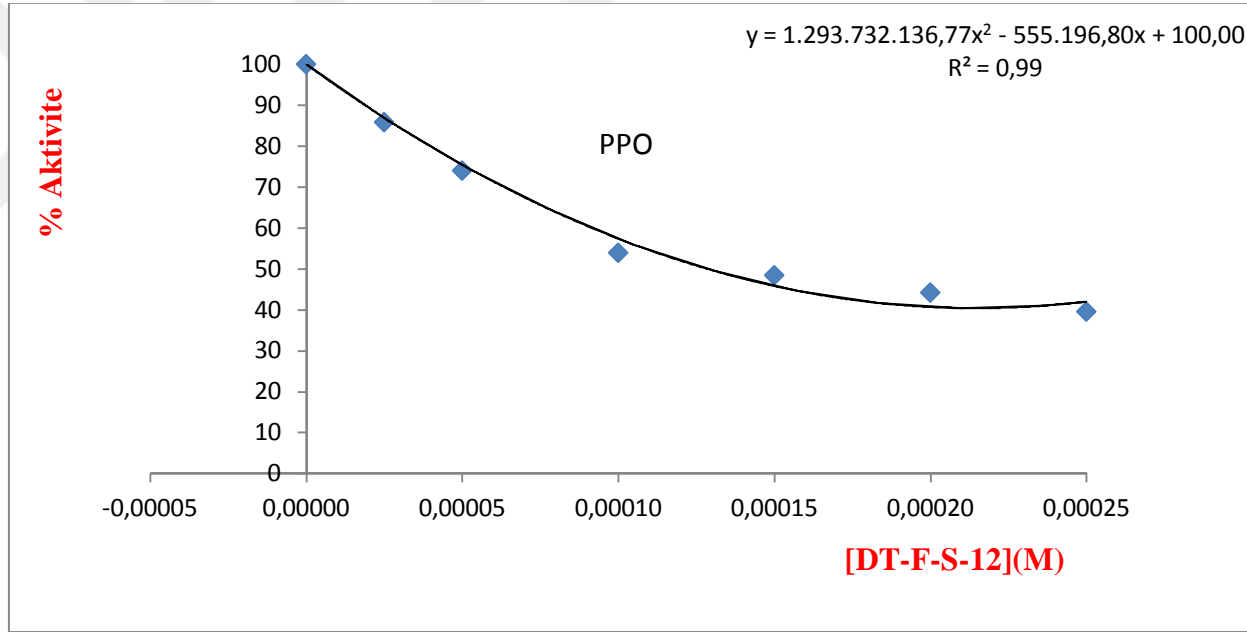
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S11 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S11 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,372	9300	78,647
372			200	50	0,000050	0,305	7625	64,482
372			150	100	0,000100	0,237	5925	50,106
372			100	150	0,000150	0,162	4050	34,249
372			50	200	0,000200	0,133	3325	28,118
372			0	250	0,000250	0,094	2350	19,873



Şekil 4.14. DT-F-S11 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S11] grafiği

TABLO 4.13. Muz PPO enzim aktivitesi üzerine DT-F-S12 bileşiminin etkisi

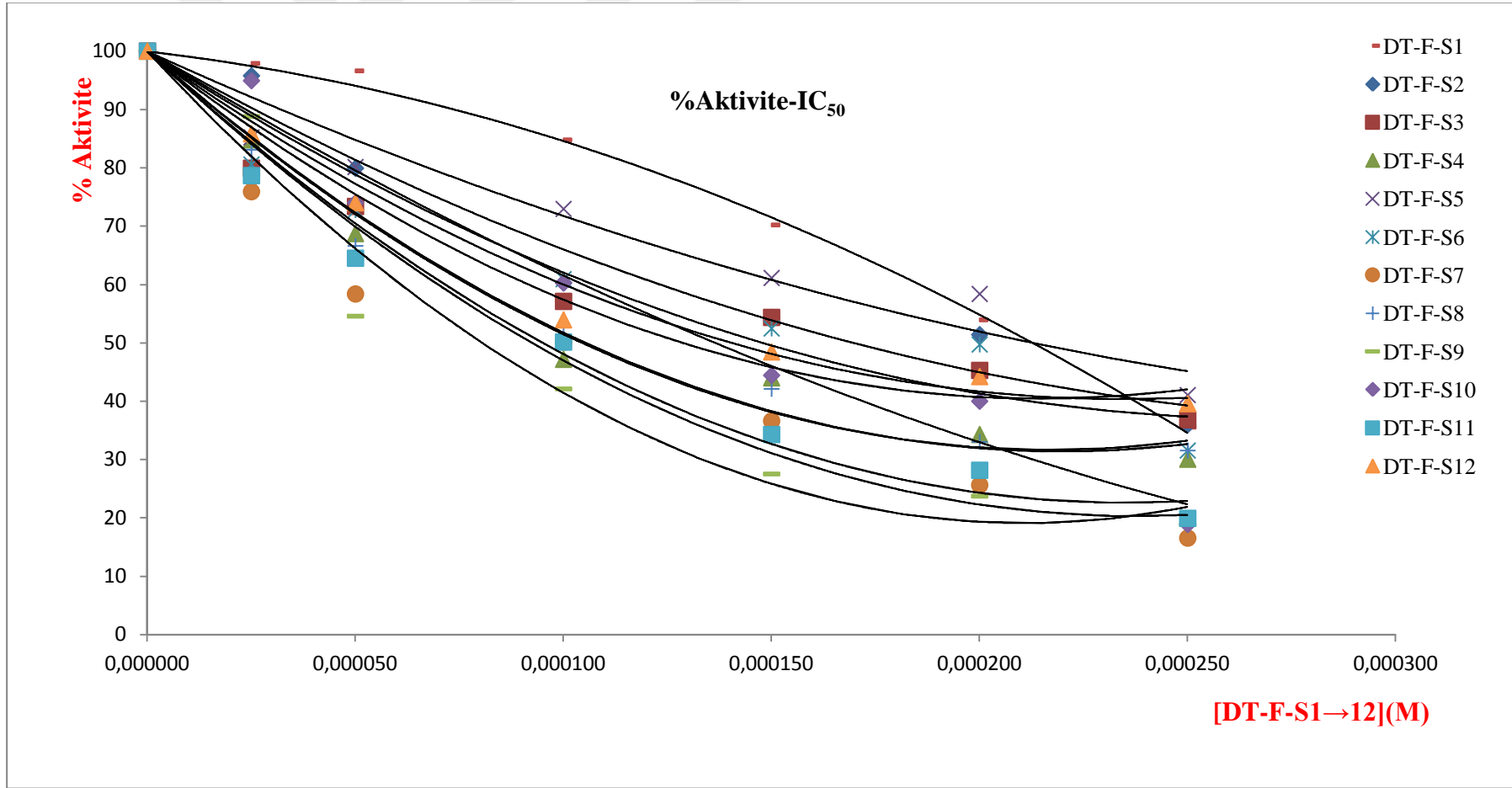
0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	DT-F-S12 Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki DT-F-S12 Bileşiminin Kons. (M)	ΔA (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
372	30	98	250	0	0,000000	0,473	11825	100,000
372			225	25	0,000025	0,406	10150	85,835
372			200	50	0,000050	0,350	8750	73,996
372			150	100	0,000100	0,255	6375	53,911
372			100	150	0,000150	0,229	5725	48,414
372			50	200	0,000200	0,209	5225	44,186
372			0	250	0,000250	0,187	4675	39,535



Şekil 4.15. DT-F-S12 kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [DT-F-S12] grafiği

Tablo 4.14. Muz PPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez sülfonamid türevlerinin IC₅₀ değerleri ve Cheng&Prusoff denkleminde göre hesaplanmış K_i değerleri

Madde Kodu	IC₅₀ değeri (μM)	K_i (μM)
DT-F-S1	212,790	40,628
DT-F-S2	169,590	32,380
DT-F-S3	140,380	26,803
DT-F-S4	86,607	16,536
DT-F-S5	212,786	40,627
DT-F-S6	147,892	28,237
DT-F-S7	92,440	17,650
DT-F-S8	39,375	7,518
DT-F-S9	41,640	7,950
DT-F-S10	136,510	26,064
DT-F-S11	95,010	18,140
DT-F-S12	128,588	24,551



Şekil 4.16. DT-F-S1 kodlu bileşikten DT-F-S12 kodlu bileşiğe kadar %Aktivite - [DT-F-S1→ DT-F-S12] grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Polifenol oksidaz (EC: 1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksido redüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir. PPO tirozinaz, fenolaz, katekoloksidaz, katekolaz, o-difenoloksidaz, mono fenoloksidaz ve kresolaz olarak da bilinir. PPO mikroorganizmalarda, hayvanlarda ve bitkilerde oldukça yaygın bir enzim olup Tirozinaz moleküler oksijen içeren monofenollerin o-difenollere hidrolizlendiği (monofenolaz) ve o-difenollerin o-kinonlara (difenolaz) hidrolizlendiği iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir [Chen ve ark., 2003].

Meyve ve sebzelerin taşınması ya da işlenmesi sırasında meydana gelen zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. Bu da istenmeyen bir işlem olup engellenmelidir. Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik esmerleşme; bunların depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında kesilme, zedelenme, dondurulmuş meyvenin çözülmesi durumlarında hava içindeki oksijeninin etkisiyle meydana gelir [Vamos-Vigyazo, 1981].

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik esmerleşme reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmeyen bir durumdur. Ancak bazı besin teknolojisi dallarında PPO enziminin sebep olduğu enzimatik esmerleşme istenmektedir. Kakao, siyah üzüm, siyah çay, kahve, siyah üzüm, siyah incirlerde ve kuru erik üretiminde PPO enziminin bu reaksiyonu önemlidir. Çünkü enzim sayesinde bu ürünler istenen son ürün karakteristiklerine kavuşurlar [Mathev ve Parpia, 1971; Vamos-Vigyazo, 1981; Memişoğlu ve ark., 2005].

Çalışmamızda daha önceden bilinen afinite jeli kullanılarak muz meyvesinden PPO enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik sabitleri optimum pH ve sıcaklıkta katekol substratı kullanılarak belirlenmiştir.

Muzdan saflaştırılan PPO enzimi üzerine orijinal sentez sülfanoamid türevlerinin *in vitro* etkisi incelenmiştir. PPO enzimi için literatürde bulunan inhibitörlerden daha etkili bir inhibitör bulunması amaçlanmıştır. Etkili inhibitörün gıdalara düşük

konsantrasyonda eklenmesi yeterli olacaktır. Böylece oluşacak yan etkiler minimum değere indirilmiş olacaktır.

PPO inhibitörü olarak rapor edilen çeşitli bileşiklerin muz PPO enzimi üzerine inhibitör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer dokulardaki inhibitör çalışmalarındaki sonuçlar tiyol reaktiflerin PPO enzimleri için çok etkili inhibitör olduklarını göstermiştir [Sayaverde-Soto ve Montgomery 1986; Raymond ve ark. 2003]. İndirgen maddeler, antioksidanlar ve enzimatik inhibitörler o-kinonların kimyasal indirgemesi ile esmerleşmelerini engeller. Bu indirgen maddelerin etkisi geçici olarak göz ardı edilebilir. Çünkü bu bileşikler, boyar madde ara ürünleri, endojen enzimler ve bakır gibi metaller ile reaksiyona girerek geri dönüşümsüz olarak yükseltgenmişlerdir. Sülfür içeren etkin maddeler arasında, L-sistein enzimatik esmerleşmeyi önlemek için etkili bir bileşiktir. Bakır ile kararlı kompleks oluşumu yoluyla sisteinle PPO'nun doğrudan inhibisyonu da ileri sürülmektedir [Nicholas ve ark. 1994]. Halim ve Montgomery (1978), konsantre armut meyve suyunda enzimatik esmerleşmeyi sisteinin sülfitten çok daha fazla etkili bir şekilde inhibe ettiğini yayınlarının bir dizisinde göstermişlerdir [Halim ve Montgomery, 1978]. Kahn (1985) avokadoların ve muzların kesilmesi ve saflaştırılmasında enzimatik esmerleşmeyi inhibe etmek için sistein kullanmıştır [Kahn, 1985]. Esmerleşmeyi önleyici test edilmiş maddeler arasında çok etkili olanları ditiyotreitrol ve sodyum metabisülfittir [Sayaverde-Soto ve Montgomery 1986]. Sülfitten enzimatik esmerleşmeyi önleme mekanizması genellikle bir seri reaksiyonla açıklanmıştır. Mekanizmadan biri o-kinonlarla ilgilidir. Kinon-sülfür komplekslerinin oluşumu kinonların polimerizasyonlarını önler [Embs ve Markakis, 1965]. Bundan başka metabisülfürün PPO'nun inaktivasyonuna yol açan PPO üzerine mekanizması doğrudan enzim yapısı üzerinedir. Golan-Goldhirsch, Whitaker, Embs ve Markakis PPO'nun sülfid (ditiyotireitol, glutatyon) ile ön-inkübasyonu boyunca enzimin esmerleşme yeteneğinde dereceli bir kayıp olduğunu bulmuşlardır [Embs ve Markakis, 1965; Golan-Goldhirsch ve Whitaker, 1984]. PPO ile sülfitten disülfid bağlarıyla reaksiyon verdiği önerilmiştir. Bu, enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesine ve inaktivasyonuna neden olur. PPO'nun bisülfid ile inhibisyonuna sebep olan mekanizma askorbik asit için tanımlandığı gibi, ortadaki kinonların indirgenme yoluyla [Embs ve Markakis, 1965]. Enzimin PPO kofaktör olarak bakır içerdiğinden dolayı tiyürelere duyarlı oldukları

görülmektedir. Enzimin geri dönüşümsüz inaktivasyonu bakırı enzimin aktif merkezinden uzaklaştıran tiyol bileşikleri, tiyoüre, hidroksikinolin vs. gibi maddelerle gerçekleştirilebilir [Schwimmer 1981]. Kükürt oksijenden daha çok polarize olduğu için, bu durumda, söylenmiş olduğu üzere, S eşleşmemiş elektron çiftlerinden birini bakırın boş 4s orbitaline vererek bir kovalent bağ oluşur. Kükürt oksijenden daha yumuşak olduğundan dolayı metal katyonlarından kaynaklanan polarizasyon etkilerini koruyucu olarak davranır ve bu etkiler geri kalan moleküllerin önemli bir miktarına iletilmez. Dolayısıyla bu durumda yakın amino gruplarının konjugasyonu üredekten daha küçüktür ve her iki C-N bağı da neredeyse eşittir [Trujillo ve ark., 2008].

Khan ve diğerleri, tropolon Cu^{+2} 'nin çok etkili spesifik PPO inhibitörlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Tropolon mantar tirozinaz enzimi mono- ve o-dihidroksifenolaz aktivitelerinin her ikisini de inhibe eder. Tropolon tarafından ortaya çıkan inhibisyonun birçoğu diyaliz ile veya ilave Cu^{+2} ile ters çevrilmiştir. Bu veri tropolon ve dihidroksifenollerin enzimin aktif bölgesindeki bakıra bağlanmak için yarıştığını göstermiştir. Çeşitli birçok etkili bakır şelatlayıcılar arasındaki karşılaştırma, tropolonun mantar tirozinazın çok güçlü inhibitörlerinden biri olduğunu göstermiştir. Tropolonun % 50 inhibisyonu $0,4 \times 10^{-3}$ mM gözlenmiştir [Khan ve Andrawis, 1985].

Oksitleyici enzimler için, bitkilerde her zaman bulunan bakır içerikli PPO enzimi örnek olarak çalışılmaktadır (metal iyonu (bakır) ve moleküler oksijen kullanıldığı için) [Song ve ark., 2006]. Flavonoidlerin, özellikle büteine benzeyen kalkanların, bakır şelatlama aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir [Cheng ve ark., 1998]. PPO'nun inhibisyonu enzimin aktif bölgesinde bulunan bakırın şelatlanmasından dolayı olabilir. L-sistein enzimatik esmerleşmeyi engelleyen etkili bir bileşiktir. Bakır ile kararlı kompleksin oluşmasından dolayı olan PPO'nun sistein ile direkt immobilizasyonu da önerilmiştir [Nicholas ve ark., 1994]. Enzim kofaktör olarak bakır içerdiğinden dolayı tiyoürelere de duyarlı görünmektedir, enzimin geridönüşümsüz inaktivasyonu bakırı aktif merkezden uzaklaştıran tiyol bileşikleri tiyoürelere, hidroksikinolin gibi maddelerle gerçekleştirilebilir [Schwimmer, 1981].

Çalışmamızın bir sonraki basamağında, gıda endüstrisinde çoğu zaman istenmeyen enzimatik reaksiyonla esmerleşmeye neden olan PPO enziminin saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli üç farklı reaksiyon sonucunda

sentezlenebilmiştir. Bunlardan birincisi Sepharose-4B matriksinin CNBr vasıtasıyla aktifleştirilmesi olup, ikinci reaksiyon ise uzantı kolu olarak nitelendirilen L-tirozinin Sepharose-4B matriksine bağlanmasıdır. Üçüncü ve son reaksiyon ise Sepharose-4B-L-tirozin yapısına daha öncesinde tarafımızca diazolanmış olan p-aminobenzoik asit sülfonilamidin kenetlenmesidir.

Çalışmanın dizayn edilmesi sürecinde katı destek materyali olan matriks seçiminde farklı matrikslerin kullanılması düşünülmüştür. Ancak Sepharose-4B'nin serbest -OH gruplarının, özellikle CNBr yardımıyla hem kısa sürede hem de verimli bir şekilde aktiveşebildiği ve ilgili matriksin gayet iyi akış kabiliyetine sahip olması literatürden görülünce, çalışmamızda matriks olarak tekrardan Sepharose-4B'nin kullanılmasına sebebiyet vermiştir.

Meyve dokularından PPO ekstraksiyonu için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir. Araştırmamızda bir çok literatürde belirtildiği gibi 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.30) kullanılmıştır [Beena ve Gowda 2000; Doğan ve ark 2002, Arslan ve ark 2004].

Sülfanoamid türevlerinin IC₅₀ değerleri inhibisyon grafiklerinden hesaplanmıştır. Elde edilen IC₅₀ değerleri DT-F-S1, DT-F-S2, DT-F-S3, DT-F-S4, DT-F-S5, DT-F-S6, DT-F-S7, DT-F-S8, DT-F-S9, DT-F-S10, DT-F-S11, DT-F-S12 için sırası ile 212,760 µM, 169,590 µM, 140,380 µM, 86,607 µM, 212,786 µM, 147,892 µM, 92,440 µM, 39,375 µM, 41,640 µM, 136,510 µM, 95,010 µM, 128,588 µM, olarak hesaplanmıştır. İçerisinde DT-F-S8 maddesi 39,375 µM IC₅₀ değeri ile en iyi inhibisyon etkisi gösteren yapı olarak tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Andrawis, A. ve Kahn, V., 1996. Effect of Methimazole in The Activity of Mushroom Tyrosinase'', *Biochemical Journal*, 235, 91-96.
- Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range . *J. Biochem.* 96, 595-606.
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I., 1997. Polyphenol Oxidase From *Allium* sp. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:2861.
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S., 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.
- Aydemir, T., 2004. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 87:59-67.
- Bao, H., 1999. Biocatalysis of Tyrosinase in Organic Solvent Media Using Phenolic Substrate Models. A Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, *McGill University Montreal*, Quebec, Canada.
- Beena, P. ve Gowda, L. R., 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From The Seeds of Field Bean, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3839.
- Bingöl, G., 1983. Biyokimya. *Güven Matbaası*. Ankara. 169-174.
- Bowden, K., Harris, N.V., Watson, C.A., 1993. Structure-Activity Relationships of Dihydrofolate Reductase Inhibitors, *Journal of Chemotherapy*; 5(6):377-88.
- Brander G.C., Pugh D.M., Bywater R.J., 1982. Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. *A Bailliere Tindall*, London, UK, 422 pp.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Campbell, L.K., 1999. Sulphonamides: Updates on Veterinary Medicine, *Veterinary Dermatology*; 10, 205-215.
- Cash, J.N., Sistrunk, W.A., Stutile, C.A., 1976. Characteristics of Concord Grape Polyphenol Oxidase Involved in Juice Color Loss. *Journal of Food Science*, 41:1398.
- Chen, Q. X. ve Kubo, I., 2002. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin'', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4108-4112.
- Chen, Q. X., Liu, X. D., Huang, H., 2003. Inactivation Kinetics of Mushroom Tyrosinase in The Dimethyl Sulfoxide Solution, *Biochemistry Moscow*, 68 (6), 644-649.
- Cheng, Z.J., Kuo, S.C., Chan, S.C., Ko, F.N., Teng, C.M., 1998. Antioxidant Properties of Butein Isolated From *Dalbergia Odorifera*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1392 (2-3), 291-299.
- Cilliers, J. J. L. ve Singleton, V. L., 1990. Caffeic Acid Autooxidation and The Effects of Thiols'', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1789- 1796.
- Cuatrecasas, P., 1970. Protein Purification by Affinity Chromatography. Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059.

- Dawson, C.R. ve Mager, R.J., 1952. Plant PPO in Methods in Ehzymology Vol, 5, colowlok, S.P.,Kaplan, *Academic Press N.Y.*
- Demir, H., Yörük, İ. H., Savran, A., Ekici, K., 2006. Prufication and Properties of Polyphenol Oxidase From Van Apple (*Golden Delicious*). *Asian Journal of Chemistry*, 18:475-480.
- Doğan, M., Arslan, O., Doğan, S., 2002. Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase From Different Aubergine Cultivars, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 415.
- Doğu, H., 1994. Türkiye’de Satılan Bazı Sülfö Grubu İlaçların Fizikokimyasal Parametrelerinin tayinleri üzerinde çalışmalar, *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Eskişehir, 51s.
- Dökmeci, İ., 1992. Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, *Nobel Tıp Kitapevi, 1. Baskı*, İstanbul, 976s.
- Droy, B.F., Goodrich, M.S., Lech, J.J. and Kleinow, K.M., 1990. Bioavailability, Disposition and Pharmacokinetics of 14C-Ormetoprim in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*). *Xenobiotica*, 20 (2): 147-157.
- Ebeling. P. W., Montgomery, M. W., 1990. Strawberry Polyphenoloxidase. Purification and Characterization, *Journal of Food Science*, 55:1315.
- Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C., 1999. Catechol Oxidase — Structure and Activity’, *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 677–683.
- Embs, R. J. ve Markakis, P., 1965. The Mechanism of Sulphite Inhibition of Browning Caused by Polyphenol Oxidase, *Journal of the Science*, 30, 753-758.
- Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O. K., 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 Özelliklerin İncelenmesi, *Balıkesir University, Phd Dissertation*, Balıkesir, Turkey.
- Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P. A., Varon R., Garcia-Canovas, F., 1998. Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2968-2975.
- Espin, J. C. ve Wichers, H. J., 2001. Effect of Captopril on Mushroom Tyrosinase Activity in vitro’’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, 289-300.
- Esterbauer, H., Schwarzl, E., Hayn, M., 1977. A Rapid Assay for Catechol Oxidase and Laccase Using 2-nitro-5-thiobenzoic Acid, *Analytical Biochemistry*, 77, 486.
- Ferrar, P. H. ve Walker, J. R. L., 2000. Inhibition of Diphenol Oxidases: A Comperative Study, *Journal of Food Biochemistry*, 20, 15-30.
- FDA., 1996. Chemical Preservatives’, *Food and Drug Administration, The Office of Federal Register*, USA: Washington DC.
- Flurkey, W. H. ve Jen, J. J., 1980. Purification of Peach Polyphenoloxidase in The Presence of Added Protease Inhibitors, *Journal of Food Biochemistry*, 4(8):29.
- Flurkey, W. H., 1989. Polypeptide Compasition and Amino Terminal Sequence of Broad Bean Polyphenoloxidase, *Plant Physiology*, 91:481
- Friedman, M., 1997. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Golan-Goldhirsh, A. ve Whitaker, J. R., 1984. Effect of Ascorbic Acid, Sodium Bisulfate and Thiol Compounds on Mushroom Polyphenol Oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 1003-1008.

- Golbeck, J. H., Cammarata, K. V., 1981. Spinach Thylakoid Polyphenol Oxidase. Isolation, Activation and Properties of The native Chloroplast Enzyme, *Plant Physiology*, 67:877.
- Gonzales, E. M., De Ancos, B., Cano, M. P., 1999. Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47:4068.
- Gross. D. ve Coombs. J., 1975. *Enzymatic colour formation in beet and cane juices, Vienna: Paper presented at the 15th General Assembly of C. I. T. S.*
- Gutteridge, S. ve Robb, D., 1973. Purification of Mushroom Tyrosinase by Affinity Chromatography', *Biochemical Society Transactions*, 1, 519.
- Halder, J., Tamuli, P., Bhaduri, A. N., 1998. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*)', *Nutritional Biochemistry*, 9, 75-80.
- Halim, D. ve Montgomery, M. W., 1978. Polyphenol Oxidase of D'Anjou Pears, *Journal of the Science*, 43, 603-610.
- Heimann, W. ve Andler, St., 1962. Zur Aktivitätsbestimmung der Polyphenoloxidase. III. Eine polarometrische Methode zur Bestimmung der Phenolaseaktivität', *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 117, 203.
- Herrmann, K., 1973. Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe als Natürliche Antioxydantein, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 75, 499.
- Hutcheson, S. W. ve Buchanan, B. B., 1980. Polyphenol Oxidation by Vida Faba Chloroplast Membranes, *Plant Physiology*, 66:1150.
- Hormazabal, V. ve Rogstad, A., 1992. Simultaneous Determination of Sulphadiazine and Trimethoprim in Plasma and Tissues of Cultured Fish for Residual and Pharmacokinetic Studies. *Journal Of Chromatography: Biomedical Applications*, 583 (2): 201-207.
- Iyengar, R. ve McEvily, A.J., 1992. Antibrowning Agent: Alternatives to The Use of Sulfites in Foods. *Trends in Food Science and Technology*, 3:60-64. DOI: 10.1016/0924-2244(92)90131-F.
- İnan, Y. ve Gül, M., 2001. Biyokimya, *Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.*, Adana, 447 s.
- Jimenez-Atienzar, M. and Garcia-Carmona, F., 1996. Kinetics of The Slow pHmediated Transition of Polyphenol Oxidase'', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331, 15-22.
- Kahn, V., 1985. Effect of Protein, Protein Hydrolizates and Aminoacids on Odihydroxyphenolase Activity Polyphenol Oxidase of Mushroom, Avocado and Banana. *Journal of Food Science*, 50:111.
- Khan, V. ve Andrawis, A., 1985. Inhibition of Mushroom Tyrosinase by Tropolone, *Phytochemistry*, 24 (5), 905-908.
- Kavrayan, D. ve Aydemir, T., 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenoloxidase From Peppermint (*Mentha pipetita*)', *Food Chemistry*, 74, 147-154.
- Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A., 1997. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji (Cilt 2). *Medisan Yayınevi, 1. Baskı*, Ankara, Türkiye, 790 pp.
- Kayaalp, S.O., 1984. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. *Ulucan Matbaası*, Ankara, Türkiye, 995 pp.
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel Yönden Tıbbi Famakoloji. *Hacettepe-Taş 10. Baskı*, Ankara, 1726 s.

- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997. *Biyokimya*, Muhtelif kısımlar. *Şafak Yayınevi*, Erzurum.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, *Biyokimya*, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, 642 s.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. *Biyokimya*, Muhtelif kısımlar. *Şafak Yayınevi*, Erzurum.
- Kovvalski, S. P., Eanette, N. T., Hirzei, A. T., Steffens, J. C., 1992. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Glandular Trichomes of *Solanum Berthaultii*. *Plant Physiology*, 100:677.
- Kubo, I. ve Yokokava, Y., 1992. Two Tyrosinase Inhibiting Flavanol Glycosides From *Buddleia Coriacea*'', *Phytochemistry*, 31, 1075-1077.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1998. Tyrosinase Inhibitors from Cumin'', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5338-5341.
- Kuzucu M., 2011. Karbonik Anhidraz I Ve II İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların *in vitro* Etkilerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan.
- Labuza, T. P., Lillemo, J. H., Taoukis, P. S., 1992. Inhibition of Polyphenol Oxidase by Proteolytic Enzymes, *Fruit Processing*, 2, 9-13.
- Laemelli, D. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *London: Nature*, 227-680.
- Lamikanra, O., Sharon, D. K., Mitve, M., 1992. Muscadine Grape Polyphenoloxidase: Partial Purification by High Pressure Liquid Chromatography and Some Properties. *Journal of Food Science*, 57:686.
- Laurila, E., Kervinen R., Ahvenainen, R., 1998. The Inhibition of Enzymatic Browning in Minimally Processed Vegetables and Fruits. *Postharvest News and Information*, 9(4), 53-66.
- Lee, H. S., 2002. Tyrosinase Inhibitors from Pulsatilla Cernua Root-Derived Materials'', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1400-1403.
- Lehninger, A. L., 1982. Principles of Biochemistry. Worth publisher, *Acedemic Press*, New York. 587-665.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., 2005. Principles of Biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), *Palme Yayıncılık*, Ankara.
- Lerman, L. S., 1953. Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39, 232-236.
- Marshall, M. R., Kim, J., Wei, C., 2000. Report on —Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods', Food and Agriculture Organization.
- Matheis, G. ve Belitz, H. D., 1977. Studies on Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1,14,18,1) Monophenol, Dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 163, 191.
- Mathew, A.G. and Parpia H.A.B., 1971. Food Browning As a Polyphenol Reaction, *Advances in Food Research*, 19, 75.
- Mathewson, P. R., 2000. Enzymes, *Eagen Press Handbook Series*, 37-38.
- Mayer, A. M., and HAREL, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants, *Phytochemistry*, 18 (2), 193-215.
- Mayer, A. M., 1987. Polyphenol Oxidases in Plants-Recent Progress, *Phytochemistry*, 26, 11-20.

- Mazzocco, F. ve Pifferi, P. G., 1976. An Improvement of The Spectrophotometric Method for The Determination of Tyrosinase Catecholase Activity by Besthorn's Hydrazone, *Analytical Biochemistry*, 72, 643.
- Memişoğlu, N., Yağlica, M., Doğan, N., Yabaci, S.N., 2005. Anamur Muzu Polifenol Oksidaz Enziminin Özellikleri, *Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi*, Adana.
- Mihalyi, K. ve Vamos-Vigyazo, L., 1976. A Method for Determining Polyphenol Oxidase Activity in Fruits and Vegetables Applying a Natural Substrate', *Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 5, 69.
- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A., Klenitskaya, I. A., 1992. Immobilization of Polyphenol Oxidase by Soil Humus, *Eurasian Science*, 5, 60-65.
- Murata. M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S., Kaneko, K., 1995. Relationship Between Apple Ripening and Browning: Changes in Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 43:1115-1121.
- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amilot, M. J., Aubert, S.Y. 1994. Enzymatic Browning Reaction in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2); 109-157.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, İ., Sakiroğlu, H., 1992. Polyphenoloxidase From Amasya apple, *Biochemistry*, 56:1705-1710.
- O'Neill, S. P., Graves, D. J., Ferguson, J. E., 1973. Affinity Chromatography of Mushroom Tyrosinase'', *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 7, 1159-1166.
- Önez, Z., 2006. Üzüm (Vitis Vinifera L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi, *Ankara University, Master's Thesis*, Ankara, Turkey.
- Özalp, E.A.D., 2002, Farmakoloji, *Nobel Tıp Kitap Evleri*, İstanbul.
- Özoğlu, H. Bayındırlı, A., 2002. Inhibition of Enzymatic Browning in Cloudy Apple Juice With Selected Antibrowning Agents. *Food Control*, 13(4-5): 213-221. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00011-7.
- Palmer. J. K., 1963. Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties, *Plant Physiology*, 38, 508, (1963).
- Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S., Hegade, M. V. J., 1992. Effect of Activation Methods on Affinity Chromatography of Potato Polyphenol Oxidase'', *Phytochemistry*, 31, 1481.
- Paul, B., Gowda, L. R., 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase From The Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48:3839.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisinde Uygulamaları, *Gıda*, 17 (3), 181-186.
- Ponting, J.D. ve Joslyn, M.A. 1948. Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 19, 47.
- Ponting, J.D., 1960. The Control of Enzymatic Browning in Fruits, In ''Food Enzymes'' Ch. 9. H.W. Schultz (ed.) p. 105 *AVI Publishing Company*, Westport, CT.
- Raymond, J., Rakariyatham, N., Azanza, J.L., 1993. Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase From Sunflower Seeds, *Phytochemistry*, 34, 927-931.

- Richardson T. ve Hyslop D.B., 1985. Enzymes In Food and Browning in Apple Tissue, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 19: 47.
- Samuelson, O.B. ve Ervik, A., 1997. Single Dose Pharmacokinetic Study of Flemequine After Intravenous, Intraperitoneal and Oral Administration to Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) Held in Sea Water At 9 °C. *Aquaculture*, 158 (3-4): 215-227.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F., 1990. Partial Purification of a Thylakoid Bound Enzyme Using Temperature-induced Phase Partitioning'', *Analytical Biochemistry*, 184, 279-282.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog. J. M., 1989. Immobilization of Enzymes on Clays and Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 223-230.
- Sato, M., 1962. The Conversion by Phenolase of P-coumaric Acid to Caffeic Acid With Special Reference to The Role of Ascorbic Acid, *Phytochemistry*, 8, 353.
- Sayaverde-Soto L. A. ve Montgomery M. W., 1986. Inhibition of Polyphenol Oxidase by Sulfite, *Journal of Food Science*, 51, 1531-1535.
- Schwimmer, S. ve Schwimmer, S., (Ed.), 1981. *Source Book of Food Enzymology*, Westport: AVI Publishing, 274-267.
- Segel, I.H., 1976. Biochemical Calculations, 2nd Edition. *John Wiley and sons*, Inc. N.Y. 441 p.
- Siddiq, M., Sinha, N. K., Cash, J. N., 1992. Characterization of Polyphenoloxidase From Stanley Plums. *Journal of Food Science*, 57:1177.
- Sly, W.S., Hu, P.Y., 1995, Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Review of Biochemistry*, 67, 375-401.
- Sondheimer, E., 1964. Chlorogenic Acids and Related Depsides, *Botanical Review*, 30, 667.
- Song, K. K., Huang, H., Han, P., Zhang, C. L., Shi, Y., Chen, Q. X., 2006. Inhibitory Effects of Cis- and Trans-Isomers of 3,5-Dihydroxystilbene on The Activity of Mushroom Tyrosinase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 1147-1151.
- Spille, G. A., 1997. The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage, Chapter 3., *CRC Press*, 1-38.
- Stelzig, D.A. ve Akhtar, S., 1972. Catechol Oxidase of Red Delicious Apple Peel, *Phytochemistry*, 11: 535.
- Supuran C.T., ve Scozzafava A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Şakiroğlu, H., 1994. Kuşburnu Meyvesinden İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi', *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum.
- Tekman, Ş., Öner, N., 1986. Genel Kimya, I. Cilt, *Fatih Yayınevi Matbaası*, İstanbul.335-367.
- Tipton, K.F. ve Dixon, H.B.F., 1983. Effect of PH on Enzymes. In ''Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism'' D.L. Purich (Ed.) *Academic Press*, Inc. N.Y.
- Trujillo, C., Lamsabhi, A. M., Mo, O., Yanez, M., 2008. The Importance of The Oxidative Character of Doubly Charged Metal Cations in Binding Neutral Bases. [Urea-M]²⁺ and [Thiourea-M]²⁺ (M=Mg, Ca, Cu) Complexes, *Chemical Physics*, 10, 3229-3235.

- Ulutun F., 1992. Karaciğer Hastalarında Antimikrobiyal İlaçların Kullanımı, Antimikrobiyal Kemoterapi -Klinik Uygulamalar ve Yenilikler, Ed; Meço, O., *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları*, Ankara. pp. 27.
- Unal, M. U., 2005. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry* (in press).
- Valero E., Varon R., Garcia-Cormona F., 1988. Characterization of Polyphenol Oxidase From Airen Grapes, *Journal of Food science*, 53. (5) 1482.
- Vamos-Vıgyazo, L., 1981 Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Vaughn, K. C. ve Duke, S. O., 1984. Function of Polyphenol Oxidase in Higher plants', *Physiology Plants*, 60, 106–112.
- Vial, T., Biour, M., Descotes, J., Trepo, C., 1997. Antibiotic-associated Hepatitis: Update 1990. *The Annals of Pharmacotherapy*. 31: 204-220.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48:2732.
- Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., Hayashi, N., 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peell, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1446-1449.
- Yokotsuka, K., Makino, S., Singleton, V.L., 1988. Polyphenol Oxidase From Grapes, *American Journal of Enology and Viticulture*, 39 (4) : 293.
- Zawistowski, J., Biliaders, C. G., Murray, E. D., 1988. Isolation and Some Properties of An Acidic Fraction of Polphenol Oxidase Fom Jerusalem Artichoke (*Helliantus tuberosus* L.) *Journal of Food Biochemistry*, 43:23.
- Ziyan, E., 1998. Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus Communis*)'ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Ankara.
- Ziyan, E., Pekyardımcı, Ş., 2004. Purification and Characterization of Pear (*Pyrus Communis*) Polyphenol Oxidase. *Turkish Journal of Chemistry*, 28:547-557.
- Walker, J.R.L. ve HULME, A.C., 1966. Enzymatle Browning of Apple , III. Purification of Apple Phenolaseg, *Phytochemistry*, 5: 259.
- Walker, J. R. L., 1975. Studies on the enzymic browning of apples II. Properties of apple polyphenol oxidase. *Australian Journal of Biological Sciences*, 17, 360.
- Whitaker, J. R., 1972. Principles of Enzymolgy for The Food Sciences, *Marcel Dekker*. New York, Chapters, 22-24.
- Wisseman, K. W. ve Montgornerly, M. W., 1973. Purification of D'Anjou Pear Polyphenoloxidase. *Plant Physiology*, 52:501.
- Wisseman K.W., 1981. Characterization of PPO, *Journal of Food science*. 46, 506.
- Wisseman, K. W. ve Lee, C. Y., 1981. Characterization of Polyphenoloxidase From Ravat 51 and Nigara Grapes. *Journal of Food Biochemistry*, 46:506.
- Wisseman, K. W. ve Montgomery, M. W., 1985. Purification of d'Anjou Pear (*Pyrus communis* L.) Polyphenol Oxidase'', *Plant Physiology*, 78, 256-262
- Url-1< <https://bilgihanem.com/muz-/nedir>>, [Ziyaret Tarihi: 28 Nisan 2019].

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Osman ÖZBEY
Doğum Yeri ve Tarihi	: SURUÇ – 26.04.1987
Telefon	: 05514283943
E-posta	: ozbeyosman@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Arif Nihat Asya Lisesi-Şehitkamil-Gaziantep	2005
Üniversite	: Siirt Üniversitesi-Merkez-Siirt	2014
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi-Merkez-Siirt	2019
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2014	Kanuni Sultan Süleyman Meslek Lisesi	Öğretmen
2015-2016	Acarsan Makarna Un Gıda Sanayi ve Ticaret	Kimyager
2019	Mehmet Akif Ersoy Meslek Lisesi	Öğretmen

UZMANLIK ALANI :Kimya (Biyokimya)

YABANCI DİLLER : İngilizce