

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ARAP KIZI YEREL ELMA ÇEŞİDİNDE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI
KİLLERLE İMMOBİLİZASYONU VE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Özge MİLLİOĞLU

**Danışman
Doç. Dr. Dudu DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2019**



© 2019 [Özge MİLLİOĞLU]

TEZ ONAYI

Özge MİLLİOĞLU tarafından hazırlanan "Arap Kızı Yerel Elma Çeşidinde Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Killerle İmmobilizasyonu ve İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Dudu DEMİR

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf UÇAR

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Özge MİLLİOĞLU



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyaller.....	24
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	24
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	25
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması	30
3.2.2. Amonyum sülfatla çöktürme	30
3.2.3. Diyaliz	31
3.2.4. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	31
3.2.5. Afinite jellerinin hazırlanması.....	31
3.2.6. Enzim çözeltilisinin afinite kolonuna tatbiki ve elüsyon işlemi...	32
3.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığının tespiti	33
3.2.8. Kalitatif ve kantitatif protein tayini	34
3.2.9. PPO enziminin aktivite tayini	35
3.2.10. Optimum pH ve sıcaklık çalışması	35
3.2.11. Optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması	36
3.2.12. Bazı killerle PPO enziminin immobilizasyonu ile killerin inhibisyon etkisi, IC_{50} ve K_i değerlerinin bulunması	36
3.2.13. Serbest PPO enzimine killerin inhibisyon etkisi, IC_{50} ve K_i değerlerinin bulunması	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri	38
4.2. Elma PPO Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması.....	39
4.3. Elma PPO Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
4.4. Arap kızı PPO Enziminin Farklı Substratlar için Optimum pH ve Sıcaklık Çalışması	42
4.5. Optimum pH ve Sıcaklıkta Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Tespit Edilmesi	59
4.6. Bazı Killerle PPO Enziminin Immobilizasyonu ile Killerin İnhibisyon Etkisi IC_{50} ve K_i Değerlerinin Tespit Edilmesi.....	62
4.7. Serbest PPO Enzimine Killerin İnhibisyon Etkisi IC_{50} ve K_i Değerlerinin Tespit Edilmesi	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	70
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ARAP KIZI YEREL ELMA ÇEŞİDİNDE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI KİLLERLE İMMOBİLİZASYONU VE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Özge MİLLİOĞLU

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Dudu DEMİR

Isparta ilinde yetiştirilen yerel elma çeşidimiz olan Arap kızı elmasından (*Malus domestica*) polifenol oksidaz enzimi (PPO) saflaştırılmıştır. Polifenol oksidaz enzimi fosfat tamponunda izole edildikten sonra amonyum sülfat çöktürme, diyaliz ve Sepharose 4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jelinin ardarda kullanılmasıyla saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

Optimum pH ve sıcaklık değerlerini belirlemek için farklı pH değerlerinde (4.5-9.0) ve farklı sıcaklık aralığında (10-45°C) üç farklı substrat kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Arap kızı PPO enziminin farklı substratlara karşı K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile katekol substratı için 50 mM ve 2500 U/mL'de; 4-metil katekol substratı için 2 mM ve 2000 U/mL'de; pirogallol substratı için 6 mM ve 10000 U/mL'de olarak bulunmuştur. Pirogallol substratının Arap kızı PPO enzimi için en uygun substrat olduğu belirlenmiştir. Pirogallol substratı için optimum pH 8.5 ve optimum sıcaklık 10°C olarak bulunmuştur.

Saflaştırılan PPO enziminin üç farklı kile (kırmızı, yeşil ve beyaz) immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PPO enziminin immobilize edildiği ve ölçüm sırasında eklendiği serbest enzim için inhibisyon tipleri, IC_{50} ve K_i değerleri belirlenmiştir. Hem immobilize enzim hem de serbest enzim için etkili inhibitörün beyaz kil olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, elma, saflaştırma, kil, immobilizasyon, inhibisyon.

2019, 82 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME AND INVESTIGATION OF IMMOBILIZATION WITH DIFFERENT CLAYS AND THEIR INHIBITION EFFECTS USING LOCAL APPLE VARIETY ARAP KIZI

Özge MİLLİOĞLU

Isparta University of Applied Sciences
The Institute for Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dudu DEMİR

The Polyphenol oxidase enzyme was purified from Arap kızı apple (*Malus domestica*), a local apple cultivar, grown in Isparta province. The PPO enzyme was extracted in phosphate buffer and purified by the sequential use of ammonium sulfate precipitation, dialysis, and Sepharose 4-B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity gel. The enzyme molecular weight was estimated by SDS-PAGE.

To determine the optimum pH and temperature values, the activities were measured using three different substrates at different pH (4.5-9.0) and temperature ranges (10-45°C). K_M and V_{max} values of PPO enzyme against different substrates were determined by the Lineweaver-Burk method as 50 mM and 2500 U/mLmin for catechol substrate; 2 mM and 2000 U/mLmin for 4-methyl catechol substrate; 6 mM and 10000 U/mLmin for pyrogallol substrate. Pyrogallol substrate was found to be the most suitable substrate for the PPO enzyme. Optimum pH was 8.5 and optimum temperature was 10°C for the pyrogallol substrate.

Purified PPO enzyme was immobilized on to three different clays (red, green and white). Inhibition types, IC_{50} and K_i values for immobilized PPO and free enzyme, which was added during the measurements, were determined. The most effective inhibitor for both the immobilized and the free enzyme was white clay.

Keywords: Polyphenol oxidase, apple, purification, clay, immobilization, inhibition.

2019, 82 pages

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Dudu DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü yöneticilerine ve manevi desteğini esirgemeyen öğretim elemanlarına; çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Servet Millioğlu'na ve her daim yanımda olan arkadaşım Nida Oktay'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Özge MİLLİOĞLU
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Arap kızı elmasındaki enzimatik esmerleşme.....	3
Şekil 3.1. Çalışılan kil çeşitleri (a) kırmızı kil, (b) yeşil kil ve (c) beyaz kil ...	29
Şekil 4.1. Bradford yöntemine göre protein standart grafiği	38
Şekil 4.2. p-aminobenzoik asit afinite kolonunun pH:5.0'de Na ₂ HPO ₄ tamponu ile yıkanması işleminden sonra Arap kızı elması PPO enziminin 0.05 M pH:7.0 Na ₂ HPO ₄ /1 M NaCl tamponu ile elüsyonu	40
Şekil 4.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezleri: a) Arap kızı elma PPO enzimi ham ekstraktı b) Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jeli ile saflaştırılan Arap kızı elma PPO enzimi	42
Şekil 4.4. PPO enziminin 10°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	51
Şekil 4.5. PPO enziminin 15°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	51
Şekil 4.6. PPO enziminin 20°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	52
Şekil 4.7. PPO enziminin 25°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	52
Şekil 4.8. PPO enziminin 30°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	53
Şekil 4.9. PPO enziminin 35°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	53
Şekil 4.10. PPO enziminin 40°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	54
Şekil 4.11. PPO enziminin 45°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	54
Şekil 4.12. PPO enziminin katekol substratı için farklı pH'ya bağlı aktivite değişimi gösteren grafik.....	56
Şekil 4.13. PPO enziminin 4- metil katekol substratı için farklı pH'ya bağlı aktivite değişimi gösteren grafik	57
Şekil 4.14. PPO enziminin pirogallol substratı için farklı pH'ya bağlı aktivite değişimi gösteren grafik.....	58
Şekil 4.15. Arap kızı PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	59
Şekil 4.16. Arap kızı PPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	60
Şekil 4.17. Arap kızı PPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	61
Şekil 4.18. Kırmızı kil içinde immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC ₅₀] (g/mL) grafiği	62
Şekil 4.19. Yeşil kil içinde immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC ₅₀] (g/mL) grafiği ..	63
Şekil 4.20. Beyaz kil içinde immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC ₅₀] (g/mL) grafiği	63
Şekil 4.21. Kırmızı kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ([K ₁] = 3.0 x 10 ⁻² g/mL, [K ₂] = 3.8 x 10 ⁻² g/mL)	64
Şekil 4.22. Yeşil kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ([Y ₁] = 6.0 x 10 ⁻² g/mL, [Y ₂] = 7.0 x 10 ⁻² g/mL).....	64

Şekil 4.23. Beyaz kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ($[B_1] = 2.3 \times 10^{-2}$ g/mL, $[B_2] = 3.1 \times 10^{-2}$ g/mL)	65
Şekil 4.24. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan kırmızı kil üzerine 0,1 M pirogallol substratında % Aktivite- $[IC_{50}]$ (g/mL) grafiği	66
Şekil 4.25. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan yeşil kil üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite- $[IC_{50}]$ (g/mL) grafiği .	67
Şekil 4.26. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan beyaz kil üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite- $[IC_{50}]$ (g/mL) grafiği .	67
Şekil 4.27. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan kırmızı kil için inhibisyon etkisi ($[K_1] = 6.8 \times 10^{-2}$ g/mL, $[K_2] = 7.5 \times 10^{-2}$ g/mL)	68
Şekil 4.28. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan yeşil kil için inhibisyon etkisi ($[Y_1] = 5.8 \times 10^{-2}$ g/mL, $[Y_2] = 6.6 \times 10^{-2}$ g/mL)	68
Şekil 4.29. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan beyaz kil için inhibisyon etkisi ($[B_1] = 0.9 \times 10^{-1}$ g/mL, $[B_2] = 1.7 \times 10^{-1}$ g/mL)	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	28
Çizelge 3.2. Killerin polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon derecelerini hesaplamak için kullanılan kil konsantrasyonları	37
Çizelge 4.1. Arap kızı elması PPO enziminin saflaştırma tablosu	41
Çizelge 4.2. Arap kızı PPO enziminin 10°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	43
Çizelge 4.3. Arap kızı PPO enziminin 15°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	44
Çizelge 4.4. Arap kızı PPO enziminin 20°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	45
Çizelge 4.5. Arap kızı PPO enziminin 25°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	46
Çizelge 4.6. Arap kızı PPO enziminin 30°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	47
Çizelge 4.7. Arap kızı PPO enziminin 35°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	48
Çizelge 4.8. Arap kızı PPO enziminin 40°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	49
Çizelge 4.9. Arap kızı PPO enziminin 45°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm), aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri	50
Çizelge 4.10. Arap kızı PPO enziminin üç ayrı substratı için farklı sıcaklıklardaki optimum pH değerleri.....	55
Çizelge 4.11. Arap kızı PPO enziminin üç ayrı substrat için optimum pH, optimum sıcaklık (°C) ve aktivite (U/mLdak) değerleri	55
Çizelge 4.12. Arap kızı elma PPO enziminin katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri.....	59
Çizelge 4.13. Arap kızı elma PPO enziminin 4-metil katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri	60
Çizelge 4.14. Arap kızı elma PPO enziminin pirogallol substratı için K_M ve V_{max} değerleri.....	61
Çizelge 4.15. Arap kızı immobilize PPO enzimi üzerine 0,1 M pirogallol substratı konsantrasyonunda $[IC]_{50}$ ve K_i inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları	65
Çizelge 4.15. Arap kızı serbest PPO enzimi üzerine 0,1 M pirogallol substratı konsantrasyonunda $[IC]_{50}$ ve K_i inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EC	Enzim komisyon numarası
EU ya da U	Enzim ünitesi
K_M	Michaelis sabiti
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PPO	Polifenol oksidaz
TEMED	N, N, N', N' -tetrametil etilendiamin
UV	Ultraviyole
V_{max}	Maksimum hız
°C	Santigrad derece



1. GİRİŞ

Elma, *Rosaceae* ailesine ait olan ılıman iklim kuşağında değişik ekolojilerde yetiştirilebilen, dünya üzerinde çok geniş yayılma alanı gösteren meyvelerin tarımsal açıdan en önemlileri arasında yer alır (Chen vd., 2007).

Kültür elması olarak bilinen elma (*Malus domestica*)'nın sınıflandırılmasını aşağıdaki şekilde belirtmek mümkündür (Anonim, 2015).

Bölüm : Spermatophyta
Alt Bölüm : Angiospermae
Sınıf : Dicotyledoneae
Takım : Rosales
Familya : Rosaceae
Alt familya : Pomoideae
Cins : *Malus*
Tür : *Malus domestica* L.

Dünya elma üretimi yaklaşık 89 milyon ton olup Türkiye bu üretimin 2.925 milyon tonunu karşılamaktadır (FAO, 2016). Türkiye'de 2017 verilerine göre 3032164 ton elma üretimi gerçekleşmiştir. Isparta ili bu üretimin yaklaşık % 20.4'ünü sağlayarak 617375 tonluk üretim ile birinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2017). Isparta ilini elma üretiminde Niğde, Karaman ve Antalya illeri izlemektedir. Ülkemizde elma üretimi yüksek miktardadır. Fakat buna rağmen ihraç edilen elma miktarı % 5'i geçmemektedir. Isparta içinde bulunduğu bölgenin ekolojik koşulları sayesinde elma yetiştiriciliğinde yüksek verim ve kaliteyi yakalamaktadır. Özellikle Eğirdir, Gelendost, Senirkent, Yalvaç ve Gönen ilçeleri başta olmak üzere Isparta genelinde elma üretimi yapılmaktadır (Anonim 2018a). Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü ve Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsüne ait arazi gen bankalarında, yerli ve yabancı orijinli 400'ü aşkın elma tip ve/veya çeşidi muhafaza altında tutulmaktadır. Bu araştırma enstitülerinde Amasya, Arap kızı ve Hüryemez gibi bazı yerli elma çeşitleriyle kurulu bahçelere rastlanılmaktadır. (Atay ve ark., 2011).

Arap kızı yerli elma çeşidi, ağacı kuvvetli, yarı dik gelişen, verimli bir çeşittir. Meyve iriliği orta büyüklüktedir. Meyve şekli ise yuvarlağa yakın hafif koniktir. Meyve kabuğu yeşil-sarı zemin üzerine koyu kırmızı ve küçük benekli olup sap çukuru çevresi hafif paslı bir yapıya sahiptir. Meyve içi ise açık krem renkte, sert ve gevrekli. Orta dönemde çiçeklenerek eylül sonu hasat edilir. Arap kızı, *Golden delicious* tarafından tozlanır. Kendine has mayhoş tadı, sulu olması ve aroması sebebiyle bazılarının çok severek tükettiği bir elma çeşididir (Anonim, 2018b).

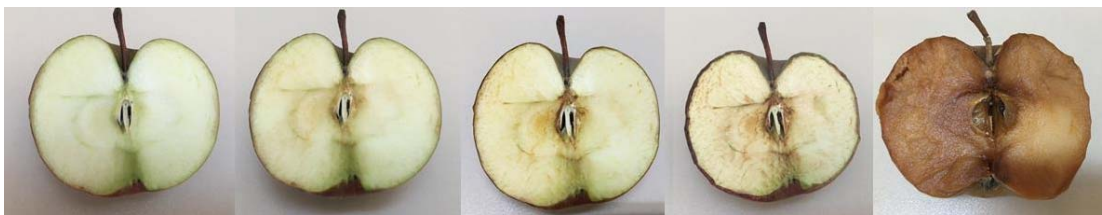
Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir. Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi), diğeri ise *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi). Kresolaz ve katekolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler oluşturur (Whitaker, 1972; Friedman,1997). PPO tirozinaz, fenolaz, katekoloksidad, katekolaz, *o*-difenoloksidad, mono fenoloksidad ve kresolaz olarak da bilinmektedir. 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 benzokinonları oluşturmaktadır (Mayer, 1979). Polifenol oksidaz enzimleri substrat spesifikliklerine ve etki mekanizmalarına göre başlıca üç sınıfa ayrılır. Bunlar; katekolaz (EC 1.10.3.1), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve tirozinaz (EC 1.14.18.1) olarak bilinmektedir (Güray, 2009).

Polifenol oksidaz enziminin ilk defa Schoenbein tarafından 1856 yılında yemeklik mantarlarda bulunduğu bildirilmektedir (Whitaker, 1972). Polifenol oksidaz doğada yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol miktarda bulunduğu bilinmektedir. Bitkilerin tüm kısımlarında bulunabilirken, gelişmiş

hayvanların deri, saç, tüy ve gözlerinde bulunduğu bilinmektedir (Mayer, 1979). Ayrıca, bazı toprak türlerinin de polifenol oksidaz enzimi içerdiği bildirilmektedir (Sarkar vd., 1989; Mos'ko vd., 1992).

Meyve ve sebzelerde görülen enzimatik esmerleşme, organizmadaki fenolik bileşiklerin kinona dönüşmesi, kinonların polimerleşmesi ve bunun sonucunda kahverengi, kırmızı, siyah pigmentlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır (Mayer, 1979). Enzimatik esmerleşme, polifenol oksidaz enzimi, fenolik substratlar ve oksijen; pH, sıcaklık ve su aktivitesi açısından uygun koşullar altında bir araya geldiklerinde meydana gelir. Pek çok meyve ve sebzenin kesilmesi, kabuğunun soyulması, parçalanması ya da hasar görmesi enzimatik esmerleşmenin gerçekleşmesine neden olmaktadır (Mathew ve Parpia, 1971; Memişoğlu vd., 2005; Vamos-Vigyazo, 1981).

Enzimatik esmerleşme, taze veya işlenmiş meyve ve sebzelerde istenmeyen renkler ve istenmeyen lezzetler meydana getirir. Enzimatik esmerleşme, meyve ve sebzelerin estetik kalite kaybına ek olarak, askorbik asit gibi besin maddelerinin yok edilmesiyle beslenme kalitesini de düşürmektedir (Hsu vd., 1988). Ürünün görünümünü, lezzetini ve besin değerini düşürdüğü için de enzimatik esmerleşme reaksiyonları istenmemektedir (Mathew ve Parpia, 1971; Memişoğlu vd., 2005; Vamos-Vigyazo, 1981). Arap kızı elmasında meydana gelen enzimatik esmerleşme aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Arap kızı elmasındaki enzimatik esmerleşme

Polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu enzimatik esmerleşme reaksiyonları bazı besin teknolojisi dallarında ürünlerin bu enzim reaksiyonuyla istenen son ürün karakteristiklerine kavuşmaları için önemli olduğundan istenmektedir. Örneğin, kakao, kahve, siyah çay, siyah incir, siyah üzüm ve kuru erik

üretiminde enzimatik esmerleşme istenilen bir durumdur (Mathew ve Parpia, 1971; Memişoğlu vd., 2005; Vamos-Vigyazo, 1981).

Enzimlerin *in vitro* ve *in vivo* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından düşürülmesi veya tamamen durdurulmasına 'enzim inhibisyonu' denilmektedir. Enzimlerin inaktif edilmesi (direkt enzimi etkilemek), substratın inaktif edilmesi (fenolik bileşikler ya da oksijen gibi substratları uzaklaştırmak) ve ürünle ilgili inaktivasyon (ürün bileşimini değiştirmek) yollarıyla enzim inhibisyonu gerçekleştirilebilmektedir. Enzim inhibisyonuna neden olan bileşiklere inhibitör adı verilmektedir. İnhibitörlerin büyük bir bölümü gıda işletmesinde kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitör, ürün ve işlemin çeşidine bağlı olarak değişmektedir (Akbulut, 2011).

Enzimatik esmerleşmenin gerçekleşebilmesi için polifenol oksidaz enzimi, bunun etkilediği polifenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekmektedir. Aynı zamanda, sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların da uygun olması gerekmektedir (Pekyardımcı, 1992). Polifenol oksidaz enziminin neden olduğu esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi için enzim inhibe edilmelidir (Pekyardımcı ve Balaban, 1992). Enzimatik esmerleşme polifenol oksidaz enzimi, fenolik madde ve moleküler oksijenden birinin ortadan kaldırılmasıyla azaltılabilir veya durdurulabilir. Bu tür enzimatik esmerleşme reaksiyonları substratların uzaklaştırılması, ısı inaktivasyonu, askorbik asit ve sodyum sülfid ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanmasıyla önlenmektedir (Pekyardımcı, 1992). Polifenol oksidaz enzimini inaktive ederken enzimatik esmerleşmeyle sonuçlanan ürün kayıplarının en aza indirilmesi dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biridir. Polifenol oksidaz enzimini inaktive etmek için pek çok yöntem denenmiştir. Genellikle enzimi inaktive etmek için ısı uygulamaları ve esmerleşme karşıtı kimyasal ajanlar kullanılmaktadır (Yılmaz ve Elmacı, 2018).

İmmobilizasyon kelimesi hareketi sınırlamak anlamına gelmektedir (Uruç, 2007). İmmobilize enzim kelimesi ise enzimin aktivitesini kaybetmeden belli bir

bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi anlamına gelmektedir (Chibata, 1978). Enzimleri immobilize etmek için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Adsorbsiyon, tutuklama yöntemi, kovalent bağlama ve iyonik bağlama ile immobilizasyon yöntemleri bunlardan bazılarıdır. Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerden biri adsorbsiyon ile immobilizasyon yöntemidir. Suda çözünmeyen, yüzey aktif bir adsorbanın enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzimin fazlasının iyice yıkanmasıyla uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Van der waals kuvvetleri adsorbsiyon yönteminde enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkilidir. Enzimle taşıyıcı arasında kovalent bir bağ oluşumuna dayanan immobilizasyon yöntemi ise kovalent bağlama ile immobilizasyondur. Kovalent bağlama ile immobilizasyon işlemi, enzim yüzeyindeki aminoasit rezidülerine ait fonksiyonel gruplarla taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasında gerçekleştirilir. Gerçekleştirilmesi zor bir yöntemdir. İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanan immobilizasyon yöntemi ise iyonik bağlama ile immobilizasyondur. Bu yöntem, çok yumuşak koşullarda gerçekleştiği için enzimin aktif merkezinde ve konformasyonunda bir değişikliğe neden olmamaktadır. Fakat iyonik bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusu olabilmektedir. Enzimin belirli bir alanda durmaya zorlanmasıyla gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemi ise tutuklama yöntemi ile immobilizasyondur. Tutuklama işlemi, polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir (Bickerstaff, 1997).

Anorganik yapılı, kil, aktif karbon, cam, bentonit, silikajel, hidroksiapatit, titan dioksit, zirkonyum dioksit, nikel oksit, ponza taşı, metaller, metal oksitler; doğal polimerler, nişasta, selüloz, dextran, agur-agaroz, kollogen, karagenan, jelâtin-albümin, kitin-kitozan, ipek; sentetik polimerler, naylon, polisitiren türevleri, poliakrilamid, vinil ve alil polimerler, iyon değiştirici reçineler enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Bunların arasından killer, ucuz maliyetleri, kolay ve bol miktarlarda bulunabilmeleri sebebiyle eski tarihten günümüze endüstride çok kullanılan malzemeler olmuşlardır (Akbulut, 2011).

Kil tabakaları arasında bulunan zayıf bağlar polar sıvıların ve diğer iyonların buralara yerleşmesine izin vermektedir (Breen, 1999). Tetrahedral ve oktahedral kristal yapıdaki kil minerallerinin yüzeyinde negatif (anyon) yükler bulunmaktadır. Negatif yüklü kristaller elektriksel olarak nötrleşme eğiliminde oldukları için mevcut negatif yüke bağlı olarak, kil yüzeyi tarafından katyonlar kuvvetlice tutulurlar (Grim, 1968; Moore and Reynolds, 1989). Killerde meydana gelen etkileşim killeri organo-inorgano iyon veya bileşiklerle etkileştirerek immobilizasyon çalışmalarında önemli kılmaktadır (Akbulut, 2011).

Bu çalışmada, öncelikle polifenol oksidaz enzimi açısından zengin yerel elma çeşidimiz olan Arapkızı elmasından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Polifenol Oksidaz enziminin inaktif hale getirilebilmesi için öncelikle enzim aktivitesi ve özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bunun için, Isparta ilinde yetiştirilen, yerel üreticilerden temin edilen Arapkızı elma çeşidinden PPO enziminin bilinen Sepharose4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile saflaştırılması, K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Enzimatik esmerleşmenin kontrol edilmesi ve durdurulması için enzim, substrat ve oksijen faktörlerinden birinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla veya inhibitör eklenmesi ile mümkün olmaktadır. Bundan dolayı, Arapkızı elma çeşidinden saflaştırılan PPO enziminin bazı killere immobilizasyonu ile enzim inhibisyon etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili ve meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşmenin istenmemesinden dolayı esmerleşmenin ortadan kaldırılması ya da geciktirilmesi için günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Isparta ilinde yetiştirilen Arap kıızı elmasında polifenol oksidaz enziminin sepharose 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit afinite jeli ile saflaştırılması, karakterizasyonu, saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin killere immobilizasyonu ve inhibisyon etkilerinin incelenmesi ile ilgili daha önce yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, ilk defa yapılacak olması açısından büyük önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Elma polifenol oksidaz enzimi ile ilgili yurtdışında ve ülkemizde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir.

Elmada bulunan polifenol oksidaz enziminin aktivitesi büyük ölçüde elmanın cinsine bağlı olduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Walker, 1964; Vamos-Vigyazo, 1981).

Red Delicious (*Malus domestica*) elma çeşidinde polifenol oksidaz enzim sistemi çalışılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforez sonucu pirokatekol substratı ile tespit edilen 2 aktif izoenzim olduğu ortaya çıkmıştır. Ham enzim ekstraktının (aseton tozu) tanımlanan deneysel koşullarıyla esmerleşme reaksiyonu için optimum pH'sı 6.2, optimum sıcaklığı ise 30°C olarak belirlenmiştir. İki aktif enzim formu için ortalama Michaelis sabiti (K_M) 2.2×10^{-1} M pirokatekol ve ortalama maksimum hız (V_{max}) dakikada 4.8×10^{-1} AA390 olarak bulunmuştur (Satjawatcharaphong vd., 1983).

Amasya elması ve Golden Delicious elmasında polifenol oksidaz enzimi üzerinde çalışılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda Amasya elmasının polifenol oksidaz enzim aktivitesinin Golden Delicious'a göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Keleş, 1986).

İndirgeyici, karboksilik asit ve halojenür bileşiklerinin saflaştırılmış elma polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Askorbik asit, sistein veya bisülfid eklendiğinde, renk oluşumunda gecikme gözlenirken, oksijen alımının hemen gerçekleştiği gözlenmiştir. Bisülfidin aktiviteyi azaltan en etkili inhibitör olduğu bunu sistein ve askorbik asidin takip ettiği belirlenmiştir. Çalışılan tüm aromatik karboksilik asitlerin kompetitif inhibitör oldukları bulunmuştur. Bileşiklerdeki aynı tür yer değiştirme için sennamik, benzoik, fenilpropionik ve fenilasetik sırasına göre inhibisyon azalmıştır. Her seride, inhibisyon, *p*-hidroksi yer değiştirilmesiyle biraz arttırılmıştır ve *m*-metoksi yer değiştirilmesiyle büyük ölçüde azalmıştır. pH 5'ten 3.6'ya düşürüldüğünde inhibisyon artmıştır. Sonuçlar, karboksil grubunun nötr

formunun esasen inhibisyondan sorumlu olduğunu göstermiştir. NaF, NaCl, NaBr ve NaI sodyum halojenürlerinin verilen sıraya göre azalan inhibitör etki gösterdikleri bulunmuştur. pH 3.5-5 arasında değiştiğinde florür, karboksilik inhibitörleri ile aynı davranışı sergilemiştir. HF Ki değeri 4 μ M'a yakın olduğu için elma PPO enziminin en güçlü inhibitörü olarak bulunmuştur. Klorür, yarışmasız inhibitör olarak davranmıştır (Janovitz-Klapp vd., 1990).

Amasya elmasıyla yapılan başka bir çalışmada, polifenol oksidaz enzimi Amasya elmasından amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleri ile kısmen saflaştırılmıştır. Katekol, 4-metil katekol, pirogallol ve L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) substratları için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 34 mM, 2000 U/mL; 3.1 mM, 552 U/mL; 27.0 mM, 1215 U/mL ve 6.5mM, 27 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu substratlar için elde edilen optimum pH katekol için 7.0, 4-metil katekol için 9.0, pirogallol için 8.6 ve L-DOPA için 6.6 olarak belirlenmiştir. Amasya elmasındaki polifenol oksidaz enzimi aktivitesi için en uygun substratın katekol olduğu ve bu substrat için optimum sıcaklığın 18°C olduğu belirlenmiştir. Elektroforetik ayırmada, hem katekol hem de L-dopa substratları ile üç izoenzim olduğu bulunmuştur (Oktay vd., 1995).

Verdedoncella elmasından polifenol oksidaz enziminin monofenolaz aktivitesi üzerine çalışılmıştır. Elma polifenol oksidaz (PPO) enzimi, ilk kez Triton X-114 ile iki ardışık faz bölme kullanılarak izole edilmiş ve kısmen saflaştırılmıştır (Espin vd., 1995).

'Kog yoku (Jonathan)', 'Fuji', 'Mutsu', 'Jona Gold' ve 'Tsugaru' beş elma çeşidinin PPO aktivitesi ve esmerleşme, (-)epikateşin, (+)-katekin ve klorojenik asit gibi polifenollerin içeriği arasındaki ilişki araştırılmıştır. Polifenol, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. Klorojenik asit (3-25 mg/100g meyve) başlıca polifenol olarak bulunmuştur. Klorojenik asit ve kateşinler esmerleşerek hızlıca azalmıştır. Kateşinler klorojenik asitten daha fazla esmerleşmeye katkıda bulunmuştur. Substrat olarak klorojenik asit veya (+)-kateşin kullanılarak PPO aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Beş çeşit arasından Tsugaru çeşidinin yüksek PPO aktivitesine rağmen en az polifenol içerdiği ve en

az kahverengiye dönüştüğü tespit edilmiştir. Mutsu çeşidinin ise en yüksek polifenol içerdiği, en yüksek PPO aktivitesi ve en yoğun esmerleşme gösterdiği tespit edilmiştir. Polifenol içeriği ile esmerleşme korelasyon göstermiştir (Murata vd., 1995).

Ticari uygulama amacıyla *Malus pumila* L *Bramley's Seedling* elmasından elma polifenol oksidaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması için uygun bir yöntem geliştirilmiştir. Elma yaprağından izole edilen polifenol oksidaz enzim verimi meyveden elde edilenden daha yüksek bulunmuştur. Elma yaprağından, 5.0 ml l⁻¹ Triton X-100 ve 2.5 g l⁻¹ polivinilpirolidin içeren, pH değeri 7 olan 20 mM fosfat tamponunda elma polifenol oksidaz enzimi izole edilmiştir. Ekstrakt, santrifüj işlemiyle veya 2 haftalık bir süre bekletilerek berrak hale getirilmiştir. Akabinde elma polifenol oksidaz enziminin, DEAE (diethylaminoethyl)-Sephadex ve ultrafiltrasyonun ardışık kullanılmasıyla 50 kat saflaştırılması yapılmıştır. Elma PPO'nun geri kazanılmış spesifik aktivitesi ve maliyeti için optimize edilmiş kullanımı ile DEAE-Sephadex'i daha önceden şişirerek uygulamışlardır. Kısmen saflaştırılmış elma PPO enziminin spesifik aktivitesi substrat olarak floridzin ve 4-metil katekol kullanılarak, sırası ile 0.089 ve 4.9 µkat mg⁻¹; K_M değerleri ise sırası ile 0.6 ve 3.6 mM olarak bulunmuştur (Ridgway ve Tucker, 1999).

Ticari olgunlukta hasat edilen bazı elma çeşitlerinin bileşimsel karakterizasyonu araştırılmıştır. Bu elma çeşitlerindeki fenolik bileşiklerin ve polifenol oksidaz aktivitesinin seviyeleri analiz edilmiştir. Alwa, Boskoop, Close, Elstar, Idared, Jonagold, Lobo, Papierówka, Szampion ve Warta elma çeşitleri için polifenol oksidaz enzim aktivitesi sırasıyla 2750 U/g, 2500 U/g, 680 U/g, 2520 U/g, 1560 U/g, 1380 U/g, 3000 U/g, 960 U/g, 270 U/g, 3120 U/g olarak bulunmuştur. Bazı fenolik bileşiklerin konsantrasyonları arasında, PPO aktivitesi ile fenolik veya askorbik asit konsantrasyonları arasında korelasyon bulunmamıştır (Podsędek vd., 2000).

'Enokitake' mantarından (*Flammulina velutipes*) %70 aseton, %70 etanol ve sıcak su olmak üzere üç farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstrenin elma esmerleşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır (Jang vd., 2002).

Olgunlaşmış elmalardaki çözünür ve plastidal polifenol oksidaz enzimleri karşılaştırılmıştır. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi başlıca çoğu elmanın plastidal fraksiyonunda saptanmıştır, ancak bazen çözünür fraksiyonda plastidal fraksiyona göre daha kuvvetli bir şekilde tespit edilmiştir. Western blot analizi sonucunda hem plastid hem de çözünen fraksiyonlardaki polifenol oksidaz enzimleri aynı bant olarak saptanmıştır. Yüksek çözünür polifenol oksidaz enzim aktivitesine sahip olan bazı elmalar tam bir banda ek olarak ayrılmış PPO bandı göstermiştir. Çözünmüş, çözünür ve plastidal PPO'lar benzer optimum pH (yaklaşık 4) ve K_M değerlerine (yaklaşık 100 μM) sahiptir. Ancak, çözünmüş PPO enzimi en yüksek V_{max} değeri ve çözünür PPO enzimi en düşük V_{max} değeri göstermiştir (Tsurutani vd., 2002).

Elma (Braeburn çeşidi)'dan izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik parametreleri substrat olarak caffeoylquinic asit kullanılmasıyla belirlenmiştir. Elma çeşitlerinin sırasının parenkima dokusundan DPn'nin 80, 10.5 ve 4 üç elma prosiyanidin fraksiyonu saflaştırılmıştır. Oksidasyon ürünlerini oluşturmak için; prosiyanidinler, caffeoylquinic asit, (-)-epikateşin ve caffeoylquinic asit ve (-)-epikateşin karışımı caffeoylquinic asit *o*-kinonu ile reaksiyona sokularak oksitlenmiştir. Tüm fraksiyonların, polifenol oksidaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. DPn ile artan inhibisyon kuvveti, doğal prosiyanidinler polifenol oksidaz enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi DPn 80'in 0.026 g / L fraksiyonu, DPn 10.5'in 0.17 g / L fraksiyonu ve DPn 4'ün 1 g / L fraksiyonları için % 50 azaldığı görülmüştür. Oksitlenmiş prosiyanidinlerin inhibitör etkisi, doğal prosiyanidinlerin iki katı bulunmuştur. Caffeoylquinic asit ve (-)-epikateşin oksidasyon ürünleri de polifenol oksidaz enzimini inhibe etmiştir (Le Bourvellec vd., 2004).

Van elmasından (Golden Delicious) polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat ve DEAE selüloz ile 4.0 kat izole edilmiştir. Bu enzim için, optimum sıcaklık 50°C ve optimum pH 4 olarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. İnhibitör olarak potasyum siyanür, benzoik asit, sitrik asit, $MnCl_2$, NaCl, $NaNO_2$ ve $CuSO_4$ kullanılmıştır. Polifenol oksidaz enzim

aktivitesi 10 mM'da benzoik asit, CuSO_4 ve NaCl ile inhibe edilirken, NaN_2 , sitrik asit, KCN ve MnCl_2 ile arttırılmıştır (Demir vd., 2006).

Malus domestica Borkh. cv *Bramley's Seedling* elmadan polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, fenil sefaroj jeli, iyon değiştirme kromatografisi ve hidroksiapatit kromatografisiyle % 26.5 geri kazanım ile 75.7 kat saflaştırma yapılmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforeziyle moleköl ağırlılığının yaklaşık 45 kDa olarak tahmin edilmiştir. PPO aktivitesi için optimum pH 6.5'de gözlenmiştir ve pH 5.5 - 6.5 aralığında 72 saat depolama boyunca % 50'den fazla aktivitesini muhafaza ettiği belirlenmiştir. PPO aktivitesi için optimum sıcaklık 30° gözlenmiştir. 72 saat depolama boyunca 20°C - 30°C sıcaklık aralığında ve 24 saat depolama boyunca 40°C-50°C sıcaklık aralığında enzim aktivitesinin %50'den fazlası muhafaza edilmiştir. Çalışılan substratlardan 4-metilkatekol en yüksek PPO aktivitesine sahipken, bunu katekol, pirogallol ve (-)-epikateşin substratlarının izlediği görölmüştür çalışma sonucu, en etkili inhibitörlerin sodyum metabisülfid ve askorbik asit olduğu tespit edilmiştir (Eidhin vd., 2006).

Fuji elmalarının etli kısmından DEAE-Selüloz, amonyum sülfat çöktürme, fenil-Sepharose CL-4B ve Sephadex G-100 kromatografisiyle polifenol oksidaz enzimi izole edilmiştir. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin moleköl kütesinin 40 kDa olduğu tahmin edilmiştir. Substrat olarak klorojenik asit kullanıldığında en yüksek aktivite gösterdiği ve bu substratı kateşin ve katekolün izlediği görölmüştür. Substrat olarak hidrokinik asit, resorsitiol veya tirozin kullanıldığında saptanabilir bir aktiviteye rastlanılmamıştır. Substrat olarak katekol çalışıldığında optimum pH 6.5 ve sıcaklık 35°C derece olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 6.0'da en kararlı olduğu ve asidik pH'da kararsız olduğu tespit edilmiştir. Enzim, 45°C 'ye kadar ısıtıldığında stabildir. Fakat, 50°C 'de 30 dakikadan fazla bir süre boyunca ısıtıldığında %50'lik bir aktivite kaybı meydana gelmiştir. İndirgenmiş ZnSO_4 , L-sistein, epigallokateşin-3-o-gallat (EGCG) ve gallokateşin gallat (GCG)'da aktiviteyi inhibe etmiştir (Lim vd., 2006).

L-sisteinin elma polifenol oksidaz enzimi üzerine dönüşümlü inhibisyon etkisi çalışılmıştır. Kinetik çalışmalar sonucunda L-sistein ile polifenol oksidaz enzim inhibisyonunun yarışmasız inhibisyon olduğunu göstermiştir (Gacche vd., 2006).

Elma polifenol oksidaz aktivitesinin sodyum klorür ile inhibisyonuna çalışılmıştır. Sodyum klorür elma polifenol oksidaz enzimi üzerine güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. 10 mM sodyum klorür varlığında enzim aktivitesinin %30'unu kaybetmiştir, buna benzer bir şekilde pH 4.5'ta da en belirgin inhibisyon göstermiştir. pH 4.0'de ise PPO aktivitesinde %26'lık bir azalma gözlenmiştir. Dixon ve Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak, sodyum klorürün elma PPO katekol oksidasyonunda karışık-inhibitör olduğu belirlenmiştir (Lu vd., ,2006).

β -siklodekstrin, 4-heksilresorkinol ve metil jasmonat ile farklı substrat konsantrasyonlarında Red Delicious elmasındaki polifenol oksidaz enzim inhibisyonu incelenmiştir. Klorojenik asit substrat olarak kullanılmıştır. Çalışılan her üç madde de tüm substrat konsantrasyonlarında inhibitör etkisi göstermiştir. İnhibisyon sabiti K_i değerlerine bakıldığında, inhibitör kuvvetinin 4-heksilresorkinol, β -siklodekstrin, metil jasmonat şeklinde azaldığı belirlenmiştir. 4-heksilresorkinol yarışmalı tip inhibisyon göstermiştir ve K_i değeri 0.26 mM bulunmuştur. β -siklodekstrin ve metil jasmonat karışık tip inhibitor olarak davranmışlardır (Alvarez-Parrilla vd., 2007).

Golden Delicious elmasında polifenol oksidaz enzimi üzerine sulu klor dioksit muamelesinin etkileri araştırılmıştır. Artan klor dioksit konsantrasyonu ile V_{max} değerinin düştüğü ve K_M değerinin düzensiz değiştiği gözlenmiştir. Klor dioksit konsantrasyonu arttıkça, polifenol oksidaz enzimi aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Fu vd., 2007).

Starking Delicious elma çeşidindeki PPO enziminin aktivitesi, kinetik davranışı ve termal inaktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Elma ekstraktındaki polifenol oksidaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri 4-metil katekol, pirogallol substratları

için sırasıyla 2.24 mM, 0.415 U/mL; 8.04 mM, 1.067 U/mL olarak bulunmuştur. Enzimin 4-metil katekol için optimum pH değeri 5.5, pirogallol için ise optimum pH değeri 7.2 bulunmuştur (Soysal, 2008).

Golden Delicious elma çeşidinin PPO enzimi ve elma esmerleşmesi üzerine yeşil çay özütünün etkilerine çalışılmıştır. PPO enzimi Golden Delicious elmasından izole edilmiştir. Polivinilpolipirrolidon ve Triton X100 ile ekstraksiyon yapılarak spesifik enzim aktivitesinde 6.45 kat artış sağlanmıştır. PPO enzim için optimum pH 5.5 ve optimum sıcaklık 25°C olarak bulunmuştur. Michaelis-Menten modeli kullanılarak 4-metil katekol substratı için K_M değeri 4.76 mM olarak belirlenmiştir. Yeşil çay özütünün elma PPO aktivitesini inhibe etmiştir. Elma PPO'suna karşı inhibitör etkisi, ekstraksiyon konsantrasyonunun artmasıyla artmıştır. 30 mg/mL yeşil çay özütünün eklenmesi, elmanın PPO aktivitesinde yaklaşık % 42 inhibisyonla sonuçlanmıştır. PPO'nun inhibisyon davranışını desteklemek için, elma dilimlerinin yeşil çay ekstraktına batırılmasıyla elmanın esmerleşmesi de araştırılmış ve elma dilimlerinin esmerleşmesinin yeşil çay ekstratı ile etkili bir şekilde geciktirildiği ortaya çıkmıştır (Soysal, 2009).

Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografisiyle Iğdır elmasından polifenol oksidaz enzimi 110 kat saflaştırılmıştır. Kolondan alınan fraksiyonlardan aktivite gösterenlerin kantitatif protein tayinleri için Coomassie Blue yöntemi (595 nm) kullanılmıştır. Iğdır elması polifenol oksidaz enziminin optimum pH'ı, optimum sıcaklığı, iyonik şiddet etkisi ve bazı kimyasalların inhibisyon etkisi çalışılmıştır. Optimum pH 6, optimum sıcaklık ise 50°C olarak bulunmuştur (Türkan, 2009).

Polifenol oksidaz enziminin elma kabuğundan geri katyonik misel ekstraksiyonuyla kısmi saflaştırılması yapılmıştır. Dodesil trimetil amonyum bromür (DTAB), miselleri oluşturmak için kullanılmıştır. Ekstraksiyon, KCl içermeyen pH'ı 6 olan 100 mM sodyum fosfat tamponu ve 100 mM DTAB içeren organik bir faz (5: 1 oranında bir izooktan: hekzanol) ile yapılmıştır. Çözünür PPO % 10 etanol içeren pH'ı 6 olan 1 M KCl çözeltisi ile verimli bir şekilde geri kazanılmıştır. Optimum koşullar altında, polifenol oksidaz enziminin saflaştırma

katsayısı % 12.6 ve geri kazanılmış aktivitesi % 71 olarak bulunmuştur. Bu saflaştırma katsayısı ve geri kazanım izolasyon hacmi 10-200 ml arasında arttığında da muhafaza edildiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, geri katyonik misel izolasyonunun, genel olarak elma kabuğundan PPO saflaştırılması için verimli bir ilk adım olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Imm ve Kim, 2009).

Meyve gelişimi sırasında Aori27, Elstar, Fuji ve Mellow elma çeşitlerindeki enzimatik esmerleşme, polifenol oksidaz aktivitesi ve polifenoller araştırılmıştır. Çalışılan elma çeşitleri arasında, 'Fuji' elma çeşidinin yüksek fenolik içeriği nedeniyle taze tüketime en uygun olduğu belirlenmiştir. 'Aori27' elma çeşidinin en düşük PPO aktivitesi ve polifenol içeriğine bağlı olarak düşük enzimatik esmerleşme göstermesi sonucu meyve işleme için en uygun çeşit olduğu belirlenmiştir (Holderbaum vd., 2010).

Braeburn, Topaz ve Golden Delicious elma çeşitlerinin PPO aktivitelerine 4-metilkatekol substratı kullanılarak çalışılmıştır. Braeburn için aktivite: 3007-4450 U/dak/mL, Topaz için aktivite: 1647-2709 U/dak/mL ve Golden Delicious için aktivite: 2970-3649 U/dak/mL olarak bulunmuştur (Schmitz-Eiberger ve Matthes, 2011).

Fuji elmasındaki polifenol oksidaz enzimi üzerine Hinokitiol'un inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Polifenol oksidaz enzimi için Hinokitiol yarışmalı inhibisyon etkisi göstermiştir. Klorojenik asit substratı için K_M değeri 2.5 mM'dir. Elma polifenol oksidaz enzimine karşı Hinokitiol'ün K_i değeri 5.5 μ M olarak bulunmuştur (Okumura vd., 2011).

Elmanın enzimatik esmerleşmesinde klorojenik asit kinonun, kateşinlerin etkileşimi ve klorojenik asit kinonun rolü araştırılmıştır (Amaki vd., 2011).

Ultrason ve askorbik asidin birlikte muamelesi ile taze kesilmiş elma üzerinde polifenol oksidaz ve peroksidaz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ultrason ve askorbik asidin birlikte muamelesi, enzimatik

esmerleşme ile ilgili çeşitli enzimler üzerinde sinerjik inhibitör etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Jang vd., 2011).

Taze kesilmiş Golden Delicious, Scarlet Spur ve Granny Smith elma çeşitlerindeki renk, esmerleşme potansiyeli ve polifenol oksidaz aktivitesi soğuk depolama boyunca, araştırılmıştır. Bu taze kesilmiş elmalar üzerine esmerleşmeyi önleyici maddelerin etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, polifenol oksidaz enzimi inhibitörü olarak % 1 (w/v) sitrik asit/CaCl₂ ve % 1 (w/v) askorbik asit/CaCl₂ uygulamalarının etkili olduğu bulunmuştur. Elma dilimlerinin renk bozulmalarını önlemek için 1-metilsiklopropan uygulanmasının, soğuk depolamanın ilk gününden itibaren etkili olmadığı görülmüştür (Chiabrando ve Giacalone, 2012).

Üç farklı enzim kaynağındaki (elma, mantar ve patates) polifenol oksidaz enzimi üzerine mavi midye (*Mytilus edulis*) ham ekstraktının inhibitör etkisi araştırılmıştır. Mavi midyenin elma polifenol oksidaz enzimi üzerine %58 inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur (Schulbach vd., 2013).

Red Delicious elmasında enzimatik esmerleşmeye alkali elektrolize suyun inhibitör etkisi araştırılmıştır. Alkali elektrolize suyun, polifenol oksidaz enziminin aktivitesini yaklaşık olarak % 66 azalttığı belirlenmiştir (Kim ve Hung, 2014).

Yomra elmasının ham polifenol oksidaz enzim aktivitesi ve antioksidan özellikleri çalışılmıştır. L-Tirozin, 3- (4-hidroksifenil) propanoik asit, katekol, 4 metilkatekol ve L-3,4-dihidroksifenilalanin substratları için polifenol oksidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla L-Tirozin için 9.30 mM, 7.60 μ M/dak; 3- (4-hidroksifenil) propanoik asit için 0.70 mM, 1.02 μ M/dak; katekol için 7.90 mM, 21.50 μ M/dak; , 4-metil katekol için 10.10 mM, 24.80 μ M/dak; L-3,4-dihidroksifenilalanin için 2.50 mM, 1.60 μ M/dak olarak belirlenmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda Yomra Elması polifenol oksidaz enziminin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve difenolaz aktivitesi katekol substratına

karşı en yüksek ilgiye sahipken, bunu sırasıyla 4-metil katekol ve L-DOPA'nın izlediği, monofenolaz aktivitesi için ise substrat ilgisinin sırasıyla 3-(3,4-hidroksifenil) propiyonik asit (MHPPA), L-Tirozin şeklinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca askorbik asit, sodium azid, sodium metabisülfid ve bezoik asit gibi genel polifenol oksidaz enzim inhibitörlerinin enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiştir (Can vd., 2014).

Fuji elmasından, saflaştırılan membrana bağlı polifenol oksidaz enzimiyle kısmen saflaştırılan çözünür polifenol oksidaz enziminin karşılaştırılması yapılmıştır. Membrana bağlı polifenol oksidaz enziminin sıcaklığa bağlı faz bölme yöntemi ve iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Membrana bağlı PPO enziminin spesifik aktivitesinin 34.12 kat çözünür PPO enziminkinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan membrana bağlı PPO'nun yaklaşık 67 kDa'lık molekül kütesine sahip bir dimer olduğu bulunmuştur (Liu vd., 2015a).

Membrana bağlı polifenol oksidaz enziminin Fuji elmasından saflaştırılması ve yapısal analizi üzerinde çalışılmıştır. Membrana bağlı polifenol oksidaz enzimi sıcaklığa bağlı faz bölme tekniği ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak 54.41 kat saflaştırılmıştır. Membrana bağlı polifenol oksidaz enziminin moleküler ağırlığı 67.3 kDa olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2015b).

Hemşin (Rize)'de organik olarak yetiştirilen Hemşin elmasından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. PPO enzim aktivitesi katekol substratı ile belirlenmiştir. Önce amonyum sülfat çöktürmesi ve daha sonra diyaliz işlemi yapılmıştır. En son olarak, enzim DE52-Selüloz iyon değişimi ve Sephadex G-25 kolonu ile sırasıyla 7.85 kat ve 28.80 kat saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada, optimum pH 5.5'de ve optimum sıcaklık 30-40 °C'de gerçekleştirilmiştir. K_M değeri ve V_{max} değeri sırasıyla 3.40 mM ve 333.3 EU/mL.dak olarak tespit edilmiştir. Ek olarak, Pb^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Na^{+} 'nin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri çalışılarak IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir (Aydın vd., 2015).

Depolama sırasında 5°C'de on gün boyunca, taze kesilmiş Gala elma dilimlerinde mikrobiyolojik kalite, renk, polifenol oksidaz enzimi üzerine kitosan-esasına dayalı nanopartiküllerin etkileri incelenmiştir. Polifenol oksidaz enzim aktivitesinin farklı muamelelerde, bütün numuneler için zamanla arttığı gözlenmiştir (Pilon vd., 2015).

Muz, elma, ayva, patlıcan, erik, dereotu ve kültür mantar kaynaklarından elde edilen ham polifenol oksidaz enzim ekstraktlarının aktiviteleri incelenmiştir. Amasya elmasından izole edilen polifenol oksidaz enzim aktivitesi 352 EU/mL olarak tespit edilmiştir. Ham polifenol oksidaz ekstraktı 40°C sıcaklıkta 40 dakika boyunca ultrason ve ultraviyole ışıkla muamele edilmiştir. Sadece ultrason muamelesiyle %12 ve %100 arasında, sadece ultraviyole ışık muamelesiyle %4 ile %29 arasında, aynı anda ultrason ve ultraviyole ışık muamelesiyle polifenol oksidaz enzim aktivitesinin %80 ve %100 arasında inaktive olduğu bulunmuştur (Şakiroğlu vd., 2016).

Elmadan polifenol oksidaz enzimi, potasyum fosfat tamponuyla homojenize edilerek ve ardından 1.5 hacim soğuk asetonla çöktürülerek izole edilmiştir. Elma posasındaki enzim konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Elma posasındaki ham enzim aktivitesi 2.65 $\mu\text{mol}/\text{dk}^{-1}\text{cm}^{-3}$ olarak tespit edilmiştir. Elma posasındaki ham polifenol oksidaz enzimi aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7 ve 20°C olarak bulunmuştur (Ansari vd., 2017).

Meksika Golden Delicious elmasındaki polifenol oksidaz enzimi izole edilip, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Ham ekstrakta ilk önce % 0–30'luk amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından, % 30–85'lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Sonrasında fenilsefarozen hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmıştır. En son olarak da anyon değişim kromatografisi uygulanarak polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmıştır. PPO enzimi anyon değişim kromatografisiyle %1.6'lık bir verimle 319 kat saflaştırılmıştır. Jel filtrasyon ve SDS-PAGE sonucunda 58 kDa'lık bir monomer elde edilmiştir. Optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 35°C ve 6.0 olarak bulunmuştur. Substrat

olarak pirogallol, 4-metil katekol, katekol ve klorojenik asit kullanılmıştır. Pirogallol substratı 5,941 V_{max}/K_M oranıyla 4-metil katekol substratı 15,402 V_{max}/K_M oranıyla en iyi katalitik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Marrufo-Hernandez vd., 2017).

Polifenol oksidaz enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonuyla Tortum elmasından ilk defa saflaştırılmıştır. Enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE'le yapılmıştır. Enzimin katekol substratı için optimum pH değeri 5.0 ve 4-metil katekol için optimum pH değeri 5.5 olarak belirlenmiştir. Katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 6.17 mM, 20.83 $\mu\text{mol/L}$.dak 4-metil katekol için sırasıyla 4.16 mM, 32.26 $\mu\text{mol/L}$.dak olarak bulunmuştur. Enzimin iki ayrı substratı için stabil pH değeri 5.5, optimum iyonik şiddet değeri 0,05 M ve optimum sıcaklık değeri 10°C olarak belirlenmiştir. Sodyum azit, indirgenmiş glutatyon, tiyoüre, ditiyoeritritol ve askorbik asidin inhibitör etkilerine bakılmıştır. Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. K_i sabitleri ve IC_{50} değerleri karşılaştırılarak askorbik asitin en etkili inhibitör olduğu bulunmuştur (Karabulut, 2017).

Elma (*Malus domestica*)'dan (MdPPO1) ilk bitki pro-tirozinaz latent formunda (56.4 kDa) rekombinant olarak ifade edilmiştir. Enzimin aktivitesini etkilediğine inanılan katalitik cebin etrafındaki dört pozisyonda mutasyona uğratılmıştır (Kampatsikas vd., 2017a).

Üç rekombinant ifade edilmiş elma tirozinazı, bitki polifenol oksidazlarındaki mono-versus difenolaz aktivitesi için sorumlu olan amino asitler üzerinde çalışılmıştır. PPO pro-enzimlerini kodlayan üç cDNA, *Malus domestica* (elma, MdPPO) yapraklarından klonlanmıştır. Üç pro-enzim olan MdPP01-3, *E. coli* içinde heterolog olarak ifade edilmiştir. Önemli miktarlarda protein vermiştir ve SDS, asidik ve proteolitik aktivasyondan kaynaklanan optimum aktiviteleri açısından karakterize edilmiştir. Farklı mono ve difenolik substratlar uygulandığında, MdPP01-3'ün kinetik karakterizasyonunda önemli farklılıklar bulunmuştur. Her üç enzim de tirozinazlar olarak sınıflandırılmıştır. Aktiviteye, sekans verilerine ve homoloji modellemesine dayanarak, PPO'ların monofenolaz

ve difenolaz aktivitesinin, aktif bölgesinde yer alan ve bu nedenle "aktivite kontrolörleri" olarak adlandırılan iki amino asidin uygun kombinasyonu ile manipüle edilebileceği önerilmiştir (Kampatsikas vd., 2017b).

Bu çalışmada, *Garcinia mangostana* rind meyvesinden siyanidin-3-sophoroside (CS)'in polifenol oksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Lineweaver Burk grafiği ile CS'nin yarışmasız inhibisyon yaptığı bulunmuştur. CS, PPO aktivitesini ve taze kesilmiş elmaların esmerleşmesini azaltmış ve raf ömrünü uzatmıştır. CS'nin enzimatik esmerleşmeyi kontrol etmek için bir anti-esmerleştirici madde olarak kullanılabilirliği görülmüştür (Hemachandran vd., 2017).

Fuji elmasından saflaştırılan polifenol oksidaz enzimine oligokitosanın yarı yarışmalı bir inhibitör olarak inhibisyon kinetiği çalışılmıştır. Polifenol oksidaz enzimi dört adımda ayrılmış ve saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının yaklaşık 65 kDa olduğu tahmin edilmiştir. PPO enzimi pH 7'de ve 35°C 'de optimum aktivite göstermiştir. 25-55°C sıcaklık aralığında %50'den fazla kalan aktiviteyle kararlı olduğu bulunmuştur. Termal inaktivasyon parametreleri, Fuji elma polifenol oksidaz enziminin ısıya çok dayanıksız olduğunu göstermiştir. Substrat olarak katekolün kullanılmasıyla, PPO aktivitesi oligokitosan konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı ve konsantrasyon 4 mg/mL'ye ulaştığında sadece %30'luk bir aktivite kaldığı görülmüştür. Oligokitosan, 0.26 mg/mL'lik K_i değeriyle yarı yarışmalı inhibisyon göstermiştir (Guo vd., 2018).

Red Fuji, Granny Smith ve Golden Delicious elma çeşitlerinin biyokimyasal özellikleri ve membrana bağlı polifenol oksidazın (mPPO) termal inaktivasyonunun karşılaştırılması yapılmıştır. Üç elma çeşidinden elde edilen mPPO'lar önemli ölçüde farklı özellikler göstermiştir. Granny Smith mPPO, katekole karşı en güçlü afiniteye sahip olduğu, Red Fuji mPPO ise en yüksek maksimum hıza sahip olduğu belirlenmiştir. mPPO'ları Red Fuji'de pH 8.0, Golden Delicious'da pH 4.5 ve Granny Smith'de pH 7.5-8.0 en yüksek aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Red Fuji mPPO pH 5.0-8.5 aralığında Golden

Delicious ve Granny Smith mPPO'lardan daha kararlı olduğu görülmüştür. Granny Smith mPPO için en uygun sıcaklık 70-75°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık aralığı Red Fuji ve Golden Delicious'den elde edilen mPPO'lardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Liu vd., 2018).

Katekol gibi fenolik bileşikler, çeşitli endüstriyel kaynaklardan çevreye salınır ve ciddi bir ekosistem yüküne neden olurlar. Çalışmada, fenolik kontaminantların dönüşümü için kısmen saflaştırılmış elma polifenol oksidaz kullanılma olasılığı incelenmiştir. Proses koşullarının optimizasyonu için, PPO aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. PPO'nun uygulanabilirliğinin teyit edilebilmesi için çeşitli fenollere karşı PPO afinitesi ve atık sularda bulunabilen bazı tuzların ve organik çözücülerin etkisine bakılmıştır. Atık su arıtımında kısmen saflaştırılmış elma PPO'nun pH 6.8 ve 25°C 'de maksimum aktivite gösterdiği, ancak pH değeri 5.0-8.0 arasında iken maksimum aktivitesinin % 85'inden fazlasını ve 10-50°C sıcaklık aralığında % 90'dan fazlasını gösterdiği bulunmuştur. PPO çeşitli difenollere karşı yüksek afinite gösterirken, monofenollere karşı düşük afinite göstermiştir. Sodyum tetraborat dekahidrat, PPO aktivitesini orta derecede inhibe ederken, PPO'nun organik çözücülere ($\varphi = \% 5$) maruz kalması, aktivitesinde % 40'lık bir kayba neden olmuştur. PPO ile katekol oksidasyonu, bir kesikli reaktörde sadece 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiş en uygun proses koşullarında % 25'lik bir dönüşüm ile sonuçlanmıştır. Elde edilen verilere dayanarak, kısmen saflaştırılmış elma PPO'nun atık su arıtımında iyi bir potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Salic vd., 2018).

Killerle ilgili yurtdışında ve ülkemizde yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Bir laponit kil matrisine immobilize edilen katekol-polifenol oksidaz sistemi çalışılmıştır. Amperometrik katekol biyosensörler, kontrollü miktarlarda polifenol oksidaz ve polikatyonik oligosilasesioksan katkı maddesi içeren sulu sentetik bir laponit kilinin, camsı karbon döner disk elektrot yüzeyine kurutulmasıyla oluşturulmuştur. Metot, geliştirilmiş adezyon, arttırılmış mekanik dayanıklılık ve yüksek enzimatik aktivite sergileyen kompozit enzim-

laponit kil filmleriyle elektrot yüzeyinin kaplanmasını sağlar. Bu şekilde hazırlanan elektrotların 0.5 nM ile 10 µM aralığındaki katekol substratını tespit edebildiği bulunmuştur (Coche vd., 1999).

Katekol tayini için glutaraldehitle çapraz bağlanan ve bir laponit kil kaplaması içinde polifenol oksidazın tutulması esasına dayanan amperometrik biyosensör hazırlanmıştır. PPO'nun glutaraldehitle kimyasal çapraz bağlanmasıyla elde edilen biyosensörlere kıyasla laponit, biyosensörün uzun süreli stabilitesini arttıran hidrofilik bir enzim sağladığı görülmüştür. Kil matriksi içinde yer alan katyonik bir boya olan Azure B, -0.05 V'de fenol türevlerinin aracılık edilmesini sağlayan bir elektron mekiği olarak kullanılmıştır. Katekol, *p*-kresol ve fenol için optimize edilmiş biyosensör konfigürasyonu ile tayin limitleri sırasıyla 1.1 ve 17 nM olarak belirlenmiştir (Shan vd., 2003).

Siyanür tayini için anyonik kil olarak da adlandırılan Zn-Al katmanlı çift hidroksitlere polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonuna dayanan yeni, ucuz ve basit bir amperometrik biyosensör hazırlanmıştır. Siyanürün tayin edilmesi PPO elektrodu üzerindeki inhibe edici etkisiyle gerçekleştirilmiştir. Enzim ölçümünde substrat olarak 3,4-dihidroksifenilasetik asit kullanılmıştır. Siyanür için aşırı hassas bir tayin limiti (0.1 nM) tespit edilmiştir. Bir anyon değiştirici kile enzim immobilizasyonu, kil matrisinde anyon birikiminden dolayı siyanürün inhibisyon etkilerinde artışa neden olmuştur (Shan vd., 2004).

Katekolün hassas bir şekilde tespit edilebilmesi için polifenol oksidaz ile modifiye edilmiş kuaterner amonyum fonksiyonel kil film elektrotları geliştirilmiştir. Doğal olarak meydana gelen Kamerun simektit kil trimetilpropilamonyum (TMPA) gruplarıyla aşılınmış ve elde edilen organokil polifenol oksidaz enzimi için uygun bir immobilizasyon matrisi olarak, camsı bir karbon elektrot yüzeyine uygulanmıştır. Katekol biosensörlenmesi için elektrokimyasal cihazın yüksek duyarlılığı polifenol oksidaz enzimi ve TMPA-kil tabakası arasındaki elektrostatik etkileşim nedeniyle enzim biriktirildikten sonra organokil film içinde emildiği zaman elde edilebildiği bulunmuştur (Mbougouen vd., 2007).

Polifenol oksidaz enzimi Denizli'de yetişen nardan afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi Montmorillonit-Analsim (Eskişehir) kiline immobilize edilmiştir. 60 ml suya 1.5 gr kil ilave edilerek oluşturulan karışımdan 4 mL alınarak 1 mL saf polifenol oksidaz enzimi ile muamele edilmiş, vortexle karıştırıldıktan sonra fosfat tamponu ile 3 kere yıkanmıştır ve kile immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Demir ve ark., 2009).

Dereotundan (*Anethum graveolens*) amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri ile kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi bazı killerle immobilize edilmiştir. Optimum koşullarda (sıcaklık, pH ve iyonik şiddet) K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. K_M değerleri katekol için $1,57 \times 10^{-3}$ M, klorogenik asit için $2,91 \times 10^{-4}$ M, 3,4 dihidroksi fenil alanin için $6,10 \times 10^{-2}$ M, ve gallik asit için $7,10 \times 10^{-2}$ M olarak; V_{max} değerleri katekol için 526,31 EÜ/mL.dak, klorogenik asit için 416,66 EÜ/mL.dak, 3,4 dihidroksi fenil alanin için 204,08 EÜ/mL.dak ve gallik asit için 70,92 EÜ/m.dak olarak belirlenmiştir. Farklı miktarlardaki killer ile pH 6,5 olan 0,2 M fosfat tamponununun 1 mL'si karıştırılarak hazırlanan karışıma 0,5 mL kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi ilave edilerek immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Her bir kilden 0.066 g/mL; 0.040 g/mL; 0.020g/mL; 0.0133 g/mL; 0.0066 g/mL; 0.0033 g/mL konsantrasyonlarda numuneler hazırlanmıştır. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi, katekol substratına karşı 420 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. IC_{50} ve K_i değerleri bulunmuştur. Enzimin en iyi kırmızı kile immobilize olduğu gözlemlenmiştir. Substrat olarak katekol kullanılarak askorbik asit, L-sistein klorür, sodyum metabisülfid ve tiyoüre inhibitörleri için I_{50} ve K_i değerleri belirlenmiştir. En etkili inhibitörün askorbik asit olduğu bulunmuştur (Akbulut, 2011).

Tirozinaz, glutaraldehid çapraz bağlı kitosan-kil kompozit tanecikleri üzerine immobilize edilerek fenollerin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Immobilizasyon verimi % 67, yükleme verimi % 25 ve tirozinaz immobilize taneciklerin aktivitesi 1400 U/g olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık

serbest enzim için 25–30°C ve immobilize enzim için 25°C olarak belirlenmiştir. Serbest tirozinaz enzimi için K_M değeri 0.93 mM ve immobilize tirozinaz enzimi için 1.7 mM olarak bulunmuştur. Tirozinaz immobilize edilmiş aynı taneciklerin yedi kez tekrarlanan ve her biri 150 dakikadan fazla süren kullanımından sonra fenol uzaklaştırılmasının verimliliği % 43'e düşmüştür (Dinçer vd, 2011).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan; Sepharose 4B, *p*-aminobenzoik asit, L-tirozin, siyanojen bromür (CNBr), L-askorbik asit, glisin, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED), akrilamid/bis-akrilamid, diyaliz torbası, amonyum persülfat Sigma Firma'sından; tris (hidroksimetil) aminometan (Tris), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), polietilenglikol (PEG), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), di-sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), sodyum klorür (NaCl), katekol, β-merkaptobetanol, asetik asit, sodyum nitrit, amonyum sülfat, sıgır serum albümin (BSA), fosforik asit, gliserol, Coomassie brillant blue G-250 Merck Firma'sından; Coomassie brillant blue R-250 Amresco Firma'sından; Marker Thermo Fisher Scientific Firma'sından; Bromfenol mavisi Fisher Chem. Firma'sından; Etanol Tekkim Firma'sından; metanol J.T. Baker Firma'sından sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Buz makinesi: İzmak

Çalkalayıcı: WiseShake

Derin dondurucu: Operon DFU-374E

Destile Su Cihazı: Millipore Direct-Q 3 UV with Pump

Hassas Terazisi: Precisa XB 220A SCS

Jel tankı ve Güç kaynağı: Bio-Rad Tetra Sistem

Klinik Santrifüj: Sigma 1-14

Kromatografi kolonu: Sigma C4169 Column

Manyetik Karıştırıcı: WiseStir MSH-20A

Otomatik Pipetler: Nichipet & Brand

pH metre: Mettler Toledo S220K SevenCompact

Soğutmalı Santrifüj: Beckman Coulter Allegra 64R

Spektrofotometre: Spectramax-Plus 384

Vortex: Biosan V1 Plus

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

1-) Ekstraksiyon tamponu: % 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit içeren pH: 7.3, 0.5 M fosfat tamponu hazırlanmıştır. Tamponu hazırlamak için ilk önce 8.7 gr (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 gr polietilen glikol (PEG) ve 0.176 gr (0.001 mol) askorbik asit alınarak 80 mL destile suda çözülmüştür. Daha sonra 1 M HCl ile pH'ı 7.3'e ayarlanmıştır. Son hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

2-) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözeltiye alındığı ve diyalizin yapıldığı tampon: 5 mM, pH:6.3 fosfat tamponu hazırlanmıştır. Tamponu hazırlamak için ilk önce 0.87 gr (0.005 mol) K_2HPO_4 alınarak 950 mL destile suda çözülmüştür. Daha sonra 1 M HCl ile pH:6.3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Son hacim saf suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

3-) Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:

0.1 M, pH:10.0 $NaHCO_3$ tamponu: 950 mL destile suda 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ çözülerek, 1 N NaOH ile pH:10.0'a ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

0.2 M, pH:8.8 $NaHCO_3$ tamponu; 450 mL destile suda 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ çözülerek, 1 N NaOH ile pH:8.8'e ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

0.01 M, pH:6.0 Na_2HPO_4 tamponu; 950 mL destile suda 1.42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 çözülerek, 1 N NaOH ile pH:6.0'a ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

4-) Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar:

0.05 M, pH: 5.0 fosfat tamponu; 450 mL destile su içinde 3.55 gr (0.025 mol)

Na₂HPO₄ alınarak çözülmüştür. pH:5.0'a ayarlanarak saf su ile son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

5-) Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti: 0.05 M Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH:7.00 fosfat tamponu; 450 mL destile su içinde 3.55 gr (0.025 mol) Na₂HPO₄ ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl alınarak çözülmüştür. pH:7.0'a getirilerek saf su ile son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

6-) Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4.5-9.0 arasında olan tampon çözeltiler: 0.1 M pH (4.5-9.0) fosfat tamponu hazırlanmıştır. 7.1 gr (0.05 mol) Na₂HPO₄ alınarak 450 mL destile su içinde çözülmüştür. NaOH veya HCl ile istenilen pH aralıkları ayarlanmıştır. Saf su ile son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır (Arslan, 2004).

7-) Substrat çözeltisi:

Katekol çözeltisi; 0.1 M olacak şekilde 10 mL hazırlanmıştır. Bu amaçla 0.11 gr (1x10⁻³ mol) katekol alınarak saf su ile son hacim 10 mL olacak şekilde çözülmüştür.

4-metil katekol çözeltisi; 0.1 M olacak şekilde 10 mL hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0.124 gr (1x10⁻³ mol) 4-metil katekol alınarak saf su ile son hacim 10 mL olacak şekilde çözülmüştür.

Pirogallol çözeltisi; 0.1 M olacak şekilde 10 mL hazırlanmıştır. Bu amaçla 0.126 gr (1x10⁻³ mol) pirogallol alınarak saf su ile son hacim 10 mL olacak şekilde çözülmüştür (Erzengin, 2002).

8-) Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi: 1 mg/mL olacak şekilde 25 mL saf suda 25 mg standart serum albumin çözülmüştür (Erzengin, 2002).

9-) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti: Coomassie brilliant blue G-250'den 100 mg alınarak 50 mL etanolde çözülmüştür. Bu çözeltiye, % 95'lik fosforik asitten 100 mL ilave edilmiştir. Çözeltinin saf su ile son hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

10-) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8) tamponu	2.5 mL
%10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkaptoetanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Saf su	0.5 mL (Erzengin, 2002).

11-) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Tris HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

Son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır (Erzengin, 2002).

12-) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının kullanılan miktarları ve hazırlanışı Çizelge 3.1'de verilmiştir (Erzengin, 2002).

13-) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 120 mL metanolde 0.66 gr coomassie brilliant blue R-250 alınarak çözülmüştür. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL saf su ilave edilmiştir (Erzengin, 2002).

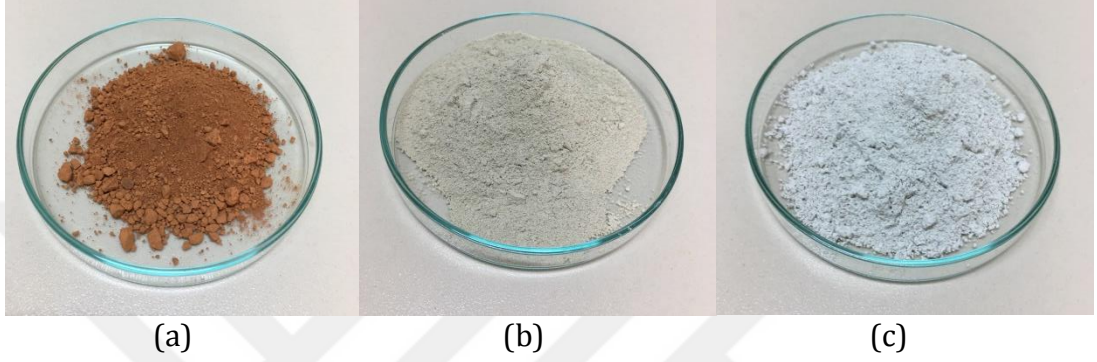
14-) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: Çözelti, %5 metanol, %7.5 asetik asit ve %87.5 mL saf su içermektedir. Bu amaçla 50 mL metanol, 75 mL asetik asit ve 875 mL saf su birbiriyle karıştırılmıştır (Erzengin, 2002).

Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u> Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr alınarak saf su ile son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.	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 alınarak pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek saf su ile son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.	12.5 mL	-
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 gr alınarak pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek saf su ile son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.	-	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 gr alınarak saf su ile son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 gr alınarak saf su ile son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.	750 µL	0 µL

15-) Killerin hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere üç farklı kil çeşidi; kırmızı, yeşil ve beyaz Isparta'daki ticari bir işletmeden temin edilmiştir (Şekil 3.1). Killer herhangi bir işleme tabi tutulmadan deneylerde kullanılmıştır (Akbulut, 2011).



Şekil 3.1. Çalışılan kil çeşitleri (a) kırmızı kil, (b) yeşil kil ve (c) beyaz kil

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Çalışmada kullanılan yerel elma çeşidi Arap kızı, Isparta'da yetiştirilmiş olup, buradaki üreticilerden temin edilmiştir. Elmalar çalışmada kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Ham ekstraktın hazırlanması için öncelikle 50 gram elma 100 ml 0.5 M pH:7.3 fosfat tamponu (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit karışımı) içerisinde ev blenderı ile bir kaç dakika homojenize edilmiştir. Homojenize edildikten sonra 2 kat tülbenkten süzlmüştür. Daha sonra, süzöntü 1 saat 2000xg'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Selülozik lifli kısmı ve bitki duvarlarını içeren çökelek atılmıştır. Süpernatant ise ham ekstrakt olarak kullanılmıştır (Arslan vd., 2004).

3.2.2. Amonyum sülfatla çöktürme

Amonyum sülfat ile çöktürme %0-80 arasında doyunlukta yapılmıştır. Çöktürme işlemi sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formülle tespit edilmiştir.

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

V:Süpernatant hacmi

S₁:1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyunluğu

S₂:1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi işleminde, formülde çıkan miktarda katı amonyum sülfat yavaş yavaş ve azar azar ham ekstrakta katılmıştır. Her defasında amonyum sülfatın tamamen çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Katı amonyum sülfat katılarak %80 doyunluğa getirilen süspansiyon 1 saat 2000xg'de soğutmalı santrifüj edilmiştir. Ekstrakt bu şekilde santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Çökelek kısmı ise; 5 mM pH:6.3 olan fosfat tamponunun çözünebildiği en az miktarda çözülmüştür (Arslan vd., 2004).

3.2.3. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbası içine alınarak, 5 mM pH:6.3 fosfat tamponuna karşı 24 saat boyunca 3-4 defa değiştirilerek diyaliz edilmiştir (Arslan vd., 2004).

3.2.4. PPO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Afinite kromatografisi, polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması için kullanılan yöntemlerden biridir ve bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Saflaştırılmak istenen molekül veya biyolojik ünitenin, bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve dönüşümlü bağlandığı bir tekniktir. Ligand, çözünmeyen bir kolon maddesine (matriks) kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu sayede yorucu, çok zor ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemleri kısa sürede gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmiştir (Cuatrecasas, 1970).

3.2.5. Afinite jellinin hazırlanması

Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit afinite jeli aşağıdaki yöntemle sentezlenmiştir (Arslan vd., 2004). Bu jel matriks olarak Sepharose-4B kullanılarak hazırlanmıştır. Sepharose-4B'nin serbest -OH gruplarının modifikasyonu için CNBr yönteminden yararlanılmıştır (Pathak vd., 1992). 10 mL Sepharose-4B jeli saf suyla iyice yıkanarak dekante edildikten sonra eşit hacimde saf su ile birleştirilmiştir. Eşit hacimdeki saf su ile birleştirilip karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 gram CNBr katılmıştır. pH metre kullanılarak 4 M NaOH çözeltisiyle süspansiyonun pH'sı hemen 11'e çıkarılmış ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edilmiştir. Reaksiyona pH sabitleninceye kadar devam edilmiştir. pH sabitlenince çok miktarda buz süspansiyona katılmış ve karışım bir buchner hunisine aktarılarak 250 mL soğuk 0.1 M, pH:10 NaHCO₃ tampon çözeltisiyle yıkanmıştır. 15 mg tirozin içeren 20 mL aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek, yavaşça karıştırılan süspansiyondan, bağlanma derecesini belirleme amacıyla, her 15 dakikada jel bulunmayan kısımdan 0.2 mL

örnek alınarak ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimi izlenmiştir. Absorbans değişimi izlenmesine, absorbansda önemli bir farklılık olmadığı zamana kadar devam edilmiştir. Bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 16 saat bekletilmiştir. 16 saat bitiminde süspansiyon yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkanmıştır. Böylelikle reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi, 100 mL 0.2 M, pH:8.8 NaHCO₃ tamponu ile tekrarlanmıştır. Tirozinle modifiye edilen Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL'si içine alınmıştır. Daha sonra da bu yapıdaki tirozine, diazolanmış *p*-amino benzoik asidin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde 25 mg *p*-aminobenzoik asit çözülmüştür. 0°C' deki 75 mg NaNO₂ içeren 5 mL sulu çözelti, *p*- amino benzoik asit çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Bu reaksiyon 10 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyondan sonra diazolanmış olan *p*-aminobenzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edilip, pH 9.5'e getirilerek bu pH'da sabit tutularak 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra 1000 mL saf su ve ardından 200 mL 0.01 M, pH:6 Na₂HPO₄ tamponuyla yıkanıp aynı tamponda muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M, pH: 5.0 olan fosfat tamponuyla üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponların pH değeri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlanmıştır. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edilmiştir. 0.05 M, pH:5.0 Na₂HPO₄ tamponu ile yıkanarak 2'şer mL halinde tüplere alınmıştır. Böylelikle diğer safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Toplanan tüm tüplerin 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapılmıştır. Daha sonra enzimin, 0,05 M pH:7.0 Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponuyla 2'şer mL halinde tüplere elüsyonu yapılmıştır. Elüatlarda Bradford yöntemiyle kantitatif, 280 nm'de kalitatif protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapılmıştır (Arslan vd., 2004).

3.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığının tespiti

Isparta ilinde yetiştirilen Arap kızı elma çeşidi polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra, yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle enzimin saflık derecesi kontrol edilmiş ve molekül ağırlığı belirlenmiştir (Laemelli, 1970). Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlenmiştir. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konularak ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konulmuştur. Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar otomatik mikro pipetle dökülmüştür. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanolle ince bir tabaka oluşturulmuştur. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki n-bütanol dökülmüştür. Daha sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığılma jeli cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar ilave edilmiştir. Tarak, jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine dikkatlice yerleştirilip jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Yükleme jeli polimerleştikten sonra kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek tarak çıkarılmıştır. Kuyucuklar ilk önce saf suyla sonra da tank tamponuyla yıkanmıştır. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulmuştur.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek numune tamponuyla karıştırılmıştır. 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 (marker), içerisinde her birinden 20 μ g protein olacak şekilde numune tamponuyla karıştırılmıştır. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Numuneler soğutulularak otomatik mikro pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlanmıştır. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune

tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltilmiştir. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra yürütme durdurulmuştur. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılarak yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konulup çalkalayıcıda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılıp renksizleştirme çözeltisi içerisine konulmuştur. Bu çözelti içinde jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar belirli aralıklarla değiştirilerek çalkalanmıştır. Renksizleştirme çözeltisinden çıkarılan jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.8. Kalitatif ve kantitatif protein tayini

Çalışmada yapılan afinite kromatografisi işlemi sonucunda elde edilen elüatların hepsinde kalitatif protein tayini yapılmıştır. Yapılan kalitatif protein tayininin temel prensibi, proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip olan amino asitlerinin (tirozin, fenilalanin ve triptofan) 280 nm'de UV ışınlarını absorblaması esasına dayanmaktadır (Jaenicke, 1984). Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları 280 nm'de spektrofotometrede standarda karşı ölçülmüştür. Standart olarak proteinin içinde bulunduğu tampon alınmıştır. Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri (kantitatif protein tayini) Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Bradford yöntemi fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Bradford, 1976). Protein tayini için 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL hacimlerde alınmıştır. pH: 6.3 olan 5 mM fosfat tamponu ile tüm tüplerin hacimleri 100 µL'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 5'er mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edilmiştir. Tüpler vorteks ile karıştırılıp, 10 dakika sonrasında 3 mL'lik küvetlerde standarta karşı 595 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Standarta olarak 100 µL'lik ilk tüp (pH: 6.3, 5

mM fosfat tamponu) kullanılmıştır. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri kullanılarak standart grafik çizilmiştir. Hazırlanan enzim çözeltilerinden 100'er μL iki ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi eklenip, vortekste karıştırılmıştır. 10 dakika sonrasında 595 nm'de absorbansları ölçülmüştür. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla bulunmuştur.

3.2.9. PPO enziminin aktivite tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Aktivite ölçümü için enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan tampon + substrat (0.1 M katekol, 0.1 M 4-metil katekol ve 0.1 M pirogallol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de standarta karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okunmuştur. 1 Enzim Ünitesi (U) reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0,001'lik artış olarak tanımlanmaktadır. Aktivite birimi olarak '1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişme' kullanılmıştır (Arslan vd., 2004).

3.2.10. Optimum pH ve sıcaklık çalışması

Arap kızı polifenol oksidaz enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) üç farklı substrat (katekol, 4-metil katekol ve pirogallol) kullanarak farklı sıcaklık değerlerinde (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45) reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlenmiştir. Her ölçüm üç kez tekrarlanıp çıkan değerlerin ortalaması alınmıştır. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler hesaplanmıştır. Böylelikle, polifenol oksidaz enzimi için optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir (Arslan vd., 2004).

3.2.11. Optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

Polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için, optimum koşullarda K_M ve V_{max} değerleri tayin edilmiştir. K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Her ölçüm üç defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alınmıştır (Arslan vd., 2004).

3.2.12. Bazı killerle PPO enziminin immobilizasyonu ile killerin inhibisyon etkisi, IC_{50} ve K_i değerlerinin bulunması

Killerin polifenol oksidaz enzimi üzerine immobilizasyonu ile inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla üç farklı kil çeşidiyle on iki farklı konsantrasyonda numuneler hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.). Belli miktarlarda killerden alınarak 1.0 ml fosfat tamponu ilave edilerek 30 dakika vortex ile karıştırılmıştır. Bu tamponlu kil çözeltisi üzerine 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 10 dakika daha karıştırılmıştır. PPO enzimi ile kil immobilizasyonu bu şekilde gerçekteştirilmiştir. Aktivite ölçümleri üstte kalan süpernatant ile yapılmıştır. Bu üç kile PPO enziminin immobilizasyonu ile kilin inhibisyon etkisi incelenmiştir. İmmobilize killer ile polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini tespit etmek için IC_{50} ve K_i değerleri belirlenmiştir (Akbulut, 2011).

3.2.13. Serbest PPO enzime killerin inhibisyon etkisi, IC_{50} ve K_i değerlerinin bulunması

Serbest PPO enzime killerin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla üç farklı renkteki kil çeşidiyle on iki farklı konsantrasyonda numuneler hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.). Belli miktarlarda killer alınarak 1.0 mL sadece fosfat tamponu ilave edilerek (enzim katılmadan) 30 dakika vortex ile karıştırılmıştır. Enzim ölçüm sırasında küvete ilave edilmiştir. Killerin serbest polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini tespit etmek için IC_{50} ve K_i değerleri belirlenmiştir (Akbulut, 2011).

Çizelge 3.2. Serbest ve immobilize killerin polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon derecelerini hesaplamak için kullanılan kil konsantrasyonları

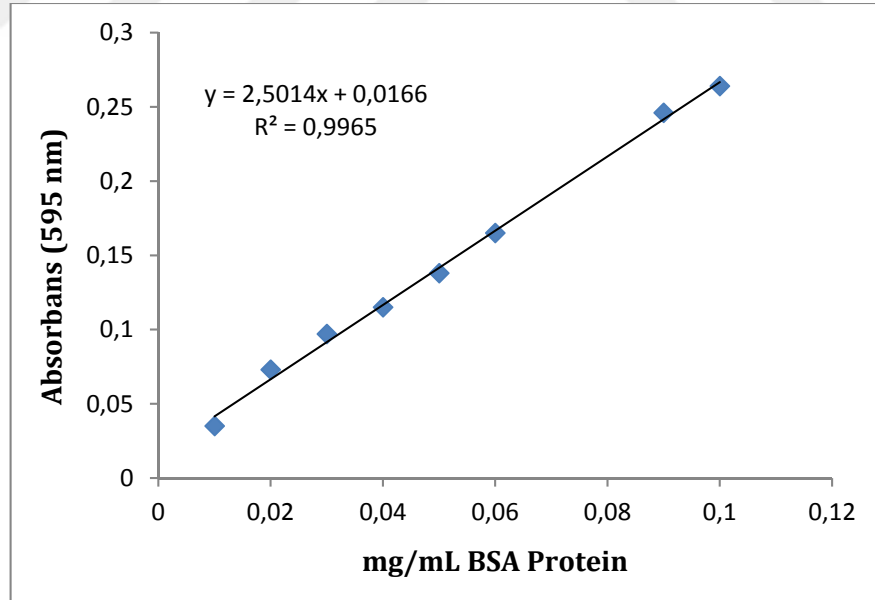
Kil Numuneleri (g/mL)	Kırmızı Kil (g/mL)	Yeşil Kil (g/mL)	Beyaz Kil (g/mL)
1. Nolu Numune	0.005	0.005	0.005
2. Nolu Numune	0.010	0.010	0.010
3. Nolu Numune	0.015	0.015	0.015
4. Nolu Numune	0.020	0.020	0.020
5. Nolu Numune	0.025	0.025	0.025
6. Nolu Numune	0.030	0.030	0.030
7. Nolu Numune	0.035	0.035	0.035
8. Nolu Numune	0.040	0.040	0.040
9. Nolu Numune	0.060	0.060	0.060
10. Nolu Numune	0.080	0.080	0.080
11. Nolu Numune	0.100	0.100	0.100
12. Nolu Numune	0.120	0.120	0.120

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Isparta ilinde yetiştirilen yerel elma çeşidimiz olan Arap kızı (*Malus domestica*) elmasından polifenol oksidaz enzimi izole edilmiş, amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve Sepharose 4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile saflaştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra saflaştırılan PPO enzimi karakterizasyon için kullanılmıştır. Optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı substrat kullanılarak belirlenmiştir. Bulunan optimum koşullarla çalışılan her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini için Bradford yöntemi kullanılarak protein standart grafiği çizilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen PPO enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki PPO enzim çözeltilerinin protein miktarları bu grafiğe göre belirlenmiştir (Şekil 4.1).

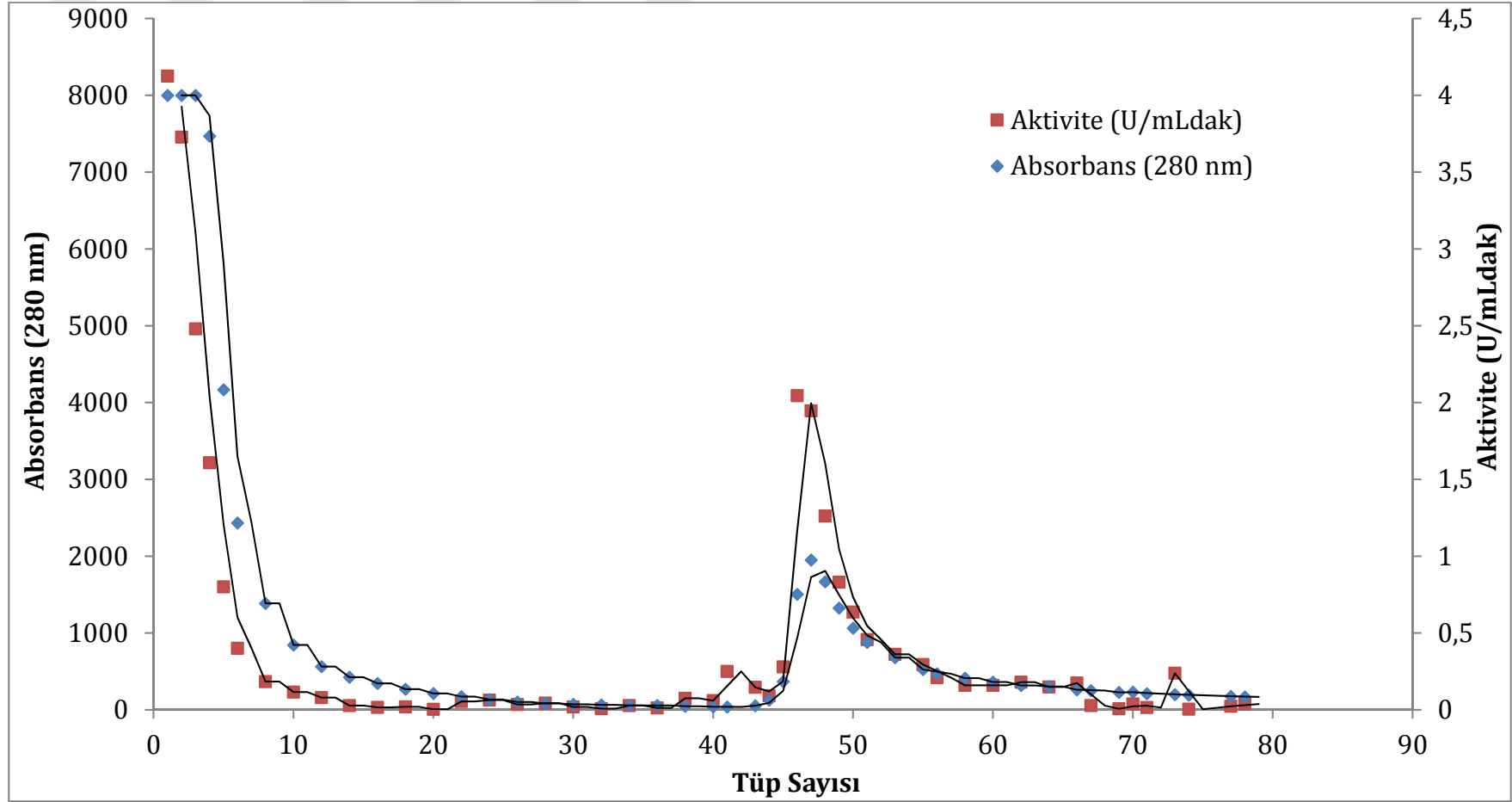


Şekil 4.1. Bradford yöntemine göre protein standart grafiği

4.2. Elma PPO Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması

Isparta ilinde yetiştirilen yerel elma çeşidimiz olan Arap kızı (*Malus domestica*) elmasından polifenol oksidaz Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılma sonucu elde edilen yıkama elüsyon grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).

Ham ekstrakt. amonyum sülfat sonrası. diyaliz sonrası (kolona tatbik edilen numune) ve afinite jeli kullanılarak elde edilen elüat çözeltilerinin kantitatif protein miktarları ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).



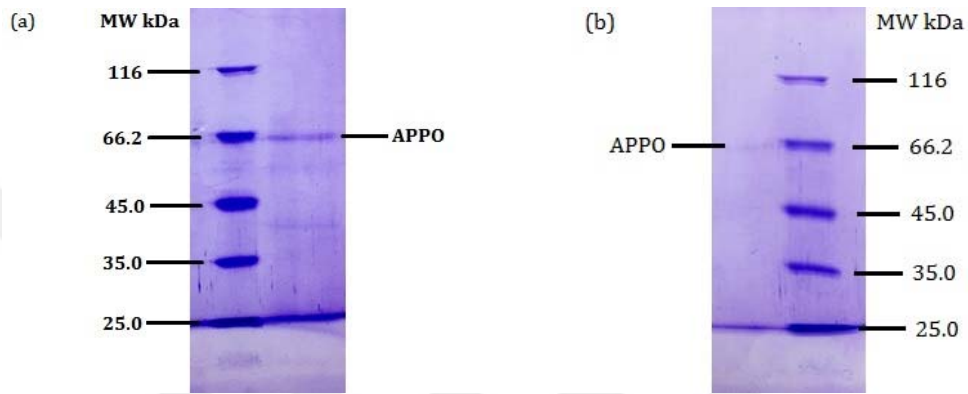
Şekil 4.2. *p*-aminobenzoik asit afinite kolonunun pH:5.0'de Na₂HPO₄ tamponu ile yıkanması işleminden sonra Arap kıızı elması PPO enziminin 0.05 M pH:7.0 Na₂HPO₄ / 1 M NaCl tamponu ile elüsyonu

Çizelge 4.1. Arap kızı elması PPO enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	122	127.50	15555.00	0.0131	1.5982	9732.82	100.00	1
Amonyum Sülfat	13	4010.83	52140.79	0.0144	0.1872	278529.86	335.20	28.62
Diyaliz	13	1621.25	21076.25	0.0083	0.1079	195331.33	135.50	20.07
Sepharose 4B-L-tirozin-<i>p</i>-amino Benzoik Asit Afinite Kromatografisi	2	1341.25	2682.50	0.0106	0.0212	126533.02	17.25	13.00

4.3. Elma PPO Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile elmadan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflık kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi için bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi yapılmıştır. Ham ekstraktaki protein bantları ve saflaştırılan protein bandını içeren SDS PAGE jellerinin fotoğrafları Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3. SDS poliakrilamid jel elektrofrezleri: a) Arap kızı elma PPO enzimi ham ekstraktı b) Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile saflaştırılan Arap kızı elma PPO enzimi

4.4. Arap kızı PPO Enziminin Farklı Substratlar için Optimum pH ve Sıcaklık Çalışması

Arap kızı elmasının optimum pH ve sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarına karşı pH değeri 4.5-9.0 aralığında 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu kullanılarak; 10°C-45°C aralığında sıcaklık değerlerinde aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri 0.1 M katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pH-aktivite grafikleri sıcaklıklara göre Çizelge 4.2-4.8’de ve Şekil 4.4-4.11 ‘de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Arap kızı PPO enziminin 10°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite(U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

10°C									
	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
pH	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4	0.0045	113	11.72	0.0083	208	12.10	0.0036	90	2.93
4.5	0.0001	3	0.26	0.0123	308	17.93	0.0323	808	26.34
5.0	0.0121	303	31.51	0.0147	368	21.43	0.0091	228	7.43
5.5	0.0143	358	37.24	0.0353	883	51.46	0.0252	630	20.53
6.0	0.0172	430	44.79	0.0444	1110	64.72	0.016	400	13.04
6.5	0.0384	960	100.00	0.0577	1443	84.11	0.0169	423	13.79
7.0	0.0169	423	44.01	0.0686	1715	100.00	0.0174	435	14.18
7.5	0.0234	585	60.94	0.0454	1135	66.18	0.0157	393	12.81
8.0	0.0348	870	90.63	0.0242	605	35.28	0.0035	88	2.87
8.5	0.0288	720	75.00	0.0137	343	19.97	0.1227	3068	100.00
9.0	0.0093	233	24.22	0.0053	133	7.73	0.0266	665	21.68

Bulunan verilere göre 10 °C'de katekol substratı için enzim pH 6.5'de en yüksek aktivite değerine (960 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 7.0'de en yüksek aktivite değerine (1715 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (3068 U/mLdak) ulaşmıştır. 10 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 6.5, 7.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Arap kızı PPO enziminin 15°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

15°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0054	135	17.31	0.0039	98	5.60	0.0064	160	21.11
4.5	0.0107	268	34.29	0.0151	378	21.60	0.0168	420	55.41
5.0	0.01	250	32.05	0.0105	263	15.03	0.0106	265	34.96
5.5	0.0145	363	46.47	0.0429	1073	61.31	0.0152	380	50.13
6.0	0.0259	648	83.01	0.07	1750	100.00	0.0134	335	44.20
6.5	0.0251	628	80.45	0.0674	1685	96.29	0.0117	293	38.65
7.0	0.0312	780	100.00	0.0633	1583	90.46	0.0023	58	7.65
7.5	0.0165	413	52.88	0.0594	1485	84.86	0.0179	448	59.10
8.0	0.0247	618	79.17	0.0357	893	51.03	0.0053	133	17.55
8.5	0.0229	573	73.40	0.0174	435	24.86	0.0303	758	100.00
9.0	0.0245	613	78.53	0.006	150	8.57	0.03	750	98.94

Bulunan verilere göre 15 °C'de katekol substratı için enzim pH 7.0'de en yüksek aktivite değerine (780 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 6.0'de en yüksek aktivite değerine (1750 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (758 U/mLdak) ulaşmıştır. 15 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 7.0, 6.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Arap kızı PPO enziminin 20°C’de üç farklı substrat için farklı pH’larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

20°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0123	308	61.50	0.0075	188	14.20	0.0036	90	6.16
4.5	0.0052	130	26.00	0.0196	490	37.12	0.0323	808	55.31
5.0	0.0079	198	39.50	0.0107	268	20.27	0.0091	228	15.58
5.5	0.0123	308	61.50	0.0334	835	63.26	0.0252	630	43.15
6.0	0.0157	393	78.50	0.0429	1073	81.25	0.016	400	27.40
6.5	0.0128	320	64.00	0.0498	1245	94.32	0.0169	423	28.94
7.0	0.0198	495	99.00	0.0528	1320	100.00	0.0174	435	29.79
7.5	0.0135	338	67.50	0.0318	795	60.23	0.0157	393	26.88
8.0	0.02	500	100.00	0.0293	733	55.49	0.0035	88	5.99
8.5	0.0086	215	43.00	0.0124	310	23.48	0.0584	1460	100.00
9.0	0.0111	278	55.50	0.0026	65	4.92	0.0266	665	45.55

Bulunan verilere göre 20 °C’de katekol substratı için enzim pH 8.0’de en yüksek aktivite değerine (500 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 7.0’de en yüksek aktivite değerine (1320 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5’de en yüksek aktivite değerine (1460 U/mLdak) ulaşmıştır. 20 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 8.0, 7.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Arap kızı PPO enziminin 25°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

25°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	ΔOD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0001	3	0.77	0.0057	143	26.39	0.003	75	22.22
4.5	0.003	75	23.08	0.0066	165	30.56	0.0047	118	34.81
5.0	0.0052	130	40.00	0.0113	283	52.31	0.0102	255	75.56
5.5	0.0067	168	51.54	0.02	500	92.59	0.0019	48	14.07
6.0	0.0055	138	42.31	0.0192	480	88.89	0.0073	183	54.07
6.5	0.013	325	100.00	0.0216	540	100.00	0.0062	155	45.93
7.0	0.0081	203	62.31	0.0156	390	72.22	0.004	100	29.63
7.5	0.0068	170	52.31	0.0115	288	53.24	0.0105	263	77.78
8.0	0.0088	220	67.69	0.0069	173	31.94	0.0104	260	77.04
8.5	0.0129	323	99.23	0.0047	118	21.76	0.0135	338	100.00
9.0	0.0115	288	88.46	0.0009	23	4.17	0.0108	270	80.00

Bulunan verilere göre 25 °C'de katekol substratı için enzim pH 6.5'de en yüksek aktivite değerine (325 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 6.5'de en yüksek aktivite değerine (540 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (338 U/mLdak) ulaşmıştır. 25 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 6.5, 6.5, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Arap kızı PPO enziminin 30°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

30°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0054	135	30.51	0.0085	213	24.50	0.0064	160	27.95
4.5	0.0101	253	57.06	0.0121	303	34.87	0.0058	145	25.33
5.0	0.0113	283	63.84	0.0116	290	33.43	0.0014	35	6.11
5.5	0.0103	258	58.19	0.0272	680	78.39	0.004	100	17.47
6.0	0.0086	215	48.59	0.0347	868	100.00	0.0044	110	19.21
6.5	0.0174	435	98.31	0.0296	740	85.30	0.0094	235	41.05
7.0	0.0091	228	51.41	0.0305	763	87.90	0.0095	238	41.48
7.5	0.0161	403	90.96	0.0027	68	7.78	0.0094	235	41.05
8.0	0.0107	268	60.45	0.0113	283	32.56	0.0047	118	20.52
8.5	0.0096	240	54.24	0.0044	110	12.68	0.0229	573	100.00
9.0	0.0177	443	100.00	0.0073	183	21.04	0.0202	505	88.21

Bulunan verilere göre 30 °C'de katekol substratı için enzim pH 9.0'de en yüksek aktivite değerine (443 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 6.0'de en yüksek aktivite değerine (868 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (573 U/mLdak) ulaşmıştır. 30 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 9.0, 6.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Arap kızı PPO enziminin 35°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

35°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.003	75	22.06	0.0061	153	49.19	0.0026	65	12.43
4.5	0.0055	138	40.44	0.0075	188	60.48	0.0072	180	34.42
5.0	0.0077	193	56.62	0.0046	115	37.10	0.0043	108	20.65
5.5	0.0019	48	13.97	0.0039	98	31.45	0.0147	368	70.36
6.0	0.0036	90	26.47	0.006	150	48.39	0.0011	28	5.35
6.5	0.0049	123	36.03	0.0041	103	33.06	0.001	25	4.78
7.0	0.0031	78	22.79	0.0072	180	58.06	0.0039	98	18.74
7.5	0.004	100	29.41	0.0022	55	17.74	0.0036	90	17.21
8.0	0.0064	160	47.06	0.0008	20	6.45	0.0209	459	87.76
8.5	0.0136	340	100.00	0.01	250	80.65	0.0209	523	100.00
9.0	0.0105	263	77.21	0.0124	310	100.00	0.0043	108	20.65

Bulunan verilere göre 35 °C'de katekol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (340 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 9.0'de en yüksek aktivite değerine (310 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (523 U/mLdak) ulaşmıştır. 35 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 8.5, 9.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Arap kızı PPO enziminin 40°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

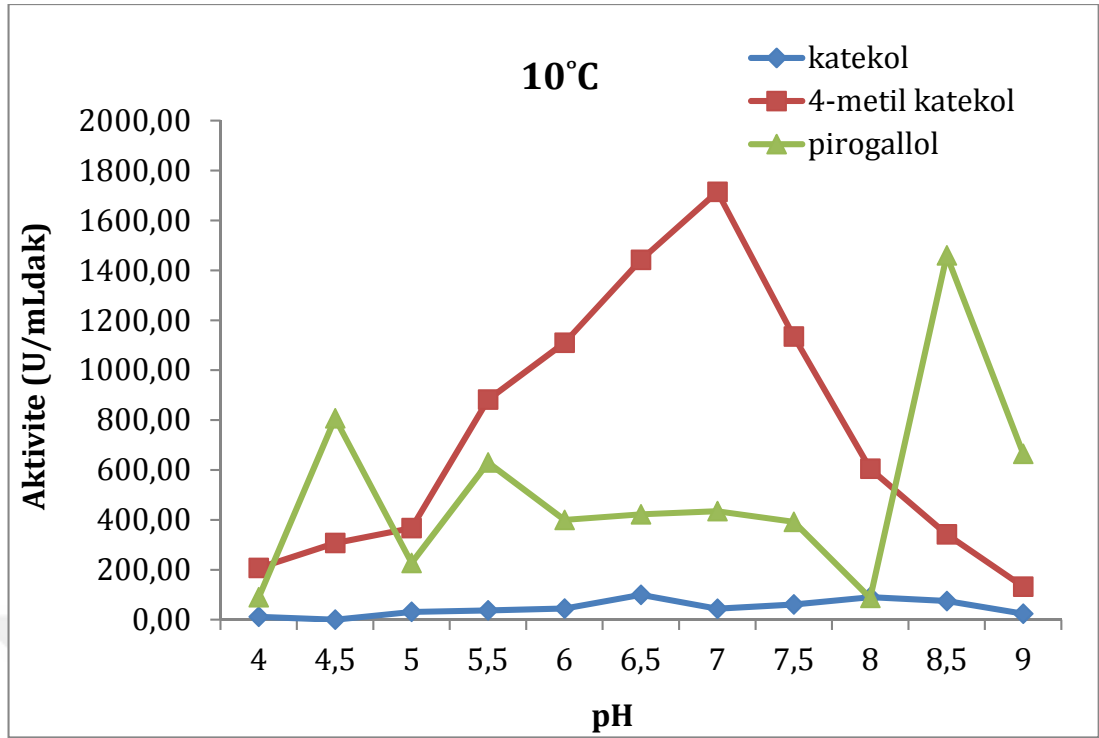
40°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0047	118	18.36	0.0221	553	100.00	0.002	50	14.71
4.5	0.0099	248	38.67	0.0069	173	31.22	0.0038	95	27.94
5.0	0.0132	330	51.56	0.0018	45	8.14	0.0006	15	4.41
5.5	0.0075	188	29.30	0.0034	85	15.38	0.0041	103	30.15
6.0	0.0046	115	17.97	0.0165	413	74.66	0.0008	20	5.88
6.5	0.0042	105	16.41	0.0093	233	42.08	0.0027	68	19.85
7.0	0.0074	185	28.91	0.0081	203	36.65	0.0023	58	16.91
7.5	0.0068	170	26.56	0.0052	130	23.53	0.006	150	44.12
8.0	0.008	200	31.25	0.002	50	9.05	0.0018	45	13.24
8.5	0.0145	363	56.64	0.0117	293	52.94	0.0136	340	100.00
9.0	0.0256	640	100.00	0.0041	103	18.55	0.0112	280	82.35

Bulunan verilere göre 40 °C'de katekol substratı için enzim pH 9.0'de en yüksek aktivite değerine (640 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 4.0'de en yüksek aktivite değerine (553 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.5'de en yüksek aktivite değerine (340 U/mLdak) ulaşmıştır. 40 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 9.0, 4.0, 8.5 olarak bulunmuştur.

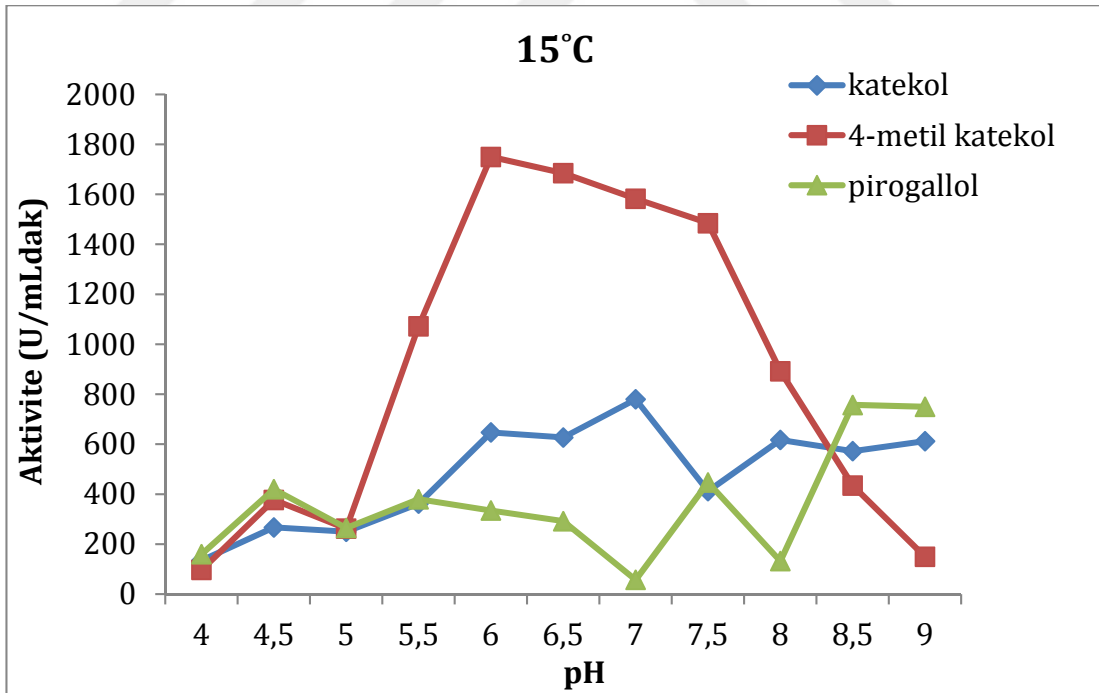
Çizelge 4.9. Arap kızı PPO enziminin 45°C'de üç farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans (420 nm) aktivite (U/mLdak) ve % 100 aktivite değerleri

45°C									
pH	Katekol			4-metil katekol			Pirogallol		
	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite	Δ OD (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	%100 Aktivite
4.0	0.0016	40	4.55	0.0025	63	4.96	0.0035	88	11.43
4.5	0.0054	135	15.34	0.006	150	11.90	0.008	200	25.97
5.0	0.0081	203	23.01	0.0052	130	10.32	0.0013	33	4.29
5.5	0.0027	68	7.67	0.0124	310	24.60	0.005	125	16.23
6.0	0.0089	223	25.28	0.0133	333	26.39	0.0023	58	7.53
6.5	0.0013	33	3.69	0.0128	320	25.40	0.0027	68	8.83
7.0	0.0057	143	16.19	0.0071	178	14.09	0.0041	103	13.38
7.5	0.0033	83	9.38	0.0041	103	8.13	0.005	125	16.23
8.0	0.0087	218	24.72	0.0086	215	17.06	0.0308	770	100.00
8.5	0.0191	478	54.26	0.0089	223	17.66	0.0273	683	88.70
9.0	0.0352	880	100.00	0.0504	1260	100.00	0.026	650	84.42

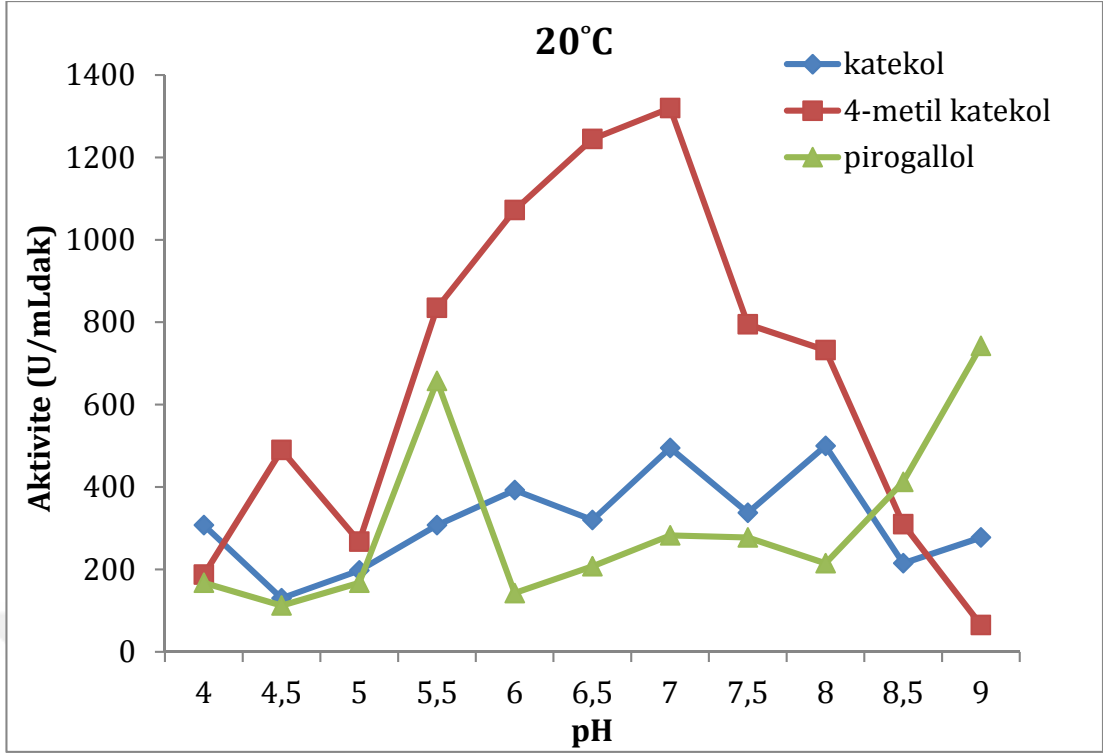
Bulunan verilere göre 45 °C'de katekol substratı için enzim pH 9.0'de en yüksek aktivite değerine (880 U/mLdak), 4-metil katekol substratı için enzim pH 9.0'de en yüksek aktivite değerine (1260 U/mLdak), pirogallol substratı için enzim pH 8.0'de en yüksek aktivite değerine (770 U/mLdak) ulaşmıştır. 45 °C sıcaklıkta katekol substratı, 4-metil katekol substratı ve pirogallol substratı için optimum pH sırasıyla 9.0, 9.0, 8.0 olarak bulunmuştur.



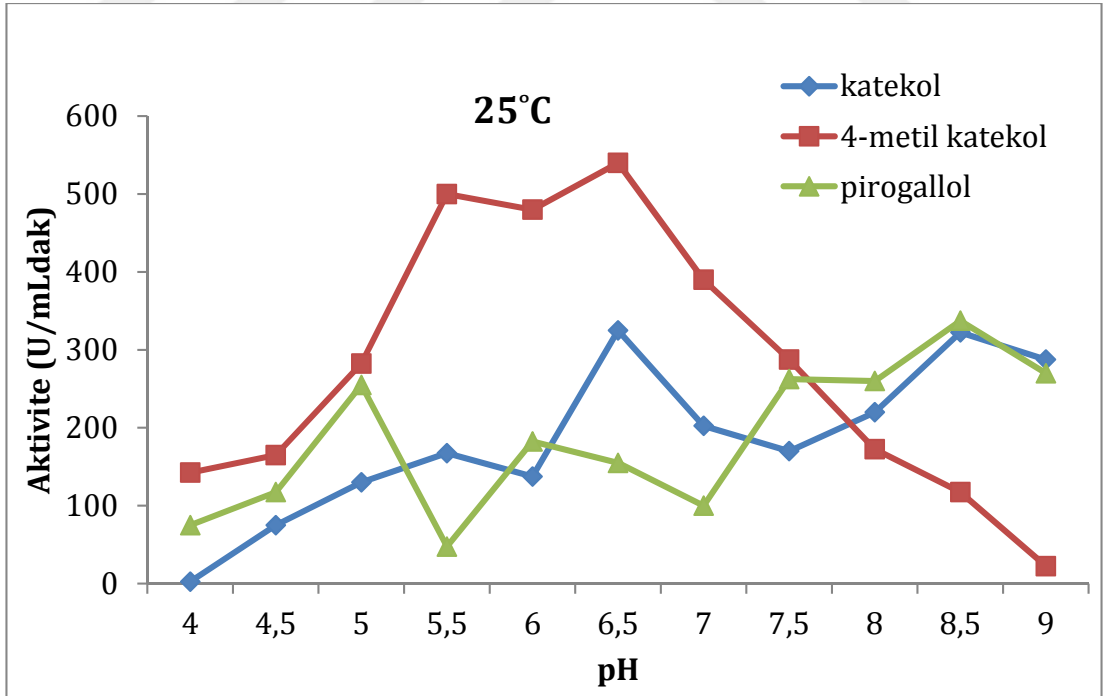
Şekil 4.4. PPO enziminin 10°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



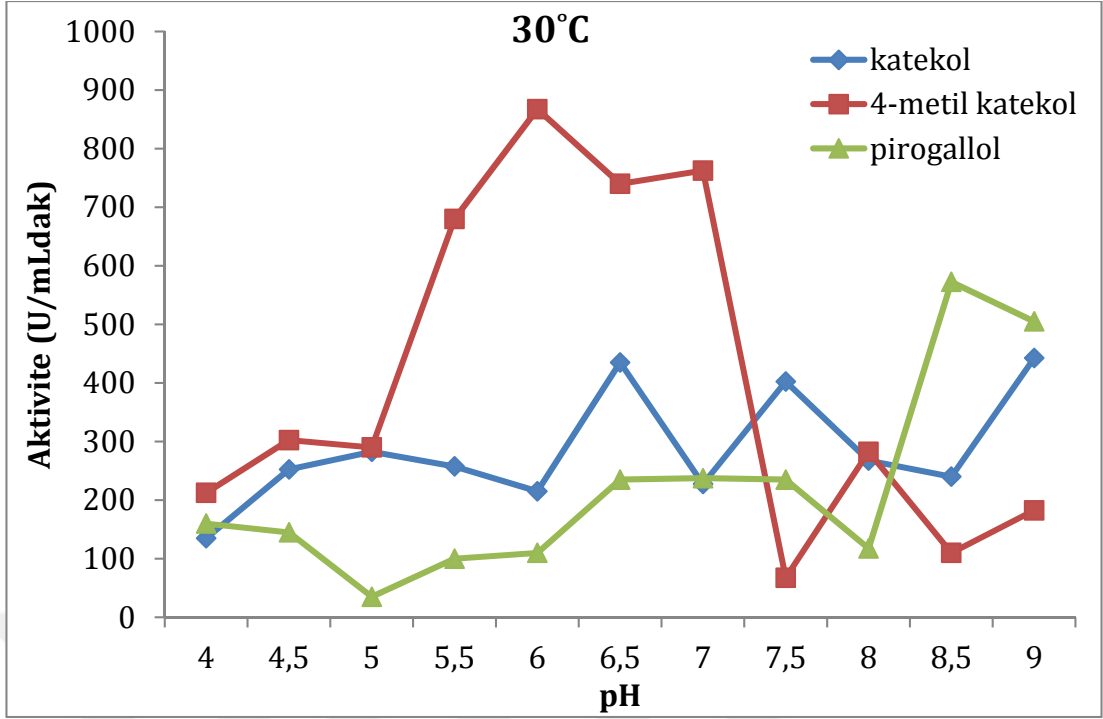
Şekil 4.5. PPO enziminin 15°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



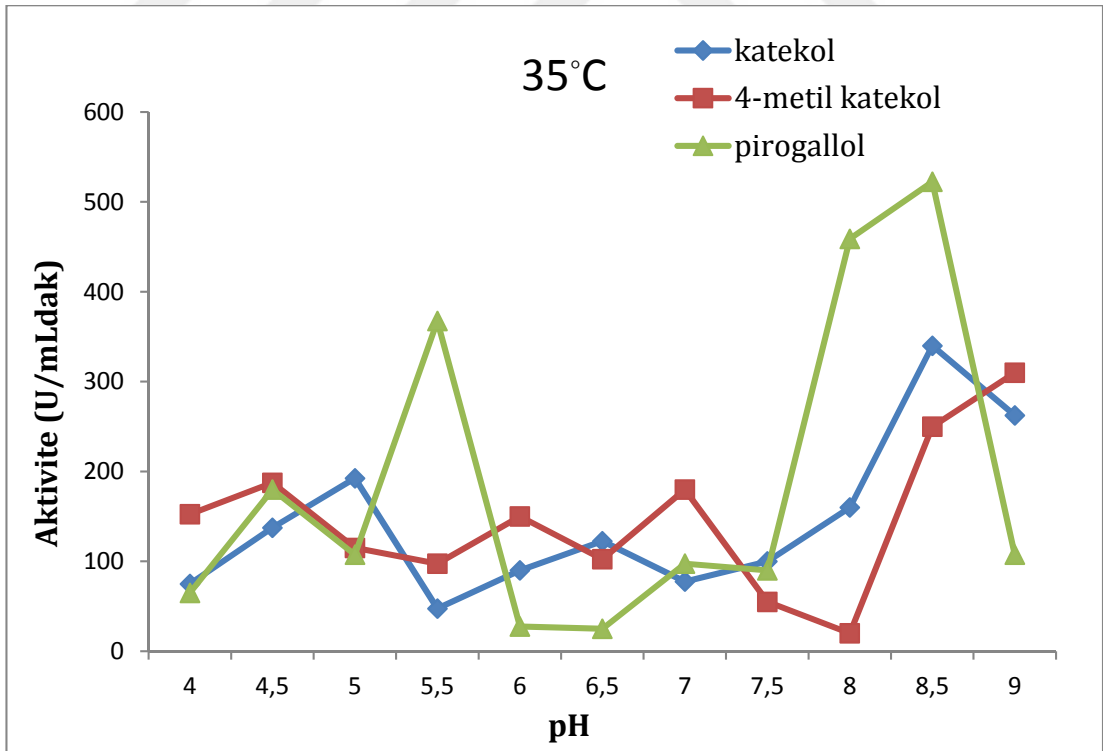
Şekil 4.6. PPO enziminin 20°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



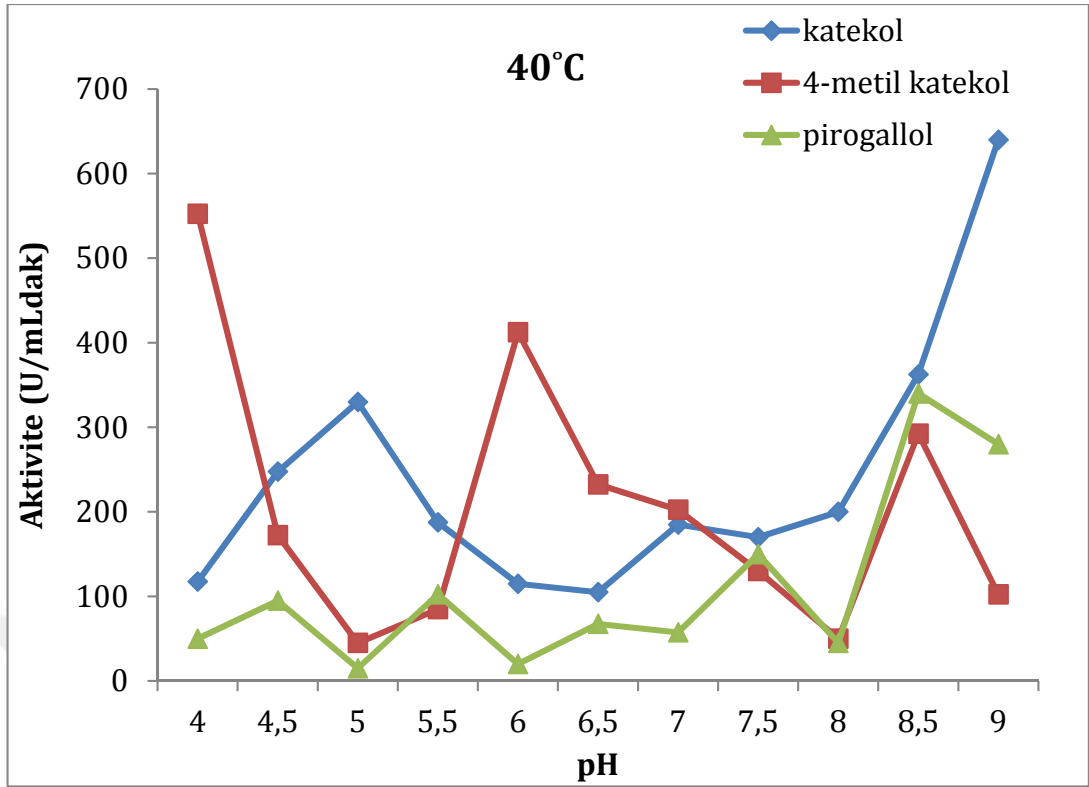
Şekil 4.7. PPO enziminin 25°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



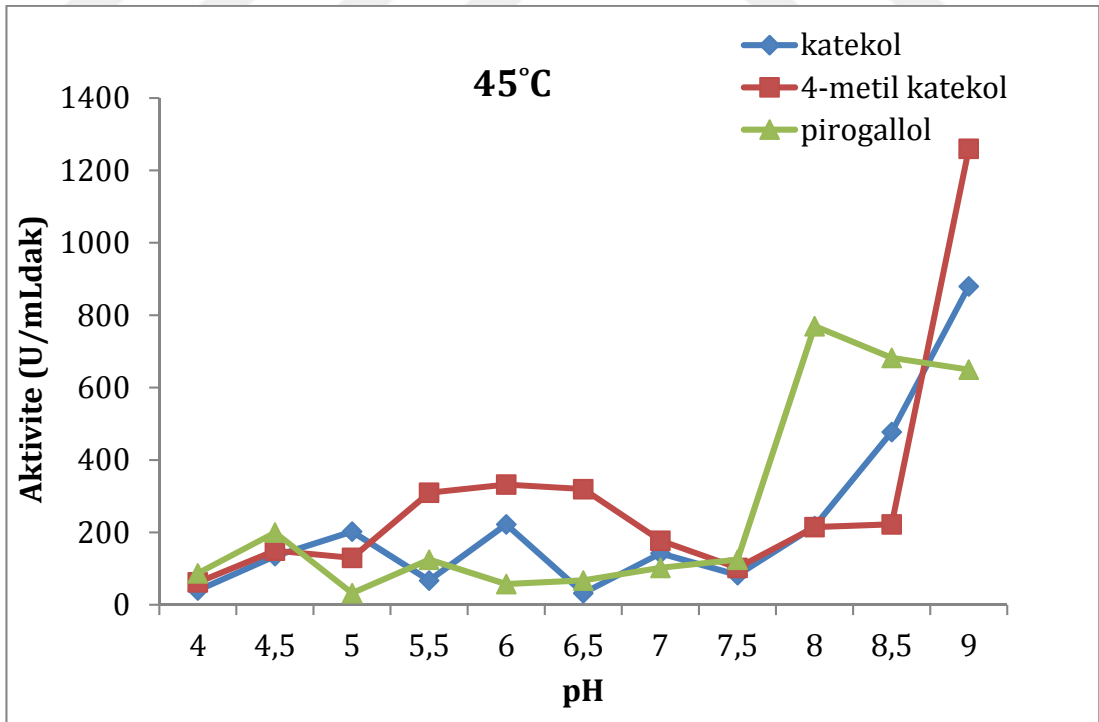
Şekil 4.8. PPO enziminin 30°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



Şekil 4.9. PPO enziminin 35°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



Şekil 4.10. PPO enziminin 40°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği



Şekil 4.11. PPO enziminin 45°C'de üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği

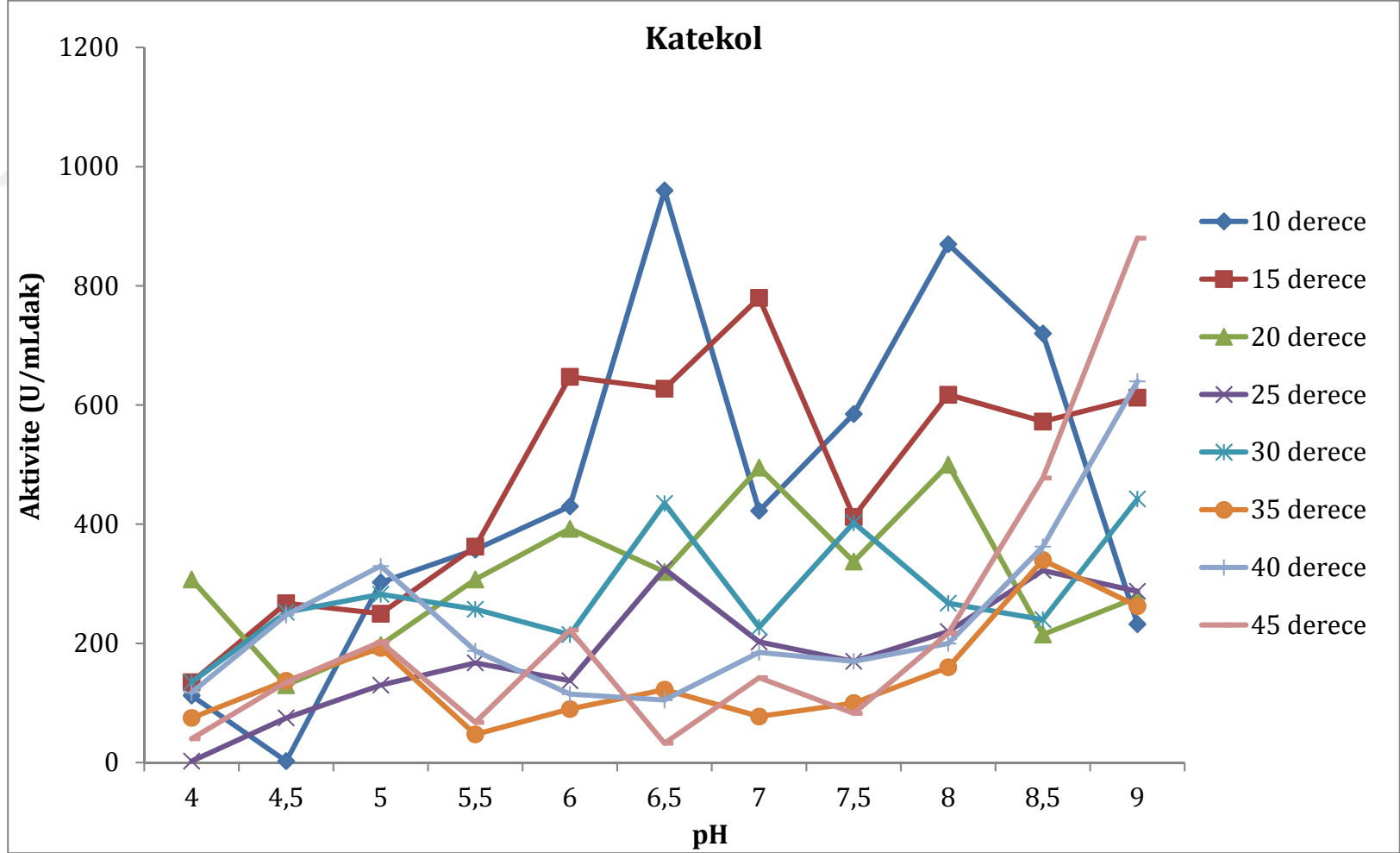
Çizelge 4.10. Arap kızı PPO enziminin üç ayrı substratı için farklı sıcaklıklardaki optimum pH değerleri

SICAKLIK (°C)	SUBSTRAT		
	Katekol	4-metil katekol	Pirogallol
	Optimum pH	Optimum pH	Optimum pH
10	6.5	7.0	8.5
15	7.0	6.0	8.5
20	8.0	7.0	8.5
25	6.5	6.5	8.5
30	9.0	6.0	8.5
35	8.5	9.0	8.5
40	9.0	4.0	8.5
45	9.0	9.0	8.0

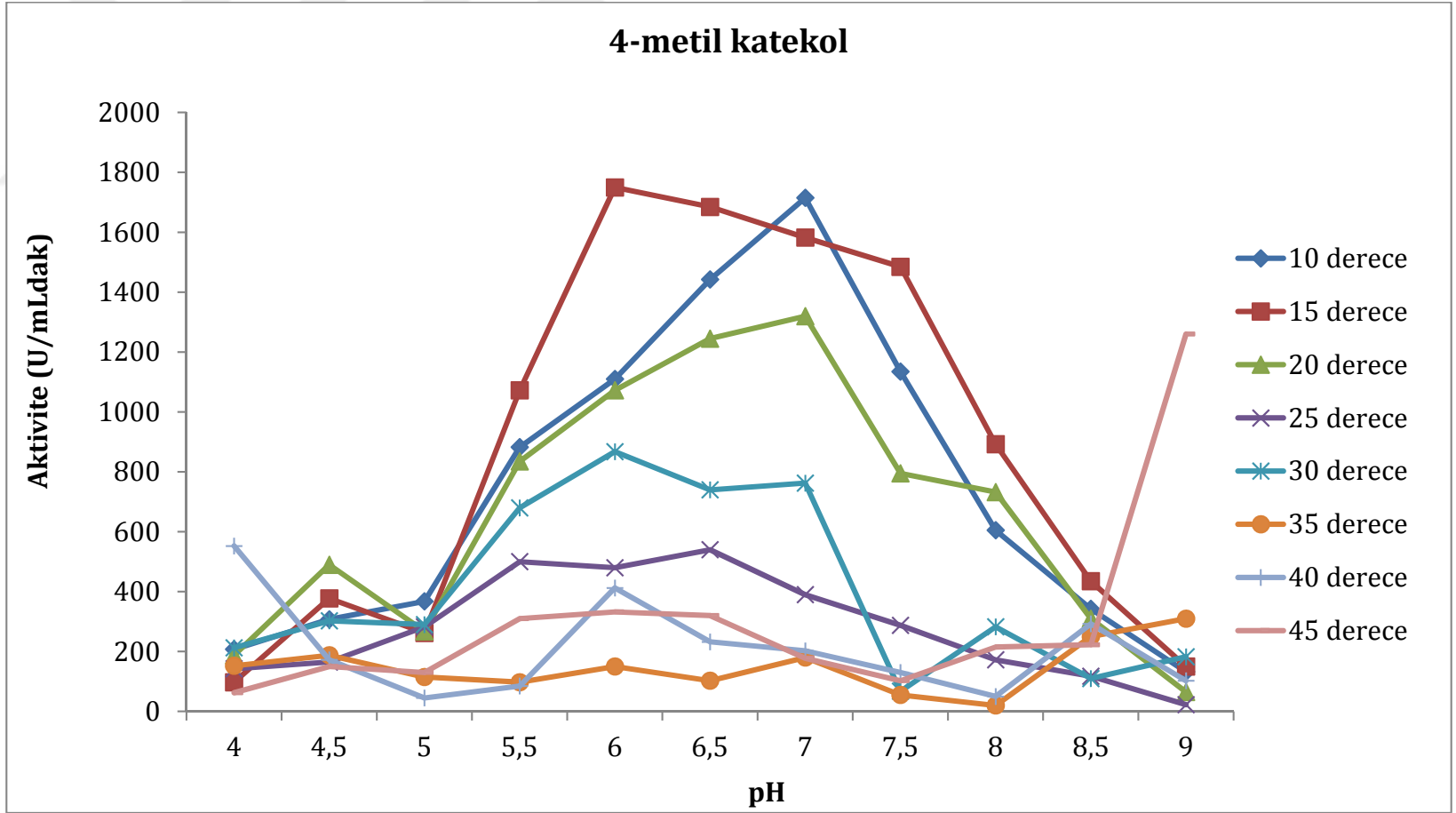
Arap kızı PPO enziminin katekol substratı için optimum pH'ı 10°C'de 6.5, 15°C'de 7.0, 20°C'de 8.0, 25°C'de 6.5, 30°C'de 9.0, 35°C'de 8.5, 40°C'de 9.0, 45°C'de 9.0 olarak bulunmuştur. 4-metil katekol substratı için optimum pH'ı 10°C'de 7.0, 15°C'de 6.0, 20°C'de 7.0, 25°C'de 6.5, 30°C'de 6.0, 35°C'de 9.0, 40°C'de 4.0, 45°C'de 9.0 olarak bulunmuştur. Pirogallol substratı için optimum pH'ı 10°C'de 8.5, 15°C'de 8.5, 20°C'de 9.0, 25°C'de 8.5, 30°C'de 8.5, 35°C'de 8.5, 40°C'de 8.5, 45°C'de 8.0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Çizelge 4.2 - 4.9'daki verilere bakılarak enzim aktivitelerinin ulaştığı en yüksek değerlerinin (katekol için 960 U/mL'dak, 4-metil katekol için 1750 U/mL'dak ve pirogallol için 3068 U/mL'dak) görüldüğü pH ve sıcaklıklara bakılarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırası ile 6.5, 10°C; 6.0, 15°C ve 8.5, 10°C olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Arap kızı PPO enziminin üç ayrı substrat için optimum pH, optimum sıcaklık (°C) ve aktivite (U/mL'dak) değerleri

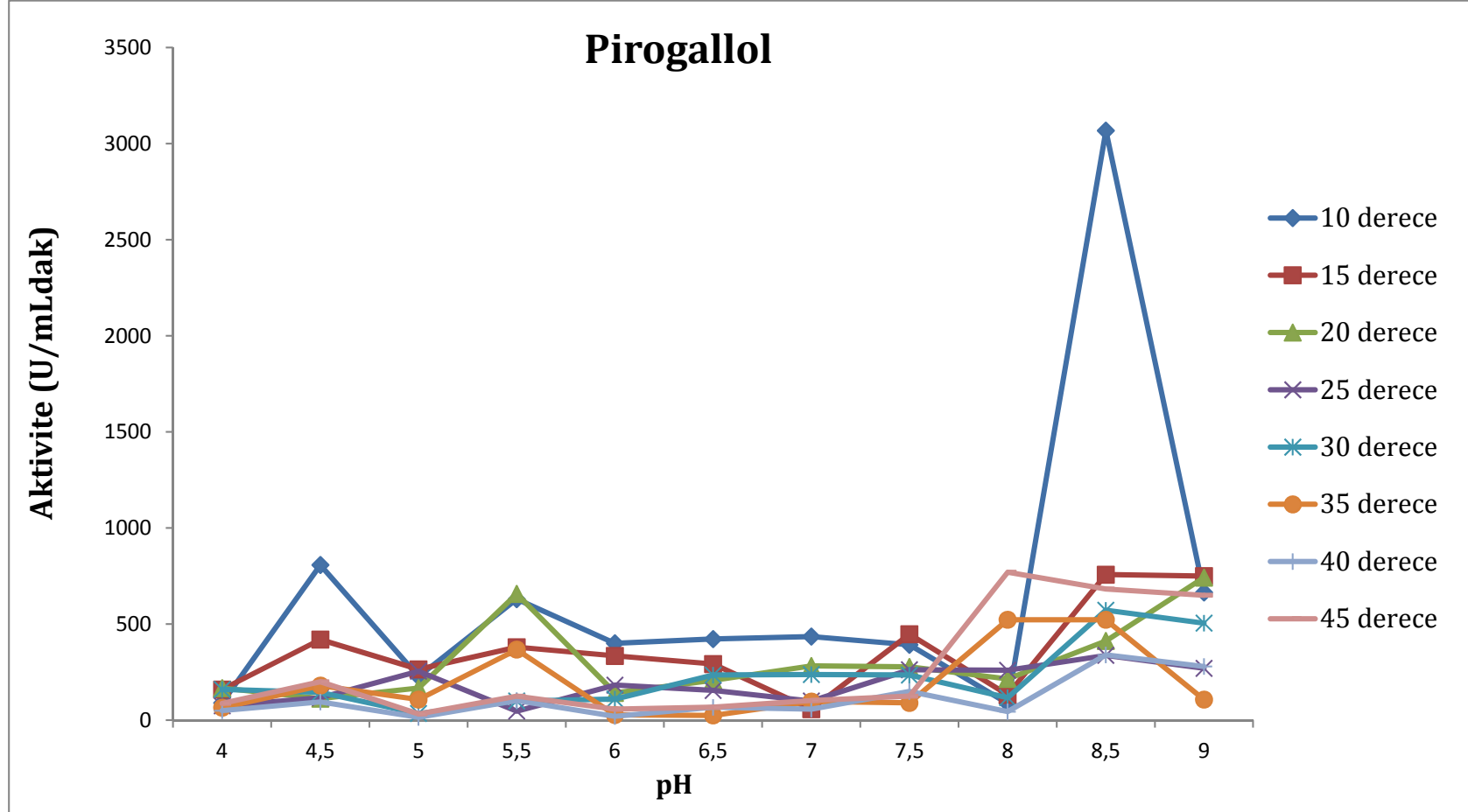
SUBSTRAT	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/mL'dak)
katekol	6.5	10	960
4-metil katekol	6.0	15	1750
pirogallol	8.5	10	3068



Şekil 4.12. PPO enziminin katekol substratı için farklı pH'a bağlı aktivite değişimi gösteren grafik



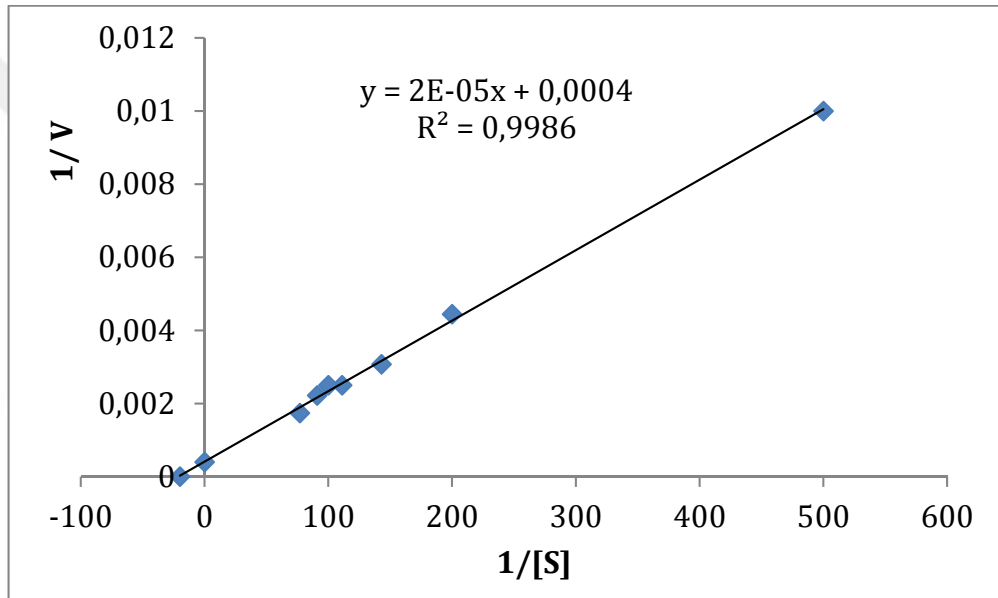
Şekil 4.13. PPO enziminin 4- metil katekol substratı için farklı pH'a bağlı aktivite değişimi gösteren grafik



Şekil 4.14. PPO enziminin pirogallol substratı için farklı pH'a bağlı aktivite değişimi gösteren grafik

4.5. Optimum pH ve Sıcaklıkta Farklı Substratlara Karşı K_M Ve V_{max} Değerlerinin Tespit Edilmesi

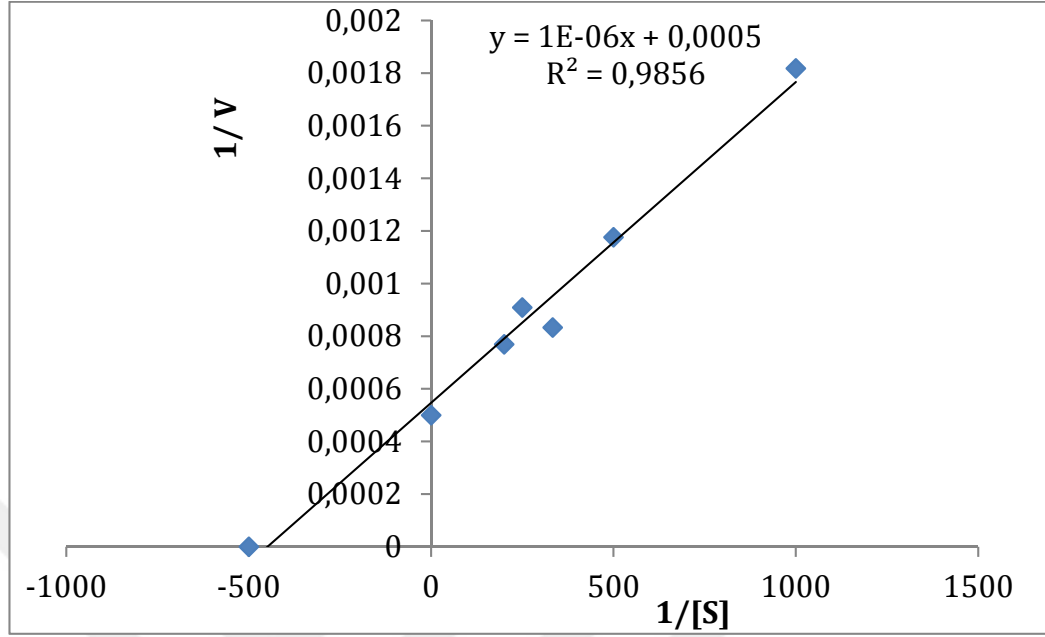
Her bir substrat için kendi optimum şartlarında farklı substrat konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri belirlenmiştir. Elde edilen $1/[S]$ - $1/V$ değerleri ile Linewear-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.15–4.17). Bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.18–4.21'deki grafiklerden yararlanılarak hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 4.11-4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Arap kızı PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği

Çizelge 4.12. Arap kızı elma PPO enziminin katekol substrat için K_M ve V_{max} değerleri

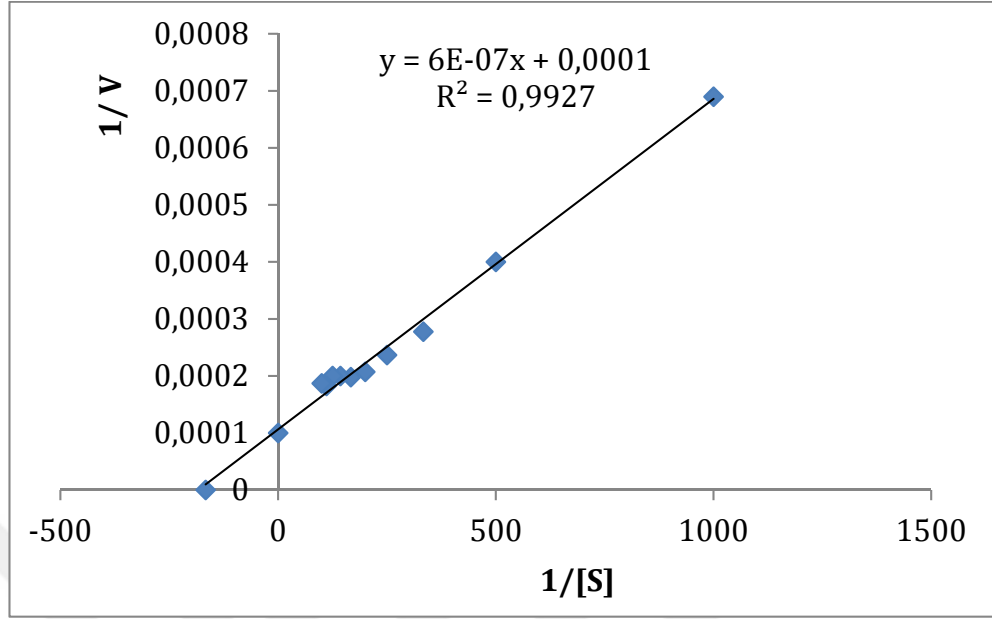
Substrat	K_M (mM)	V_{max} (U/mLdak)	V_{max}/K_M
Katekol	50	2500	50



Şekil 4.16. Arap kızı PPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.13. Arap kızı elma PPO enziminin 4-metil katekol substrat için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (U/mLdak)	V_{max}/K_M
4- metil katekol	2	2000	1000



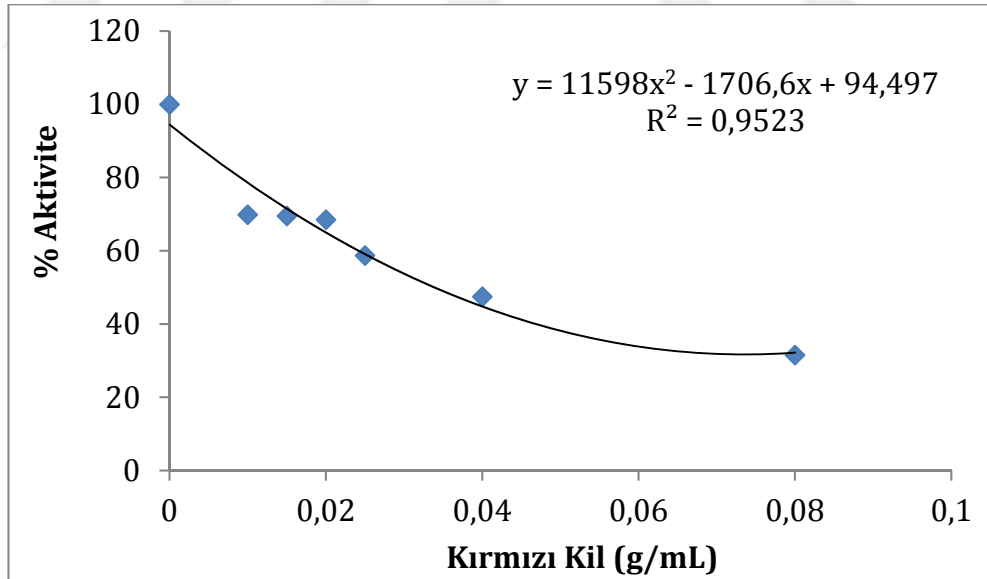
Şekil 4.17. Arap kızı PPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.14. Arap kızı elma PPO enziminin pirogallol substrat için K_M ve V_{max} değerleri

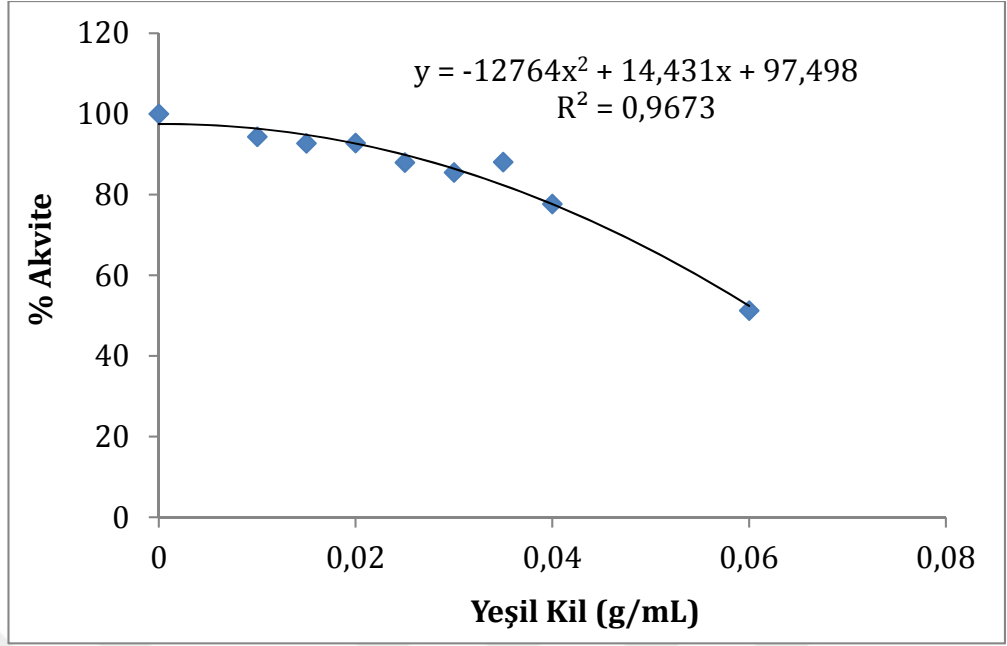
Substrat	K_M (mM)	V_{max} (U/mLdak)	V_{max}/K_M
Pirogallol	6	10000	1667

4.6. Bazı Killerle PPO Enziminin İmmobilizasyonu ile Killerin İnhibisyon Etkisi. IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Tespit Edilmesi

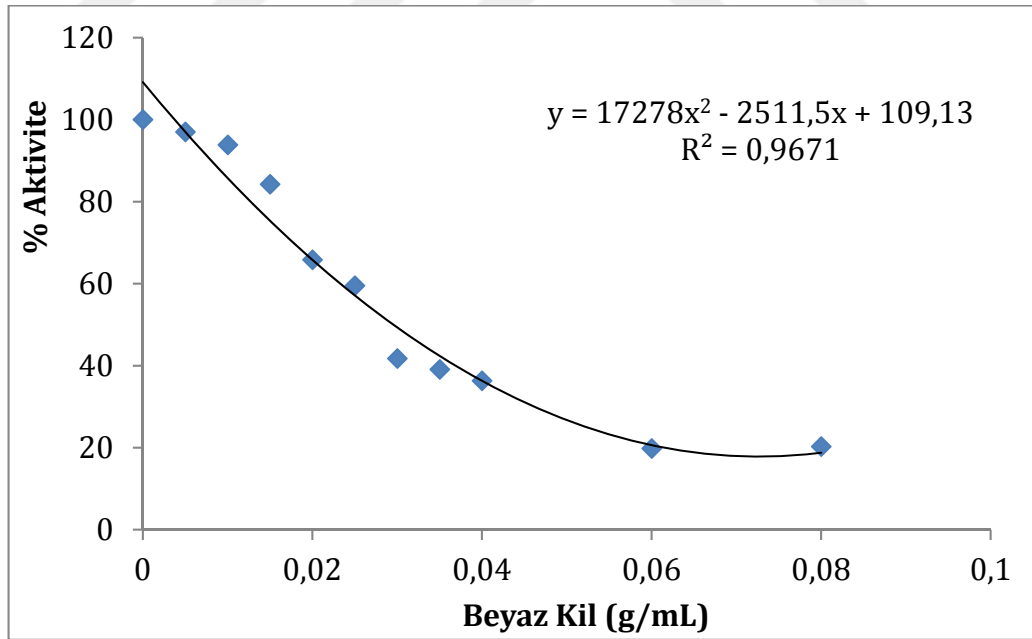
Farklı killere immobilizasyonu yapılan Arap kıızı elmasında PPO enziminin IC₅₀ değerlerinin tespiti için bölüm 3.2.12’de açıklandığı gibi üstte kalan süpernatant alınarak 0.1 M pirogallol substratına karşı aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen aktivite değerlerinden yararlanılarak %A-[I] grafikleri çizilip (Şekil 4.18-4.20) %50 inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları belirlenmiştir. İmmobilize edilen PPO enziminin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla; bölüm 3.2.12’de açıklandığı gibi üstte kalan süpernatant alınarak farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. En iyi aktivite veren pirogallol substratıyla iki farklı sabit immobilize kil konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlardan 1/V ve 1/[S] değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.21-4.23). Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.14’de verilmiştir.



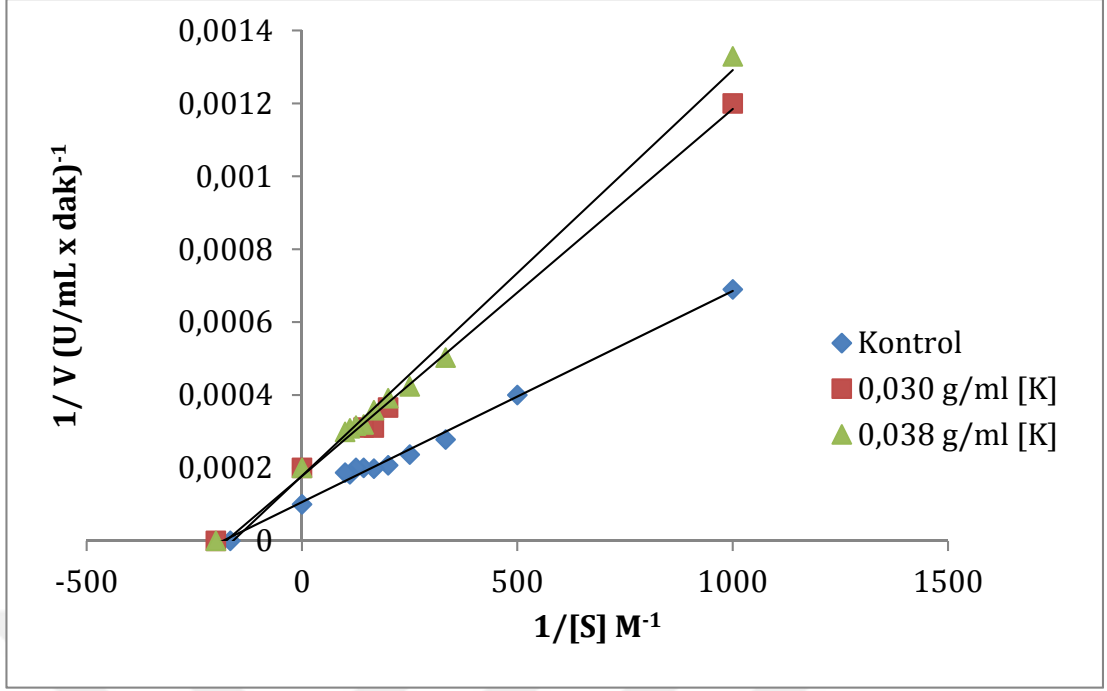
Şekil 4.18. Kırmızı kil içinde immobilize edilen Arap kıızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



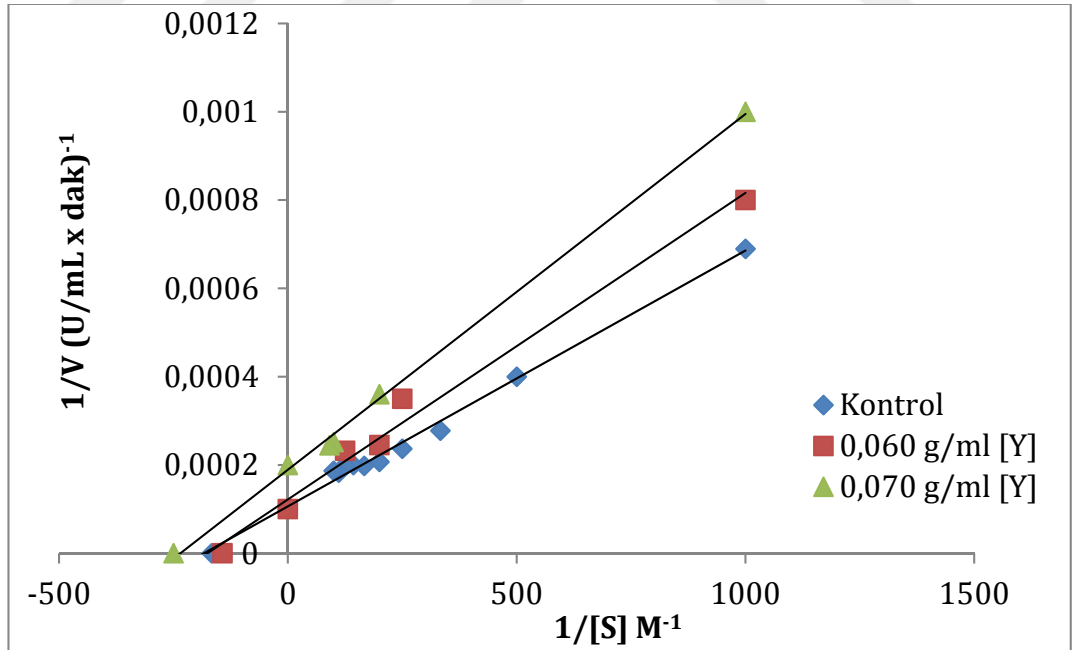
Şekil 4.19. Yeşil kil içinde immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



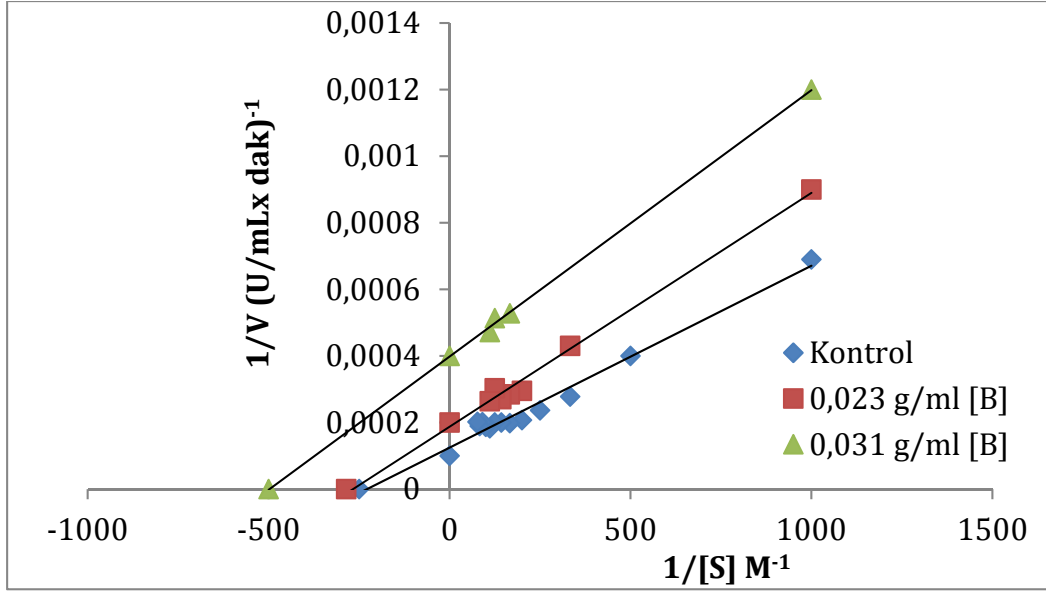
Şekil 4.20. Beyaz kil içinde immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



Şekil 4.21. Kırmızı kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ($[K_1] = 3.0 \times 10^{-2}$ g/mL, $[K_2] = 3.8 \times 10^{-2}$ g/mL)



Şekil 4.22. Yeşil kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ($[Y_1] = 6.0 \times 10^{-2}$ g/mL, $[Y_2] = 7.0 \times 10^{-2}$ g/mL)



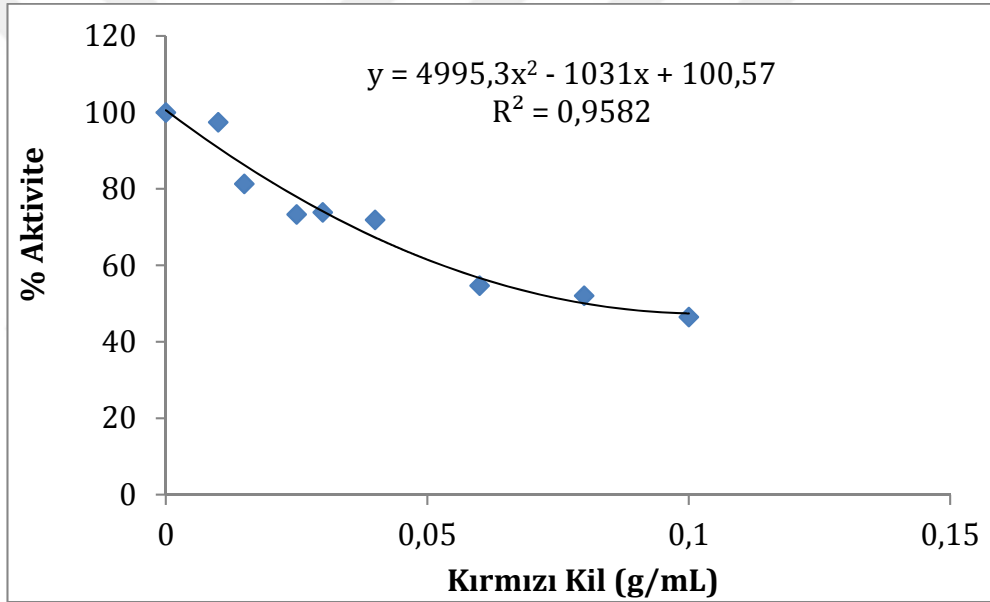
Şekil 4.23. Beyaz kil ile immobilize edilen Arap kızı PPO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ($[B_1] = 2.3 \times 10^{-2}$ g/mL, $[B_2] = 3.1 \times 10^{-2}$ g/mL)

Çizelge 4.15. Arap kızı immobilize PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratı konsantrasyonunda $[IC]_{50}$ ve K_i inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları

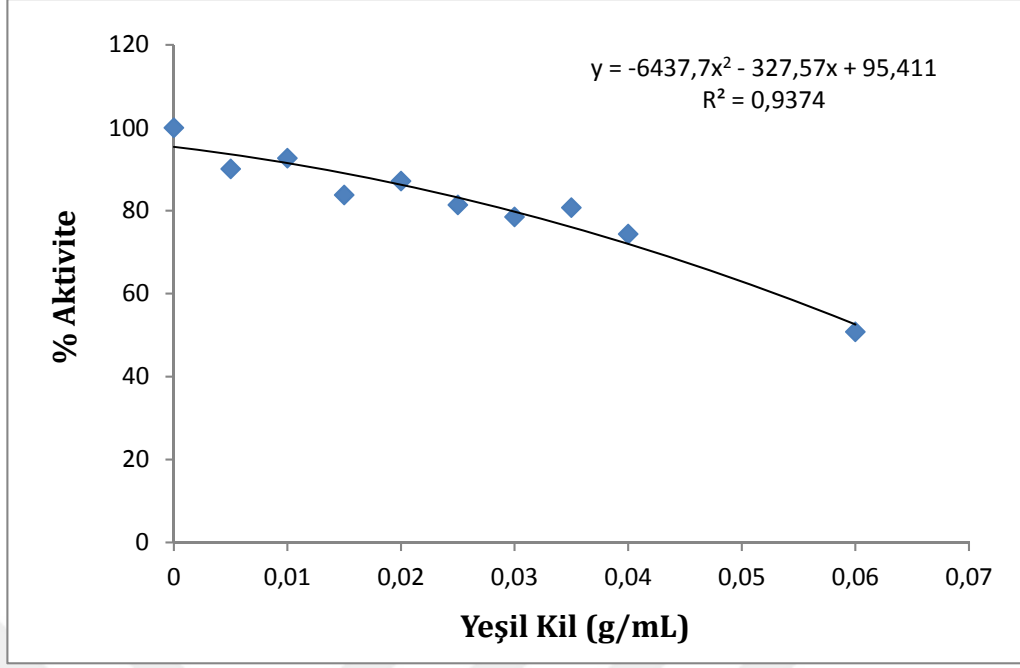
Kil Çeşitleri	$[IC]_{50}$ (g/mL)	K_i (g/mL)	Ortalama K_i (g/mL)	İnhibisyon Türü
Kırmızı Kil	0.034	0.045 0.057	0.051	Yarışmasız
Yeşil Kil	0.062	0.36 0.21	0.285	Yarışmasız
Beyaz Kil	0.027	0.032 0.016	0.024	Yarı yarışmalı

4.7. Serbest PPO Enzimine Killerin İnhibisyon Etkisi. IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Tespit Edilmesi

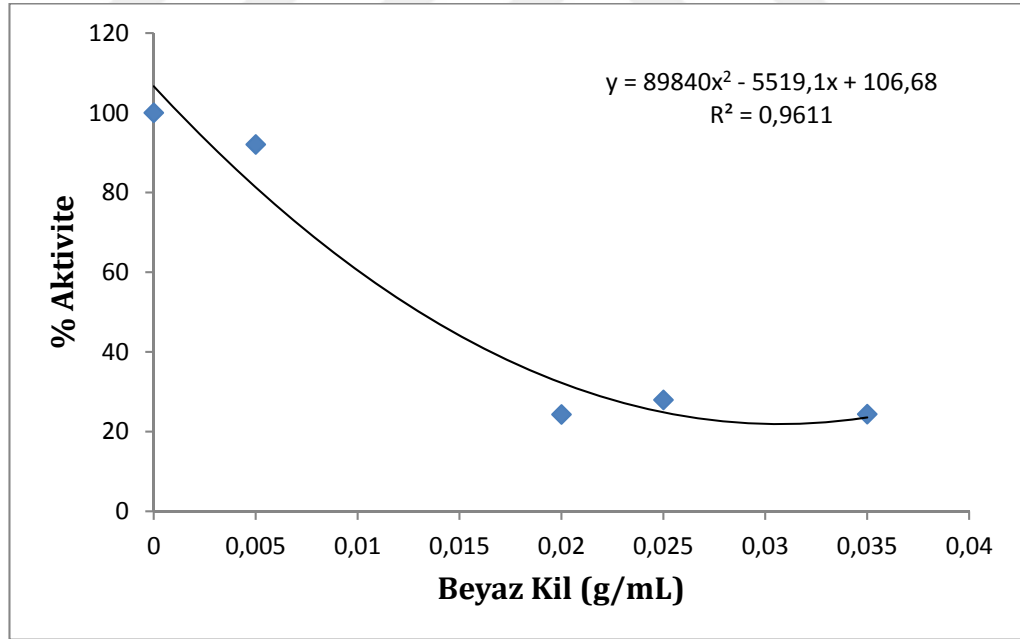
Serbest PPO enzimi, immobilizasyondan farklı olarak enzim ölçüm sırasında tampon içinde bulunan kil çözeltisine uygulanmıştır. Elde edilen %A-[I] grafikleri Şekil 4.24-4.26'de verilmiştir. Serbest PPO enziminin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla; immobilize olmayan serbest enzim ortamında farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. En iyi aktivite veren pirogallol substratı ile iki farklı kil konsantrasyonlarında serbest PPO enzimi çalışılmıştır. Aynı şekilde hesaplanan 1/V-1/[S] değerlerine ait grafikler Şekil 4.27-4.29'de verilmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 4.15'de verilmiştir.



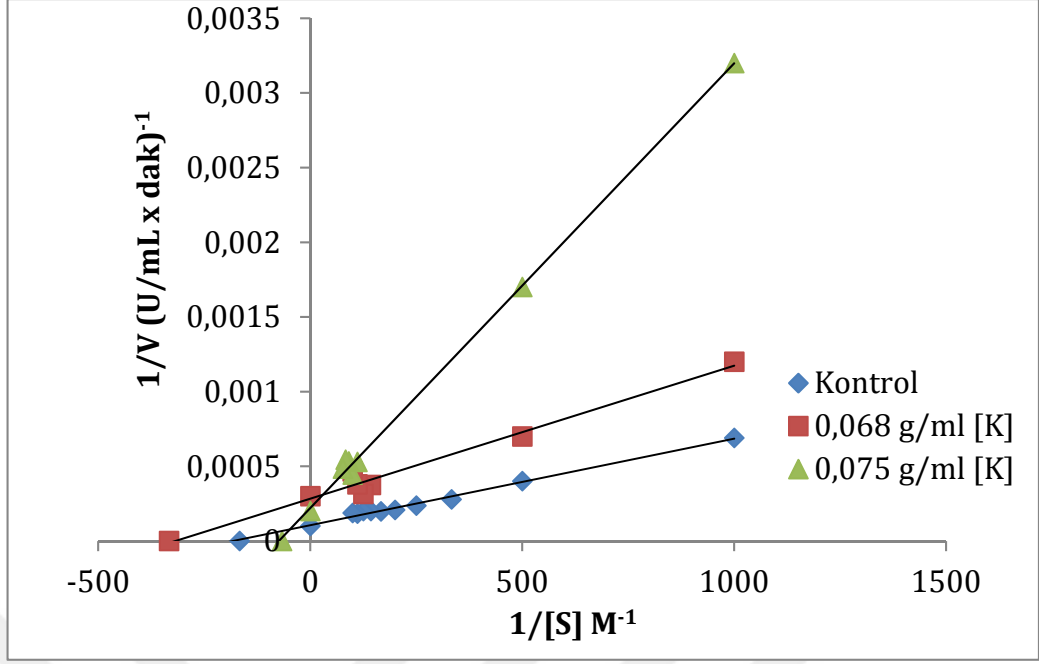
Şekil 4.24. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan kırmızı kil üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



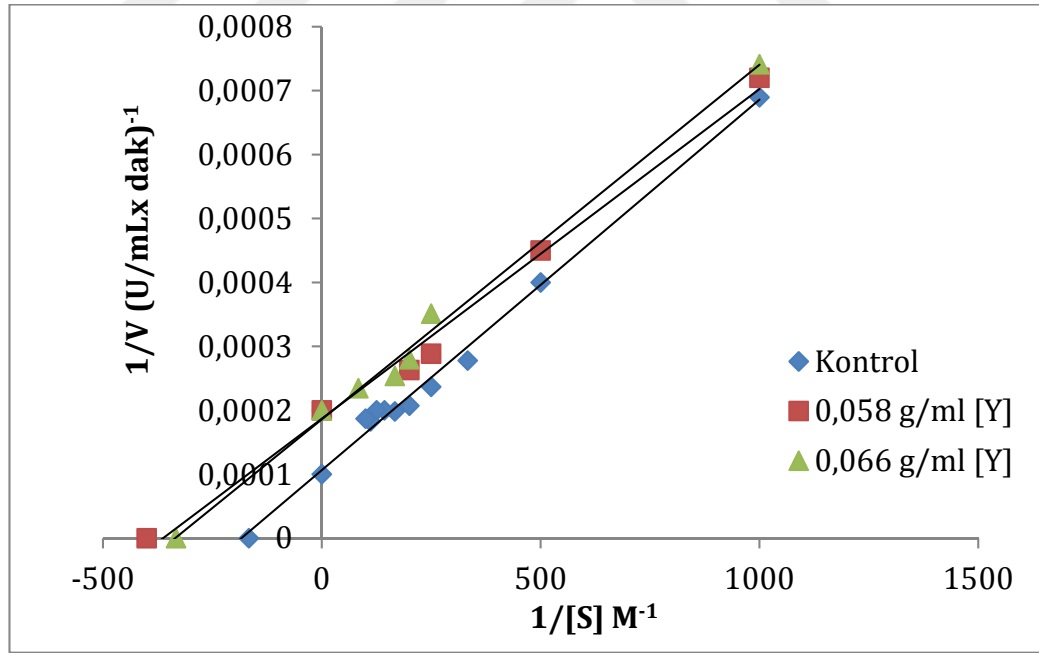
Şekil 4.25. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan yeşil kil üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



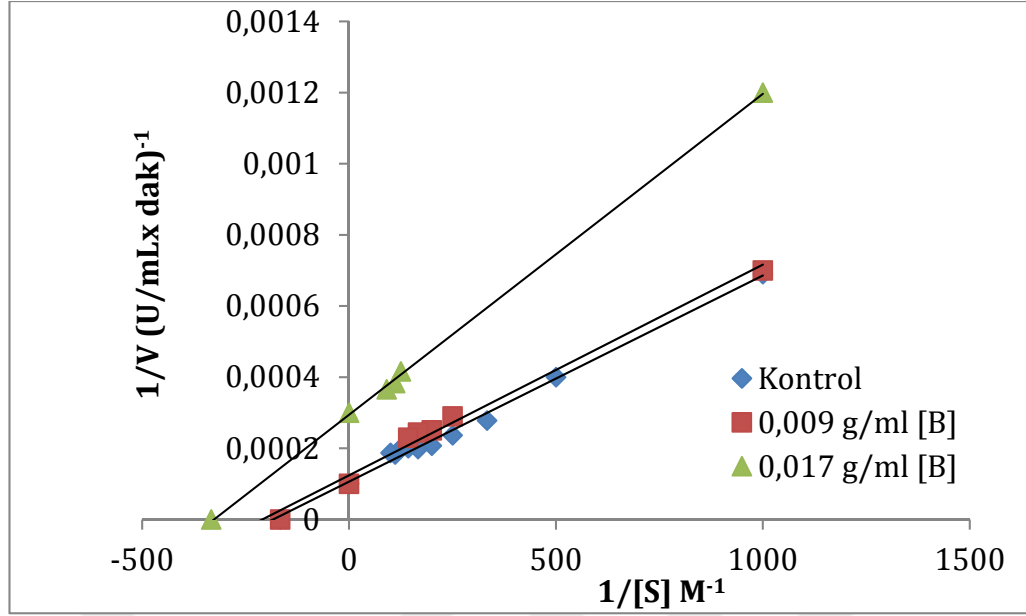
Şekil 4.26. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan beyaz kil üzerine 0.1 M pirogallol substratında % Aktivite-[IC₅₀] (g/mL) grafiği



Şekil 4. 27. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan kırmızı kil için inhibisyon etkisi ($[K_1] = 6.8 \times 10^{-2}$ g/mL, $[K_2] = 7.5 \times 10^{-2}$ g/mL)



Şekil 4. 28. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan yeşil kil için inhibisyon etkisi ($[Y_1] = 5.8 \times 10^{-2}$ g/mL, $[Y_2] = 6.6 \times 10^{-2}$ g/mL)



Şekil 4. 29. Arap kızı PPO enzimi ölçüm sırasında katılan beyaz kil için inhibisyon etkisi ($[B_1] = 0.9 \times 10^{-1} \text{ g/mL}$, $[B_2] = 1.7 \times 10^{-1} \text{ g/mL}$)

Çizelge 4.16. Arap kızı serbest PPO enzimi üzerine 0.1 M pirogallol substratı konsantrasyonunda $[IC]_{50}$ ve K_i inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları

Kil Çeşitleri	$[IC]_{50}$ (g/mL)	K_i (g/mL)	Ortalama K_i (g/mL)	İnhibisyon Türü
Kırmızı Kil	0.071	0.136 0.019	0.077	Lineer Karışık Tip
Yeşil Kil	0.062	0.041 0.066	0.054	Yarı yarışmalı
Beyaz Kil	0.013	0.018 0.017	0.018	Yarı yarışmalı

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Arap kızı elması ülkemizde yetiştirilen kendine has getirisi ve tadı ile tercih edilen, sevilerek tüketilen bir meyvedir. Bunun yanında PPO enzimi açısından oldukça zengindir. Elmadaki hızlı esmerleşme, istenmeyen renk değişimi bizi bu konuda çalışmaya sevk etmiştir. Bu çalışmada, Arap kızı elmasından saflaştırılan PPO enziminin belirlediğimiz bazı özellikleri incelenerek, kil ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ilk önce polifenol oksidaz enzimi Arap kızı elmasından Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile % 17'lik bir verimle 13.00 kat saflaştırılmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, bilinen Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak Iğdır elmasından polifenol oksidaz enzimi 110 kat saflaştırılmıştır (Türkan, 2009). Polifenol oksidaz enzimi Tortum elmasından afinite jeli ile 27.55 kat saflaştırılmıştır (Karabulut, 2017). Aynı afinite jeli ile Golden Delicious elma çeşidi 45.92 kat, Starking Delicious elma çeşidi 128.95 kat, Granny Smith elma çeşidi 25.60 kat saflaştırılmıştır (Çelik, 2017).

Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzim saflığının kontrolü ve molekül ağırlığı tespiti yapılmıştır. Saflaştırılan protein bandını içeren SDS PAGE jel fotoğrafı Şekil 4.3'te verilmiştir. Afinite jelinden saflaştırılan Arap kızı elma çeşidinde SDS-PAGE sonucuna göre PPO enziminin molekül kütlesi yaklaşık 66.2 kDa olarak tahmin edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, Red Delicious elma çeşidindeki polifenol oksidaz enzimi için poliakrilamid jel elektroforez sonucu pirokatekol substratı ile tespit edilen 2 aktif izoenzim olduğu ortaya çıkmıştır (Satjawatcharaphong vd., 1983). SDS PAGE ile, *Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling elmasının PPO enzimi molekül kütlesinin yaklaşık 45 kDa olduğu bulunmuştur (Eidhin vd., 2006). Fuji elmasından saflaştırılan PPO enziminin molekül

kütlesinin SDS PAGE ile 40 kDa olduğu tahmin edilmiştir (Lim vd., 2006). Fuji elmasından saflaştırılan membrana bağlı PPO'nun yaklaşık olarak 67 kDa'lık molekül kütlesine sahip bir dimer olduğu bulunmuştur (Liu vd., 2015a). Fuji elmasının membrana bağlı polifenol oksidaz enziminin molekül kütlesi 67.3 kDa olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2015b). Jel filtrasyonu ve SDS-PAGE işlemleri sonucu Meksika Golden Delicious elmasının PPO enziminin 58 kDa'lık bir monomer olduğu görülmüştür (Marrufo-Hernandez vd., 2017). Tortum elmasından saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin SDS-PAGE sonucuna göre yaklaşık 60 kDa'ya tekabül eden tek bant gözlenmiştir (Karabulut, 2017).

Çalışma sırasında kalitatif protein tayini elde edilen elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Kantitatif protein tayinleri ise Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Ürünün oluşma hızı, kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluklarının spektrofotometrik metod kullanılarak 420 nm dalga boyunda aktivite ölçümleri ile yapılmıştır. Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak pH 4.5-9.0 aralığında fosfat tamponu (Na_2HPO_4) kullanılarak yapılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesinde de aynı üç substratla 10°C-45°C sıcaklık aralığında aktiviteler belirlenmiştir. Arap kızı elmasında PPO enzimi için katekol substratına karşı optimum pH 6.5 ve sıcaklık 10 °C; 4-metil katekol substratına karşı optimum pH 6.0 ve sıcaklık 15 °C; pirogallol substratına karşı optimum pH 8.5 ve sıcaklık 10 °C olarak bulunmuştur. Arap kızı elmasında PPO enzimi için katekol substratına karşı en yüksek aktivite 960 U/mL'de; 4-metil katekol substratına karşı en yüksek aktivite 1750 U/mL'de; pirogallol substratına karşı en yüksek aktivite 3068 U/mL'de olarak belirlenmiştir. Belirlenen sonuçlara göre, Arap kızı elmasındaki PPO enzimi için en uygun substratın pirogallol olduğu, optimum pH 8.5 ve optimum sıcaklığın 10°C olduğu bulunmuştur.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, Red Delicious elma çeşidindeki polifenol oksidaz enziminin ham enzim ekstraktı için optimum pH'sı 6.2, optimum sıcaklığı ise 30°C olarak belirlenmiştir (Satjawatcharaphong vd., 1983). Amasya elmasında PPO için elde edilen optimum pH katekol için 7.0, 4-metil katekol için

9.0, pirogallol için 8.6 ve L-DOPA için 6.6 olarak belirlenmiştir. Amasya elmasındaki polifenol oksidaz enzimi aktivitesi için en uygun substratın katekol olduğu ve katekol için optimum sıcaklığın 18°C olduğu belirlenmiştir. (Oktay vd., 1995). Van elmasından (Golden Delicious) polifenol oksidaz enzimi için optimum sıcaklık 50°C ve optimum pH 4.0 olarak belirlenmiştir (Demir vd., 2006). *Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling elmadan polifenol oksidaz enzimi PPO aktivitesi için optimum pH 6.5'da gözlenmiştir. PPO aktivitesi için optimum sıcaklık 30°C gözlenmiştir. Çalışılan substratlardan 4-metilkatekolün en yüksek PPO aktivitesine sahip olduğu, bunu katekol, pirogallol ve (-)-epikateşin substratlarının izlediği görülmüştür (Eidhin vd., 2006). Fuji elmasının etli kısmındaki PPO enzimi için substrat olarak katekol çalışıldığında optimum pH 6.5 ve sıcaklık 35°C derece olarak belirlenmiştir (Lim vd., 2006). Starking Delicious elma çeşidindeki PPO enziminin 4-metil katekol için optimum pH değeri 5.5, pirogallol için ise optimum pH değeri 7.2 bulunmuştur (Soysal, 2008). Golden Delicious elma çeşidinden izole edilen PPO enzimi için optimum pH 5.5 ve optimum sıcaklık 25°C olarak bulunmuştur (Soysal, 2009). İğdir elmasındaki polifenol oksidaz enziminin optimum pH 6.0 optimum sıcaklığı ise 50°C olarak bulunmuştur (Türkan, 2009). Hemşin elmasından polifenol oksidaz enzimi için optimum pH 5.5 ve optimum sıcaklık 30-40°C'de olarak bulunmuştur (Aydın vd., 2015). Elma posasından ekstre edilen polifenol oksidaz enzimi aktivitesi için optimum pH 7.0 ve sıcaklık değerleri 20°C olarak bulunmuştur (Ansari vd., 2017). Meksika Golden Delicious elmasındaki polifenol oksidaz enzimi optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 35°C ve 6.0 olarak bulunmuştur (Marrufo-Hernandez vd., 2017). Tortum elmasından PPO enziminin katekol substratı için optimum pH değeri 5.0 ve 4-metil katekol için optimum pH değeri 5.5'dir. Enzimin her iki substratı için stabil pH değeri 5.5. optimum iyonik şiddet değeri 0.05 M ve optimum sıcaklık değeri 10°C olarak belirlenmiştir (Karabulut, 2017). Fuji elmasından saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi için optimum pH 7.0 ve sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur (Guo vd., 2018).

Bu çalışmada, Arap kızı elmasının PPO enziminin substratlara karşı K_M ve V_{max} değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur. Katekol substratı için K_M 50

mM ve V_{max} 2500 U/mL'de; 4-metil katekol substratı için K_M 2 mM ve V_{max} 2000 U/mL'de; pirogallol substratı için K_M 6 mM ve V_{max} 10000 U/mL'de olarak belirlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, Red Delicious elma çeşidindeki polifenol oksidaz enziminin ham enzim ekstraktı iki aktif enzim formu için ortalama K_M 2.2×10^{-1} M pirokatekoldür. Ortalama V_{max} ise dakikada 4.8×10^{-1} AA390 olarak bulunmuştur (Satjawatcharaphong vd., 1983). Starking Delicious elma çeşidindeki polifenol oksidaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri 4-metil katekol, pirogallol substratları için sırasıyla 2.24 mM, 0.415 U/mL; 8.04 mM, 1.067 U/mL olarak bulunmuştur (Soysal, 2008). Golden Delicious elma çeşidinden izole edilen PPO enziminin 4-metil katekol substratı için K_M değeri Michaelis-Menten modeli kullanılarak 4.76 mM olarak belirlenmiştir (Sosyal, 2009). Yomra elması ham polifenol oksidaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri L-tirozin substratı için 9.30 mM, 7.60 μ M/dak; 3-(4-hidroksifenil) propanoik asit substratı için 0.70 mM, 1.02 μ M/dak; katekol substratı için 7.90 mM, 21.50 μ M/dak; 4-metilkatekol substratı için 10.10 mM, 24.80 μ M/dak; L-3,4-dihidroksifenilalanin substratı için 2.50 mM, 1.60 μ M/dak olarak bulunmuştur. Yomra Elması polifenol oksidaz enziminin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve difenolaz aktivitesi katekol substratına karşı en yüksek ilgiye sahipken, bunu sırasıyla 4-metil katekol ve L-DOPA'nın izlediği, monofenolaz aktivitesi için ise substrat ilgisinin sırasıyla MHPPA, L-Tirozin şeklinde olduğu bulunmuştur (Can vd., 2014). Hemşin elmasından polifenol oksidaz enziminin K_M değeri 3.40 mM ve V_{max} değeri 333.3 EU/mL'de olarak tespit edilmiştir (Aydın vd., 2015).

Bu çalışmada, Arap kızı elmasında tüm IC_{50} ve K_i değerlerini belirlemek için pirogallol substratı kullanılmıştır. Polifenol oksidaz enziminin kille immobilizasyonu için kırmızı, yeşil ve beyaz kil çeşitleri kullanılmıştır. Arap kızı elma polifenol oksidaz enzimi immobilize edildiğinde elde edilen kırmızı kil için IC_{50} değeri 0.034 g/mL, yeşil kil için IC_{50} değeri, 0.062 g/mL beyaz kil için IC_{50} değeri 0.027 g/mL olarak bulunmuştur. K_i değerleri ise kırmızı kil için 0.051 g/mL, yeşil kil için 0.285 g/mL beyaz kil için 0.024 g/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.14). Enzimin killere immobilize edildiği durumda: kırmızı ve yeşil kil

yarışmasız inhibisyon, beyaz kil yarı yarışmalı tip inhibisyon etkisi göstermiştir. Elde edilen verilere göre immobilizasyon sonucunda Arap kızı elmasından elde edilen polifenol oksidaz enzimi için en etkili inhibitörün beyaz kil olduğu bulunmuştur. Arap kızı elma polifenol oksidaz enziminin immobilize olmadığı ve ölçüm sırasında eklendiği durumdaki kırmızı kil için IC_{50} değeri 0.071 g/mL, yeşil kil için IC_{50} değeri 0.062 g/mL beyaz kil için IC_{50} değeri 0.013 g/mL olarak bulunmuştur. K_i değerleri ise kırmızı kil için 0.077 g/mL, yeşil kil için 0.054 g/mL beyaz kil için 0.018 g/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.15). Enzimin serbest olduğu durumda kırmızı kil lineer karışık tip olarak, yeşil ve beyaz killerde ise yarı yarışmalı tip inhibisyon etkisi yapmıştır. Arap kızı elmasından elde edilen polifenol oksidaz enziminin serbest olduğu durumda en etkili inhibitörün beyaz kil olduğu belirlenmiştir. Tüm verilere bakıldığında enzimin immobilize edildiği ve serbest olduğu iki durumda da en etkili inhibitörün beyaz kil olduğu görülmektedir.

Dereotundan Polifenol oksidaz enzimi kısmi saflaştırılarak yeşil, sarı ve kırmızı killere immobilize edilmiştir. Yeşil, sarı ve kırmızı kil immobilize enzimler için elde edilen K_i değerleri sırasıyla 1.46×10^{-2} M, 8.9×10^{-4} M, 7.57×10^{-5} M olarak bulunmuştur. Immobilize enzimlerden yeşil kil ve sarı kil ile yapılan immobilizasyonların yarışmasız, kırmızı kil ile yapılan immobilizasyonun ise yarı yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Immobilizasyon sonucu dereotundan elde edilen PPO enzimi için en etkili inhibitörün kırmızı kil olduğu bulunmuştur. Dereotundan elde edilen PPO enziminin immobilize edildiğindeki 10 mM katekol substratıyla %50 inhibisyona sebep olan IC_{50} değerleri yeşil kil için 2.99×10^{-2} M, kırmızı kil için 4.90×10^{-2} M, sarı kil için 7.2×10^{-2} M olarak bulunmuştur. PPO enziminin ölçüm esnasında kil çözeltisine karıştırıldığı immobilize olmamış enzim çözeltilerinde katekol substratı ile %50 inhibisyona sebep olan IC_{50} değerleri yeşil kil için 6.04×10^{-1} M, sarı kil için 2.32×10^{-1} M ve kırmızı kil için 2.63×10^{-1} M olarak bulunmuştur. Immobilize olmayan enzimler için elde edilen K_i değerleri yeşil kil için 4.83×10^{-3} , sarı kil için 2.76×10^{-3} ve kırmızı kil için 2.27×10^{-3} M olarak bulunmuştur. İnhibisyon etkileri her üç tür içinde yarışmalıdır. Elde edilen değerlere göre kırmızı kilin diğer killere oranla daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Va'zquez-Flores, A., González-Aguilar, G. A., 2007. Dual Effect of b-Cyclodextrin (b-CD) on the Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and Methyl Jasmonate (MJ). *Food Chemistry*, 101, 1346–1356.
- Akbulut, N., 2011. Dereotundan (*Anethum graveolens*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Bazı Killerle Immobilizasyonu ve Seçilmiş Özelliklerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 85s, Erzurum.
- Amaki, K., Saito, E., Taniguchi, K., Joshita, K., Murata, M., 2011. Role of Chlorogenic Acid Quinone and Interaction of Chlorogenic Acid Quinone and Catechins in the Enzymatic Browning of Apple. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(5), 829–832.
- Anonim, 2015. Malus Cinsi Türleri. T.C3.BCrler. Erişim tarihi: 26.10.2015. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Malus#>
- Anonim, 2018a. Isparta Elması <http://www.isparta.gov.tr/isparta-elmasi> Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Anonim, 2018b. <https://www.fidandeposu.com/arapkizi-elma-fidani> Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Ansari, R., Khan, Z.H., Mular, S., Khan, N., D., 2017. Extraction and characterization of polyphenol oxidase from pulp of apple fruit. *International Journal of Applied Research*, 3(1), 569-572.
- Arslan, O., Erzenin, 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.
- Arslan, O., Doğan, S., 2005. Inhibition of Polyphenol Oxidase Obtained from Various Sources by 2.3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1499–1504.
- Atay, E., Atay, A.N., 2011. Kültür Tarihi ve Taksonomi. History and Taxonomi. 9s. <https://www.researchgate.net/publication/285054355> Erişim Tarihi: 25.10.2018.
- Aydın, B., Gülçin, I., Alwasel, S.H., 2015. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Hemşin Apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, 18, 2735–2745.
- Breen, C., 1999. The Characterization and Use of Polycation-Exchanged Bentonites. *Applied Clay Science*, 15, 187–219.

- Bickerstaff, G.F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Enzymology. Humana Press, New Jersey, 1-11.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas N., Yıldız, O., Kolaylı, S., 2014. Polyphenol Oxidase Activity and Antioxidant Properties of Yomra Apple (*Malus communis* L.) From Turkey. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29(6), 829-835.
- Chen, X., Feng, T., Zhang, Y., He, T., Feng, J., Zhang, C., 2007. Genetic Diversity of Volatile Components in Xinjiang Wild Apple (*Malus sieversii*). Journal of Genetics and Genomics, 34(2), 171-179.
- Chiabrando, V., Giacalone, G., 2012. Effect Of Antibrowning Agents on Color And Related Enzymes in Fresh-Cut Apples During Cold Storage. Journal of Food Processing and Preservation, 36, 133–140.
- Chibata, I., 1978. Immobilized Enzymes. Research and Development. Kodansha, Tokyo.
- Cuatracasas, P., 1970. Protein Purification by Affinity Chromatography. Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads. Journal Biological Chemistry, 245 (12). 3059-3065.
- Coche-Guerente, L., Desprez. V., Labbe. P., Therias, S., 1999. Amplification of Amperometric Biosensor Responses by Electrochemical Substrate Recycling Part II. Experimental Study of the Catechol-Polyphenol Oxidase System Immobilized in a Laponite Clay Matrix. Journal of Electroanalytical Chemistry, 470 (1), 61-69.
- Demir, H., Yörük, İ.H., Savran, A., Ekici, K., 2006. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Van Apple (*Golden delicious*). Asian Journal of Chemistry, 18(1). 475-480.
- Demir, H., Alkan, S., Savran, A., Baycan, Y.S., Emre, Ö., Sabancılar, İ., 2009. Nar Polifenol Oksidaz Enziminin Kil ile İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. 23. Ulusal Kimya Kongresi (16-20 Haziran 2009/Sivas), BP-085.
- Dinçer, A., Becerik, S., Aydemir, T., 2011 Immobilization of Tyrosinase on Chitosan–Clay Composite Beads International Journal of Biological Macromolecules, 50, 815– 820.
- Eidhin, D.M.N., Murphy, E., O’beirne, D., 2006. Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley’s Seedling): Purification Strategies and Characterization. Journal of Food Science, 71(1), 51-58.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1995. Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Verdedoncella Apple. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43 (11), 2807-2812.
- Friedman, M., 1997. Chemistry. Biochemistry. and Dietary Role of Potato Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.

- Fu, Y., Zhang, K., Wang, N., Du, J., 2007. Effects of Aqueous Chlorine Dioxide Treatment on Polyphenol Oxidases from Golden Delicious Apple. *LWT Food Science and Technology*, 40, 1362–1368.
- Gacche, R.N., Shete, A.M., Dhole, N.A., Ghole, V.S., 2006. Reversible inhibition of polyphenol oxidase from apple using L-cysteine. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13 (5), 459-463.
- Grim, R.E., 1968. *Clay Mineralogy*. McGraw-Hill Book Company, USA.
- Guo, S.W., Zhang, L., Zhang, L., Zhao, M.N., Meng, X.H., 2018. Inhibition Kinetics of Oligochitosan as an Uncompetitive Inhibitor on Fuji Apple Polyphenol Oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 42 (5) e12585. DOI: 10.1111/jfbc.12585.
- Güray, M.Z., 2009. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Thermophilic *Bacillus* sp. İzmir Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 54s, İzmir.
- Hemachandran, H., Anantharaman, A., Mohan, S., Mohan, G., Kumar, D.T., Dey, D., Kumar, D., Dey, P., Choudhury, A., Doss, C.G.P., Ramamoorthy, S., 2017. Unraveling the Inhibition Mechanism of Cyanidin-3-sophoroside on Polyphenol Oxidase and its Effect on Enzymatic Browning of Apples. *Food Chemistry*, 227. 102-110.
- Holderbaum, D.F., Kon, T., Kudo, T., Guerra, M.P., 2010. Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development, *Hortscience*, 45 (8), 1150-1154.
- Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D., White, K., 1988. Inhibition of mushroom Polyphenol Oxidase by Ascorbic Acid Derivatives. *Journal Food Science*, 53:765-771.
- Jang, M.S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., Ohshima, T., 2002. Inhibitory Effects of 'Enokitake' Mushroom Extracts on Polyphenol Oxidase and Prevention of Apple Browning. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 35, 697–702.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J., 1990. Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (4). 926-931.
- Jang, J.H., Moon, K.D., 2011. Inhibition of Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities on Fresh-Cut Apple by Simultaneous Treatment of Ultrasound and Ascorbic Acid. *Food Chemistry*, 124 (2), 444-449.
- Karabulut, Ş., 2017. Tortum Elmasından (*Malus Sylvestris*.) Polifenol Oksidaz Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması. Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71s, Erzurum.

- Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., Rompel, A., 2017a. In Crystallo Activity Tests with Latent Apple Tyrosinase and Two Mutants Reveal the Importance of the Mutated Sites for Polyphenol Oxidase Activity. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 73, 491-499.
- Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., Rompel, A., 2017b. Three Recombinantly Expressed Apple Tyrosinases Suggest the Amino Acids Responsible for Mono-Versus Diphenolase Activity in Plant Polyphenol Oxidases. *Scientific Reports*, 7, 8860. DOI: 10.1038/s41598-017-08097-5.
- Keleş, F., 1986. Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerine Araştırmalar I. Genel Özellikler, *Doğa*. D2. 10 (2). 224-234.
- Kim, M.J., Hung, Y.C., 2014. Effect Of Alkaline Electrolyzed Water As An Inhibitor Of Enzymatic Browning In Red Delicious Apples. *Journal of Food Biochemistry*, 38, 542-550.
- Le Bourvellec, C., Le Quere, J.M., Sanoner, P., Drilleau, J.F., Guyot, S., 2004. Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Procyanidins and Polyphenol Oxidation Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1), 122-130.
- Lim, J.H., Jeong, M.C., Moon, K.D., 2006. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase in the Flesh of the Fuji Apple. *Food Science and Biotechnology*, 15 (2), 177-182.
- Liu, F., Zhao, J.H., Gan, Z.L., Ni, Y.Y., 2015a. Comparison of Membrane-Bound and Soluble Polyphenol Oxidase in Fuji Apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji). *Food Chemistry*, 173, 86-91.
- Liu, F., Zhao, J. H., Wen, X., Ni, Y.Y., 2015b. Purification and Structural Analysis of Membrane-Bound Polyphenol Oxidase from Fuji Apple. *Food Chemistry*, 183, 72-77.
- Liu, F., Han, Q.Y., Ni, Y.Y., 2018. Comparison of Biochemical Properties and Thermal Inactivation of Membrane-Bound Polyphenol Oxidase from Three Apple Cultivars (*Malus domestica* Borkh). *International Journal of Food Science and Technology*, 53 (4), 1005-1012.
- Lu, S.M., Luo, Y.G., Feng, H., 2006. Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Sodium Chlorite. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (10), 3693-3696.
- Marrufo-Hernandez, N. A., Palma-Orozco, G., Beltran, H.I., Najera, H., 2017. Purification. Partial Biochemical Characterization and Inactivation of Polyphenol Oxidase from Mexican Golden Delicious Apple (*Malus domestica*). *Journal of Food Biochemistry*, 41:e12356.
- Mathew, A.G., Parpia, H.A.B., 1971. Food Browning as a Polyphenol Reaction. *Advances in Food Research*, 19, 75-145.

- Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*, 18 (2), 193-215.
- Mbougouen, J.K., Ngameni, E., Walcarius, A., 2007. Quaternary Ammonium Functionalized Clay Film Electrodes Modified with Polyphenol Oxidase for the Sensitive Detection of Catechol. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(2), 269-275.
- Memişoğlu, N., Yağlica, M., Doğan, N., Yabaci, S.N., 2005. Anamur Muzu Polifenol Oksidaz Enziminin Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Moore, D., Reynolds, R.C., 1989. X-Ray Diffraction and The Identification and Analysis of Clay Minerals. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Murata, M., Noda, I., Homma, S., 1995. Enzymatic Browning of Apples on the Market: Relationship between Browning, Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42(10), 820-826.
- Okumura, S., Hoshino, M., Joshita, K., Nishinomiya, T., Murata, M., 2011. Hinokitiol Inhibits Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning. *Food Science and Technology Research*, 17(3). 251-256.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., Şakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food Science*, 60(3). 494-496.
- 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(5), 1481-83.
- Pekyardımcı. Ş. 1992. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisinde Uygulamaları, *Gıda/ The Journal Of Food*, 17(3), 181-186.
- Pekyardımcı, Ş., Balaban, M.O., 1992. High Pressure CO₂ Treatment on Polyphenoloxidase Activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 16(2), 153-163.
- Pilon, L., Spricigo, P.C., Miranda, M., de Moura, M.R., Assis, O.B.G., Mattoso, L.H.C., Ferreira, M.D., 2015. Chitosan Nanoparticle Coatings Reduce Microbial Growth on Fresh-Cut Apples while not Affecting Quality Attributes. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 440-448.
- Podsedek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowski, J., 2000. Compositional Characterisation of Some Apple Varieties. *European Food Research and Technology*, 210, 268-272.
- Ridgway, T.J., Tucker, G.A., 1999. Procedure for the Partial Purification of Apple Leaf Polyphenol Oxidase Suitable for Commercial Application. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 225-231.

- Salic, A., Strelec, I., Zelic, B., Tisma, M., 2018 Potential Use of Apple Polyphenol Oxidase for Bioremediation of Phenolic Contaminants. *Kemija U Industriji-Journal of Chemists and Chemical Engineers*, 67 (3-4), 109-116.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollog, J.M., 1989. Immobilization of Enzymes on Clays and Soils. *Soil Biology Biochemistry*, 21 (2), 223-230.
- Satjawatcharaphong, C., Rymal, K.S., Dozier, J.R., Smith, R.C., 1983. Polyphenol Oxidase System in Red Delicious Apples. *Journal Food Science*, 48 (6), 1879-1880.
- Schmitz-Eiberger, M., Matthes, A., 2011. Effect of Harvest Maturity, Duration of Storage and Shelf Life of Apples on the Allergen Mal d 1, Polyphenoloxidase Activity and Polyphenol Content. *Food Chemistry*, 127, 1459-1464.
- Schulbach, K.F., Johnson, J.V., Simonne, A.H., Kim, J.M., Jeong, Y., Yagiz, Y., Marshall M.R., 2013. Polyphenol oxidase inhibitor from blue mussel (*Mytilus edulis*) extract. *Journal of Food Science*, 78(3),425-31.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., 2004. Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors. *Analytical Chemistry*, 76(1), 178-183.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., Mu. S.L., 2003. A new Polyphenol Oxidase Biosensor Mediated by Azure B in Laponite Clay Matrix. *Electroanalysis*, 15(19), 1506-1512.
- Soysal, Ç., 2008. Kinetics and Thermal Activation/Inactivation of Starking Apple Polyphenol Oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32, 1034-1046.
- Soysal, Ç., 2009. Effects Of Green Tea Extract On "Golden Delicious" Apple Polyphenoloxidase and Its Browning. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 134-148.
- Şakiroğlu, H., Birdal, C., Başlar, M., Öztürk, A.E., 2016. Inactivation Kinetics of Polyphenol Oxidase in an Aqueous Model System Under Stand-Alone and Combined Ultrasound and Ultraviolet Treatments. *International Journal of Food Properties*, 19, 1535-1543.
- Türkan, F., 2009. Iğdır Elmasından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Van.*
- Tsurutani, M., Yanagida, Y., Hagiwara, S., Murata, M., Homma, S., 2002. Comparison of Soluble and Plastidal Polyphenol Oxidase in Mature Apples. *Food Science and Technology Research*, 8(1), 42-44.
- Uruç, H., 2007. Katalaz Enziminin (E.C.1.11.1.6) Montmorilonit Analsim Kili Üzerine İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van*

- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 15(1), 49-127.
- Yılmaz, L., Elmacı, Y., 2018. Polifenol Oksidaz Enzimi ve İnaktivasyon Yöntemleri . Türk Tarım- Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(3), 333-345.
- Walker, J.R.L., 1964. Studies on the Enzymic Browning of Apples II. Properties of Apple Polyphenol Oxidase. Australian Journal of Biological Sciences, 17, 360-371.
- Whitaker, J.R., 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker. New York, Chapters. 22-24.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge MİLLİOĞLU

Doğum Yeri ve Yılı : Antalya/Elmalı, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ozgemillioglu@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Antalya / Finike - Finike Cumhuriyet Mesleki Ve Teknik Anadolu Lisesi, 2011

Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yayınlar

Millioğlu, Ö., Demir, D. 2018. Characterization and Purification Polyphenol Oxidase Enzyme from Local Apple Variety Arap Kızı. International Conference on Technology, Engineering and Science (IConTES) (26-29 October 2018 Antalya/Turkey):76.