

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özge GÖKKAYA**

**BEYAZ KİRAZ MEYVESİ (STARKS GOLD) POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2009**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEYAZ KİRAZ MEYVESİ (STARKS GOLD) POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

**Özge GÖKKAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 30/06/2009 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza:.....  
Doç.Dr.M.Ümit ÜNAL  
Danışman

İmza:.....  
Prof. Dr. Sadık DİNÇER  
Üye

İmza:.....  
Yrd. Doç. Dr. Sertaç ÖZER  
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ**  
**Enstitü Müdürü**  
**İmza ve mühür**

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF 2008 YL 08

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEYAZ KİRAZ MEYVESİ (STARKS GOLD) POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Özge GÖKKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman :** Doç. Dr. M. Ümit ÜNAL

**Yıl :** 2009, **Sayfa :** 39

**Jüri :** Doç. Dr. M. Ümit ÜNAL

Prof Dr. Sadık DİNÇER

Yrd. Doç. Dr. M.Sertaç ÖZER

Bu çalışmada, Konya'nın Ereğli ilçesinde yetiştirilen beyaz kirazdan izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin (PFO) optimum sıcaklık, optimum pH, termal inaktivasyon, kinetik parametreler ve inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır.

Saflaştırma sonucu iki ayrı aktivite piki elde edilmiştir. İlk aktivite görülen pik izoenzim A, diğeri ise izoenzim B şeklinde isimlendirilmiştir. İzoenzim A % 48.7 verimle 3.9 kat, izoenzim B ise % 54.3 verimle 76.7 kat saflaştırılmıştır. PFO enziminin optimum pH değeri A izoformu için 4.5, B izoformu için 4.98 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık çalışmalarında A enziminin optimum sıcaklığının 20°C ve B enziminin optimum sıcaklığının ise 30°C olduğu saptanmıştır. İzoenzim B'nin kateşole ilgisinin izoenzim A'dan daha fazla olduğu bulunmuştur. Enzimlerin aktivasyon enerjisi  $Z$  ve ( $E_a$ ) değerleri sırasıyla, A enzimi için 22.1°C ( $r^2=0.8832$ ) ve 98.5 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $r^2=0.8776$ ) ve B enzimi için ise 13.9°C ( $r^2=0.9903$ ) ve 157.1 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $r^2=0.9886$ ) olarak bulunmuştur. İnhibitör olarak L-sistein ve Sodyum disülfid kullanılmış ve denenen inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin her iki enzim için farklılık gösterdiği ve B enzimini her iki inhibitörün 1.00 mM konsantrasyonda % 100 inhibe ettiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Beyaz kiraz, polifenol oksidaz, enzimatik esmerleşme, kinetik, termal inaktivasyon

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM WHITE CHERRY FRUIT

Özge GÖKKAYA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGIE  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

**Supervisor :** Assoc. Prof. M. Ümit ÜNAL

**Year :** 2009, **Sayfa :** 39

**Jury :** Assoc. Prof. M. Ümit ÜNAL

Prof Dr. Sadık DİNÇER

Asist. Prof. M.Sertaç ÖZER

This research was undertaken to determine some of the biochemical properties (optimum pH, optimum temperature, heat inactivation, kinetic parameters and effect of inhibitors) of polyphenol oxidase (PPO) which was isolated from white cherry grown in Ereğli/Konya and partially purified.

The enzyme showed two peaks with PPO activity, which were denoted as isoenzyme A and isoenzyme B. The isoenzyme A and isoenzyme B were purified 3.9 fold with a recovery of 48.7% and 76.7 fold with a recovery of 54.3%, respectively. The optimum pH value for isoenzyme A was 4.5 and 4.98 for isoenzyme B. The temperature optima for enzyme activity were found to be 20°C for isoenzyme A and 30°C for isoenzyme B. The affinity of isoenzyme B for catechol as substrate was higher than that of isoenzyme A. Activation energies ( $E_a$ ) and Z values were 22.1°C ( $r^2=0.8832$ ) and 98.5  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $r^2=0.8776$ ) for isoenzyme A and 13.9°C ( $r^2=0.9903$ ) and 157.1  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $r^2=0.9886$ ) for isoenzyme B, respectively. L-cysteine and sodium disulphide were used as inhibitors. It was found that the effects of the inhibitors differed from each other and both inhibitors inhibited both isoenzymes 100% at 1.00 mM.

**Key Words:** White cherry, polyphenol oxidase, enzymatic browning, kinetics, thermal inactivation

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren, bana yol gösteren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. M. Ümit Ünal'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; Araştırma Görevlisi Aysun Şener ve değerli arkadaşlarım Aykut Aksoy, Selin Yabacı, Ceren Taş'a

İlgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Mustafa Gökkaya, annem Hülya Gökkaya, abim Veli Gökkaya'ya ve arkadaşım Gülşah Gürbüzöğlü'na

Destek ve katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesine, Gıda Mühendisliği Bölümü ve Biyoteknoloji anabilim dalı personeline teşekkürlerimi bir borç bilirim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>3</b>
2.1.Beyaz Kiraz.....	3
2.2.Polifenol Oksidazlar.....	4
<b>3.MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>17</b>
3.1.Materyal.....	17
3.1.1.Beyaz Kiraz Örnekleri .....	17
3.1.2.Analizlerde Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler.....	17
3.2.Metot.....	18
3.2.1.Polifenol Oksidaz Ekstraktının Hazırlanması .....	18
3.2.2.Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	18
3.2.3. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma.....	18
3.2.4.Protein Tayini.....	19
3.2.5.Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	19
3.2.6.Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	19
3.2.6.1.Optimum pH.....	19
3.2.6.2.Optimum Sıcaklık.....	20
3.2.6.3.Kinetik Parametreler.....	20
3.2.6.4.Termal İnaktivasyon.....	20
3.2.6.5.İnhibitörlerin Etkileri.....	22
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b> .....	<b>23</b>
4.1.Enzimin Saflaştırılması.....	23
4.2.Optimum pH.....	24

4.3.Optimum Sıcaklık.....	27
4.4.Kinetik Parametreler.....	29
4.5.Termal İnaktivasyon.....	30
4.6. İnhibitörlerin Etkisi.....	31
<b>5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>34</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>39</b>

<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Çizelge 2.1. Dünya Kiraz İhracatı.....	3
Çizelge 4.1 Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırması.....	24
Çizelge 4.2. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Optimum pH Değerleri.....	26
Çizelge 4.3. Çeşitli Ürünlerden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklık Değerleri.....	28
Çizelge 4.4. Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Parametreleri.....	29
Çizelge 4.5. Çeşitli Ürünlerden Elde Edilen Polifenol Enzimlerinin $K_m$ Değerleri .....	29
Çizelge 4.6. Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Termal İnaktivasyon Parametreleri .....	30
Çizelge 4.7. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Aktivasyon Enerjileri .....	31
Çizelge 4.8. İnhibitörlerin Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enzimine Etkileri .....	32



<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Şekil 2.2. Enzimatik Esmerleşme Mekanizması.....	5
Şekil 4.1. DEAE-selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması.....	23
Şekil 4.2. pH'nın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim A ) Etkisi .....	25
Şekil 4.3. pH'nın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim B) Etkisi.....	26
Şekil 4.4. Sıcaklığın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim A) Etkisi .....	27
Şekil 4.5. Sıcaklığın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim B) Etkisi.....	28

**1.GİRİŞ**

Kiraz (*Prunus avium* L.) *Rosaceae* familyasından bir meyve olup anavatanı Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölgedir. Bu açıdan ülkemiz kirazın orijin merkezlerinden biridir. Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip kiraz üretiminde, Türkiye ön sıralarda yer almaktadır. Çoğu meyve türlerinde olduğu gibi, kirazın kültürünün yapıldığı en eski yer Anadolu'dur. Türkiye'de Kuzey Anadolu Dağları ve Doğu Toroslar da yabancı tipleri bol miktarda bulunmaktadır. Kiraz dünyada geniş bir yayılım göstermesine rağmen ticari olarak A.B.D, Türkiye, Fransa ve İtalya önemli üretici ülkelerdendir. Türkiye'de üretim miktarı yüksek olmasına rağmen üretim kalitesi ve ihraç edilebilir miktar yönünden istenilen seviyede değildir. Kiraz, Türkiye'nin her yöresinde az çok yetiştirilmekle beraber; temel geçim kaynağı olduğu illerimiz Manisa, İzmir, Afyon, Isparta, Bursa, Konya, Kocaeli, Sakarya, Artvin, Zonguldak, Kastamonu ve Amasya olarak sıralanabilir (Sağlam, 2007).

Türkiye meyve yetiştiriciliğinde önemli yeri olan bir meyve türüdür. İlbaharda meyve türü sayısının az olduğu bir dönemde pazara çıkarak, güzel rengi, kendine özgü tadı ile insanlar tarafından zevkle tüketilir. Türkiye'deki farklı ekolojiye sahip değişik bölgeler ve çeşitlilerin olgunlaşma zamanları dikkate alındığında, kiraz mayıs ayı başından temmuz ayı ortasına kadar soğuk hava depolarında muhafazaya gerek duymadan pazarlarımızda görebilmekteyiz.

Kiraz erken hasat edildiğinde açık renkli, az tatlı ve küçük meyve elde edilir. Geç kalındığında ise, kirazın dayanıklılığı azalır, meyve yumuşar, kararır ve sapları kurur. Bunun dışında işleme, depolama ve pazara sunum gibi aşamalarda kararmalar olmaktadır. Kararmaya polifenoloksidaz enzimi sebep olmaktadır ( Anon, 2007).

Polifenol oksidazlar (PFO enzimleri), oksidoredüktaz grubuna giren enzimlerdir ve bakır içerirler. Substratları fenolik bileşiklerdir. Özellikle bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan PFO'lar, hayvansal dokular ve küf mantarlarında da bulunmaktadır. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde enzimatik esmerleşme olarak da bilinmektedir (Godfrey ve West, 1996).

Enzimatik esmerleşme genellikle fenol bileşiklerince zengin bitkilerde görülür. Özellikle meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşme sonucu önemli renk sorunları ortaya çıkar. Bitkilerde dokunun hastalıklı olması veya çeşitli işlemler (kabuk soyma, boyut küçültme, ezme, dondurma, kurutma) sırasında zarar görmesi kolaylıkla esmerleşmeye neden olur. Bu durum elma, armut, kayısı şeftali, muz, patates ve mantar gibi çeşitli ürünler için söz konusu olabilir. Ancak limon ve turunçgiller kahverengiye dönüşmez, çünkü içerdikleri sitrik asit nedeniyle oksitlenme renksiz gerçekleşir (Aehle, 2004).

PFO, gıdalarda yol açtığı enzimatik esmerleşmeyle önemli kalite kayıplarına neden olmaktadır. PFO'nun meyve ve sebzelerden izole edilip biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi depolama ve işleme sırasında kalite kayıplarının en aza indirilmesi ve böylece daha kaliteli ürünlerin üretilmesine olanak sağlayabilir. Bu nedenle PFO enzimi üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış, çok değişik meyve ve sebzelerdeki PFO enziminin özellikleri belirlenmiştir. Ancak, ülkemizde yetiştirilen beyaz kiraz PFO'sunun özellikleri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Ereğli/Konya bölgesinde yetiştirilen beyaz kiraz PFO enziminin kısmen saflaştırılarak bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemektir.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. Beyaz Kiraz**

Beyaz kiraz ( Starks Gold ) Ereğli’de önemli miktarlarda üretilmekte ve işlenmektedir. Meyvesi yuvarlak, orta irilikte (3.4 gr), sarı renkli, sert ve orta kalitededir. Sofralığın yanı sıra reçel yapımı ve salamura olarak değerlendirilmektedir. %3 oranında meyve çatlaması yapar ve taşımaya dayanıklılığı azdır ( Gürbüzöğlü ve ark., 2005).

Türkiye dünya meyve üretiminde 11. sırada, kiraz üretiminde ise 1. sıradadır. Ülkenin hemen her bölgesinde yetiştirilmekte olan kiraz dış ticaret açısından gözle görülür bir etkiye sahiptir. Son yıllarda da kiraz ihracatını arttıran en önemli etken beyaz kirazın bazı ülkeler tarafından yoğun ilgi görmesidir. Ülkemizde beyaz kiraz üretiminde önemli bölgelerden birisi de Ereğli’dir.

Türkiye önemli bir üretici olmasına rağmen ihracatın üretime oranı %3.5 civarındadır. Bunun sebebi ise üretimden tüketime kalite kayıplarının yüksek olması ve uluslararası pazarda talep edilen çeşitliliğe uygun olmaması gösterilebilir. İhracatın %85’lik bölümü OECD ülkelerine yapılmaktadır. Bu oran içinde AB ülkelerinin payı %80’e ulaşmaktadır. AB ülkelerinin içinde en önemli alıcılar Almanya ve İtalya’dır.

Çizelge 2.1. Dünya Kiraz İhracatı (1000\$) (FAO, 2006)

	2001	2002	2003	2004	2005
İran	329.58	285.39	307.39	259.89	613.00
İtalya	15.493.00	14.867.00	24.218.00	10.279.00	36.064.00
Romanya	1.352.00	920.00	1.546.00	1.399.00	1.344.00
ABD	152.096.00	142.547.00	171.619.00	178.189.00	217.872.00
İspanya	15.521.00	20.028.00	28.990.00	32.651.00	39.123.00
Türkiye	48.702.00	49.276.00	76.944.00	117.988.00	92.147.00

Türkiye 2002 verilerine göre 19042 ton ile kiraz ihracatında 2. sıradadır. İhracatın büyük bir oranı da beyaz kiraza aittir. Dış ticaret için önemli olan kalite kriterinin Ereğli’de yetişen beyaz kirazda mevcut olması yurt dışı talebini arttırmaktadır. Üretilen kirazın tamamına yakını yurt dışına ihraç edilmektedir. En fazla talep İtalya’dan olup burada işlenerek dünyaya satılmaktadır. Ereğli’den 2003 yılı itibariyle 1 650 000 Euro’luk kırmızı, 1 000 000 dolarlık beyaz kiraz ihracatı yapılmıştır. Beyaz kiraz taze olarak reçel, konserve gibi fermente ürünler olarak tüketilmektedir. Ereğli’den 2003 yılında Almanya’ya 683.27 ton kiraz, İtalya’ya ise 3573.92 ton kiraz konservesi ihraç edilmiştir. Kiraz ihracat miktarları içinde beyaz kirazın payı %60–70 arasındadır (Sağlam, 2007).

## **2.2. Polifenol Oksidazlar**

PFO’lar meyve ve sebzelerin hasat, depolama ve işleme kalitesi ve ekonomisini belirleyen çok önemli enzimlerdir. Oksijen geçişine neden olan hasat, depolama ve işleme sırasındaki zedelenme, kesilme ve diğer mekanik zararlar çoğu meyve ve sebzelerde melanin oluşumuna, bu da hızla esmerleşmeye neden olur. Esmerleşme yüzünden meyvelerde önemli kayıplar olmaktadır. Muz, şeftali, kayısı, elma, üzüm, çilek ve bazı tropik meyveler ve suları, ayrıca, patates, marul ve diğer yapraklı sebzelerde istenmeyen esmerleşmeler görülmektedir. Bunlardan farklı olarak, çay, kahve, kakao, siyah üzüm ve siyah incirlerde PFO aktivitesi istenen bir durumdur. Çünkü enzim sayesinde bu ürünler istenen son ürün karakteristiklerine kavuşurlar (Memişoğlu ve ark.,2005).

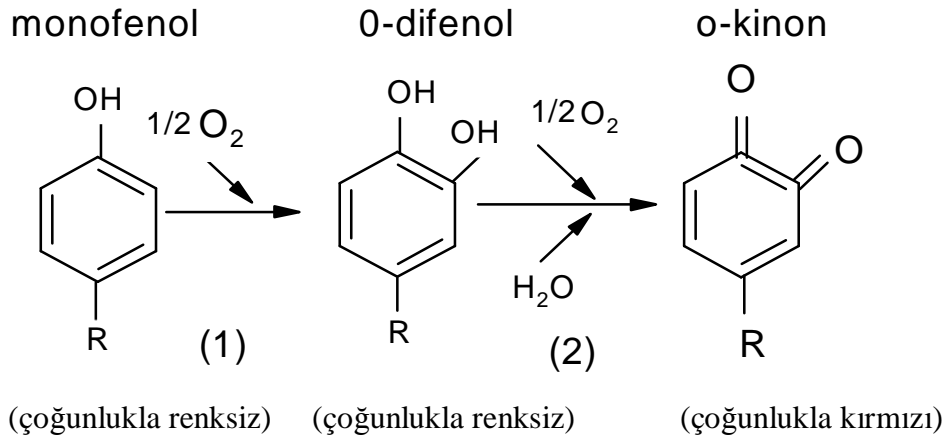
Yenilebilir bitkilerdeki PFO dağılımı, birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Son yıllarda farklı kaynaklardan da izole edilmiş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. PFO aktivitesine rastlanan gıda ürünleri: buğday unu, makarna, enginar, biber, trabzon hurması, baklagil, kakao çekirdeği, soya, hıyar, yabani piriç, çilek, mantar, karidesler, ıstakoz, yengeçtir. Bitkilerdeki PFO miktarı çeşit, kültürel işlemler, olgunluk ve yaşa bağlıdır. Şekerpancarında, PFO kloroplastta ve çeşitli dokusal yapılarda aromatik olmayan aminoasitlere peptid bağlarıyla bağlı olarak bulunur. PFO’ın 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 PFO aktivitesi gözlenmiştir. İstakozda epidermis veya kütikül PFO'nun en çok bulunduğu yer olarak saptanmıştır. Bitkilerde ve kabuklu deniz ürünlerinde PFO dağılımının türe, yaşa, olgunluğa göre değişmesi çok önemli bir noktadır (Memişoğlu ve ark., 2005).

PFO, Uluslararası Biyokimya Birliğinin sınıflandırmasında monofenol monooksijenaz (EC 1.14.18.1) ve kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1) olarak yer almıştır. Monofenol oksidaza tirozinaz, fenolaz, monofenol oksidaz ve kresolaz gibi geleneksel isimler verilmiştir. Kateşol oksidaz ise difenol oksidaz, o-difenolaz, fenolaz, polifenoloksidaz ve tirozinaz olarak adlandırılmıştır. PFO pek çok reaksiyon katalizleyebilir. Bir monofenol olan p-kresolü, difenol 4-metil kateşol okside ederlerken, bir o-difenol olan kateşölü ise o-benzokinone parçalarlar (Hammer, 1993).

Bakır içeren bir enzim olan PFO iki farklı reaksiyon katalizler (Zawistowski ve ark., 1991):

- i) monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu
- ii) o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonu



Şekil 2.2. Enzimatik Esmerleşme Mekanizması ( Cemeroğlu ve Ark., 2001)

Bu aktivitelerden ilki monofenolaz (hidroksilaz veya kresolaz) ve ikincisi ise difenolaz (kateşolaz veya oksidaz) aktivitesi olarak adlandırılır. Her iki reaksiyonda da oksijen yardımcı substrat olarak kullanılır. Oluşan o-kinonlar daha sonra

enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu kahverengi-siyah renkteki melanin pigmentlerine dönüşür. Bitki ve funguslardan elde edilen PFO'lar hem monofenollerini (p-kresol, tirosin gibi) hem de difenollerini (kateşol ve o-dihidroksifenilalanin gibi) okside ederler. Ancak, bu etki PFO'nun elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterir (Ramirez ve ark., 2003). PFO enzimi meyve ve sebzelerde görülen fenolik bileşiklerin sadece bir kısmını substrat olarak kullanabilir. PFO'nun substrat spesifikliği elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterir (Marshall ve ark., 2000).

PFO, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak görülen bir enzimdir. Bitkilerde tüm kısımlarda bulunabilirken, gelişmiş hayvanlarda deri, saç, tüy ve gözlerde bulunur. Bitkisel dokularda öncelikle latent (inaktif) formlar halinde sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, örneğin dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya etilen gibi birtakım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler (Yemenicioğlu ve ark., 1997).

PFO enzimi bitkisel ürünlerden en çok üzüm, elma ve patatesten bulunmaktadır. Son yıllarda farklı kaynaklardan da izole edilen PFO'lar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. PFO aktivitesine rastlanan diğer gıda ürünleri; buğday unu, makarna, enginar, biber, Japon hurması, baklagil, kakao taneleri, soya, hıyar, yabancı pirinç, çilek, mantar, karidesler, istakoz ve yengeçler (Cemeroğlu ve ark., 2001).

Sağlıklı meyve ve sebze dokularında, PFO enzimlerinin, substratları olan fenolik bileşiklerle teması yok denecek kadar azdır. Bunun başlıca nedeni, enzim ve substratlarının bitkisel hücrenin farklı kısımlarında yer almalarıdır. Nitekim PFO enzimlerinin bir kısmı sitoplazmada serbest halde bulunurken, büyük bir kısmı hücrenin tilakoid ve kloroplast gibi unsurlarında, membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Buna karşın, fenolik bileşiklerin neredeyse tamamı vakuollerde yoğunlaşmış halde bulunmaktadır. Ancak doku olgunlaşmasının ileri aşamalarında hücredeki pektinazların faaliyetiyle, doku kontrollü ve sınırlı bir şekilde doğal olarak değişimlere uğrar. Ayrıca, hasat, taşıma ve işleme sırasındaki etkiler veya uygulanan çeşitli işlemlerle hücre ve buna bağlı olarak doku bütünlüğü bozulmaktadır. Böylece, PFO enzimleri kendi substratları olan fenolik bileşiklerle ve havadaki oksijen ile bir araya gelmektedir (Muchuweti ve ark., 2006).

Isıl işlem uygulayarak bazı meyve ve sebzelerde (özellikle meyve sularında) PFO'ları inaktive etmek yaygın bir uygulamadır. Kesilmiş meyve ve sebzelerde kahverengileşmeyi önlemek için askorbik asit, tiyol bileşikleri ve sülfidler gibi bazı bileşikler ilave edilebilir. Gıdaların esmerleşmesi, oksijenin uzaklaştırılması, asitlendirme, siklodekstrin ve polivinilpirolidon gibi kompleks oluşturucu maddelerle fenollerin uzaklaştırılması ile de önlenabilir (Yemenicioğlu ve ark., 1997).

Meyve ve sebzelerin yüzeylerindeki oksijen absorpsiyonunu önleyen koruyucu kabuk sağlam olduğu ve hücre dokusu zarar görmediği sürece esmerleşme görülmez. Gıda işleme ve paketlemede oksijen; azot gazı, oksijen geçişine izin vermeyen kaplama ve filmler, kontrollü atmosfer uygulamaları ile uzaklaştırılabilir (Aehle, 2004).

PFO enzimlerinin neden olduğu esmerleşmeler, ürünün sadece rengine bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda diğer duysal özelliklerini de etkilemektedir. Her meyve ve sebzedeki PFO enziminin nitelikleri birbirinden oldukça farklıdır. Hatta aynı tür meyve ve sebzenin PFO enziminin nitelikleri, yetiştirme koşulları ve olgunluk aşamasına göre farklı olabilmektedir (Godfrey ve West, 1996).

PFO enzimi üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Ünal (2007), Türkiyede yetişen Anamur muzundan polifenol oksidaz enzimini saflaştırıp, enzimin karakteristik özelliklerini çalışmıştır. Muz PFO'sunun optimum sıcaklığı 30°C ve optimum pH'sı 7.0 olarak bulunmuştur. 60-75°C arasındaki termal inaktivasyon çalışmalarından, enzimin yarı ömür değerleri 7.3 ve 85.6 dakika arasında bulunmuştur.  $E_a$  ve  $Z$  değerleri sırasıyla, 155  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ve 14.2°C olarak bulunmuştur.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 8.5 mM ve 0.754  $\text{OD}_{410} \text{ dk.}^{-1}$ 'dir. İnhibitör testlerinde ise askorbik asit ve sodyum metasülfatın en etkili inhibitörler olduğu saptanmıştır.

Ünal ve Şener (2006), Türkiye'de yetiştirilen Emir üzümünden PFO enzimini ekstrakte etmiş ve pH, optimum sıcaklık, termal inaktivasyon, kinetik parametreler ve bazı potansiyel PFO inhibitörlerin karakteristik özelliklerini belirlemişlerdir. Substrat olarak kateşol kullanıldığında üzüm kökenli PFO'nun



optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4.2 ve 25°C olarak bulunmuştur.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $25.1 \pm 2.72 \text{ mmol L}^{-1}$  ve  $0.925 \pm 0.04 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$  bulunmuştur. Değişik inhibitörlerin etkileri incelenmiş ve en etkin inhibitörün sodyum metabisülfid olduğu ve bunu askorbik asitin takip ettiği bildirilmiştir. Enzimin  $E_a$  ve  $Z$  değeri sırasıyla  $251.4 \text{ kJmol}^{-1}$  ( $r^2 = 0.996$ ) ve  $8.92^\circ\text{C}$  ( $r^2 = 0.993$ ) olarak hesaplanmıştır.

Beşel (2003), Mantardan (*Agaricus bisporus*) elde edilen polifenoloksidaz (PFO) (EC 1.14.18.1) enzimini araştırmıştır. %8'lik TX-114 kullanıldığı zaman yaklaşık 5 kat saflaştırma elde edilmiştir. pH 7.0'de polivinilpolipirrolidon (PVPP) kullanılarak saflaştırma 10 kat artmış ve %72 enzim geri kazanımı elde edilmiştir. Bununla beraber, pH 6.0'da çalışıldığı zaman saflaştırma 15.5 kata ve geri kazanım %100'e yükselmiştir. Sodyum veya potasyum tuzlarını eklemek, PFO moleküllerinin deterjanca zengin alt faza ayrılmasına yol açmıştır.

Yemenicioğlu ve ark. (1997) altı elma çeşidinin (Golden Delicious, Starking Delicious, Granny Smith; Gloster, Starcrimson ve Amasya) PFO'larının ısı inaktivasyon kinetiklerini üç sıcaklıkta (68°, 73° ve 78°C) çalışmışlardır. PFO aktivitesi başlangıçta artmış ve daha sonra sıcaklıkla birlikte azalmıştır. Aktivitedeki artış latent PFO'nun varlığını göstermektedir. 78°C'de Amasya cinsindeki PFO'nun en düşük Starking Delicious cinsine ait PFO'nun ise en yüksek ısıl-dayanıklılığa sahip olduğu saptanmıştır. 78°C'deki ısıl inaktivasyon için inaktivasyon hız sabitleri 0.16–0.28  $\text{dk}^{-1}$  arasında bulunmuştur.

Yemencioğlu ve Cemeroğlu(1996), "Hale Haven" seftalilerinde polifenol oksidaz (PFO) enziminin niteliklerini araştırmışlardır. Ham, yarı olgun ve tam olgun seftalilerden öncelikle aseton tozu hazırlanmıştır. Aseton tozundan hazırlanan enzim çözeltisinde optimum pH, Michaelis sabiti ( $K_m$ ), maksimum hız ( $V_{max}$ ) ve enzim aktivitesinin termal inaktivasyonu incelenmiştir. Olgunluk aşamasına göre enzimin optimum pH derecesi 6.0-6.5 arasında bulunmuştur. Tam olgun seftalilerden elde edilmiş enzimin  $K_m$  değeri 14.3 mM ve  $V_{max}$  değeri  $1.25 \text{ Abs.dak}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  olduğu saptanmıştır. Enzimin termal inaktivasyon kinetiği 70°C de araştırılmıştır. Her enzim ekstraktının termal inaktivasyon kurvesinin, başlangıçta dik bir doğru, sonra daha yatık bir doğru olmak üzere iki bölümden oluştuğu belirlenmiştir. Bu nedenle seftali PFO enziminin ısıya direnci farklı iki izoenzimden oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Başlangıçtaki hat, ısıya duyarlı enzimin inaktivasyonunu, ikinci hat ise ısıya dirençli enzimin inaktivasyonunu temsil etmektedir. Isıya dirençli fraksiyonun 70°C’de inaktivasyonu, birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uymaktadır. Reaksiyon hız sabitleri, ham, yarı olgun ve tam olgun şeftalilerde sırasıyla, 20.36, 23.17 ve 19.66 dk<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Toplam enzim aktivitesinde ısıya dirençli kısmın oranı, inaktivasyon kurvesinin sıfır zamana kadar ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. Bu değerlerin, ham, yarı olgun ve tam olgun meyveler için sırasıyla %83, %48 ve %55 olduğu saptanmıştır.

Gülçin ve arkadaşları (2005), ısırgan otunda ( *Urtica dioica L.*) PFO enzimini (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> ile çöktürme, diyaliz ve CM Sephadex iyon değişim kromatografisi aracılığıyla saflaştırmış ve karakterize etmiştir. PFO’ın kateşol, 4-metilkateşol, pirogallol, L-tirozin, kateşin ve trans-sinamik asite karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu substratların her biri için pH ve sıcaklık gibi koşulların optimum değerleri belirlenmiş ve L-tirozinin en uygun substrat olduğu bildirilmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 4.5 ve 30°C olduğu ve  $K_m$  ile  $V_{max}$  değerlerinin substrat olarak L-tirosin kullanıldığında sırasıyla  $7.90 \times 10^{-4}$  mM ve 11290 EU/ml olduğu bulunmuştur. Ayrıca L-sistein, klorid, sodyum azid, sodyum siyanid, benzoik asit, salisilik asit, L-askorbik asit, glutation, tiyoüre, sodyum dietil, ditiyokarbomat,  $\beta$ -merkaptotanol ve sodyum metabisülfid gibi çeşitli inhibitörlerin inhibitör etkileri test edilmiş ve ditiyokarbomat en etkili inhibitör olarak bulunmuştur.

Serradell ve arkadaşları (2000) Selva çileğinden (*Fragaria x ananassa Duch*) PFO’u ekstrakte edip saflaştırmışlardır. Ekstraksiyon tamponunda kullanılan NaCl ve Triton X-100’ün enzim aktivitesinde belirgin bir artış sağladığı görülmüştür. Substrat olarak pirokateşol kullanıldığında  $K_m$  değeri 11.2 mM bulunmuştur. SDS olmaksızın maksimum enzim aktivitesi 50°C sıcaklıkta ve pH 5.3–6 arasında bulunmuş ve SDS varlığında ise optimum pH değerinin 7.2’ye yükseldiği gözlemlenmiştir.

Ziyan ve Peşyardımcı (2003) çalışmalarında enginar kabuğu ve meyve eti PFO’sunu ekstrakte etmişler ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ve jel filtrasyonu vasıtasıyla saflaştırmışlardır. 50 mM kateşol substrat olarak kullanıldığında optimum pH değerleri, kabuk PFO’su için 7.5, meyve eti PFO’su için 8.0 bulunmuştur. Optimum sıcaklık, kabuk ve meyve eti PFO’su için sırasıyla 25°C ve 30°C bulunmuştur.

Çalışmada altı inhibitör test edilmiş ve hem kabuk hemde meyve eti PFO'su için, en etkili inhibitörlerin, sodyum azid ve tiyüre olduğu saptanmıştır.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, sırasıyla kabuk PFO'su için 5.09 mM ve 363.6 birim/dk.ml ve meyve eti PFO'su için 4.03mM ve 714.2 birim/dk.ml olarak bulunmuştur. Aktivasyon enerjisi kabuk PFO'su için 29.34 kcal/mol, meyve eti PFO'su için ise 42.56 kcal/mol olarak bulunmuştur.

Görmez (2002) gıda işleme operasyonları sırasında yol gösterici olarak yararlı bilgi sağlamak amacıyla iki avokado çeşidinden (Booth 1 (B1PFO) ve Julio Millian (JMPFO) ) elde edilen kaba PFO enzimi üzerinde çalışmıştır. İki ekstrakt için de optimum aktivitenin görüldüğü pH 7.5–7.6 arasında bulunmuştur. 67–84°C arasındaki sıcaklıklarda termal inaktivasyon enerjisi, 21.4-64.1 kcal/mol arasında değişmektedir. Substrat spesifikliği çalışmalarında  $V_{max}/K_m$  değerleri büyükten küçüğe şöyle bulunmuştur: 4-metil kateşol>klorogenikasit>pirogallol>kateşol>kafeik asit. İnhibitörler etkinliklerine göre L-sistein>askorbik asit>resorsinol>glisin>NaCl şeklinde sıralanmıştır.

Gawlik-Dziki ve arkadaşları(2006) brokoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) elde ettikleri polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu yapmışlardır. PFO enzimi  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filitasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid ile jel elektroforez (SDS-PAGE) ve jel filitasyon yapılarak moleküler ağırlık 51.3-57 kDa olarak hesaplanmıştır. PFO'nun en yüksek aktiviteyi, kateşol ( $K_m = 12.34 \pm 0.057$  mM,  $V_{max} = 2000 \pm 8736$  U/ml/min) ve 4-metil kateşol ( $K_m = 21 \pm 0.087$  mM,  $V_{max} = 28.20 \pm 0.525$  U/ml/min) karşı gösterdiği bildirilmiştir. Kateşol ve 4-metil kateşol kullanıldığında brokoli PFO'sunun optimum aktivite gösterdiği pH 5.7'dir. En etkili inhibitör olarak sodyum fosfat bulunmuştur.

Yılmaz (2007) İspir şeker fasülyesinden, polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ile izole ederek bazı biyokimyasal özelliklerini incelemiştir. Bu amaçla 3 ayrı substrat için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek üzere optimum şartlar (pH, sıcaklık ve iyonik şiddet) belirlenmiştir. Optimum şartlarda 3 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak  $K_m$  değeri kateşol, kateşin ve klorogenik asit için sırasıyla 2.4875, 1.3154, 2.2487 M,  $V_{max}$  değerleri ise

aynı substratlar için 3.148, 0.6130, 0.5039 EÜ/ml.dk. olarak bulunmuştur. İnhibitör çalışmalarında substrat olarak kateşol kullanılarak L-sistein klorür, ditiyoeritritol, tiyoüre ve glutation inhibitörleri ile çalışılmış ve en etkili inhibitörün glutation olduğu belirlenmiştir.

Kolcuoğlu (2005), yabani ve yenilebilir birkaç çeşit mantarı polifenol oksidaz potansiyeli açısından incelenmiştir. Maçka Lişer Yaylası'ndan (Trabzon) birkaç mantar türü toplanmış ve bunların ham özütlerinde hem monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri belirlenmiştir. Bu yabani mantar türlerinin yenilebilenleri arasından *Macrolepiota mastoidea*'nın en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ham özüt hem 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA)'e karşı monofenolaz aktivitesi ve hem de 4-metil kateşol (4-MK)'e karşı difenolaz aktivitesi göstermiştir. *M. mastoidea*' dan hazırlanan enzim özütünün optimum pH değerleri monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için sırasıyla 6.0 ve 4.0 olarak belirlenmiştir. Enzim, özütü bu pH değerlerinde 4°C de 24 saat bekletildiğinde başlangıç monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin %90 oranında korunduğu gözlenmiştir. Termodinamik verilerden monofenolaz aktivitesinin difenolaz aktivitesinden daha yüksek termal kararlılığa sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki enzimin kendi substratlarının varlığında elde edilen substrat doyum eğrilerinden bu enzimlerin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu gözlenmiştir. Monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin katalitik etkinliği sırasıyla 15.2 dk<sup>-1</sup> ve 72.6 dk<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Monofenolaz için tiyoüre ve askorbik asit, difenolaz için ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid'in potansiyel inhibitörler olduğu belirlenmiştir.

Astarcı (2003) termofilik bir küf olan *Thermomyces lanuginosus*'un hücre dışı polifenol oksidaz üretimini incelenmiş olup çeşitli besin kaynaklarının, indükleyici bazı maddelerin ve değişik fermantasyon parametrelerinin enzim üretimi üzerine etkileri araştırmıştır. En yüksek enzim aktivitesinin, %1.4 maya ekstraktı, %0.3 MgSO<sub>4</sub>, %1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.003 CuSO<sub>4</sub> ve %0.032 gallik asit içeren ortamda olduğu görülmüştür. *Thermomyces lanuginosus* tarafından üretilen polifenol oksidaz tipinin lakkaz olduğu belirlenmiştir. Enzim için en uygun sıcaklık ve pH değerleri sırası ile 60°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir. Enzim 80°C de 1 saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin %67'sini, pH 9.0 ve oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon

sonrasında da aktivitesinin %87'sini koruduğu gözlenmiştir. Enzimin Michealis-Menten kinetiğine uyduğu görülmüş,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 5 mg /ml ve 38 U/ml bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığının 29 kDa ve izoelektrik noktasının 6.0 civarında olduğu belirlenmiştir.

Kayıkçı (1990) çayın dormansi (uyku) dönemine geçiş sürecini oluşturan Eylül, Ekim ve Kasım ayları süresince, PFO aktivitesi ile bakır, magnezyum, çinko ve demir miktarı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Yedi çeşit çay tipi üzerinde yapılan analizler neticesinde PFO aktivitesi ile bakır miktarı söz konusu aylar süresince düzenli bir azalma gösterirken, magnezyum ve çinko miktarlarında genellikle artış olduğu gözlenmiştir. Demir miktarında ise aylar süresince doğrusal değişimin olmadığı görülmüştür. Yapılan korelasyon analizi neticesinde, PFO aktivitesi ile bakır arasında çok yüksek korelasyonun mevcut olduğu görülmüştür. PFO aktivitesi ile magnezyum ve çinko miktarları arasında daha az bağlantının mevcut olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında demir miktarı ile PFO aktivitesi arasında herhangi bir doğrusal ilişkiye rastlanmamıştır. Tiplerin bu aylar süresince PFO aktivitesi, bakır, magnezyum, çinko ve demir miktarlarının etkileşimleri incelendiğinde, PFO aktivitesi ile bakır miktarının aylara göre değiştiği anlaşılmıştır. Diğer taraftan magnezyum, çinko ve demir miktarlarının ayla ilgili olmadığı görülmüştür.

Erzengi (2002) PFO enzimini saflaştırmak için yeni bir afinite jeli sentezlemiştir. Enzim kaynağı olarak yer elması (*Helianthus tuberosus L.*) ve dut (*Morus alba L.*) meyveleri kullanmıştır. Her iki kaynaktan izole edilen PFO enzimleri, sentezlenen afinite jeli ile saflaştırılmıştır. Dut ve yer elması polifenol oksidaz enzimlerine nativ ve SDS poliakril amid jel elektroforezi uygulanarak, her iki enzimin de yaklaşık 65 kDA molekül ağırlıklarına sahip olduğu bulunmuştur. Kateşol, 4-metil kateşol ve pirogallol substratları kullanılarak, yer elması ve dut PFO enzimlerinin aktiviteleri üzerine sıcaklık ve pH'nın etkisi araştırılmıştır. Yer elması PFO enziminin kullanılan üç farklı substratı için, optimum pH ve sıcaklıkların sırasıyla pH 5.0–8.0 ve 20–35°C arasında değiştiği bulunmuştur. Bu değerler dut PFO enzimi için ise pH 4.5–8.0 ve 20–45°C arasında tespit edilmiştir. Her iki kaynaktan izole edilen enzimin, çeşitli zaman aralıklarında, değişik sıcaklıklardaki ısı stabiliteyi araştırılmıştır. Sıcaklık artışının her iki enzim üzerinde denatürasyona

sebebi olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın düşürülmesi sonucunda yalnız yer elması PFO enziminde renatürasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Dut ve yer elması PFO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta kateşol, 4-metil kateşol ve pirogallol substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur.  $V_{max}/K_m$  değerlerine göre yer elması PFO enzimi için en uygun substratın kateşol, dut PFO enzimi için ise pirogallol olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki enziminde p-kreşol ve L-tirozin üzerinde hiçbir aktivite göstermediği saptanmıştır. Dut ve yer elması PFO enzimleri için ilk defa sülfanamid bileşikleri de inhibitör olarak kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin belirli oranlarda her iki enzimi de inhibe ettiği saptanmıştır.

Aydemir (2004) polifenol oksidaz (PFO) enzimini yer elmasından izole etmiştir. PFO, kateşol, L-dopa, DL-dopa'ya karşı aktivite göstermiş fakat bir monofenol olan L-tirozine karşı aktivite göstermemiştir. Yer elmasından izole edilen PFO'nun optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.0 ve 25°C'dir. Enzim nötr pH civarında oldukça karardır. 60°C ve 80°C deki aktivitelerinin % 50 inaktivasyonu için gerekli olan zamanlar sırasıyla, 40 dk ve 20 dk olarak bulunmuştur. Kateşol için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla, 5.88 mM ve 25 402 IU/mg.min'dir. En fazla inhibitör etkisi gösteren maddeler potasyum siyanid,  $\beta$ -merkaptotanol ve tiyoüre olduğu saptanmıştır.

Saygılı ve arkadaşları (1998) yürüttükleri çalışmada Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş., Şeker Enstitüsü (Ankara) deneme tarlalarında yetiştirilen Evita, TŞ. Poly, Gisela, Adonis ve Agra adlı şeker pancarı çeşitlerindeki polifenoloksidaz (PFO) aktivitelerini incelemişlerdir. PFO enzim aktivitesi substrat olarak kateşolün kullanıldığı dolaylı bir yöntemle ölçülmüştür. Absorbans-zaman grafiğinin eğimi toplam enzim aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. Bazı şeker pancarı çeşitlerinde (Evita, T.Ş., Poly) ortalama PFO aktivitesinin yüksek olduğu ve aynı çeşit örneklerdeki enzim aktivitesi değerlerinin çok geniş sınırlar arasında değiştiği belirlenmiştir. Fakat Adonis çeşidi için ortalama PFO aktivitesi ve standart sapma değerleri oldukça düşük bulunmuştur. Doğal şeker üretiminde pancardaki polifenol oksidazlar, ürün rengini olumsuz etkilemekte ve bu nedenle üretimin ilk aşamasında

PFO buharla inaktive edilmektedir. Bu tür düşük PFO aktivitesine sahip çeşitlerin kullanımı ile proseste ve ürün kalitesinde iyileştirme sağlanabilecektir.

Nakamura ve ark. (1983) Japon çeşitlerinden Kosu üzümünden aseton tozu yöntemi ile ekstrakte ettikleri PFO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon ile saflaştırmışlar ve enzimin bazı özelliklerini belirlemişlerdir. Enzimin molekül ağırlığının 39000-41000 Da, optimum pH'sının 6.0 ve optimum sıcaklığının ise 25°C olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, PFO enzimi o-difenolik bileşiklerle yüksek aktivite gösterirken monofenollere hiç aktivite göstermemiştir.

Yabancı (2008), Karadeniz bölgesinde yetiştirilen çay bitkisinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin (PFO) optimum sıcaklık, optimum pH, substrat spesifikliği, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırmıştır. Denenen substratlar içerisinde enzimin ilgisinin en yüksek olduğu substratın 4-metil kateşol olduğunu bulmuştur. PFO aktivitesi için optimum pH değerinin 6.02 olduğu bulunmuş ve enzim 4.03–7.00 gibi geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur. Enzim 20-80°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında % 70'in üzerinde aktivite göstermiştir. Termal inaktivasyon sonuçlarına göre, sıcaklık arttıkça  $k_D$  değerleri artarken yarı ömür ve  $D$  değerlerinin azalmıştır. Enzimin aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve  $Z$  değerleri sırasıyla, 58.301 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $r^2=0.9614$ ) ve 39.68°C ( $r^2=0.9645$ ) olarak bulunmuştur. Enzimin termal stabilitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Denenen inhibitörlerden en düşük inhibisyon etkisinin L-sistein'de olduğu görülmüştür.

Yağar (2004) çalışmasında, pH 7'de, 0.1 M fosfat tamponu kullanarak kereviz köklerinden PFO enzimini ekstrakte etmiştir. Substrat spesifikliği denemeleri, kateşol, pirogallol, L-DOPA, p-kreşol, resorsinol ve tirozin kullanılarak yapılmıştır. Pirogallol, kateşol ve L-DOPA için  $K_m$  değerleri 25°C'de sırasıyla; 4.5, 8.3 ve 6.2 mM bulunmuştur. En yüksek  $V_{max}/K_m$  değeri substrat olarak pirogallol kullanıldığında bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık değerleri, substrat olarak kateşol, pirogallol ve L-DOPA kullanılarak belirlenmiştir. Kateşol ve L-DOPA için optimum pH değeri 7, pirogallolün pH değeri ise 7.5 olduğu bulunmuştur. En yüksek PFO aktivitesi için optimum sıcaklıklar; pirogallol için 25°C, kateşol için 40°C ve L-

DOPA için 45°C bulunmuştur. Termal inaktivasyon çalışmaları, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzimatik aktivitede düşüş olduğunu göstermiştir. İnhibitörlerin etki sırası şu şekilde bulunmuştur: L-sistein>askorbik asit>glisin>resorsinol>NaCl.

Rapeanu ve arkadaşları (2006) Güney Afrika'da yetişen Viktorya üzümlerinden ekstrakte edilen PFO enziminin biyokimyasal özelliklerini ve kimyasal stabilitesini araştırmışlardır. Fosfat-sitrat tamponu içindeki 10 mM kateşol substratı ile üzüm PFO aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 5.0 ve 25°C bulunmuştur. 10 mM kateşol substrat olarak kullanıldığında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $52.6 \pm 0.00436$  mM ve  $653 \pm 24.0$  OD<sub>400</sub> nm/dak olarak bulunmuştur. Çalışmada sekiz inhibitör test edilmiş ve en etkili inhibitörler olarak askorbik asit, L-sistein ve sodyum metabisülfid bulunmuştur. Kinetik çalışmalar Viktorya üzümleri PFO'sunun termal inaktivasyonunun,  $E_a = 225 \pm 13.5$  kJ/mol'lük bir aktivasyon enerjisi ile birinci dereceden kinetiğe uyduğunu göstermiştir. Hem yarı-safılaştırılmış ekstraktta hem de üzüm suyunda PFO enzimi güçlü bir yüksek basınç stabilitesi göstermiştir.

Doğan ve ark. (2002) kurutma işlemleri için en uygun patlıcan çeşidini belirleyebilmek için, farklı patlıcan çeşitlerinden elde edilen PFO enziminin substrat spesifikliğini, termal inaktivasyonunu, sıcaklık ve inhibitörlerin etkilerini araştırmışlardır. PFO kateşol ve 4-metilkateşole karşı aktivite göstermiş, fakat L-tirosine karşı aktivite göstermemiştir. 1. çeşit ( $V_{max}=3333.3$  EU dak<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>,  $K_m=8.7$  mM ve  $V_{max}/K_m= 384.9$  dak<sup>-1</sup>) ve 3. çeşit patlıcan ( $V_{max} 1000$  EU dak<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>,  $K_m=9.3$  mM ve  $V_{max}/K_m= 107.5$  dak<sup>-1</sup>) için en iyi substrat kateşol bulunurken, 2. çeşit patlıcan için ( $V_{max}=5000$  EU dak<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>,  $K_m=35.5$  mM ve  $V_{max}/K_m= 140.8$  dak<sup>-1</sup>) en iyi substrat 4-metilkateşol bulunmuştur. Substrat olarak kateşol kullanıldığında optimum pH 7.0, 4-metilkateşol kullanıldığında ise pH 6.0 olarak bulunmuştur. Termal inaktivasyon çalışmalarına göre 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesi düşmüştür. Kateşol ve 4-metil kateşol substratları için maksimum aktivite elde etmek için optimum sıcaklık, kateşol kullanılan ve optimum sıcaklığı 20°C bulunan 1. çeşit patlıcan dışındaki patlıcan çeşitleri için 30°C bulunmuştur. PFO üzerine tropolon, DL-ditiotreitrol ve glutation gibi bileşenlerin inhibitör olarak etkileri test edilmiş ve genel olarak en etkili inhibitör tropolon bulunmuştur.



Mazzafera ve Robinson (2000), kahve yaprakları ve kahve endospermininden elde ettikleri PFO enzimini karakterize etmişlerdir. Meyve endospermi ve yapraklarının her ikisinde, erken gelişme safhasında diğer dönemlere göre PFO aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Tripsin veya proteinaz K ile ekstraktın uzun inkübasyonu PFO aktivitesini inhibe etmiştir. Ancak pepsinin hiçbir etkisi olmamıştır. Proteinaz K ile PFO inhibisyonu SDS varlığında artmıştır. İki dokudaki PFO aktivitesi pH 6.0-7.0'de ve sıcaklığı 30°C'de optimumdur. Substrat olarak klorogenik asit 0.882 mM (PFO-L) ve 2.27 mM (PFO-E)  $K_m$  değeri ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Hekzadekil trimetil-amonyum bromid polivinilprolidon 40, sinamik asit ve salisihidroksamik asit her iki dokudan elde edilen PFO'yu inhibe etmişlerdir. Her iki enzim de ısıyla inaktive edilmiştir. Fakat endosperm ekstraktındaki aktivite yapraklardakinden daha stabil bulunmuştur.

**3. MATERYAL VE METOT****3.1. Materyal****3.1.1. Beyaz Kiraz Örnekleri**

Denemelerde kullanılan kirazlar Konya'nın Ereğli ilçesinden temin edilmiştir.

**3.1.2. Analizlerde Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler**

Aseton tozunun elde edilmesinde "Torrington HGBTWTS3 marka waring blender (Amerika) kullanılmıştır. Tamponların ayarlanmasında ve pH ölçümlerinde cam elektrodlu "Inolab marka pH metre (Almanya) kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler, sıcaklık kontrol ünitesi olan "Shimadzu UV-1700" marka spektrofotometrede (Japonya) gerçekleştirilmiştir. Enzim ekstraktının elde edilmesinde "Nüve NM 110" marka karıştırıcı ve "Kubota 7780 (Japonya) marka santrifüj kullanılmıştır. Enzimlerin saflaştırılmasında "Atto AC-5750 (Japonya)" marka fraksiyon kollektörü kullanılmıştır. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi sırasında "Memmert WB14" ve "Nüve BM402" marka su banyosu kullanılmıştır.

Enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan kateşol, triton X-100, sodyum metabisülfid, polivinilpolipirrolidon (PVPP), askorbik asit, commasie brilliant blue (CBB) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. DEAE-Toyopearl 650-M Supelco (Montgomeryville, Amerika) firmasından sağlanmıştır. PEG (polietilen glikol), PMSF (fenilmetilsülfonil florid), sodyum disülfid, askorbik asit, L-sistein, aseton, amonyum sülfat ve selüloz membran (76mm×49mm) Sigma-Aldrich (St. Louis, Amerika) firmasından temin edilmiştir.

**3.2. Metot****3.2.1. Polifenol Oksidaz Ekstraktının Hazırlanması**

Dondurulmuş ve  $-25^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiş kirazların sap ve çekirdekleri çıkarıldıktan sonra 300 g kiraz pulpu, 3.33 g polietilen glikol (PEG) içeren 400 ml önceden soğutulmuş ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) aseton içerisinde 2 dk Waring blendorda homojenize edilmiştir. Homojenat vakumlu filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtre keki 200 ml soğutulmuş aseton ile karıştırılarak aynı işlemler uygulanmıştır. Filtre üzerinde kalan kısım, beyaz aseton tozu elde edilene kadar 200 ml soğuk aseton kullanımıyla ekstrakte edilmiştir. Elde edilen aseton tozu bir gece oda sıcaklığında kurutulduktan sonra cam kavanoz içerisinde  $-25^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Coseteng ve Lee, 1987).

**3.2.2. Enzimin Kısmi Saflaştırılması**

Elde edilen aseton tozundan 10 g alınarak 10 mM askorbik asit, %0.1 polivinilpoliprolidon, %0.5 Triton X-100 ve 1mM PMSF içeren 300 ml, 0.1 M pH 6.8 fosfat tamponunda 40 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat 3 saat süreyle,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve daha sonra 10.000 x g'de 45 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, berrak kısma %90 amonyum sülfat çökeltmesi uygulanmıştır. Çökelti 10.000 x g'de 45 dakika,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Çökelti, az miktarda 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponunda çözülmüş ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de aynı tampona karşı bir gece boyunca diyaliz edilmiştir (Serradell ve ark., 2000).

**3.2.3. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma**

Diyaliz edilen enzim çözeltisi, 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponu ile dengelenmiş DEAE-Toyopearl 650-M iyon değişim kolonuna (2.5 x 30 cm)  $0.5 \text{ ml.dak}^{-1}$  hızla verilmiştir. Enzim çözeltisi verildikten sonra  $0.5 \text{ ml.dak}^{-1}$  hızla yaklaşık 200 ml başlangıç tamponu geçirildikten sonra 0.01–0.20 M, pH 6.8 fosfat tamponu kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Toplam 40 ml enzim çözeltisi kolona

verilmiştir. Fraksiyonlar 4'er ml olacak şekilde toplanmış ve elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivitesi ve 280 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

#### **3.2.4. Protein Tayini**

Enzimlerin protein içeriği standart olarak sığır serum albumini kullanılan Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford, 1976).

#### **3.2.5. Enzim Aktivitesinin Ölçümü**

Enzim aktivitesi 30°C'de 410 nm'de 40 sn boyunca absorbanstaki artıştan belirlenmiştir. Absorbans-zaman grafiğinin lineer kısmının eğiminden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Ölçümler üç parelli olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde ifade edilmiştir. Optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış ve 30°C'ye ısıtılmış 0.9 ml substrat çözeltisi 0.1 ml enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra absorbanstaki artış otomatik olarak kaydedilmiştir. Sadece inhibitörün etkisini belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 0.8 ml substrat, 0.1 ml inhibitör ve 0.1 ml enzim çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol olarak fosfat tamponunda hazırlanmış substrat kullanılmıştır. 1 ünite PFO aktivitesi 30°C'de dakikada 0.001 birimlik absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Ünal ve Şener, 2006).

#### **3.2.6. Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Enzimin optimum pH ve sıcaklığı, kinetik parametreleri, termal inaktivasyonu, enzime inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri Ünal (2007)'a göre belirlenmiştir.

##### **3.2.6.1. Optimum pH**

Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'yı bulabilmek için 3.46–6.30 pH aralıklarında aktivite ölçülmüştür. pH 3.46–5.80 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.30 için 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır. PFO aktivitesi farklı

tamponlarda, standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri optimum pH olarak belirlenmiş ve diğer deneyler bu pH'larda gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6.2. Optimum Sıcaklık**

Optimum sıcaklığı belirleyebilmek için enzimlerin 10–70°C'ler arasındaki sıcaklıklarda aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tamponla hazırlanmış 0.9 ml kateşol çözeltisi ilgili sıcaklıkta su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 0.1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

### **3.2.6.3. Kinetik Parametreler**

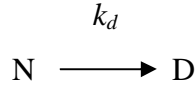
Michealis sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ )'ı belirlemek için substrat olarak çeşitli konsantrasyonlarda kateşol (6.25–100 mM) çözeltisi kullanarak enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.6.4. Termal İnaktivasyon**

Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisini belirlemek için enzimler 60, 65 ve 70 °C 5, 10, 15 dk süreyle ısıtıldıktan sonra enzim kalıntı aktiviteler belirlenmiştir. Vidalı deney tüpü ilgili sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra içerisine 0.5 ml enzim konulup değişik sürelerde sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Süre sonunda enzim hızlı bir şekilde su banyosundan çıkarılıp buz banyosunda soğutulmuş, ardından oda sıcaklığına getirildikten sonra enzim aktivitesi standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol olarak sıcaklığa maruz bırakılmayan enzim kullanılmıştır. Sıcaklığa maruz kalan enzimlerdeki kalıntı enzim aktivitesi ( $E_t$ ), sıcaklığa maruz kalmamış enzimin aktivitesi ( $E_o$ ) ile kıyaslanarak birinci dereceli inaktivasyon sabiti ( $k_d$ ), yarı ömür ( $t_{1/2}$ ), aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), sabit bir sıcaklıktaki enzim aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre olan  $D$

değeri ve  $D$  değerinde bir  $\log_{10}$  azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı olan  $Z$  değeri hesaplanmıştır.

Bu değerlerin hesaplanması aşağıda özetlenmiştir. Belli bir zaman süreci içerisinde doğal enzimin aktivitesindeki kayıplar ya da konsantrasyonundaki azalmalar birinci dereceden kinetiğe uyar ve aşağıdaki gibi ifade edilebilir.



Burada  $N$  doğal enzimi,  $D$  denatüre olmuş enzimi ve  $k_d$  ise (1/zaman) enzim için birinci dereceli inaktivasyon sabitini göstermektedir. Enzimlerin termal inaktivasyonu genellikle birinci dereceden reaksiyonla ifade edilir:

$$E_t = E_o \cdot e^{-k_d t}$$

$E_t$ ,  $t$  anındaki enzim aktivitesi ve  $E_o$  başlangıçtaki aktiviteyi,  $t$  ise ısı işlem uygulama süresini ifade eder. Sabit sıcaklıkta  $\ln(E_t/E_o)$ 'ın süreye karşı grafiği çizildiğinde, kurvenin eğimi  $-k_d$ 'dir.

Yarı ömür ( $t_{1/2}$ ) değeri, enzim stabilitesinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bir parametredir. Belli bir sıcaklıkta enzim aktivitesinin yarı yarıya azalması için gereken süredir. Enzimlerin ısı yolla inaktivasyonu çoğunlukla birinci dereceden kinetiğe uyduğundan aşağıdaki formülden kolaylıkla hesaplanabilir:

$$t_{1/2} = 0.693 / k_d$$

$D$  değeri, sabit bir sıcaklıktaki orijinal enzim aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre olarak tanımlanmaktadır.  $D$  değeri aşağıdaki formülden hesaplanabileceği gibi,

$$D = \ln(10) / k_d$$

$\log_{10} (E_t/E_o)$ 'ın zamana karşı grafiğinin eğiminden de hesaplanabilir. Eğim  $-1/D$ 'ye eşittir.

Eğer hız sabitleri farklı sıcaklıklarda elde edilirse denatürasyon için aktivasyon enerjisi hesaplanabilir. Aktivasyon enerjisi aşağıda verilen Arrhenius modeli yardımıyla hesaplanabilir.

$$\ln k_d = \ln A - (E_a / RT)$$

A (1/zaman), kimyasal reaksiyonlar sırasında meydana gelen çarpışmaların toplam sayısı ile ilgili bir parametredir.  $E_a$  (kJ.mol<sup>-1</sup>), aktivasyon enerjisidir. R (kJ.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>), üniversal gaz sabiti ve T(K) mutlak sıcaklıktır.

Aktivasyon enerjisi ile yakından ilişkili bir parametre olan Z değeri, desimal azalma süresinin (D) sıcaklığa bağımlılığını ifade eder ve enzimin ısıl direncini yansıtan bir parametredir. Z değeri, D değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışıdır. Log10D'nin sıcaklığa karşı grafiği çizildiğinde, doğrunun eğimi 1/Z'dir (Marangoni, 2003).

### **3.2.6.5. İnhibitörlerin Etkileri**

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonlarda 2 farklı inhibitör (sodyum disülfid ve L-sistein) kullanılarak enzimlerin aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış kateşol çözeltisinden 0.8 ml ve optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki inhibitör çözeltilerinden 0.1 ml deney tüpüne konularak 5 dk 30 °C'de su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra üzerine 0.1 ml enzim ilave edilerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Kontrol olarak inhibitör kullanılmadan hazırlanan standart reaksiyon karışımında enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_o - A_i)/A_o] * 100$$

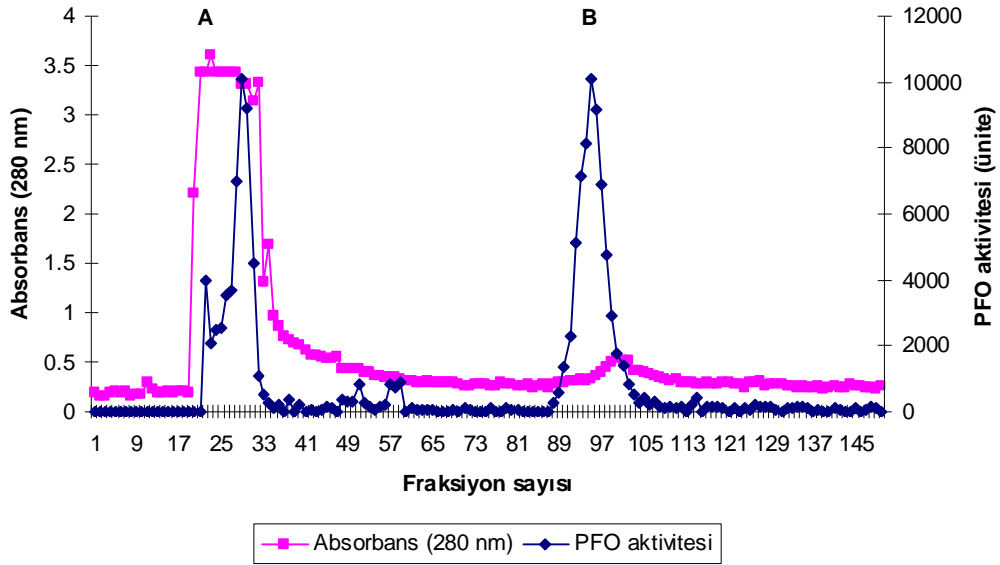
A<sub>o</sub>: İnhibitör kullanmadan belirlenen enzim aktivitesi

A<sub>i</sub>: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi

## 4. ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA

## 4.1. Enzimin Saflastirilmesi

İyon değişim kromatografisinde elde edilen fraksiyonların her birinde absorbans (280 nm) ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri pH'sı 4.98 olan 0.2 M sitrat tamponunda hazırlanmış 25 mM kateşol kullanılarak yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlara karşı absorbans ve PFO aktiviteleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi iki ayrı aktivite piki, yani iki PFO izoenzimi elde edilmiş ve ilk aktivite görülen pik izoenzim A, diğeri ise izoenzim B şeklinde isimlendirilmiştir. A pikinde 22. ve 26-31'inci fraksiyonlar B pikinde ise 92-98'inci fraksiyonlar birleştirilmiş ve her iki pikin biyokimyasal özellikleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi izoenzim A 3.9, izoenzim B ise 76.7 kat saflaştırılmıştır.



Şekil 4.1. DEAE-Toyopearl İyon Değişim Kromatografisi ile Beyaz Kiraz PFO'sunun Saflastirilmesi



Çizelge 4.1. Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması

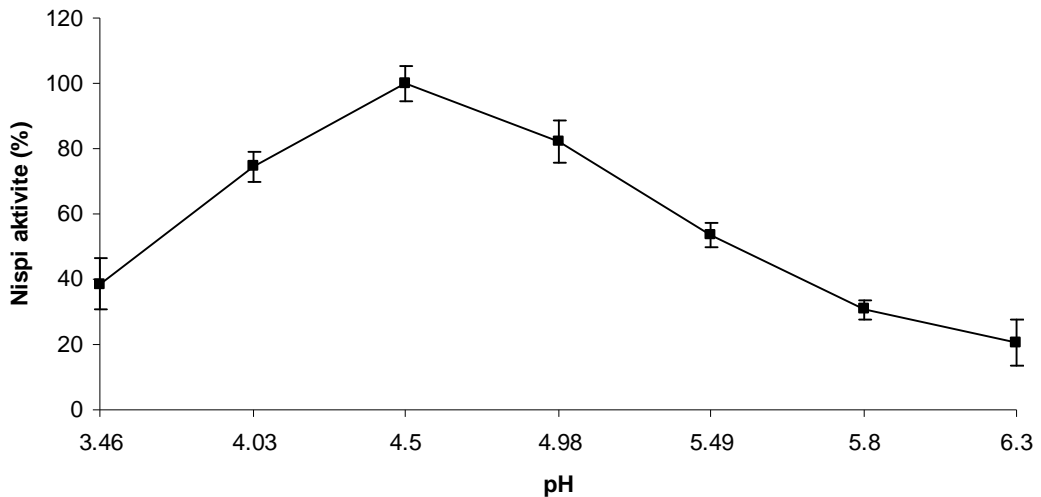
Örnek (A)	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (Ünite)	Spesifik Aktivite (Ünite/mg)	Saf. Katsayısı	Verim (%)
<b>Kaba Ekstrakt</b>	250	24	593000	24708.3	1.00	100.0
<b>Diyaliz</b>	40	5.8	206960	35682.8	1.44	34.9
<b>DEAE-Toyopearl 650M</b>	28	3.0	289016	96338.7	3.9	48.7
Örnek (B)	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (Ünite)	Spesifik Aktivite (Ünite/mg)	Saf. Katsayısı	Verim (%)
<b>Kaba Ekstrakt</b>	250	24	551000	22958.3	1.00	100.0
<b>Diyaliz</b>	40	5.8	445760	76855.2	3.3	80.9
<b>DEAE-Toyopearl 650M</b>	28	0.17	299432	1761364.7	76.7	54.3

#### 4.2. Optimum pH

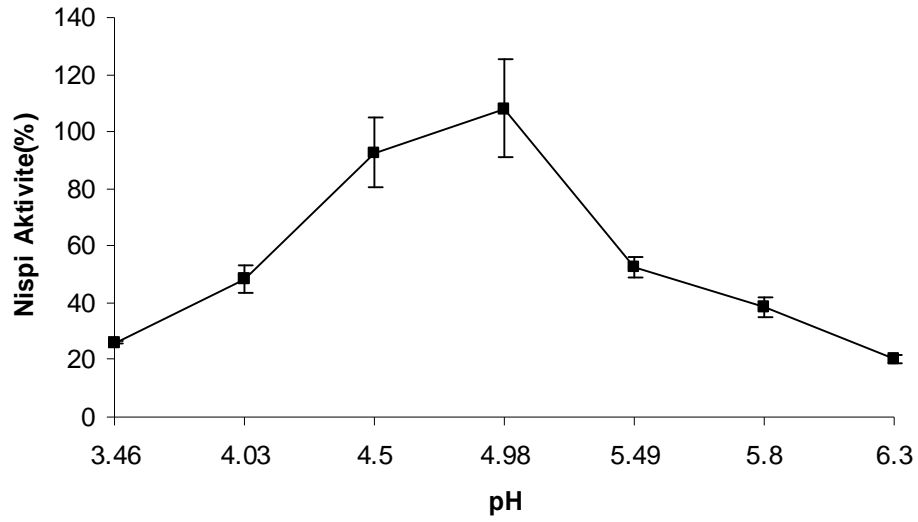
Enzimlerin optimum pH'nın altında ve üzerinde aktiviteleri düşer. Enzimler kuvvetli asit ve bazlara fazla dayanıklı değildir. Ortam pH'sındaki aşırı olmayan değişiklikler enzimin ve çoğu kez de substratın iyonik durumunda değişikliklere neden olur. Düşük asidik ve yüksek alkali pH'larda bir enzimin aktif merkezindeki prototropik grupların iyonlaşmalarındaki değişimler aktif merkezin uygun konformasyonunu, substratların bağlanmalarını ve/veya reaksiyonun katalizini etkiler. Ayrıca, pH'ya bağlı olarak proteinin tersinmez denatürasyonu ve/veya substratın stabilitesi de enzimlerin katalitik aktivitelerini etkileyebilir. Enzimler kendileri için aşırı pH değerlerinde aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların

yapılarında değişmeler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar (Koolman ve Roehm, 2005; Yoruk ve Marshall, 2003). Kovalent olmayan elektrostatik bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve kovalent disülfid bağları enzimlerin üçüncül ve dördüncül yapılarını stabilize eder. Enzim üzerindeki pozitif ve negatif gruplar arasında oluşan elektrostatik bağlar pH'dan etkilenirler. Nötral pH'larda iyonlaşabilen yan gruplar  $-\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_3\text{N}^+$  ve  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}$  gruplarıdır ve bunlar kuvvetli elektrostatik bağlar oluşturabilirler. pH 3'ün altında karboksil grupları protonlanırlar ( $-\text{COOH}$ ) ve elektrostatik bağ oluşturamazlar. pH 10'un üzerinde ise amino grupları protonlanırlar ( $-\text{NH}_2$ ) ve elektrostatik bağ oluşturamazlar (Whitaker, 2003).

Beyaz kiraz PFO'larının, en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'sını belirleyebilmek için her iki enzim için de standart reaksiyon karışımında pH'sını 3.46–6.30 arasında değişen tamponlar kullanılarak enzimlerin aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar % nispi aktivite olarak Şekil 4.2 ve 4.3'de gösterilmiştir. Şekil 4.2'den de görüleceği gibi A izoformunun pH değeri 3.46'dan 4.5'e doğru arttıkça aktivite de artmış ve en yüksek aktivite 4.5'ta görülmüştür. Şekil 4.3'te görüleceği gibi B izoformunun pH değeri 3.46'dan 4.98'e doğru arttıkça aktivite de artmış, en yüksek aktivite 4.98'de görülmüştür. Optimum pH'dan sonra enzimlerin aktivitelerinde azalma gözlenmiş ve enzimlerin aktiviteleri yaklaşık % 20'ye düşmüştür.



Şekil 4.2. pH'nın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim A) Etkisi



Şekil 4.3. pH'nın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim B) Etkisi

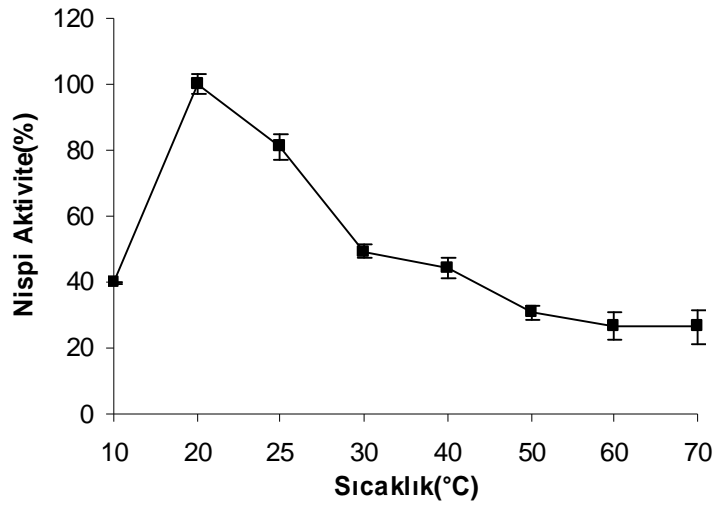
Değişik ürünlerde PFO ile yapılan optimum pH çalışma sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerden izole edilen PFO'ların optimum pH değerleri 3.0–9.0 gibi geniş bir aralıktadır ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar (4.5 ve 4.98) literatürdeki değerlerle uyum içindedir.

Çizelge 4.2. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri

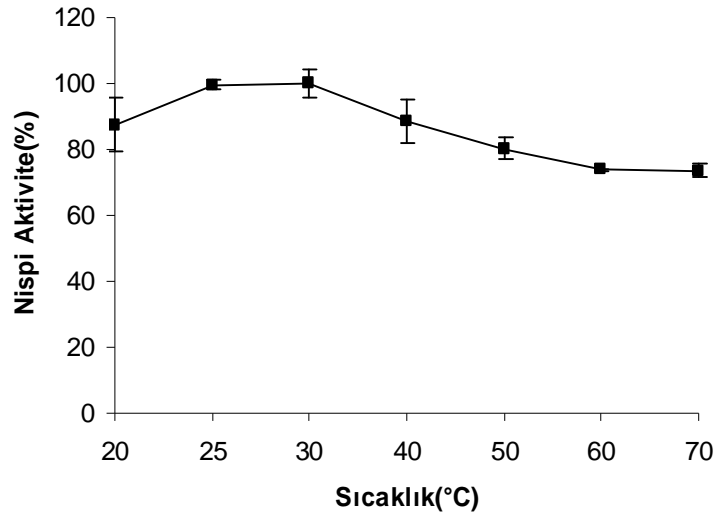
Optimum pH	Ürün	Substrat	Referans
9.0	Fasulye sürgünleri	Kateşol	Nagai ve Suzuki, 2003
7.5	Cassava kökleri	Kateşol, L-Dopa	Barthet, 1997
7.0	Muşmula	4-Metil Kateşol	Ayaz ve ark., 2008
4.0–7.0	Zambak	Kateşol	Yang ve Wang, 2008
6.0-6.5	Halen Haven Şeftalisi	Kateşol	Yemencioğlu ve Cebercioğlu, 1996
7.0	Anamur muzusu	Kateşol	Ünal, 2007
5.0	Hint çay yaprağı	Kateşol	Hadler ve ark., 1998
4.2	Emir Üzümü	Kateşol	Ünal ve Şener, 2006
3.0	Napolyon üzümü	4-tert-bütilkateşol	Delicado ve ark., 2007

### 4.3 Optimum Sıcaklık

Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler. Yüksek sıcaklıklar enzimatik reaksiyonda rol oynayan fonksiyonel grupların disosiyasyonunu etkileyebilir; enzimin aktivatörlere ve inhibitörlere olan ilgisini etkileyebilir; reaksiyonda substrat olabilecek oksijenin çözünürlüğünü etkileyebilir. Bunların dışında, yüksek sıcaklık enzimleri inaktive edebilir. Reaksiyon hızının maksimumuna eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum aktivitesi 30–40°C'dir ve 45°C'nin üzerinde denatürasyon başlar (Richardson ve Hyslop, 1985). Beyaz kiraz PFO'sunun en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirleyebilmek için izoenzim A'de 10–70°C'ler ve izoenzim B'de ise 20–70°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % nisbi aktivite olarak Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir. Ölçümlerde standart reaksiyon karışımı kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Sıcaklığın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine (İzoenzim A) Etkisi



Şekil 4.5. Sıcaklığın Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesine İzoenzim B) Etkisi

Şekillerden de görüldüğü gibi izoenzim A en yüksek aktiviteyi 20°C’de ve izoenzim B ise 30°C’de göstermiştir. İzoenzim A’nın aktivitesinde 20°C’den sonra, sıcaklıktaki artışla beraber hızlı bir düşme gözlenmiştir. İzoenzim B’nin aktivitesi ise 30°C’den sonra sıcaklıktaki artışla beraber izoenzim A’ya göre daha yavaş bir düşüş göstermiştir. İzoenzim A’nın aktivitesi optimum sıcaklıktan sonra önemli bir azalma göstererek 70°C’de %30’lara düşmüş, izoenzim B ise aktivitesinde düşme gözlemlense de 20–70°C sıcaklık aralığında %80’e yakın aktivite göstermiştir.

Değişik ürünlerden izole edilen PFO ile yapılan optimum sıcaklık çalışma sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi değişik ürünlerin optimum sıcaklık değerleri 12–45°C gibi geniş bir aralıktadır ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar (20°C ve 30° C) literatürdeki değerlerle uyum içindedir.

Çizelge 4.3. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO’ların Optimum Sıcaklık Değerleri

Optimum sıcaklık (°C)	Ürün	Referans
45	Dut	Arslan ve ark., 2004
40	Fasulye sürgünleri	Nagai ve Suzuki, 2003
30	Muşmula	Ayaz ve ark., 2008
30	Anamur muzusu	Unal, 2007
25	Emir üzümü	Unal ve Şener, 2006
25	Enginar	Aydemir, 2004
12	Ferula bitkisi	Erat ve ark. 2006

#### 4.4. Kinetik Parametreler

Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerlerini belirleyebilmek için substrat olarak değişik konsantrasyonlarda kateşol kullanılmıştır. Aktivite ölçümleri izoenzim A'da pH 4.5 ve 20°C'de, izoenzim B'de pH 4.98 ve 30°C'de yapılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4'de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Kinetik Parametreleri

	İzoenzim	Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (abs/dak)	$V_{max}/K_m$
Beyaz Kiraz	A	Kateşol	106.975	2.010	0.019
	B	Kateşol	30.325	1.261	0.042

Bir enzim için  $K_m$  değeri, maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu gösterir.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve bu değer ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksektir.  $K_m$  değerleri kıyaslandığında izoenzim B'nin kateşola olan ilgisi izoenzim A'ya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Enzim için en iyi substratı gösteren  $V_{max}/K_m$  oranına göre kateşol izoenzim B için daha iyi bir substrattır.

Çizelge 4.5'te değişik ürünlerden izole edilen PFO'ların  $K_m$  değerleri verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerden izole edilen PFO'ların  $K_m$  değerleri 3.4–230 mM gibi geniş bir aralıkta değişmektedir. Her iki enzimin de  $K_m$  değeri bu değerler aralığındadır.

Çizelge 4.5. Çeşitli Ürünlerin Polifenol Oksidaz Enzimlerinin  $K_m$  Değerleri

Ürün	Substrat	$K_m$ (mM)	Referans
Zambak	Kateşol	3.40	Yang ve Wang, 2008
Anamur muzı	Kateşol	8.50	Ünal, 2007
Enginar başı	Kateşol	10.20	Aydemir, 2004
Hint çay yaprağı	Kateşol	12.52	Halder ve ark., 1998
Cassava kökleri	Kateşol	28.21	Barthet, 1997
Fasulye sürgünleri	Kateşol	71.00	Nagai ve Suzuki, 2003
Jonagored elması	Kateşol	230.00	Rocha ve Morais, 2001

#### 4.5. Termal İnaktivasyon

PFO'nun termal inaktivasyon kinetiği iki enzim için de 60, 65 ve 70°C'de 5, 10, 15 dk. sürelerde çalışılmıştır. Termal inaktivasyon parametreleri ısı işleme maruz kalmış enzimlerin aktivitelerinin ısıılmamış örneğin aktivitesine kıyaslanmasıyla  $k_D$  (inaktivasyon sabiti),  $t_{1/2}$  (yarı ömür) ve  $D$  (desimal indirgenme süresi) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Sıcaklık arttıkça  $k_D$  değerleri artmış buna karşılık enzim aktivitesini yarı yarıya azaltmak için gereken süre ve  $D$  değerleri azalmıştır. 60°C'de izoenzim A'nın yarı ömür değeri 61.30 dk iken 70°C'de 21.70 dk olmuştur. B enziminin yarı ömrü ise 60°C'de 48.1 dk ve 70°C'de 9.2 dk olmuştur.

Çizelge 4.6. Beyaz Kiraz PFO Enzimlerinin Termal İnaktivasyon Parametreleri

İzoenzim Enzim	Sıcaklık (°C)	$k_d$ (dak <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_{1/2}$ (dak)	D (dak)
A	60	0.0113	0.9458	61.3	203.8
	65	0.0137	0.957	50.6	168.1
	70	0.0320	0.9602	21.7	72.0
B	60	0.0144	0.8756	48.1	160.0
	65	0.0286	0.9491	24.2	80.6
	70	0.0754	0.9592	9.2	30.5

Termal inaktivasyon çalışmalarının diğer önemli parametreleri aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve enzimin  $D$  değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı ifade eden  $Z$  değeridir. Bu çalışmada,  $Z$  ve  $E_a$  değerleri izoenzim A için sırasıyla 22.1°C ( $r^2=0.8832$ ) ve 98.5 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $r^2=0.8776$ ) ve izoenzim B içinse 13.9°C ( $r^2=0.9903$ ) ve 157.1 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $r^2=0.9886$ ) olarak hesaplanmıştır. Termal inaktivasyon parametrelerinin diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılması çalışılan sıcaklık ve sürelerdeki farklılıklar nedeniyle zordur. Çizelge 4.7'de değişik ürünlerden izole edilen PFO enzimlerinin aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) değerleri görülmektedir. Bu değer ürüne göre ve hatta aynı üründe bile

önemli farklılık göstermektedir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerin aktivasyon enerji değerleri 15.8-225.4  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  gibi geniş bir aralıkta değişmektedir.

Çizelge 4.7. Çeşitli Ürünlerden izole edilen Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Aktivasyon Enerjileri

Ürün	Aktivasyon Enerjisi ( $E_a$ ) ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Referans
Victoria üzümü	225.4	Râpeanu ve Bulancea, 2005
Anamur muzı	155.0	Ünal, 2007
Zambak	100.8	Yang ve Wang, 2008
Ananas püresi	82.8	Chutintrasria ve Noomhomb, 2006
Enginar başı	15.8	Aydemir, 2004

Z değerinin büyük olması enzimin ısı dayanaklılığının diğer bir göstergesidir. Râpeanu ve Bulancea (2005)'nin Victoria üzümü PFO ile yaptıkları çalışmada Z değerinin 9.66°C olarak bildirilmiştir. Ünal (2007) çalışmasında Anamur muzı PFO enziminin Z değerinin 14.2°C olduğunu bulmuştur. Chutintrasria ve Noomhomb (2006) ananas püresi PFO'sunun Z değerini 21.5°C bulmuşlardır. Bu değerlerle karşılaştırıldığında, beyaz kirazdan elde edilen her iki izoenzimin Z değerinin bu değerlere yakın olduğu bulunmuştur.

#### 4.6. İnhibitörlerin Etkisi

İnhibitörler reaksiyon ortamına eklendiğinde reaksiyon hızını azaltan doğal ya da yapay kimyasal maddelerdir. Bileşiklerin inhibe edici etkileri inhibitörün saflığına, konsantrasyonuna, enzimin kaynağına, substratın varlığına, pH ve sıcaklığa bağlıdır. PFO bir metallo proteindir. Şelat yapıcı ajanlarla inhibe edilebilir (etilendiamintetraasetat (EDTA), sodyum dietilditiokarbomat (DIECA) ve sodyum azid). Askorbik asidin inhibisyonu ile ilgili iki mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan ilkinde göre, askorbik asit enzimin aktif merkezindeki bakırla şelat oluşturarak inhibisyona neden olmaktadır. İkincisinde ise askorbik asit merkezdeki bakırı indirgemektedir. Sodyum disülfid, indirgeyici bir ajandır. İndirgeyici ajanlar gıda endütrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ajanlar o-kinonların birikimini önleme yolu ile melaninlerin oluşumunu inhibe eder veya stabil renksiz



ürünler oluştururlar. L-sistein antioksidan özellikte bir maddedir (Zawistowski ve ark., 1991).

Bu çalışmada, inhibitörlerin enzim aktivitelerine etkilerini belirleyebilmek için sodyum disülfid ve L-sisteinin 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuçlar % inhibisyon olarak Çizelge 4.8’de verilmiştir. Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi denenen inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin her iki enzim için farklılık gösterdiği ve B enzimini her iki inhibitörün 1.00 mM konsantrasyonda % 100 inhibe ettiği bulunmuştur.

Çizelge 4.8. İnhibitörlerin Beyaz Kiraz Polifenol Oksidaz Enzimlerine Etkileri

		A	B
İnhibitor	Konsantrasyon (mmol L <sup>-1</sup> )	İnhibisyon (%)	İnhibisyon(%)
L-Sistein	0.01	7.25 ± 4.70	13.70 ± 11.92
	0.10	37.68 ± 10.37	25.04 ± 4.52
	1.00	87.69 ± 1.66	100.00 ± 0.0
Sodyum Disülfid	0.01	11.42 ± 9.17	YOK
	0.10	72.55 ± 2.02	84.67± 0.58
	1.00	76.68 ± 5.07	100.00 ± 0.0

Ünal’ın (2007) Anamur muzunu PFO’su üzerine yaptığı çalışmada askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitörler olarak bulunmuştur. NaCl ve sitrik asit daha az etkili bulunmuştur. Ziyen ve Pekyardımcı’nın (2003) Ankara armudu PFO’su üzerine yaptıkları çalışmada sodyum dietilditiyokarbomat en etkili inhibitör olarak bulunmuştur. Halder ve ark. (1998) Hint çay yaprağı PFO’su üzerine yaptıkları çalışmalarda enzimin 2 mM tropolone ile tamamen inhibe olduğunu bulmuşlardır.

Nagai ve Suzuki’nin (2003) fasulye PFO’su üzerine yaptıkları çalışmada 3 mM konsantrasyonda askorbik asit, L-sistein, 2-merkaptotanol ve glutation etkili inhibitörler olarak gösterilmiştir. Yang ve Wang’ın (2008) zambak bitkisi PFO’su üzerine yaptıkları çalışmada en etkili inhibitör sodyum sülfid (0.1 mM) bulunurken, askorbik asit, L-sistein ve tiyürenin yüksek konsantrasyonlarda (10 mM) oldukça etkili inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur. NaCl ve sitrik asit bu bitki enzimi için zayıf inhibitörler olarak belirtilmiştir.

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Bu çalışmada beyaz kirazdan izole edilerek kısmen saflaştırılan Polifenol oksidaz'ın (PFO) biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, enzimin optimum pH'ı ve sıcaklığı, kinetik parametreleri, termal inaktivasyonu ve enzime inhibitörlerin etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan:

- Saflaştırma ile PFO enziminin iki farklı izoformu elde edilmiş ve bu izoformlar A ve B harfleri ile isimlendirilmiştir. Beyaz kiraz PFO enziminin A izoformu % 48.7 verimle 3.9 kat ve B izoformu % 54.3 verimle 76.7 kat saflaştırılmıştır.
- A ve B izoformlarının optimum pH değerleri sırasıyla 4.50 ve 4.98 olarak bulunmuştur.
- Optimum sıcaklık çalışmalarında A ve B izoformlarının optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20°C ve 30°C olarak saptanmıştır.
- A ve B izoformlarının kateşole ilgisinin farklılık gösterdiği ve B izoformunun kateşole ilgisinin A'dan daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- Termal inaktivasyon sonuçlarına göre, sıcaklık arttıkça  $k_D$  değerleri artarken yarı ömür ve  $D$  değerleri azalmıştır. Beyaz kiraz PFO'su A ve B izoformlarının  $Z$  ve  $E_a$  değerlerinin sırasıyla 22.1°C ( $r^2=0.8832$ ) ve 98.5  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $r^2=0.8776$ ) ve 13.9°C ( $r^2=0.9903$ ) ve 157.1  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $r^2=0.9886$ ) olarak hesaplanmıştır.
- İnhibitör olarak L-sistein ve sodyum disülfid kullanılmış ve bu inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin her iki enzim için oldukça farklılık gösterdiği ve B izoformu her iki inhibitörün 1.00 mM konsantrasyonda % 100 inhibe ettiği bulunmuştur.
- Beyaz kirazlar diğer ürünlere işlenirken pH'nın düşürülmesi enzim aktivitesini düşürerek enzimatik esmerleşmeyi önleyebilir.
- Pastörizasyon formlarının belirlenmesinde elde edilen termal inaktivasyon sıcaklıkları önemlidir.

## KAYNAKLAR

ANON, 2007. <http://www.bahce.biz/bitki/meyve/visne.htm>

ANON, 2006. FAO Web Page, <http://apps.fao.org>.

AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry. Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co. KGa, Germany.

ARSLAN, O., ERZENGIN, M., SINAN, S. ve ÖZENSOY, 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.

ASTARCI, E., 2003. Production and biochemical characterization of polyphenol oxidase from *thermomyces lanuginosus*, ODTÜ, Ankara.

AYAZ, F.A., DEMİR, O., TORUN H., KOLCUOĞLU Y. ve ÇOLAK, A., 2008. Characterization of Polyphenoloxidase (PFO) and Total Phenolic Contents in Medlar (*Mespilus germanica* L.) Fruit During Ripening and Over Ripening, Science Direct, Food Chemistry, 106: 291–298.

AYDEMİR, T., 2004. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Food Chemistry, 87: 59–67.

BEŞEL, E., 2003, Use of Triton X-114 Aqueous Two Phase System for Recovery of Mushroom (*Agaricus Bisporus*) Polyphenoloxidase. Yüksek Lisans Tezi. ODTÜ, Ankara.

BARTHET, V. J. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot Esculenta*C.) Root: Extraction, Purification and Characterization, Submitted to Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGiU (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.

BRADFORD, M. M., 1976. Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

- CEMEROĞLU, B., YEMENİCİOĞLU, A. ve ÖZKAN, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:24, Ankara.
- CHUTINTRASRIA, B. ve NOOMHORMB, A., 2006. Thermal Inactivation of Polyphenoloxidase in Pineapple Puree, LWT - Food Science and Technology, 39: 492–495.
- COSETENG, M.Y. ve LEE C.Y., 1987. Changes in Apple Polyphenol oxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. Journal of Food Science, 52: 985-989.
- ÇİL M., 2006. Glukoz oksidaz ve polifenol oksidaz iletken kopolimerpoli(N-(4-(3-tiyenilmetilen)-oksikarbonilfenil)maleimid)-pirol)(P(MBThico-Py)Matrisinde tutuklanması. Yüksek lisans tezi. ODTÜ, Ankara.
- DELICADO,E. N, MEGIAS, M.S., LOPEZ, A.J.P. ve NICOLAS, J.M.L., 2007.Characterization of Polyphenol Oxidase from Napoleon Grape, FoodChemistry, 100:108–114.
- DOĞAN, M., ARSLAN, O. ve DOĞAN, S., 2002. Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Different Aubergine Cultivars International Journal of Food Science and Technology, 37: 415-423.
- ERAT, M., SAKIROGLU, H. ve KUFREVIOGLU, O. I., 2006. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Ferula sp., Food Chemistry, 95: 503– 508.
- ERZENĞİ, M., 2002. Farklı kaynaklardan afinite kromatografisiyle polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- GAWLIK-DZIKI, U., SZYMANOWSKA U. ve BARANIĄK B., 2006. Department of Biochemistry and Food Chemistry, Agricultural University, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland
- GODFREY, T. ve WEST, S., 1996. Industrial Enzymology. Stockton Pres, New York.
- GÖRMEZ, V. M.,2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado, Food Chemistry 77 (2002) 163-169.

- GÜLÇİN, İ., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ. ve OKTAY, M., 2005. Purification and Characterization of Polyphenol oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3):297-302.
- GÜRBÜZOĞLU, G., KARAOĞLAN, Ö., GÖKKAYA, Ö. ve SOLCUN, M., 2005, Beyaz Kiraz, Selçuk Üni. Tarımsal İletişim Ödevi
- HALDER, J., TAMULI, P. ve BHADURI, A.N., 1998. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*), *Nutritional Biochemistry*, 9: 75-80.
- HAMMER, F. E. (1993) Oxidoreductases. In *Enzymes in Food Processing*, T.Nagodawithana and G. Reed (ed.s). Academic Pres, San Diego, pp 221-222.
- KAYIKÇI, C.A., 1990. Dormansi (uyku) dönemine geçiş sürecinde oluşturan Türk çaylarının polifenol oksidaz, Cu, Mg, Zn ve Fe seviyelerindeki değişimler. Yüksek Lisans Tezi. KTÜ, Trabzon.
- KOLCUOĞLU, Y., 2005, Yabani ve yenebilir bir mantar olan *Macrolepiota Mastoideal*'da polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KATÜ, Trabzon.
- KOOLMAN, J. ve ROEHM, K. H., 2005. *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd Edition Thieme, Stuttgart, 88-94.
- MARANGONI, A. G., 2003. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, New Jersey: John Wiley & Sons, 140-157.
- MARSHALL, M. R., JEONGOK, K. ve WEI, C.-I., 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO.
- MAZZAFERA P. ve ROBINSON S.P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55: 285-296.
- MEMİŞOĞLU, N., YAĞLICA, M., DOĞAN, N. ve YABACI, S.N., 2005, Anamur Muzu Polifenol Oksidaz Enziminin Özellikleri, Çukurova Üniv. Lisans Tezi.
- MUCHUWETI, M., MUPURE, C. H., NDHLALA, A. R. ve KASIYAMHURU, A., 2006. Characterization of Polyphenoloxidase from *Uapaca kirkiana* Fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 328-332.

- NAGAI, T. ve SUZUKI, N., 2003. Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.), *Journal of Food Science* (68) issue 1, 16-20
- NAKAMURA, K., AMANO, Y. ve KAGAMI, M., 1983. Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. *Journal Enology Viticulture*, 34:122-127.
- RAMÍREZ, E. C., WHITAKER, J. R., ve VİRADOR, V. M. (2003) Polyphenol Oxidase. In *Handbook of Food Enzymology*. J. R. Whitakeri A. G. J. Voragen, D.W. S. Wong (Eds), Marcel Dekker, New York, pp 509-523.
- RAPEANU, G., LOEY, A. V., SMOUT, C. ve HENDRICKX, M., 2006. Biochemical Characterization and Process Stability of Poliphenoloxidase Extacted from Victoria Grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*) . *Food Chemistry*, 94: 253-261.
- RICHARDSON, T. ve HYSLOP, D. B. Enzymes. In *Food Chemistry*; Fennema, O. R., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1985; pp 371–476.
- ROCHA, A.M.C.N. ve MORAIS, A.M.M.B., 2001. Characterization of Polyphenoloxidase (PFO) Extracted from "Jonagored" Apple, *Food Control*,12: 85-90.
- SAĞLAM, F., 2007. Antosiyanince Zengin Dut, Kiraz ve Gilaburu Meyvelerindeki Fenolikler ve Antosiyanin Kapasitesi Üzerine Reçel Yapım İşleminin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya
- SAYGILI, N., LEBLEBİCİ, F. ve KÖKSEL, H. 1998. Farklı şeker pancarı türlerindeki polifenoloksidaz varlığının araştırılması. *Gıda Dergisi*, (98/3); 165 –169.
- SERRADELL, M. A., ROZENFELD, P. A., MARTINEZ, G. A., CIVELLO, P.M.,CHAVES, A. V. ve ANON, M. C., 2000. Polyphenoloxidase Activity From Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and Partial Purification, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1421-1427.
- ÜNAL, M. Ü. ve ŞENER, A., 2006. Determination of Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journalof the Science of Food and Agriculture*, 86: 2374-2379.

- ÜNAL, M. Ü., 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100(3):909-913.
- WHITAKER, J. R., 2003. Enzyme Catalyzed Reactions: Experimental Factors that Affect Rates, *Handbook of Food Enzymology* (Editörler; Whitaker, J.R., Voragen, A. G. J. ve Wong D. W. S) Marcel Dekker, New York, 31-65.
- YABACI, S., 2008. Çay bitkisi polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana.
- YAĞAR, H., 2004. Some Biochemical Properties of Poliphenol Oxidase from Celery, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, (4) 34: 378–397.
- YANG, Y. ve WANG, Z., 2008. Some Properties of Polyphenol Oxidase from Lily, *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 102–107.
- YEMENİCİOĞLU, A. ve CEMEROĞLU, B., 1996. Halen Haven Şeftalilerinde Polifenol oksidaz enziminin bazı nitelikleri. *Tr.j. of Agriculture and Forestry* 22(1998)261-265.
- YEMENİCİOĞLU, A., ÖZKAN, M. ve CEMEROĞLU, B., 1997. Heat Inactivation Kinetics of Apple Polyphenoloxidase and Activation of its Latent Form. *Journal of Food Science*, 62(3): 508-510.
- YILMAZ, E., 2007. İspir şeker fasülyesinden elde edilen polifenoloksidaz enziminin bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- YORUK, R. ve MARSHALL, M. R., 2003. Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27: 361-422.
- ZAWİSTOWSKİ, J., BİLİADERİS, C. G. ve ESKİN, N. A. M. (1991) Polyphenol Oxidase. In *Oxidative Enzymes in Foods*. D. S. Robinson and N. A. M. Eskin (Eds), Elsevier, pp 217-273.
- ZİYAN, E. ve PEKYARDIMCI, Ş., 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27:217-225.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ereğli/Konya'da, lise öğrenimimi İzmir'de tamamladım. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans öğrenimime başladım. 2006 yılında Gıda Mühendisi unvanı ile mezun oldum. Yine aynı sene Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.