

**MEYVE VE SEBZELERDE BULUNAN OKSİDATİF ENZİMLERİN
ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLER VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**EFFECT OF OXIDATIVE ENZYMES ON ANTIOXIDANT COMPOUNDS AND
ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUITS AND VEGETABLES**

ARZU ALTUNKAYA

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI'nda
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Jale Acar

Üye :.....
Prof.Dr. Ayhan Temiz

Üye :.....
Prof.Dr. Alev Bayındırlı

Üye (Danışman) :.....
Prof.Dr. Vural Gökmen

Üye :.....
Doç.Dr. Ümran Uygun

Bu tez .../.../tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem Yazgan
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

MEYVE VE SEBZELERDE BULUNAN OKSİDATİF ENZİMLERİN ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLER VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Arzu Altunkaya

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı

ÖZ

Bu çalışma ile bugüne kadar sadece enzimatik kaynaklı renk ve tat-koku bozulmalarından sorumlu olan oksidatif enzimlerin meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan ve antioksidan etkiye sahip askorbik asit, karotenoidler ve fenolik bileşiklerin oksidasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla çalışmanın ilk bölümünde, marulun (*L.satıva*) yapısında doğal olarak bulunan oksidatif enzimlerin farklı izoformları ultrafiltrasyon ve iyon değiştirme kromatografisi teknikleri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış peroksidaz (POD), polifenoloksidaz (PPO) ve lipoksigenaz (LOX) izoenzimlerinin kinetik karakterizasyonu yapılmıştır. Farklı inhibitörlerin; enzimatik esmerleşme, toplam antioksidan aktivite ve toplam fenol içeriğine olan etkileri spektrofotometrik ve kromatografik olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise taze marul ekstraktının kuersetin, α - tokoferol ve askorbik asit gibi kimyasal antioksidanlar ile yeşil çay ekstraktı ve üzüm çekirdeği ekstraktı gibi doğal antioksidanlar ile kombinasyonunda lipit oksidasyonuna karşı sinerjistik etki gösterip göstermedikleri belirlenmiştir. Lipit oksidasyonu, suda çözünen AAPH soya fosfotidil kolin lipozom sistemde konjuge dienlerin oluşumu ile gerçekleştirilmiştir. Yine bu çalışmanın devamında marulun doğal antioksidanlarla olan sinerjisinin farklı pH'lardaki değişimi lipozom ve demirin katalize ettiği radikallerin indirgenmesini temel alan ESR metodları ile izlenmiştir.

Anahtar kelimeler: oksidasyon, enzim, inhibitör, antioksidan, sinerji

Danışman: Prof.Dr. Vural GÖKMEN, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı

EFFECT OF OXIDATIVE ENZYMES ON ANTIOXIDANT COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUITS AND VEGETABLES

Arzu Altunkaya

Hacettepe University, Food Engineering Section

ABSTRACT

Effect of oxidative enzymes on some compounds that have antioxidant activity were investigated.

In first part of this study, different isoforms of oxidative enzymes naturally found in lettuce sample (*L.sativa*) were purified ultrafiltration and ion exchange chromatography. Kinetic characterization of purified peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and lipoxygenase (LOX) isoforms were established. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce were determined by spectrophotometrically and chromatographically.

In the second part, it was determined whether antioxidants present in fresh lettuce extract act synergistically in combination with quercetin, α -tocopherol or ascorbic acid against lipid oxidation at different storage temperatures. Lipid oxidation was followed by the formation of conjugated dienes in a liposome system using azo-initiator: the water soluble AAPH. In addition, whether antioxidants present in fresh lettuce extract act synergistically in combination with green tea extract or grape seed extract against lipid oxidation and iron catalysed radical formation in an aqueous system which is an important source of radicals that initiate lipid oxidation in heterogeneous foods, at different pH values.

Key words: oxidation, enzym, inhibitor, antiokxidant, sinergysm

Advisor: Prof.Dr. Vural GÖKMEN, Hacettepe University, Department of Food Engineering, Food Engineering section

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun belirlenmesi, projelenmesi, planlanması, yürütülmesine yazılması aşamalarında değerli katkılarından dolayı tez danışmanım Prof.Dr.Vural Gökmen'e,

Değeli fikirlerinden yararlandığım Prof.Dr. Jale Acar ve Prof.Dr. Alev Bayındırlı'ya,

Çalışmayı proje olarak destekleyen 100. Yıl Üniversitesi araştırma fonu ve "Meyve ve sebzelerde bulunan oksidatif enzimlerin antioksidan bileşikler ve antioksidan kapasite üzerine etkilerinin belirlenmesi" isimli 2003-ZF-001 nolu projenin yürütücüsü Yrd.Doç.Dr. Oya Aşkın ve 100. Yıl Üniversitesi eski rektörü Prof.Dr. Yücel Aşkın'a,

Tez çalışmamda çok değerli katkılarından dolayı Kopenhag Üniversitesi, Gıda Kimyası Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Leif H. Skibsted, Dr. Elenaora Miguel Becker ve Bente Danielsen'e,

Çok değerli dostum Araş.Gör. E. Burçin Özvural'a,

Her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve dualarıyla bana güç veren annem, babam ve kardeşim Murat'a

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ARZU ALTUNKAYA

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Meyve ve Sebzelerin Bileşimlerinde Bulunan Antioksidan Bileşikler ve Antioksidan Kapasite.....	3
2.2. Lipoksigenaz (LOX).....	7
2.3. Peroksidaz (POD).....	13
2.4. Polifenoloksidaz (PPO).....	18
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1 Materyal.....	26
3.2. Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	26
3.3. Enzim Saflaştırma.....	26
3.4. Protein Tayini.....	26
3.5. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	27
3.5.1. POD aktivite ölçümü.....	27
3.5.2. LOX aktivite ölçümü.....	27
3.5.3. PPO aktivite ölçümü.....	27
3.6. Kinetik Karakterizasyon.....	28
3.6.1. Ki Hesaplanması.....	28
3.7. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizleri.....	29
3.8. Marul Antioksidanlarının Karakterizasyonu.....	29
3.8.1. Marul ekstraktının hazırlanması.....	29
3.8.2. Toplam fenol konsantrasyonu.....	29
3.8.3. Antioksidan çözeltiler	29
3.8.4. Lipozom hazırlanması	30

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

3.8.5. Lipozomların Peroksidasyonu	30
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	32
4.1. Enzim saflaştırma	32
4.2. Polifenoloksidaz, Peroksidaz ve Lipoksigenaz Enzimlerinin Ana Fraksiyonlarının Bazı Özellikleri	35
4.2.1. Optimum sıcaklık derecesi	36
4.2.2. Optimum pH derecesi	38
4.2.3. Vmax ve Km değerleri	38
4.2.4. PPO ve LOX aktivitelerine inhibitörlerin etkisi	40
4.2.5. PPO inhibitörlerinin toplam antioksidan aktiviteye olan etkisi ..	51
4.2.6. PPO inhibitörlerinin toplam fenol içeriğine olan etkisi	55
4.2.7. PPO inhibitörlerinin marulun fenolik bileşik profiline olan etkisinin kromotografik olarak incelenmesi	59
4.3. Lipozom Sistemde Marul Ekstraktı ile Fenolik Antioksidanlar Arasındaki Sinerjizm	62
4.3.1. Lipozom peroksidasyon sistemine marul ekstraktı konsantrasyonu ve depolama sıcaklığının etkisi	63
4.3.2. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının α - tokoferolle etkileşimi	64
4.3.3. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının kuersetin ile etkileşimi	66
4.3.4. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının askorbik asit ile etkileşimi	67
4.4. Marulun pH'ya Bağlı Olarak Antioksidan Aktivitesindeki Değişim ve Fenolik Antioksidanlarla Sinerjismi	69
4.4.1. Marul ekstraktının antioksidan aktivitesine pH'nın etkisi	69

İÇİNDEKİLER DİZİNİ(devam)

4.4.2. Marul ve kuersetin etkileşimine pH' nın etkisi	72
4.4.3. Marul ve yeşil çay ekstraktı etkileşimine pH' nın etkisi	75
4.4.4. Marul ve üzüm çekirdeği ekstraktı etkileşimine pH'nın etkisi ..	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	87
ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lipoksigenaz enzimlerinin etki mekanizması

Şekil 2.2. Peroksdaz enzimlerinin etki mekanizması

Şekil 3.1. Kuersetin ve marul ekstraktı kombinasyonunda AAPH varlığında elde edilen spektrofotometrik sonuctan lag fazın hesaplanması

Şekil 4.1. DEAE-selüloz dolgulu kolondan elde edilen (A) PPO (B) POD ve (C) LOX enzimlerine ait aktivite değerleri

Şekil 4.2. (a) PPO, (b) POD ve (c) LOX enzimlerine ait optimum sıcaklık grafikleri

Şekil 4.3. (a) PPO, (b) POD ve (c) LOX enzimlerine optimum pH değerleri

Şekil 4.4. Oksidasyon reaksiyonu ortamına farklı konsantrasyonlarda askorbik asit ilave edildiğinde oksidasyon hızında oluşan değişimler

Şekil 4.5. Askorbik asit varlığında marul PPO1 enzimine ait Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 4.6. (a) kontrol, (b) %0.5 askorbik asit, (c) %0.05 sistein, (d) %0.5 sitrik asit ve (e) %0.5 okzalik asit varlığında 6 saat süreyle 4 ve 25 °C'lerde marulun toplam antioksidan aktivitesindeki değişim

Şekil 4.7. (a) kontrol, (b) askorbik asit, (c) sistein, (d) sitrik asit ve (e) okzalik asit varlığında 4 ve 25 °C'lerde 6 saat süreyle toplam fenol içeriğinde meydana gelen değişim.

Şekil 4.8. t=0 anında marulun fenolik bileşik profili

Şekil 4.9. Lipozomun şematik gösterimi

Şekil 4.10. İnhibitörler varlığında 24 saat süreyle klorojenik asit miktarında meydana gelen değişim (◇:kontrol, X: 0.5 % askorbik asit, Δ: 0.05 % sistein, ¥: 0.5 % sitrik asit, □: 0.5 % okzalik asit)

Şekil 4.11. Farklı fenol içeren marul örneğinin pH 7.4 ve 37 °C de AAPH (◆)ve AMVN(■)öncüğünde soya fosfoditil kolin lipozomla gerçekleştirilen oksidasyonunda konjuge dienlerin spektrofotometrik olarak ölçümü ile elde edilen lag fazlar

Şekil 4.12. Farklı pH'larda taze marulun inhibisyonu(%) (◇:1.15 mg GAE, □: 2.3 mg GAE, Δ: 3.45 mg GAE. X: 4.6 mg GAE)

Şekil 4.13. Kuersetinin farklı pH değerlerinde inhibisyonu

Şekil 4.14. Kuersetin-marul ekstraktının farklı pH değerlerinde inhibisyonu

Şekil 4.15. Kuersetinin kimyasal yapısı

Şekil 4.16. Farklı ph değerlerinde yeşil çay ekstraktının inhibisyonu (◇:0.187 mg GAE, □□ :0.6545 mg GAE, Δ: 0.935 mg GAE. X: 1.87 mg GAE)

Şekil 4.17. Marul ekstraktı-yeşil çay ekstraktının farklı pH'larda inhibisyonu

Şekil 4.18. Kateşinin kimyasal yapısı

Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde üzüm çekirdeği ekstraktının inhibisyonu (◇:0.321 mg GAE, □□: 0.642 mg GAE, Δ: 1.285 mg GAE. X: 2.57 mg GAE)

Şekil 4.20. ÜÇE-marul ekstraktının farklı pH'larda inhibisyonu

Şekil 4.21. Prosiyanidinin kimyasal yapısı

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı gıdalarda bulunan vitaminler ve fenolik bileşiklerin TEAC olarak antioksidan kapasiteleri

Çizelge 2.2. Çeşitli meyve ve sebzelerin ORAC olarak toplam antioksidan kapasiteleri

Çizelge 4.1. Taze maruldaki PPO enzimlerinin kısmi saflaştırması

Çizelge 4.2. Taze maruldaki POD enzimlerinin kısmi saflaştırması

Çizelge 4.3. Taze maruldaki LOX enzimlerinin kısmi saflaştırması

Çizelge 4.4. Marul PPO1 ve PPO4 izoenzimlerinin farklı substratlar için kinetik parametreleri (K_m ve V_m)

Çizelge 4.5. Marul PPO1 ve PPO4 izoenzimlerinin farklı substratlar için kinetik parametreleri (K_m ve V_m)

Çizelge 4.6. Marul LOX1 ve LOX2 izoenzimlerine ait kinetik parametreler (V_{max} ve K_m)

Çizelge 4.7. Farklı inhibitörlerin PPO1 ve PPO4 izoenzimlerini inhibisyon tipi

Çizelge 4.8. β -karoten varlığında LOX1 ve LOX2 enzimlerinin inhibisyon

Çizelge 4.9. Marulda belirlenen fenolik bileşiklerin birinci dereceden parçalanma hızları

Çizelge 4.10. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (α -tokoferol:TOH, marul ekstraktı:ME)

Çizelge 4.11. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (kuersetin:QC, marul ekstraktı:ME)

Çizelge 4.12. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (askorbik asit:AA, marul ekstraktı:ME)

Çizelge 4.13. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (Kuersetin: 1 mol % QC, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

Çizelge 4.14. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (GTE: 9.35×10^{-4} mg GAE/L GTE, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

Çizelge 4.15. 37 °C'de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (ÜÇ: 9.35×10^{-4} mg GAE/L ÜÇE, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PPO: polifenoloksidaz

POD: peroksidaz

LOX: lipoksigenaz

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

HPLC: High Performance Liquid Chromotography

YÇE: yeşil çay ekstraktı

ÜÇE: Üzüm çekirdeği ekstraktı

QC: kuersetin

TOH: α -tokoferol

AA: Askorbik asit

SA: Sitrik asit

OA: Okzalik asit

DEAE: Dietilaminoetil

IP: İyonizasyon Potansiyeli

BDE: Bond dissociation Energy-Bağ ayrışma enerjisi

1. GİRİŞ

Taze meyve sebzeler ile bunlardan üretilen çeşitli ürünler yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmalarından dolayı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Ancak meyve ve sebzelerin yapılarında doğal olarak bulunan oksidatif enzimler (POD,PPO,LOX) askorbik asit, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi hidrojen donör olarak davranabilen, radikal söndürme kapasitesine sahip çeşitli bileşiklerin dolaylı olarak okside olmalarına ve bu şekilde toplam antioksidan aktivitenin azalmasına neden olabilirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, sözkonusu enzimlerin özellikle kendi doğal substratlarını okside ederek bilinen renk ve tat-koku kusurları oluşturmalarına değinirken, çeşitli bileşikleri ne şekilde etkilendikleri konusuna değinmemektedir. Bu tez çalışması, bugüne kadar sadece enzimatik kaynaklı renk ve tat-koku bozulmalarından sorumlu olan oksidatif enzimlerin meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunanan ve antioksidan etkiye sahip askorbik asit, karotenoidler ve fenolik bileşiklerin oksidasyonu üzerine etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. Bu tür bir bulgu, yüksek antioksidan aktivitelerinden dolayı sağlıklı bir beslenme için vazgeçilmez kabul edilen meyve ve sebze ürünlerinin muhafazası amacıyla uygulanacak işlemlerin tasarımında büyük bir önem taşımaktadır.

Bu çalışmada marulun (*L.sativa*) yapısında doğal olarak bulunan oksidatif enzimlerin farklı izoformları iyon değiştirme kromatografisi teknikleri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış izoenzimlerin model reaksiyon koşullarında askorbik asit ve çeşitli fenolik (gallik asit, kateşin, kafeik asit, kateşol,ferulik asit, floridzin, klorojenik asit) bileşiklerin dolaylı olarak oksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmiştir. Bu amaçla POD, PPO ve LOX enzimlerinin primer oksidasyon reaksiyon koşullarında ortama ilave edilen askorbik asit, sistein, sitrik asit, okzalik asit, β -karoten ve fenolik bileşiklerin uğradığı değişim spektrofotometrik ve kromatografik olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu değişimler ile antioksidan aktivite arasında ilişki ortaya konulmuştur. Sıcaklık, pH ve oksijen konsantrasyonu gibi parametrelerin sekonder oksidasyon reaksiyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında meyve ve sebzelerde başlangıç POD, LOX ve PPO aktivitesi, ürün kompozisyonu ve depolama koşullarına bağlı olarak raf ömrü

süresince meydana gelebilecek toplam antioksidan aktivite kayıplarının belirlenmesi mümkün olmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Meyve ve sebzeler insan beslenmesinde esas olarak mineral maddeler ve vitaminlerin kaynağı olarak görülürler. Ancak antioksidan maddelerce zengin gıdaları tüketen kişilerde çeşitli kanser ve kalp-damar hastalıklarının rastlanma oranının düşük olması, son yıllarda meyve ve sebzelerin toplam antioksidan aktivitelerinin saptanması ve yapılarındaki antioksidan etkiye sahip bileşiklerin tanımlanması üzerine yapılan çalışmaları yoğunlaştırmıştır.

2.1. Meyve ve Sebzelerin Bileşimlerinde Bulunan Antioksidan Bileşikler ve Antioksidan Kapasite

İnsan vücudunda lipit, protein, nükleik asit gibi farklı moleküller serbest radikaller tarafından oksidatif hasar uğramakta ve yaşlanmanın yanında pek çok dejeneratif hastalığın başlamasına neden olmaktadır(Garcia-Alanson et al.,2004; Singh et al.,2002).

Bir hücrenin gelişimini sürdürmesinde oksijeni tüketme gerekliliği, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu da beraberinde getirmektedir ki bu olay oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Yen et.al.,2002). Super oksit anyon(O_2^-), hidroksil radikali(OH^-) ve hidrojen peroksit(H_2O_2) gibi formlarda bulunan reaktif oksijen türleri, normal metabolik prosesler veya bazı dış faktörler tarafından oluşturulmaktadır (Singh et al., 2004). Serbest radikal, kendi moleküler çevresinin dışında çok hızlı hareket edebilen radikaldir. Reaktif oksijen türleri ise kimyasal olarak reaktif bir veya daha fazla oksijen atomu içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri serbest radikalleri ve biyolojik molekülleri okside edebilen radikal olmayan reaktif bileşikleri kapsar. Bu nedenle reaktif oksijen türleri aynı zamanda oksidanlar veya prooksidanlar olarak ifade edilmektedir (El et al.,1999). Bu türler DNA'da hasara neden olmakta DNA'nın kopyalanması ve hücre oluşumunu da etkilemektedirler. DNA'nın oksidatif hasara uğraması ise kanserin bir göstergesi olabilmektedir (Yen et.al.,2002).

Antioksidanlar, okside olabilen hücresel substratların oksidasyonunu geciktiren yada önleyen maddelerdir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleme yada

söndürme gibi etkiler göstermektedir (Singh et al.,2004). Serbest radikalleri nötralize eden antioksidan bileşikler kanser, katarakt, serebral patoloji, romatoid artrit gibi pek çok hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Meyve ve sebzeler E vitamini, C vitamini, karotenoidler pek çok farklı antioksidan içermektedir. Sadece bunlar değil fenolik bileşiklerden flavanoidlerinde antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Garcia-Alanson et al.,2004; Einbond et al.,2004).

Antioksidanlar doğal olarak kombinasyon halinde bulunurlar ve antioksidan etkileşimi onların etkileri için önemli görünmektedir. Bazı antioksidanların kombinasyonunda, toplam etki, beklenen toplam etkiden daha fazla bulunduğu bu durum sinerjizm olarak ifade edilmektedir (Uri, 1961). Pek çok çalışmada bitki polifenollerinin bitkideki diğer antioksidanlarla sinerjistik bir etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Majchrzak et al., 2004; Roberts and Gordon, 2003; Pedrielli and Skibsted, 2002; Miller and Rice-Evans, 1996).

Fizyolojik işlemler ve dış etmenlerin etkisiyle oluşan serbest radikal ve aktif oksijenin diyetle alınan antioksidanlar tarafından söndürüldüğü bilinmektedir. Gıdalarda doğal olarak bulunan bazı bileşiklerin radikal söndürme kapasitesi ölçümü genellikle kontrollü olarak oluşturulan radikallerin saf antioksidan bileşikler veya gıda ekstraktları ile reaksiyona sokularak indirgenmesi ve indirgenme ürünlerinin belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu amaçla ABTS, DPPH ve fremy's salt gibi görünür bölgede absorbans yapan renkli radikaller; lipid peroksidasyonunu sağlayan AAPH yada AMVN radikalleri kullanılmakta ve reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenmektedir (Ricci et al.,2005; Garcia-Alanson et al.,2004; Einbond et al.,2004; Leja et al.,2003; Yen et al.,2002).

Bitkisel dokulardaki antioksidan aktivite enzimatik sistemler (Peroksidaz, Katalaz, Superoksit dismutaz) ve antioksidan moleküllerden (askorbik asit, tokoferol, fenolik bileşikler,karotenoidler) meydana gelmektedir (Leja,et al.,2003).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesinde meyve sebzelerin oldukça önemli rolleri olduğunu ortaya koymuştur (Hunter,et al.,2002; Piga et. al.,2002). Meyve-sebzelerin bu etkileri antioksidan

madde içermesinden kaynaklanmaktadır. Sağlıkla ilişkisi olması nedeniyle meyve ve sebzelerin antioksidan kapasiteleri bir çok araştırmacı tarafından belirlenmiştir(Çizelge 1.ve Çizelge 2).

Çizelge 2.1. Bazı gıdalarda bulunan vitaminler ve fenolik bileşiklerin TEAC olarak antioksidan kapasiteleri

Antioksidan bileşik	Kaynak	TEAC (mM) *
Vitaminler		
Askorbik asit	Sebze ve meyveler	1.0 ±0.02
Tokoferol	Tahıllar, fındık, zeytin yağı	1.0±0.03
Fenolik Bileşikler		
Siyanidin	Üzümler, ahududu, çilek	4.4±0.11
Kuersetin	Soğan, elma, üzüm, çay ve brokoli	4.7±0.10
Kaemferol	Pırasa, brokoli, greyfurt	1.3±0.08
Rutin	Soğan, elma, üzüm, çay ve brokoli	2.4±0.02
Luteolin	Limon, zeytin, kereviz, kırmızı biber	2.1±0.07
Apigenin	Kereviz, maydanoz	1.5±0.08
Epikateşin	Kara üzüm, kırmızı şarap	2.4±0.02
Epigallokateşin	Çay	3.8±0.06
Taxifolin	Turunçgil	1.9±0.03
Naringenin	Turunçgil	1.5±0.05
Hasperidin	Portakal suyu	1.0±0.03
Teaflavin	Siyah çay	2.9±0.06
Teaflavin-3-gallat	Siyah çay	4.7±0.16
Teaflavindigallat	Siyah çay	6.2±0.43

* Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite

Çizelge 2.2. Çeşitli meyve ve sebzelerin ORAC olarak toplam antioksidan kapasiteleri

Meyve ve sebze	ORAC Değeri / g *
Çilek	76.80
Ispanak	60.60
Ahududu	61.35
Brokoli	44.40
Avokado	39.10
Portakal	37.50
Üzüm (Kırmızı)	36.95
Üzüm (Beyaz)	22.30
Biber (Kırmızı)	36.55
Vişne	33.50
Kiwi	30.25
Soğan	22.45
Mısır	20.10
Patlıcan	19.30
Karnabahar	18.85
Bezelye	18.20
Patates	15.65
Kabak	14.90
Muz	11.05
Elma	10.90
Havuç	10.35
Fasulye	10.05
Domates	9.45
Kayısı	8.20
Şeftali	7.90
Armut	6.70
Karpuz	5.20
Hıyar	2.70

* Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi

Çizelge 1 ve Çizelge 2'de açıkça görüldüğü gibi meyve ve sebzeler bileşimlerinde doğal olarak bulunan antioksidan bileşikler nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler. Ancak meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan işlemler bu etkinin belli oranda azalmasına sebep olmaktadır.

Lipoksigenaz(LOX), Peroksidaz(POD) ve polifenoloksidaz(PPO) gibi oksidasyon enzimleri bir çok meyve ve sebzenin bileşiminde doğal olarak bulunmaktadır. Bu enzimler meyve ve sebze ürünlerinde işleme veya depolama sırasında ortaya çıkan bazı kalite kayıplarından sorumlu tutulmaktadır. Polifenoloksidazlar enzimatik esmerleşme sonucu renk kusurlarına neden olurken, lipoksigenazlar ise çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu kötü tat-koku oluşumuna neden olmaktadır. Peroksidazlar ise kısmen renk esmerleşmelerine neden olabilmektedirler. Bu nedenle enzimatik oksidasyon reaksiyonları gerçekleşirken ortamda bulunan ve radikal söndürme kapasitesine sahip askorbik asit, karotenoidler ve polifenoller gibi bileşiklerin birincil enzim substratı ile okside olmaları beklenir.

2.2.Lipoksigenaz

Gıdalarda meydana gelen lipit oksidasyonu, kaliteyi etkileyen ana unsurların başında gelmektedir. Lipid oksidasyonu, gıdalarda aroma, tat, koku, flavor, renk ve besinsel kalite değişimlerinde önemli rol oynamaktadır. Çoklu doymamış yağların oksidasyonu ile oluşan ürünlerle birlikte gıdalarda renk, tat, koku, flavor gibi önemli kalite kriterlerinde kayıplar meydana gelmektedir. Lipid oksidasyonu esnasında oluşan radikal türleri gıdalarda protein, pigment, vitamin ve karbonhidrat gibi bileşenlerle etkileşime girmekte ve bu bileşenlerin yapılarında değişikliklere sebep olmaktadır (Whitaker,1991).

Gıdalarda çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen enzim LOX'dır. Yapılan araştırmalarda sebzelerde istenmeyen flavor gelişinden, klorofil ve β -karoten pigmentlerinin yıkımından LOX enziminin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Sheu and Chen,1991; Williams et al.,1986).

1928 yılında Haas ve Bohn, soya fasulyesi ekstraktının, ekmekçilikte kullanılan, buğday unundan elde edilen hamurun sarı rengini açtığını, bu etkinin soya fasulyesinde bulunan ve karoten oksidaz olarak adlandırdıkları enzim tarafından gerçekleştiğini belirtmiştir (Wolf, 1975). Daha sonra yapılan çalışmalarda karoten yıkımının lipit oksidasyonunun bir sonucu olarak gerçekleştiği ve bu etkinin LOX enzimi tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Whitaker,1991).

LOX (linoleat oksidoredüktaz EC 1.3.11.12) cis,cis 1,4 pentadien sistem içeren çoklu doymamış yağ asitlerini (LH) hidroperoksitlere oksidasyonunu katalizleyen bir dioksigenazdır (Wong,1995; Robinson et.al.,1995; Smith et.al.,1996). Pek çok bitki ve hayvan dokusunda bulunmaktadır (Robinson et.al.,1995). LOX enzimin substratını bitkilerde baskın olarak bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik ve linolenik asit oluşturmaktadır (Gardner,1991). LOX doğada geniş bir dağılım göstermekte ve özellikle gelişmiş bitki ve hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu izoenzimler optimum pH, substrat spesifikliği, son ürün, ısı direnç ve ko-oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme eğilimi açısından farklılık göstermektedir (Robinson et al.,1995; Shibata and Axelrod,1995; Prigge et al.,1997).

LOX enzimleri bitki hücrelerinde hem organellerde, hem de sitoplazma içerisinde bulunmaktadırlar (O'Connor and O'Brien,1991). Ayrıca immunofloresans etiketleme çalışmalarının sonucunda, soya fasulyesindeki LOX enzimlerinin hücre içerisinde rasgele dağıldığı gösterilmiştir (Vernooy- Gerritsen et al.,1984).

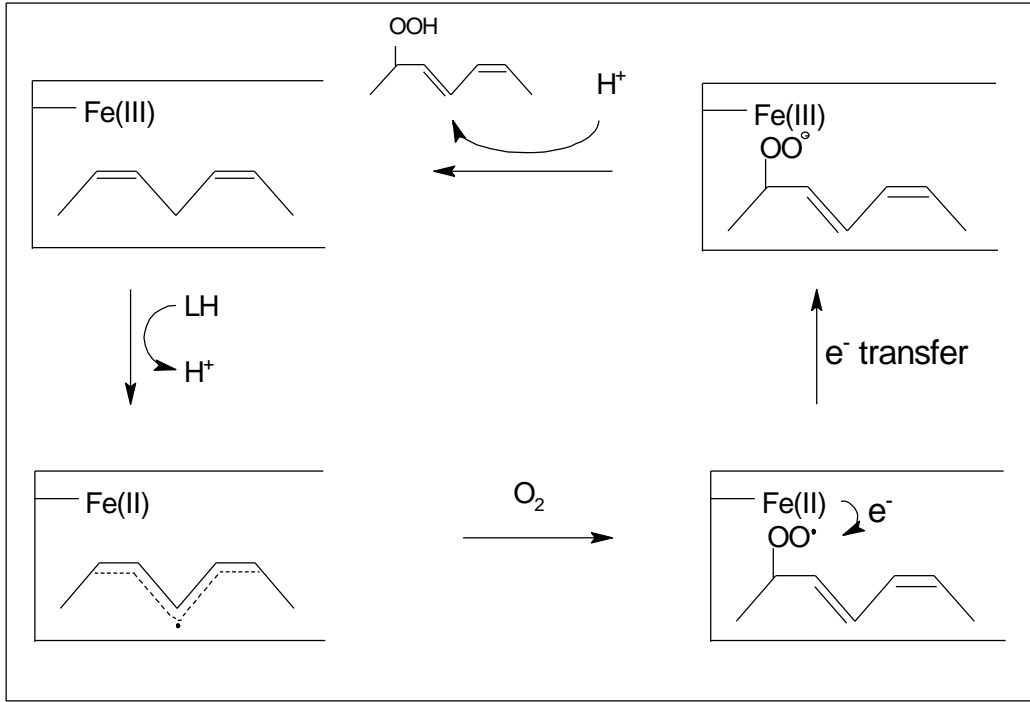
Yapılan çalışmalarda LOX enziminin tip1 ve tip2 olmak üzere iki izoformunun olduğu bulunmuştur. Optimum pH'sı 6.5 civarında olan LOX'lar serbest asit ve metil esterleriyle reaksiyona girebilmektedirler. Çoklu doymamış sistemde terminal çift bağlara bağlanırlar. Linoleik asidi 9- ve 13- hidroperoksitlere, α -linoleik asidi de 9- ve16- hidroperoksitlere okside ederler. Hidroperoksidasyon reaksiyonlarına ek olarak duysal anlamda önemli olan uçucu karbonil bileşikleri de oluştururlar. Aynı zamanda karotenoidlerin ko-oksidasyonuna da neden olurlar. Optimum pH'sı 9-10 olan LOX'lar daha yüksek peroksidasyon spesifikliği gösterirler. Linoleik asidi 13- hidroperoksite okside ederler. İz miktarlarda uçucu karbonil bileşikler oluştururlar. Karotenoid'i daha az okside ederler (O'Connor and O'Brien,1991).

LOX'ın gıdalardaki önemi kötü tat ve aroma oluşumu ile renk bozulumu üzerinde etkin rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca LOX, buğday ununun ağartılması amacıyla ekmek yapımında kullanım alanına sahiptir (Aziz et al.,1999; Robinson et al.,1995).

Enzimatik olarak oluşan hidroperoksitler klorofil ve karotenoid pigmentlerinin parçalanmasına neden olmakta dolayısıyla pigment renginde açılmalar meydana gelmektedir (Jeren-Galan et al.,1999). Pigment renginin açılması ise taze sebzelerde bozulmanın göstergesidir (Aziz et al.,1999).

LOX izoenzimlerinin molekül ağırlığı yaklaşık 95-100 kDa olup her enzim başına bir adet hem formda olmayan demir atomu içermektedirler (Wu,1996; Prigge et al.,1997). Yapıdaki demir atomunun enzime çok sıkı bir şekilde bağlı olduğu ve sadece 4,5-dihidroksi-m-benzendisülfonik asit gibi kuvvetli Fe(II) kelat yapıcı bileşiklerle yapıdan uzaklaştırılabildiği, Fe(III) kelat yapıcı bileşiklerin ise enzimdeki demir molekülünü yapıdan ayıramadığı tespit edilmiştir (Wong,1995b).

LOX, konjuge olmamış çift bağ içeren yağ asitlerinin oksijenasyonunu katalizler. Substrat olarak genellikle linoleik, linolenik ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerini kullanır. LOX enzimlerinin etki mekanizması Şekil 2.1.' de gösterilmiştir. Proses esnasında, çift bağlar konjuge olur ve perhidroksi yağ asitleri oluşur. Reaksiyon mekanizması iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta pentadien sistemden enzim-Fe(III) kompleksine doğru elektron transferi gerçekleşir. Radikal oluşur. İkinci basamakta ise radikalın, perhidroksi yağ asitlerindeki moleküler oksijen ile reaksiyona girmesiyle Fe(II) tekrardan Fe(III) 'e okside olur. Düşük oksijen konsantrasyonlarında ise ikinci basamak farklı olmaktadır. Zincirin kırılmasıyla dimerize yağ asitleri, ketonlar ve terminal aldehitler oluşmaktadır (Cuperus et.al.,1995). Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi tekniği ile yapılan çalışmalarda LOX reaksiyonu sırasında pentadienil (L[•]) ve peroksi radikallerinin (LOO[•])'nin oluştuğu gözlenmiştir (Garssen et al., 1972; Vergagen et al., 1977).



Şekil 2.1. LOX enzimlerinin etki mekanizması

LOX aktivitesi sonucu oluşan hidroperoksitler, farklı enzim grupları sayesinde uçucu özelliğe sahip çok çeşitli ürünlere parçalanmaktadır. Aşağıdaki şekilde 1-4 petadien sisteme sahip linoleik ve linolenik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucu oluşan ana ürünler görülmektedir.

LOX aktivitesi sonucu oluşan hidroperoksitlerin, farklı enzim grupları tarafından parçalanması sonucunda oluşan aldehitler ve aldehit asitleri, ketoller ve ketol yağ asitleri karakteristik aroma bileşikleridir. Çoğu uçucu özelliğe sahip olan bu karbonil bileşikleri içerisinde özellikle hekzanalin istenmeyen flavor oluşumu açısından önem taşıdığı belirtilmektedir (Eriksson, 1975; Gardner, 1975; Wolf, 1975, Grosch, 1976).

LOX karotenoidlerin ve klorofilin oksidasyonunu radikal mekanizması yoluyla, çoklu doymamış yağ asitleri varlığında katalizlemektedir. LOX, çoklu doymamış yağ asidi olmadan pigmentleri okside edememektedir. Dolayısıyla LOX varlığında gerçekleşen hidroperoksidasyon reaksiyonları esnasında karotenoidler ve klorofiller yıkıma uğradıkları için bu tip reaksiyonlara pigment ko-oksidadasyon reaksiyonları denilmektedir.

Literatürde karotenoidlerin ko-oksidasyonu, LOX katalizörlüğünde gerçekleşen çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşan radikaller ile β -karoten etkileşimi sonucu oluştuğu belirtilmektedir (Ikediobi and Snyder,1977; Aziz et al.,1991; Calligaris,2002).

Karotenoidlerin enzim-pentadienil radikal kompleksine(E-L●) yada ortama salınan pentadienil radikaline(L●) etki ettiği ve ko-oksidasyon esnasında karotenoidin yapısından hidrojen atomu ayrılmasının gerçekleştiği belirtilmektedir (Robinson et al.,1995). Bu esnada kararlı bir rezonans yapıya sahip karotenoid radikali oluşmakta oluşan karotenoid aradikali de oksijenle birleşmekte ve karbonil bileşiklerini oluşturmaktadır. Yapısına oksijen alan karotenoid yıkıma uğramakta ve bozulmaktadır (Klein et al.,1984).

Diğer bir öngörülen mekanizma da enzim peroksi radikal kompleksinin (E-LOO●) yada peroksi radikalının (LOO●) ortama salınması ve karotenoidlerle reaksiyona girerek yapılarından hidrojen atomu ayrılmasına sebep olmaktadır. Böylece yağ asidi peroksiti (LOOH) oluşmakta ve daha sonra yapısına oksijen alan karotenoidler yıkıma uğrayarak bozulmaktadır (Robinson et al. 1995; Wu et al.,1999).

Karotenoidler bir çok meyve sebzenin yapısında bulunan, sarı ile kırmızı arasında değişen renklere sahip pigmentlerdir. Domates ve havuç gibi sebzeler yüksek oranda karotenoid içermektedir (Desorby et al.,1988; Calligaris et al.,2002). Karotenoidlerin temel yapısı, 8 tane izopren birimin ard arda bağlanmasıyla oluşan, birbirin simetrik iki tane 20 karbonlu birimden meydana gelmektedir (Ege, 1994). Bütün karotenoidler 40 karbonlu iskelet yapısının değişik varyasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır. Sadece karbon ve hidrojen atomundan meydana gelmiş karotenoidlere karoten, yapısında hidroksi, epoksi ve keto gibi oksijen grupları içeren karotenoidlere ise ksantofil (ksantin) denilmektedir (Oliver and Palou,2000). Karotenoidlerin karakteristik özelliği, uzun konjuge polien zincir boyunca tek ve çift bağların sürekli olarak yer değiştirmesidir. Bu olgu, yapısındaki π -elektronlarının, polien zincir boyunca sürekli delokalize olması sonucu konjuge bir sistem oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Bu özellik karotenoidlerin molekül yapısını,

kimyasal aktivitesini, ışığı absorplama özelliklerini ve böylece rengini belirlemektedir (Britton,1995).

Karotenoidlerin polien zincirindeki her bir çift bağ, cis ve trans geometrik izomerleri olmak üzere iki farklı konfigürasyonda bulunabilmektedir. Yapıda cis formda bir çift bağın bulunması, ardaşık durumdaki hidrojen atomları ve/veya metil grupları arasında büyük bir sterik engelleme yaratmakta, bu da termodinamik açıdan karotenoidlerin cis izomerlerinin trans formlarına göre daha az kararlı olmasına neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı doğada bulunan bütün karotenoidler çoğunlukla ail-trans formunda bulunmaktadır (Britton,1995).

Karotenoidler beslenme fizyolojisi açısından önemli bir yere sahiptir. Bunun nedeni bazı karotenoidlerin provitamin A aktivitesine sahip olmalarıdır. Karotenoidlerin provitamin A aktivitesi gösterebilmesi için yapılarında en az bir tane keto, hidroksi veya epoksi grup içermeyen b-halkası bulunması gerekmektedir. Karotenoidler içerisinde en yüksek provitamin A aktivitesi gösteren molekül β -karotendir (Minguez- Mosquera et al.,2002b). Teorik olarak bir birim β -karoten molekülünden, 2 birim vitamin A elde edilmesi gerekmektedir. Fakat metabolik süreç sonunda bu oranın 6 birim β -karotenden, 1 birim retinol (vitamin A) elde edilecek şekilde gerçekleştiği belirtilmiştir (Desorby et al.,1998). β -karoten dışında, α -karoten, γ -karoten, β -kriptoksantin, β -apo-8-karotenol ve bunların yapı izomerleri, yapılarında bir tane β -halkası içerdiklerinden dolayı potansiyel A vitamini aktivitesine sahip diğer bazı karotenoidlerdir (Minguez- Mosquera et al.,2002b).

Bununla birlikte, Peto et al.(1981) tarafından, meyve ve sebzelerle alınan β -karotenin, bazı kanser çeşitlerine karşı koruyucu etki gösterdiğinin belirtilmesinden sonra, karotenoidler potansiyel antioksidan madde olarak geniş bir çalışma alanı kazanmışlardır. Daha sonraları epidemiyolojik çalışmalarda besinlerle alınan karotenoidlerin cilt kanseri (Mathews-Roth and Krinsky,1987; Greenberg,1990) akciğer kanseri,(Omenn et al.,1996) kalp damar hastalıkları(Morris et al.,1994) ve katarakt (Knekt et al.,1992) gibi hastalıklara yakalanma riskini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur.

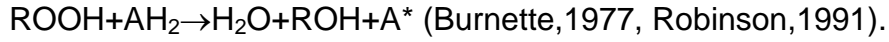
β -karoten ve diğ er karotenoidlerin bir baş ka önemli özelliğ i ise elektronca zengin konjuge bağ yapıları sayesinde, uyarılmış formdaki oksijen molekülünü (singlet oksijen, O_2^*) sö nümlendirerek tekrar doğ al formdaki oksijen molekülüne (triplet, O_3^*) dönüştürmeleidir. Singlet formdaki oksijen molekülü son derece reaktif yapıdadır ve kimyasal reaksiyonlar sonucunda oksidatif hasarlara yol açmaktadır. β -karoten uyarılmış oksijen molekülündeki fazla enerjiyi bünyesine alarak, yapısındaki uzun polien zincir boyunca moleküler titreşim sayesinde ortama ısı şeklinde aktarmakta ve bu etki neticesinde β -karoten molekülünün yapısında hiç bir değ iş iklik meydana gelmeden uyarılmış formdaki oksijen molekülü (O_2^*) tekrar doğ al formuna dönü şmektedir (Krinski,1994; Britton,1995; Edge et al.,1997). β -karotenin bu özelliğ i sayesinde, klorofil pigmenti tarafından üretilen reaktif formdaki oksijen moleküllerinin sö nümlendirilmesi sonucunda gerek klorofil pigmentinin yapısında, gerekse lipidlerin yapısında meydana gelebilecek oksidatif hasarların önlenmesi sağ lanmaktadır (Chen and Liu,1998; Rontani,2001).

2.3. Peroksidaz

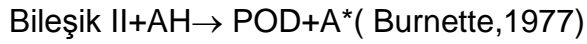
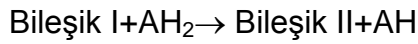
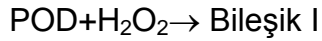
Enzimatik esmerleş me olayına katılan diğ er bir enzim POD enzimidir. POD (donör:H₂O₂ EC 1.11.1.7), oksidoredüktazlar adı verilen geniş bir enzim grubunun üyesi olup hemen hemen tüm bitki ve hayvanlarda ve çeş itli mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur (Burnette, 1977; Adams,1991). Enzimin çok geniş bir dağılım göstermesi biyolojik önemini de arttırmaktadır (Padiglia et al.,1994). Hücre içerisinde sitoplazmada çö zünür formda veya hücre duvarına bağ lı olarak bulunur (Wang et al.,2000). Hidrojen peroksitle reaksiyona girerek pek çok farklı substratı okside edebilen demir içeren oksidatif bir enzimidir (Hiner et al.,2002, Miranda et al.,2002, Pomar et al.,1997, Padiglia et al.,1994). POD enzimleri; peroksidasyon, hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonlarının gerç ekleş mesi yanında ayrıca, katalitik etkiye de sahiptirler (Robinson,1991; Wong,1995a). POD enzimleri, enzimatik reaksiyonları esnasında hem yükseltgeyici hem de indirgeyici substratları kullanırlar. Yükseltgeyici substratlar genellikle peroksitler yada peroksiasitlerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen POD enzimleri farklı yükseltgeyici substratları kullanabilmektedir. Örneğ in yabani

turplardan elde edilen POD enzimleri sadece hidrojen peroksit, metil-hidrojen peroksit ve etil hidrojen peroksitleri kullanabilmektedir (Burnette, 1977).

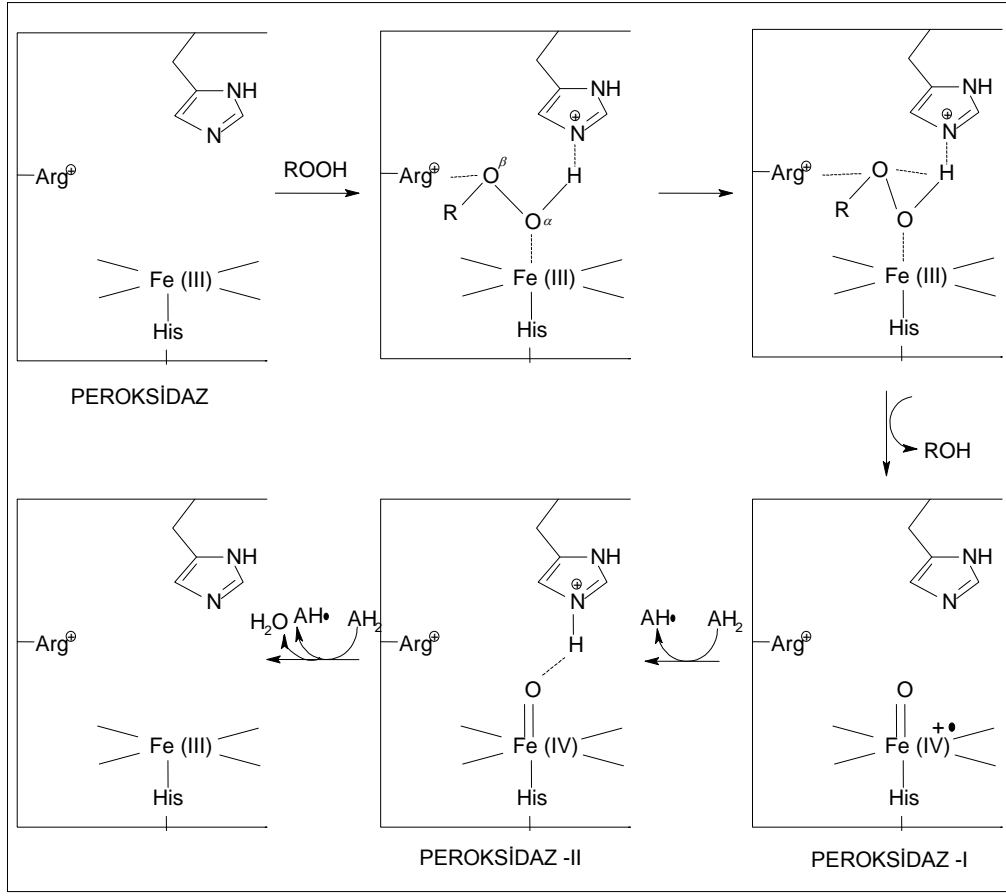
Peroksidatik etki, bir bileşimin peroksitler varlığında okside edilmesidir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamda bir peroksitin bulunması şarttır. Peroksidasyon reaksiyonlarının genel eşitliği aşağıdaki şekilde verilmektedir:



Reaksiyondaki okside edici substrat, ROOH; genellikle bir peroksit veya peroksiasittir. Reaksiyon üç aşamada gerçekleşmekte olup hidrojen donör substrat (AH_2), iki hidrojen kaybederek serbest radikal (A^*) oluşmaktadır (Robinson, 1991).



POD enzimlerinin katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyon reaksiyonu Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizması (Wong, 1995a)

POD, enzimatik reaksiyonun ilk aşamasında hidrojen peroksitin yapısındaki oksijen bağının (O-O) heterolitik olarak kırılmasını gerçekleştirmektedir. Bu aşamada hidrojen peroksit, enzimin yapısındaki iki elektronu yapısına alarak su molekülüne dönüşmekte ve peroksidaz enzimi ise $O=Fe(IV)$ -porfirin- π -kation yapısındaki demir-okso formuna yükseltgenmektedir (POD-1). Reaksiyonun ikinci aşamasında ise yükseltgenmiş formdaki enzimin hidrojen donör substratlar tarafından (AH_2) önce POD-II formuna, daha sonra da doğal formu olan POD formuna indirgenmesi gerçekleşmektedir (Wong, 1995a).

Hidrojen donör substratlar tarafından POD enziminin indirgenmesi aşamasında oluşan serbest radiller, kendi aralarında enzimatik olmayan yollarla birleşerek dimer yada polimer formlarını oluşturmaktadırlar. Örneğin POD enziminin fenolik yapıdaki hidrojen donör substratı olan guayakol molekülü, reaksiyon esnasında okside olarak guayakol radikaline dönüşmekte ve guayakol radikallerinin kendi

aralarında polimerleşmesi sonucunda da renkli yapıdaki tetraguayakinonlara dönüşmesi, POD aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bir çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Hemeda and Klein, 1991; Güneş and Bayındırlı, 1993; Yeminicioğlu et al.,1998).

Hücre içerisinde sitoplazmada çözünür formda, hücre duvarlarına ve kloroplast membranına bağlı olarak bulunan POD enziminin meyve ve sebzelerin yapısında bulunan bir çok fenolik madde ve besleyici değere sahip bileşikleri substrat olarak kullanabilmesi, serbest radikallerinde içinde bulunduğu çok geniş aralıkta ürün oluşmasına sebep olmaktadır (Robinson, 1991b).

Bitki dokularında bulunan bir çok fenolik bileşiğin oksidasyonu, çok düşük miktarlarda hidrojen peroksit varlığında bile POD tarafından katalizlenebilmektedir. POD enzimi farklı oksidasyon formlarında bulunabildiğinden, en az üç farklı tipte oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyebilmektedirler. Ayrıca bütün bitki dokuları, askorbik asit peroksidaz gibi substrat spesifik POD enzimlerini de içerebilmektedir. Meyve ve sebzelerin yapısında, fenolik bileşiklerin de içinde bulunduğu çok sayıda substrattan, serbest radikal reaksiyonları sonucunda oldukça fazla miktarda ürün meydana gelebilir. Örneğin sadece portakal suyu içerisinde yer alan substrat niteliğindeki bileşikler arasında askorbik, kafeik, genistik ve kumarik asitler yer alır. Bunlar içerisinde askorbik asitin hidrojen donör substrat olarak kullanılması, bu bileşenin dehidroaskorbik aside oksidasyonuna neden olur. Dehidroaskorbik asitin hidroliz ile diketoglukonik asite dönüşümü ise besinsel değe açısından etkinliğinin kaybolması sonucunu doğurur. Bununla birlikte hidrojen peroksit konsantrasyonunun, gerek turunçgil meyvelerinde ve gerekse diğer bitkisel ürünlerde düşük olması ve nispeten askorbik asit miktarının fazla olması, bu yolla bir oksidasyonu oldukça sınırlamaktadır (Robinson,1991).

POD enziminin çok fazla miktarda bileşiğin oksidasyonunu gerçekleştirebilmesi ve bunun sonucunda da çok geniş perspektifte ürün oluşturması nedeniyle, bitkilerin hasat edildikten sonra renk, aroma ve yapısal değişimlerden sorumlu olabileceği fakat kesin bir ilişki kurulmasının ise zor olabileceği düşünülmektedir (Robinson, 1991a; Burnette, 1977).

POD enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarda difenoller indirgen substrat olarak rol alabilirler. Bu durumda POD enzimleri kısmen enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında yer alabilmektedirler (Zhang et al.,2005; Mdluli ,2004). Bu durum POD enzimlerinin oksidatif etkisi olarak ifade edilmektedir. POD enzimleri, oksidasyon için gerekli oksijeni hidroperoksitlerden alarak fenolik bileşiklere, renk maddelerine veya tirozin veya askorbik asit gibi akseptörlere taşıyarak enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına katılırlar. POD enzimlerinin bu aktivitesi oldukça düşüktür (Mdluli ,2004).

POD enziminin bir diğer aktivitesi olan hidrosilasyon; PPO enziminin kresolaz aktivitesine benzerlik göstermektedir. POD'ın bir diğer aktivitesi olan katalitik etki ise; hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu gerçekleştiren bir aktivitedir. Dolayısıyla POD enzimi bir anlamda katalaz enziminin işlevine sahiptir (Yemenicioğlu,1998).

POD enzimleri tarafından oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi, peroksidatik etkiye bağlıdır. Ancak meyve ve sebzelerde bu enzimin ihtiyaç gösterdiği peroksitlerin oldukça düşük düzeylerde bulunduğu dikkate alınırsa, PPO'a göre ikinci derecede bir öneme sahip olduğu düşünülebilir (Adams,1991; Williams et al.,1986). Ayrıca POD enzimi, varolan peroksitlerin kullanımında da oldukça seçicidir. Örneğin turp POD'ı peroksitlerden yalnızca hidrojen peroksiti ve etil hidrojen peroksiti kullanabilmektedir (Burnette, 1977).

POD enzimleri tarafından kullanılan hidrojen donör substratların bazıları ve reaksiyon sonucu oluşan ürünler aşağıdaki çizelgede verilmiştir(Burnette,1977).

<u>Substrat</u>	<u>Ürün</u>
Pirogallol	Purpuragallin
Hidrokinon	Kuinhidron
Guayakol	Tetraguayakinon
o-fenilendiamin	fenazin
Kateşol	o-kinon
o-kresol	sarı çözelti
Tirosin	Yeşil çözelti
Adrenalin	Kırmızı çözelti

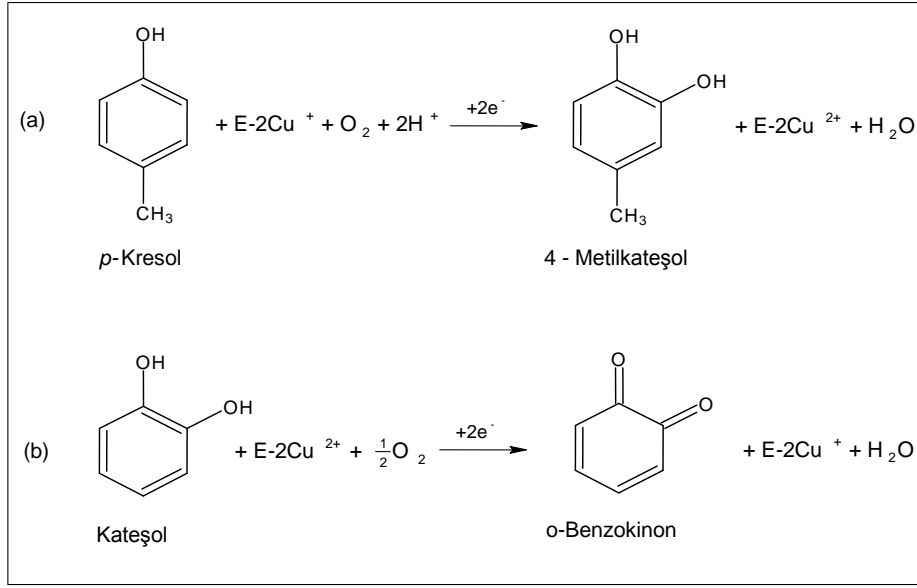
2.4. Polifenoloksidaz

PPO (monofenol,oksidoredüktaz) meyve ve sebzelerin işlenmesi ve depolanması esnasında hasarlı dokulardaki istenmeyen esmerleşme reaksiyonlarından sorumlu olan ve bakır içeren bir enzimdir (Brun-Merimee, et al.,2004; Kavrayan and Aydemir, 2001; Chazarro et al.,1997; Valero et al.,1991). PPO enzimleri tirosinaz, fenolaz, kateşol oksidaz, monofenol oksidaz, kresolaz ve kateşolaz gibi isimlerle de anılmaktadır (Wong,1995).

PPO enzimleri bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkideki PPO seviyesi; tür, çeşit, olgunluk ve yaşa bağlı olarak değişmektedir. Sağlıklı hücrede PPO inaktif formdadır. Dokunun hasara uğraması ile aktif hale geçmekte ve fenollerini okside ederek esmer renkli pigment oluşumuna neden olmaktadır (Zawistowski et al.,1991). Bitki hücresinde, PPO enzimleri plastidlerde ve fenoller vokuollerde yer almasına rağmen hücresel parçalanma meydana geldiğinde enzimatik esmerleşme gerçekleşmektedir (Rigal, Gauillard, Richard-Forget, 2000).

PPO oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizlemektedir

1. Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu,
- 2.o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (Şekil 2.3).



Şekil 2.3.PPO enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar. (a) monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi) (b) *o*-difenollerin *o*-kinonlara dehidrojenizasyonu (difenolaz aktivitesi)

Bu reaksiyolardan ilki monofenolaz ya da krezolaz ikincisi ise difenolaz yada kateşolaz olarak adlandırılmaktadır. Bu aktivitelerden ilki, yani krezolaz aktivitesi sonucu; esmer renkli pigmentler oluşmaz. Ancak hidroksilasyon sonucu *o*-difenolik bileşikler, kateşolaz aktivitesiyle esmer renkli bileşiklere dönüşürler. Böylece krezolaz aktivitesi adeta kateşolaz aktivitesini besleyerek enzimatik esmerleşme olayında dolaylı olarak rol oynar. Bu aşamada kinonlar; diğer fenolik bileşikler, aminoasitler, proteinler ve diğer hücrenel bileşenlerle enzimatik olmayan reaksiyonlara girerek renkli polimer yada pigmentleri oluştururlar (Montero et al.,2001; Duangmal et al.,1999; Richard-Forget et al.,1992).

Aynı enzimin iki farklı etki mekanizması olan kateşolaz ve krezolaz aktiviteleri enzim sistematüğinde farklı kodlarla anılmaktadır. Bu sınıflandırmada krezolaz aktivitesi E.C.1.14.18.1 ve kateşolaz aktivitesi E.C.1.14.18.2 kodlarıyla gösterilmiştir (Mayer,1987).

Her PPO enzimi aktif merkezinde molekül başına 2 adet bakır atomu içermektedir. Bu bakır kompleksi met, oksi ve dioksi olmak üzere üç formda bulunmaktadır. İki adet bakır atomunun her biri 3 adet histidine bağlıdır (Huber et al. 1985). PPO aktif hale geçebilmek için bakıra ihtiyaç duymaktadır (Zawistowski et al.,1991). Enzim önce oksijen bağlayarak oksi forma geçer. Bu arada Cu^+ , Cu^{2+} halini alır ve kompleks oluşturur. Bu formdaki enzim o-fenollerin oksidasyonu ve monofenollerin hidroksilasyonunu katalize eder (Martinez and Whitaker, 1995). PPO substratları okside olabilen OH grubu içeren (OH grupları birbirine göre orta konumda) olan bileşiklerdir. Buna göre meyve ve sebzelerin bileşiminde bulunan kafeik asit, klorojenik asit, kateşinler ve löko-antosiyanidinler gibi fenolik bileşikler enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını katalize etmektedirler (Miller and Rice-Evans,1996).

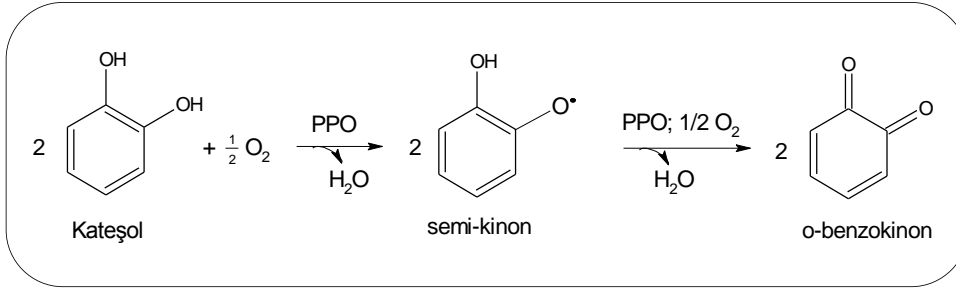
Doğada bulunan diğer PPO enzimi lakkazdır!!

Enzimatik esmerleşmenin ilk aşaması o-kinonların oluşmasıdır. O-kinonlar ise, o-dihidroksibenzol (o-difenol) birimleri içeren her çeşit fenolik bileşikten oluşabilmektedir. Buna göre, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan doğal flavonoid maddelerden, kateşinler, lökoantosiyanidinler, antosiyanidinler, flavanonlar ile ayrıca hidroksibenzoik asit, hidroksisinamik asit ve bunların türevleri olan çeşitli bileşikler, kafeik, ferulik, *p*-kumarik, kuinik, gallik, sinapik ve klorojenik asitler gibi çok çeşitli basit fenolik bileşiklerle çeşitli polifenoller enzimatik esmerleşmelerde rol oynarlar. Enzimatik esmerleşmelerde rol alan bu maddeler yanında, bir çok meyve ve sebze de çok az miktarda bulunmasına karşın onların enzimatik yolla esmerleşmelerinde önemli rol oynayan diğer maddelerden biri de tirozindir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında birçok polifenolik madde substrat olarak rol oynamasına karşın, bazı fenolik maddeler inhibitör olarak rol oynamaktadırlar. Bazıları ise ne substrat ne de inhibitör niteliğine sahiptirler (Acar and Gökmen, 2004).

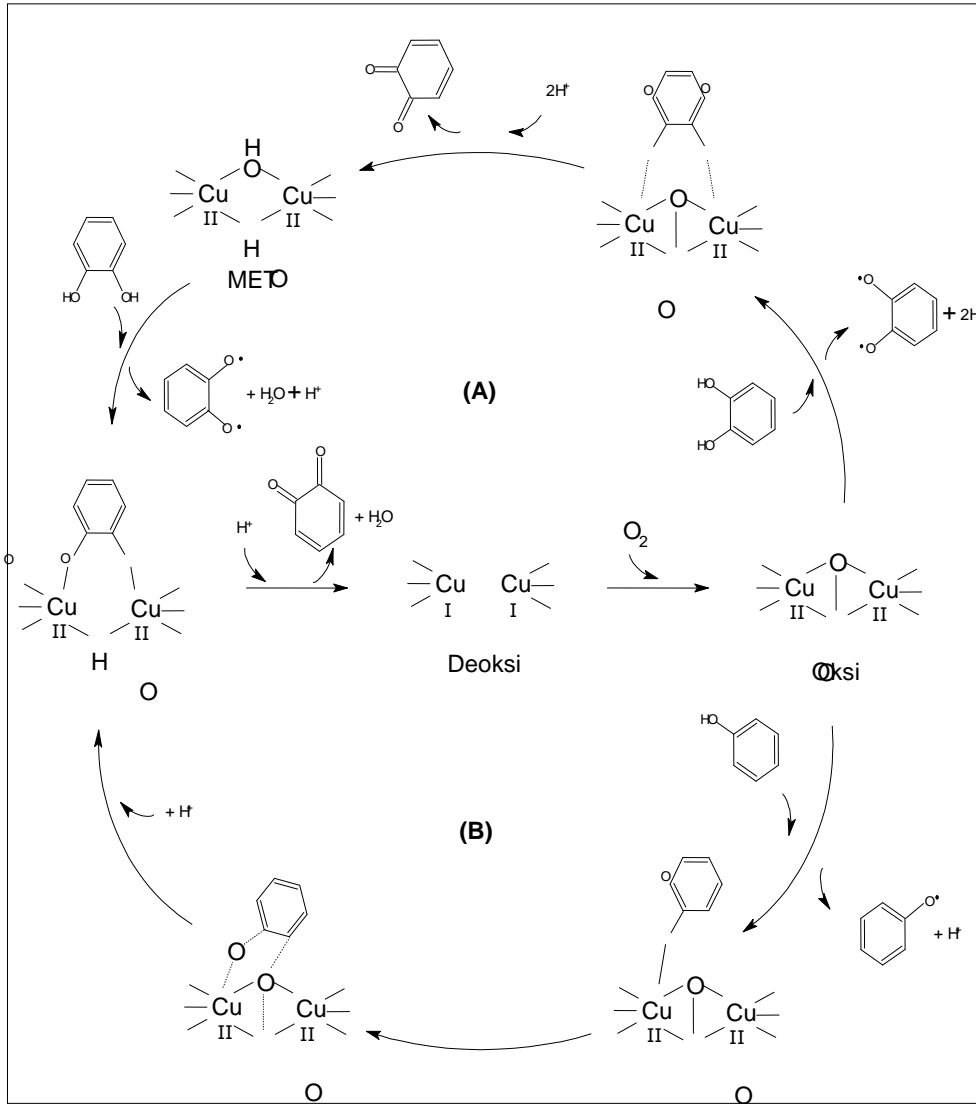
Bitkinin normal yaşam süreci içinde enzimatik esmerleşme olayı belki de lehine çalışan bir koruma mekanizmasıdır. Ancak buna karşın özellikle hasattan sonra bu enzimler normal işlevleri dışına çıkarak kontrolsüz bir faaliyet göstermektedirler. Esasen bu durum taze meyve ve sebzelerin gerek işlenmesinde, gerekse depolanmasında büyük sorunlara yol açmaktadır. Özellikle işleme sırasında uygulanan kabuk soyma, dilimleme, pulpa işleme gibi dokuyu tahrip eden prosesler; enzimleri, fenolik bileşikleri ve hava oksijenini bir araya getirerek adeta enzim faaliyetini kamçılayıcı bir etki göstermektedirler. Bunun sonucunda, daha işlemenin hemen başlangıcında ürün hiç arzu edilmeyen koyu esmer renkli bir hal alabilmekte, fenol kaybından dolayı besinsel değeri düşmekte ve dolayısıyla ticari değeri azalmaktadır. Ayrıca reaksiyon sonucu oluşan okside ürünler hiç istenmeyen bir tada sahip oldukları gibi indirgeyici özellikteki C vitamini gibi oksidasyona duyarlı öğelerin de kaybına neden olmaktadır (Yemenicioğlu, 1998).

PPO ve POD enzimleri bitkisel dokularda bir çok farklı formda bulunabilmektedirler. Örneğin kateşol oksidazlar bitkisel dokularda aktif olmayan proenzimler olarak sentezlenmekte ve daha sonra kloroplastlardaki tilakoitlerde yoğunlaşmaktadırlar. Bu enzimlerden bir kısmı buradaki protezlarca aktif hale getirilerek doğal işlevine kavuşmakta, önemli bir kısmı da latent halde yani ihtiyaç halinde kullanılabilir bir rezerv olarak dokulardaki varlığını sürdürmektedir (Mayer,1987; Söderhall and Söderhall, 1989). PPO ve POD enzimlerinin bir kısmı hücre sıvısında çözümlü halde bulunurken, bir kısmı da yoğunlaştıkları bölgelerde zayıf iyonik bağlarla veya daha güçlü kovalent bağlarla, bağlı olarak bulunmaktadırlar (Sanchez-Ferrer et al.,1990).

Kateşollerin o-benzokinonlara oksidasyonu sırasında, PPO enziminin geri dönüşümsüz bir şekilde inaktive olduğu gözlenmiştir (Golan-Goldhirsh and Whitaker, 1984). NMR tekniği kullanılarak PPO enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar sırasında ara ürün olarak semikinon radikallerinin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 2.4.) (Peter et al. 1985; Korytowski et al. 1987). PPO enzimlerinin etki mekanizması Şekil 2.5.'de detaylı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Polifenol oksidazın katalizlediği reaksiyon esnasında semi-kinon radikallerinin oluşumu.



Şekil 2.5. o- difenollerin (A) ve monofenollerin (B) polifenol oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucu oksidasyonu.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesinde çeşitli yaklaşımlar araştırılmaktadır. Genellikle, PPO'un termal inaktivasyonu ile bu durum önlemeye çalışılmakta ancak ısı işlem doku yumuşaması gibi bazı olumsuzluklara da neden olmaktadır. Isıl işlem yerine, kimyasal inhibitörler bu amaçla tercih edilmektedir (Tortoe, Orchard ve Bezer, 2006). Enzimatik esmerleşmeyi kontrol etmek için kullanılan inhibitörün etkinliği; inhibitörün konsantrasyon ve yapısına, PPO'nun kaynağına ve substrata bağlı olmaktadır. PPO enzimlerini inaktive eden pek çok inhibitör bilinmektedir. Kullanılan inhibitörlerin bir kısmı enzime, bir kısmı substrata bir kısmı ise oluşan ürüne etki etmektedir. Örneğin inorganik iyonlar enzim üzerinde etkilidir. PPO metalloprotein olduğu için; siyanid, CO₂ ve sodyumdietiltiyokarbamat(DIECA) gibi kelat yapıcı ajanlarla inhibe edilebilmektedir (Zawistowski et al.,1991). Bunlardan başka inhibitör olarak sülfidler, askorbik asit ve tiyol içeren bileşiklerde kullanılmaktadır (Ding et al.,2002; Richard-Forget et al.,1992; Zawistowski et al.,1991; Molnar-Perl et al.,1990; Sayavedro-Sota et al.,1986).

İndirgeyici ajanlar ve antioksidanlar o-kinonları renksiz difenollere indirgeyerek renk bozulmasını önlemektedirler (McEvily et al.,1992). Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının olduğu ortamda renk değişmelerinin kilit maddesi olan kinonları, o-difenollere indirgenmektedir. İndirgeyici ajanlardan en çok bilineni askorbik asittir. Askorbik asit ortamda dehidroaskorbik asite okside olarak indirgen bir özellik göstermektedir. Ayrıca askorbik asidin etkisiyle meyve ve sebze dokularında bulunan oksijeni de indirgeyerek, esmerleşme reaksiyonlarını ikinci bir yolla inhibe etme özelliğine sahiptir (Kavrayan and Aydemir, 2001).

Sitrik, okzalik, malik veya fosforik asit gibi asidulantlar ise pH'yı düşürerek ve/veya ürünlerdeki bakır ile kelat oluşturarak enzimatik esmerleşmeyi önlemektedirler. Meyve ve sebzelerin işlenmeleri sırasında ortaya çıkan enzimatik esmerleşmeler, ortamın pH ile yakından ilgilidir. PPO enzimlerinin optimum pH değeri, kökenine ve substrata göre pH 4 ile 7 arasında değişmektedir (Vamos-Vigyazo,1981). Bu nedenle enzimatik esmerleşmeler pH değerinin 4.5'in üzerine çıkmasıyla hızla artar ve 5-7 arasında maksimum düzeye ulaşır. pH 4'ün altında PPO aktivitesinin azalmasında PPO enziminin merkezinde bulunan bakırın bu düşük pH değerlerinde enzime daha gevşek bağlandığı ve enzim aktivitesinin azaldığı

düşünülmektedir. Bu nedenle meyve ve sebzelerin işlenmelerinde enzimatik esmerleşmeleri önlemek amacıyla bazen haşlama veya yıkama suyuna % 0.1 düzeyinde sitrik asit kullanılmaktadır (Martinez and Whitaker, 1995).

Sülfüroz asit ve tuzları (sülfite, bisülfite ve metabisülfite) da kuvvetli bir inhibitör etkisi gösterir. Ortamda bulunan % 0.01 düzeyindeki SO₂ esmerleşmeleri önlemektedir. Ancak özellikle son zamanlarda, bu maddenin astım hastalarında oluşturduğu gibi sağlık üzerinde bazı olumsuz etkilere neden olduğunun saptanmış olması, kullanımına FDA tarafından sınırlamalar getirilmesine yol açmıştır (Sapers and Miller, 1992; Oszmianski and Lee, 1990). Ayrıca SO₂'nin uygulandığı ürünün tad ve kokusu üzerinde belirgin olumsuzluklara neden olması ve tiamin gibi besin öğelerini parçalaması da bu maddenin kullanımının giderek azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda alternatif kimyasalların kullanımı üzerinde durulmaktadır. Ancak SO₂ kadar etkin bir kimyasal bulunamamıştır. Askorbik asit ve türevleri esmerleşmeyi, ortamdan kendileri tükenene kadar yani belli bir süre durdurabilmektedir. Ayrıca ürünün uzun süre depolanması durumunda bu maddelerin bizzat kendileri enzimatik olmayan esmerleşmeye neden olmaktadır (Tronc et al., 1997).

Meyve ve sebzelerin enzimatik yolla esmerleşmeleri, yapılarındaki enzim ve substrat (fenolik madde) değişimleri ile yakından ilgilidir. Her iki parametre, meyve ve sebzelerin cinslerine ve aynı zamanda olgunluk durumlarına göre farklı değişimlerde olabilirler. Tam olgunlaşmamış ürünlerde PPO aktivitesi yüksek olduğu gibi, kolay okside olabilen maddelerin miktarları da fazladır. Turunçgillerde ise okside olabilir nitelikte fenolik bileşik ve PPO bulunmadığından ve pH değerleri de düşük olduğundan bu meyve ve ürünlerinde enzimatik esmerleşme görülmemektedir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Bu tez çalışması kapsamında oksidasyon enzimlerinin (POD,PPO,LOX) primer reaksiyon koşullarında ortama ilave edilen askorbik asit, karotenoidler ve fenolik bileşiklerin uğradığı değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda elde edilen bulguların, meyve ve sebzelerdeki antioksidan bileşikler ile oksidasyon enzimleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi konusuna açıklık getireceği düşünülmüştür. Böylece sadece renk ve tat-koku gibi duyuşsal özelliklerin

bozulmasından sorumlu tutulan oksidasyon enzimlerinin aynı zamanda toplam antioksidan kapasite, yani besinsel kalite üzerine etkileri belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu tez çalışmasında marul örneğine ait deneyler yapılmıştır.

3.2. Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması:

PPO,POD ve LOX ham enzim kaynağı olarak seçilen marul (yak.3 g) tampon çözelti ile (yak.9ml) karıştırılarak homojenizatörde parçalanmıştır. Homojenat daha sonra +4°C'de 15 dak süreyle 15000 rpm de santrifüjlenmiştir. Hedef enzimleri içeren berrak supernatantlar birleştirilmiştir.

3.3. Enzim Saflaştırma

Ham enzim ekstraktı, DEAE-selüloz içeren kolona (10 × 2.5 cm) uygulanmıştır. DEAE kolonu, DEAE-selülozdan 10 g alınıp pH 4 tamponu ile karıştırılarak elde edilmiştir. Kolonun içerisindeki hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Kullanılmadan önce kolondan bol miktarda pH 4 tamponu geçirilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra kolon kullanıma hazır hale geldiğinden, kolona yaklaşık 30 ml enzim ekstraktı uygulanmıştır. Kolonun musluğu açılarak 5 er ml lik fraksiyonlar toplanmış ve bu işleme enzim ekstrakt seviyesi kolon dolgu seviyesine inene kadar devam edilmiştir. Böylece enzim ekstraktı ham enzim kolonuna emdirilmiştir. Bu aşamadan sonra kolona pH 4 tampon çözeltisi ilave edilerek kolondan 5 er ml'lik fraksiyonlar toplanmaya başlanmış ve zaman içerisinde kolona ilave edilen tampon çözeltisinin pH sı 0.25 aralıklarla pH 9 a kadar arttırılmıştır. Kolon çıkışından toplanan fraksiyonlarda (eluat) PPO, POD ve LOX aktiviteleri, kinetik özellikleri ve protein miktarları tespit edilmiştir.

3.4. Protein Tayini

Protein miktarı Bradford (1976) boya bağlama yöntemine göre tayin edilmiştir. Hazırlanan bradford reaktantı ile karıştırılan örneğin 595 nm'deki absorbansı, bovin albumin çözeltisi standart eğrisi ile (eşleştirilerek) karşılaştırılarak protein derişimi saptanmıştır.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü:

3.5.1. POD aktivite ölçümü:

POD aktivite ölçümlerinde substrat olarak 240 mM guayakol ve 240 mM hidrojen peroksit çözeltileri kullanılmıştır. Guayakol çözeltisi %50'lik etil alkol kullanılarak hidrojen peroksit ise deiyonize su ile hazırlanmıştır. Bir spektrofotometre küveti içerisine pH 6.5 tamponu(POD için optimum pH), substrat ve enzim ekstraktı kullanılarak küvet içerisinde 420 nm dalgaboyundaki absorbans artışı 3 dakika süreyle kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans-zaman grafiğinin doğrusal değıştığı kısmının eğiminden POD aktivitesi hesaplanmıştır.

3.5.2. LOX aktivite ölçümü:

LOX aktivite ölçümünde substrat olarak linoleik asit kullanılmıştır.12 ul linoleik asit (%99 saflıkta) 200 ul tween 20ve 1920 ml deiyonize kullanılmıştır.Reaksiyon karışımı 130 ul 0.1 M NaOH eklenerek berraklaştırılmış ve üzerine 2 ml saf su eklenerek 4.5 mM linoleik asit çözeltisi elde edilmiştir. Bir spektrofotometre küveti içerisine pH 6 tamponu(LOX için optimum pH), substrat ve enzim ekstraktı kullanılarak küvet içerisinde 234 nm dalgaboyundaki absorbans artışı 3 dakika süreyle kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans-zaman grafiğinin doğrusal değıştığı kısmının eğiminden LOX aktivitesi hesaplanmıştır.

3.5.3. PPO aktivite ölçümü

PPO aktivite ölçümünde substrat olarak 10mM kateşol kullanılmıştır. Bir spektrofotometre küveti içerisine pH 7 (PPO için optimum pH) tamponu, substrat ve

enzim ekstaktı kullanılarak küvet içerisinde 420nm dalgaboyundaki absorbans artışı 3 dakika süreyle kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans-zaman grafiğinin doğrusal değiştiği kısmının eğiminden PPO aktivitesi hesaplanmıştır.

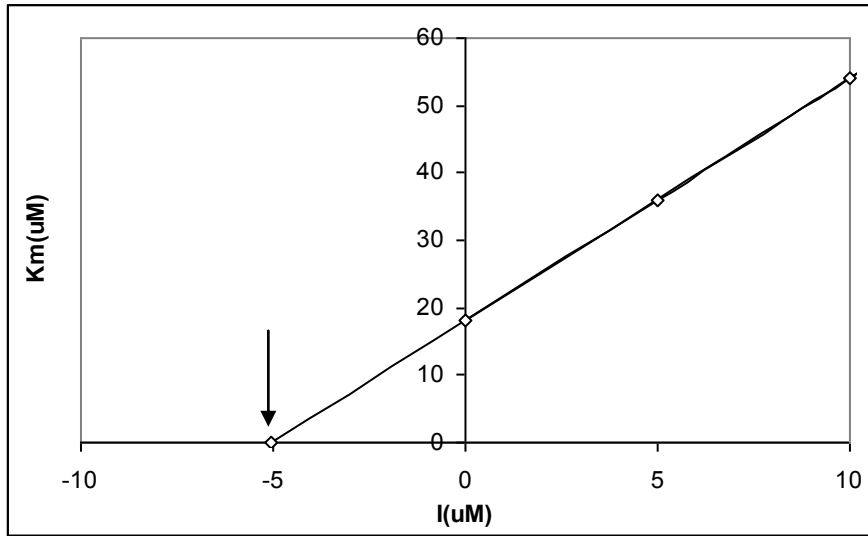
3.6. Kinetik Karakterizasyon

PPO, LOX ve POD enzimlerinin katalizlediği reaksiyonların hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi Lineveawer-Burk modeline göre belirlenmiştir. Bu amaçla POD, LOX ve PPO enzimleri için primer substrat olarak sırasıyla hidrojen peroksit ve guayakol, linoleik asit ve kateşol kullanılarak bu enzimlerin primer substrat affiniteleri belirlenmiştir. Ayrıca her üç enzimin sekonder substrat varlığında oluşan reaksiyonlarda incelenmiştir. Primer substrat affiniteleri ve sekonder oksidasyon reaksiyonları ayrıca potansiyometrik olarak da incelenmiştir.

pH ve sıcaklık aktiviteleri POD, LOX, PPO enzim aktiviteleri pH 4.0-9.0 ve 10-60 °C aralıklarında ölçülerek optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir.

3.6.1. Ki Hesaplanması

Ki, inhibitörün enzime olan affinitesini ifade eder. Ki'nin hesaplanması için kullanılan yöntem aşağıdaki grafikte gösterilmiştir. Buna göre ok ile ifade edilen değer –Ki değerini vermektedir.



Şekil 3.1. Sisteine ait ki değerinin hesaplanması

3.7. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizleri

İnce doğranmış 3 g marul örneği 9 ml saf su, % 0.5 askorbik asit, %0.05 sistein, %0.5 sitrik asit ve %0.5 okzalik asit ile karıştırılıp homojenizatörde parçalanmıştır. Elde edilen bulamaçtan 10 dakika sürelerle örnekler alınmış, HPLC analizine kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj işleminden sonra berrak supernatantlar HPLC'de izlenmiştir. Kromatografik seperasyon C18 25 cm uzunluğundaki C18 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlar 280 nm de izlenmiştir. 1 ml/dak akış hızında farklı derişimlerde formik asit (gradyent)-metanol kullanılarak seperasyon gerçekleştirilmiştir.

3.8. Marul Antioksidanlarının Karakterizasyonu

3.8.1. Marul ekstraktının hazırlanması

3 g marul ekstraktı 6 ml su ile homojenize edilmiş, başlangıçta ve 24 saat sonra homojenize edilmiş maruldan örnekler alınmıştır. Isıtma işlemi için ise homojenize edilmiş marul ekstraktı 80 °C de 10 dakika süreyle ısıtılmıştır. 15000 rpm de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatant suda çözünen antioksidan kaynağı olarak kullanılmıştır.

3. 8.2. Toplam fenol konsantrasyonu

Marul ekstraktının toplam fenol içeriği, Folin-Ciocalteu`'s phenol reagent kullanılarak 765 nm de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

3.8.3. Antioksidan çözeltiler

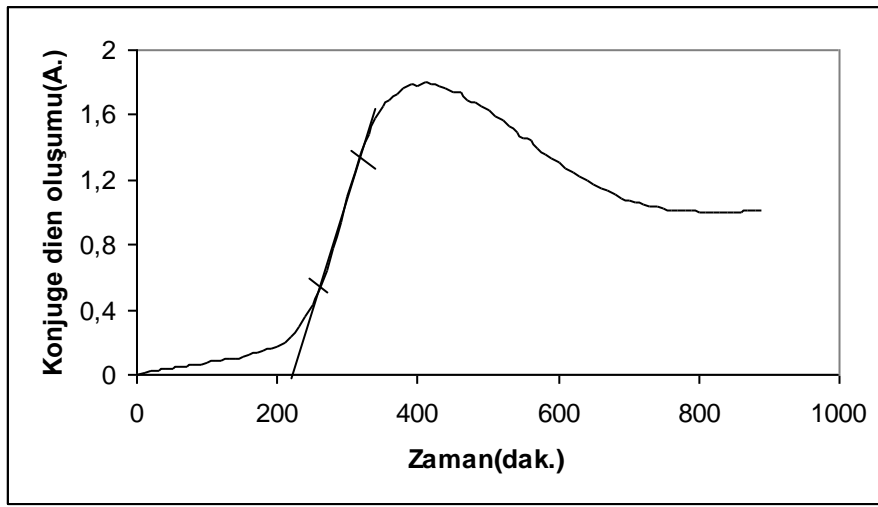
Yağda çözünen antioksidanlar, çözünürlüklerine bağlı olarak farklı çözücülerde çözündürülmüşlerdir. TOH heksanda QC ise metanolde çözündürülmüştür. Suda çözünen antoksidan (AA) 0.01 M fosfat tamponda çözündürülerek elde edilmiştir. TOH, QC ve AA konsantrasyonu, soya fosfoditil kolin moleküler ağırlığı 900g/ml olarak alınarak yağ fraksiyoundaki % mol olarak hesaplanmıştır.

3.8.4. Lipozom hazırlanması

Lipozom, Roberts & Gordon, 2003`de açıklanan metoda göre hazırlanmıştır. 1.5 µmoL soya fosfoditil kolin içeren çözeltiden 2 ml alınarak, kloroformda çözündürülmüş ve 1 mL saf heksan, 1 mL α-tokoferol çözeltisi veya 1 mL kuersetin çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oksidayon AMVN öncülüğünde gerçekleştirildiğinde absolute etanolde hazırlanan 43 mM AMVN`den 86 µl hazırlanan örneğe ilave edilmiştir. Çözücüler, sıcaklığı 30 °C ye ayarlı su banyosu ve rotary evaporatör ile yak.100 mbar basınçta uzaklaştırılmıştır. Buharlaştırmadan sonra atmosferik basınç azotla muamele edilmiştir. Lipit parçaları daha sonra 10 ml 0.01 M fosfat tamponu ile çözündürülmüş ve 10 dakika vorteks işlemi uygulanmış 30 saniye süreyle de sonikasyona tabii tutulmuştur. Sonuçta homojen ve multilamellar bir lipozom elde edilmiştir. Unilamellar lipozom, Avestin Lipofast Basic small volume (500 µL) extrusion aleti (Avestin Europe GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak hazırlanmıştır. Süspansiyon, 200 nm por çapındaki 2 katlı polikarbonat membranlardan 21 kez geçirilmiştir. Marul ekstraktı ve askorbik asit, lipozom sistemine fosfat tamponda çözündürüldükten sonra ilave edilmiştir. Marul ekstraktı, 1000 kat seyreltikten sonra 165 µl alınarak ilave edilmiş ve bu şekilde fenol içeriği de 1.84×10^{-5} mg GAE ayarlanmıştır.

3.8.5. Lipozomların Peroksidasyonu

Unilamellar lipozom süspansiyonu (2.5 mL) kuvartz küvetlere ilave edildikten sonra su ceketli küvetlerde 37 °C de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 75 mM AAPH (pH 7.4) çözeltisinden 25 µl eklenip küvetler 5 kez ters yüz edilip çevrildikten ve kapatıldıktan sonra (evaporasyonu önlemek için) reaksiyon AAPH öncülüğünde başlatılmıştır. 234 nm'deki absorbans 900 dakika süreyle her 10 dakidada bir kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans-zaman grafiğinin doğrusal değiştiği kısmının eğiminden lag faz hesaplanmıştır (Roberts & Gordon, 2003).



Şekil 3.1. Kuersetin ve marul ekstraktı kombinasyonunda AAPH varlığında elde edilen spektrofotometrik sonuçtan lag fazın hesaplanması

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Enzim saflaştırma

Bu amaçla materyal ve metot bölümünde anlatılmış olan ultra-filtrasyon ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi tekniklerinden faydalanılmıştır. Uygulanan işlemler sonucunda saflaştırmaya ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.'de verilmiştir. Buna göre ham ekstraktan itibaren kolon kromatografisi uygulamasıyla daha yüksek saflık oranlarına ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1. Taze maruldaki PPO enzimlerinin kısmi saflaştırması

Saflaştırma basamakları	Hacim(ml)	Toplam aktivite(U)	toplam protein(mg)	Spesifik aktivite(U/mg)	Verim(%)	Saflık(kat)
Ham ekstrakt		2.83	478.8	0.006	100	1
DEAE-kolon kromatografisi	30					
PPO1	5	0.067	7.9	8.48	2.4	1413
PPO2	10	0.219	93	2.35	7.8	392
PPO3	5	0.057	18	3.16	2	527
PPO4	10	0.083	18	4.60	3	767

Çizelge 4.2. Taze maruldaki POD enzimlerinin kısmi saflaştırması

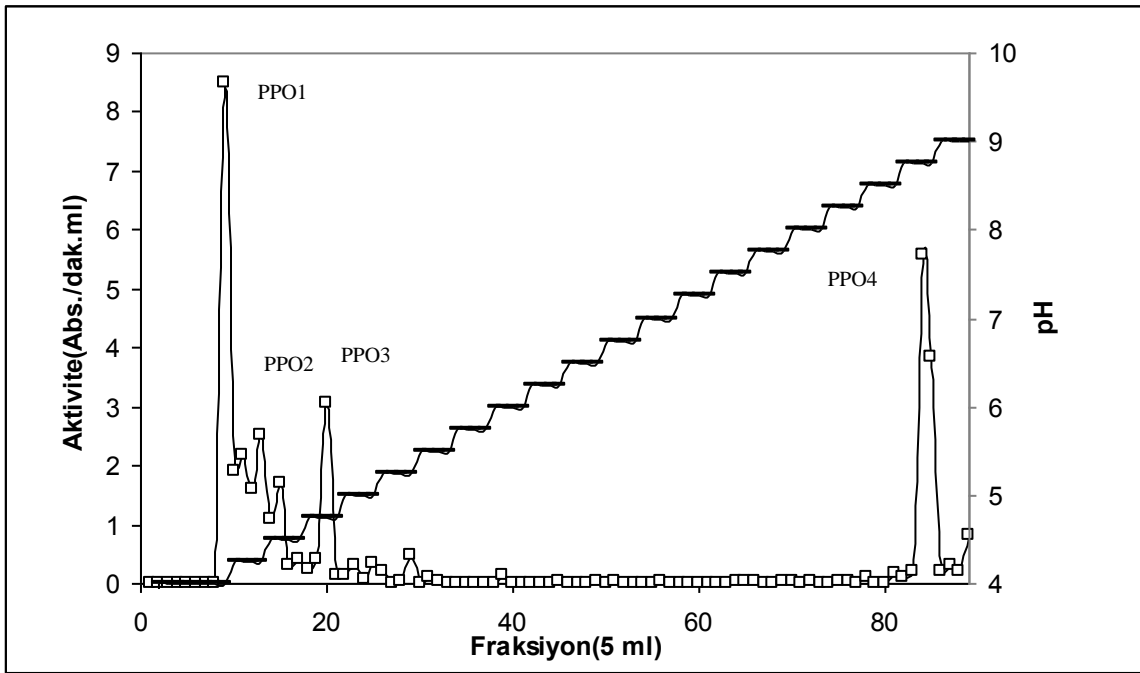
Saflaştırma basamakları	Hacim(ml)	Toplam aktivite(U)	Toplam protein(mg)	Spesifik aktivite(U/mg)	Verim(%)	Saflık (kat)
Ham ekstrakt		0.58	478.8	0.0012	100	
DEAE-kolon kromatografisi	30					
POD1	5	0.052	18	2.9	9	2417

Çizelge 4.3. Taze maruldaki LOX enzimlerinin kısmi saflaştırması

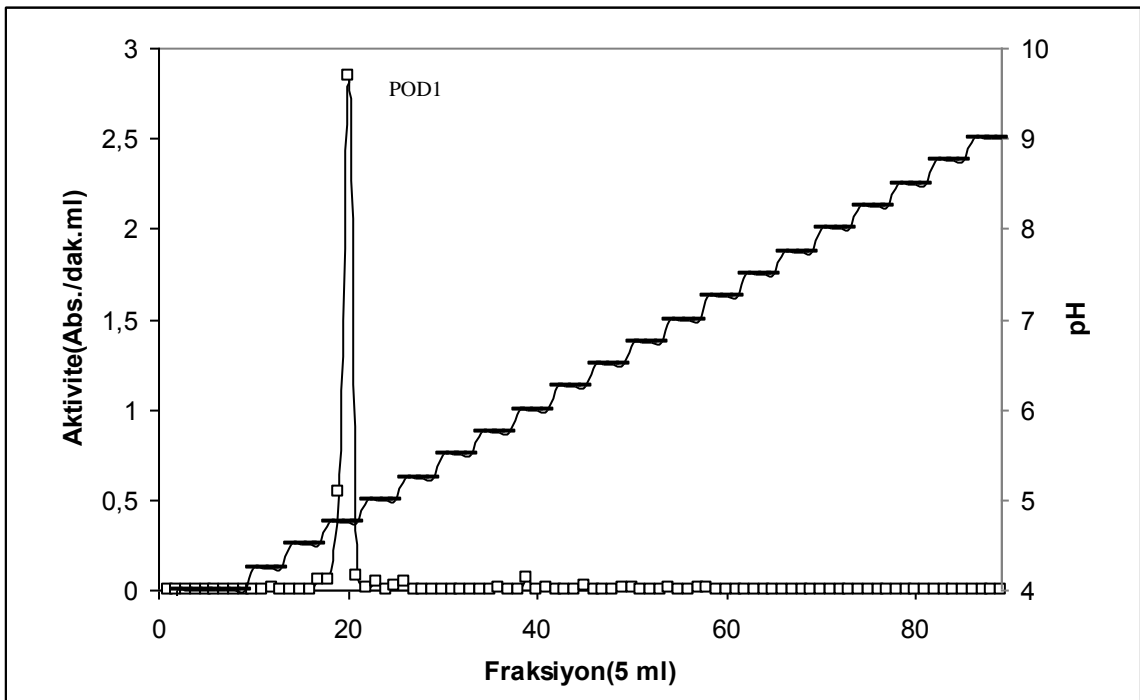
Safılaştırma basamakaları	Hacim(ml)	Toplam aktivite(U)	Toplam protein(mg)	Spesifik aktivite(U/mg)	Verim(%)	Safılık (kat)
Ham ekstrakt		1.19	478.8	0.003		
DEAE-kolon kromotografisi	30					
LOX1	5	0.24	217	1.1	20	367
LOX2	10	0.17	194	0.86	14	292

PPO, POD ve LOX enzimlerinin karakteristik özelliklerinin daha iyi açıklanabilmesi için saflaştırma işlemi yapılmıştır. Kolon, DEAE-selüloz ile doldurulmuş ve pH 4-9 arasında gradient uygulanmıştır. En aktif fraksiyonlar, PPO için PPO1, PPO2, PPO3 ve PPO4; POD için POD1 ve LOX için LOX1 ve LOX2 fraksiyonları toplanmıştır. PPO için pH 4.25, 4.5, 4.75 ve 8.275'de; POD pH 4.75'de; LOX için pH 5.75 ve 7.5'de en aktif fraksiyonlar elde edilmiştir. PH gradientinden önce tuz gradienti denemiş ancak sonuç başarılı bulunmamıştır. PPO ve POD enzimlerinin esmerleşme reaksiyonlarına neden olması dolayısıyla polifenollerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla PVPP kullanılmıştır (Goulart, et al., 2003).

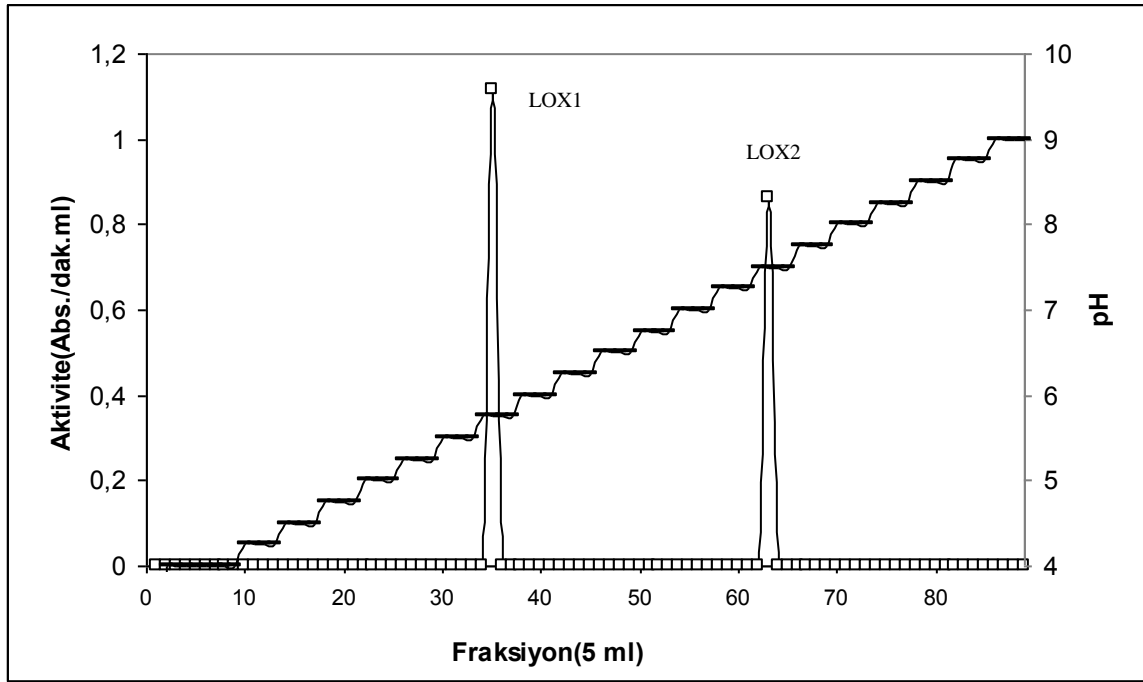
Şekil 4.1'deki elüsyon profili incelediğinde, elüsyonun hemen başında enzim aktivitesi içermeyen bileşiklerin topluca kolondan ayrıldığı görülmektedir. Bu durum gradient başlamadan önce kolonun bol miktarda tamponla yıkanmış olmasından kaynaklanmakta olup, bu yolla PPO, POD ve LOX dışındaki tüm unsurların uzaklaştırılması hiç kuşkusuz saflaştırma işlemine katkıda bulunmaktadır. Yine aynı elüsyon profilinde kolondan tutulmadan geçebilmiş PPO enzimlerinin başlıca iki ana fraksiyonu (PPO1 ve PPO4) ve bunları takip eden iki alt fraksiyondan (PPO2 ve PPO3) oluştuğu anlaşılmaktadır. Bu fraksiyonlardan PPO1 ve PPO4'ün saflığı, bir önceki işlem aşmalarındaki kiyasla artarken dört alt fraksiyonun saflık düzeyleri yaklaşık ham ekstrakttaki saflık düzeyine düşmüştür. Bu nedenle sadece iki alt fraksiyon (PPO1 ve PPO4) karakterize edilmiştir.



(a)



(b)



Şekil 4.1. DEAE-selüloz dolgulu kolondan elde edilen (A) PPO (B) POD ve (C) LOX enzimlerine ait aktivite değerleri

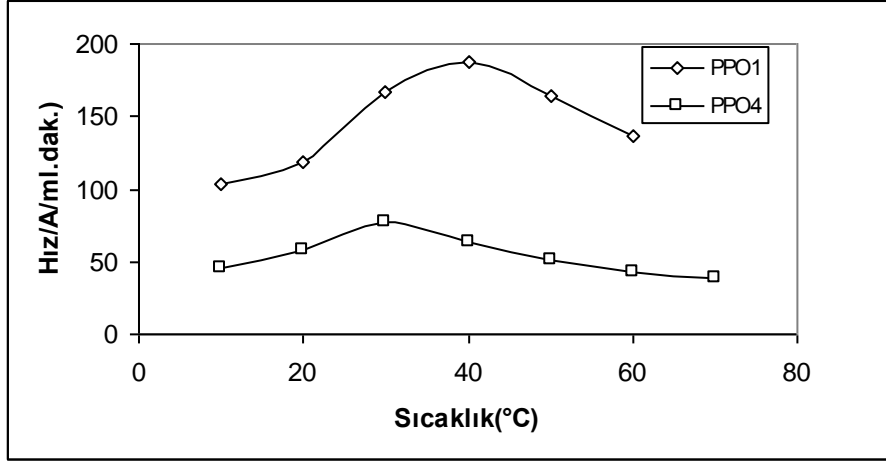
4.2. Polifenoloksidaz, Peroksidaz ve Lipoksigenaz Enzimlerinin Ana Fraksiyonlarının Bazı Özellikleri

4.2.1. Optimum sıcaklık derecesi

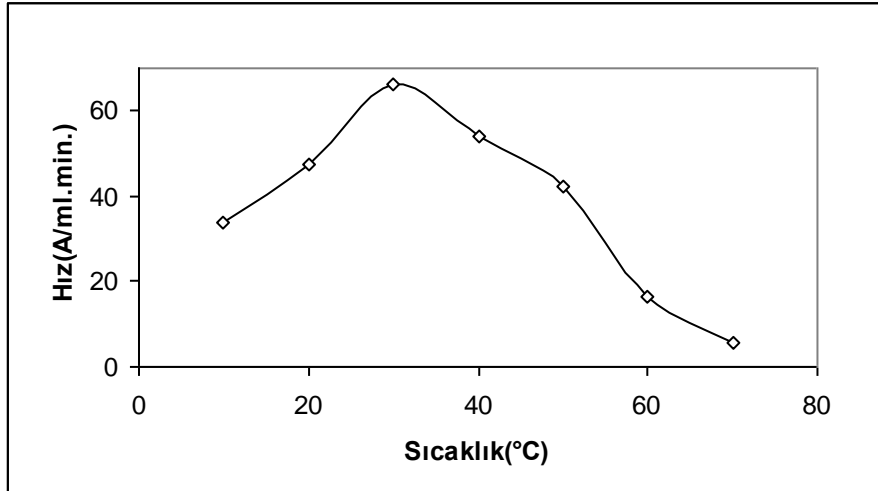
Bu amaçla 10-80 °C aralığında aktivite ölçümleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi PPO1 fraksiyonu 40 °C'de ve PPO4 fraksiyonu ise 30 °C'de optimum aktivite göstermektedir. Bu değerler PPO enzimi için ham ekstrakta da belirlenmiş olup 40 °C olarak bulunmuştur. 40°C'yi dereceyi aşan sıcaklıklarda PPO enzimlerinin denatürasyonu sonucu aktivite azalmaktadır. Buna göre, PPO1ve PPO4 fraksiyonları ham ekstrakta bulunanlar gibi yüksek sıcaklıklarda çalışabilen enzim fraksiyonları içermemektedir.

Saflaştırılmış POD enzimi için de optimum sıcaklık 30 °C olarak tespit edilmiştir. Aynı değer çilek POD aktivitesi için de bildirilmiştir (Civello et al.,1995).

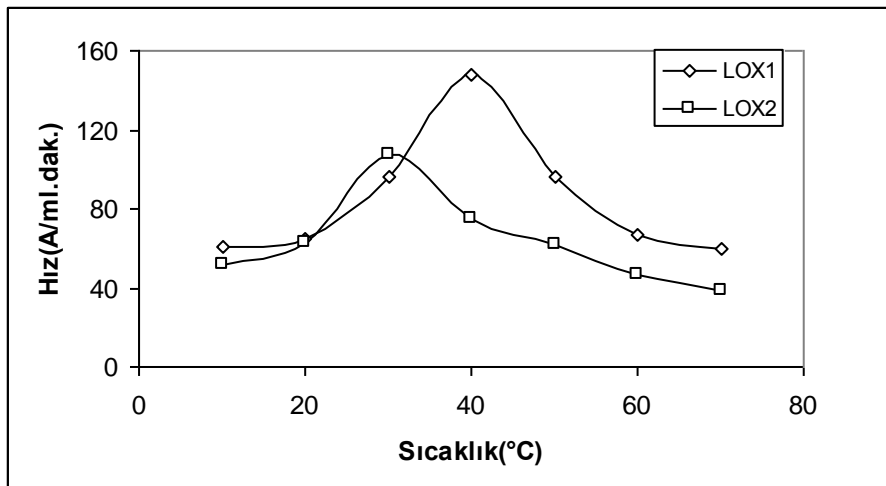
LOX enzimlerinin izoformları ise 40 ve 30 °C'lerde optimum aktivite göstermektedirler. Muz yaprağı (banana leaf) LOX aktivitesi de 40 °C de optimum aktivite göstermektedir (Kuo et al., 2006).



(a)



(b)

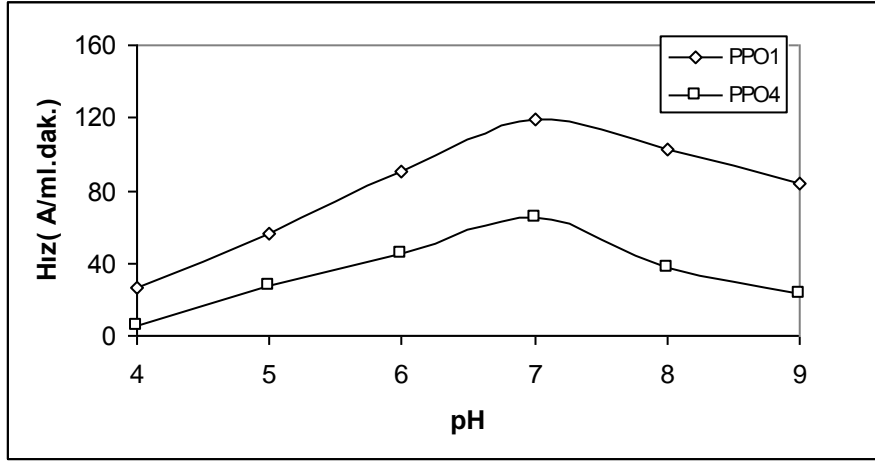


(c)

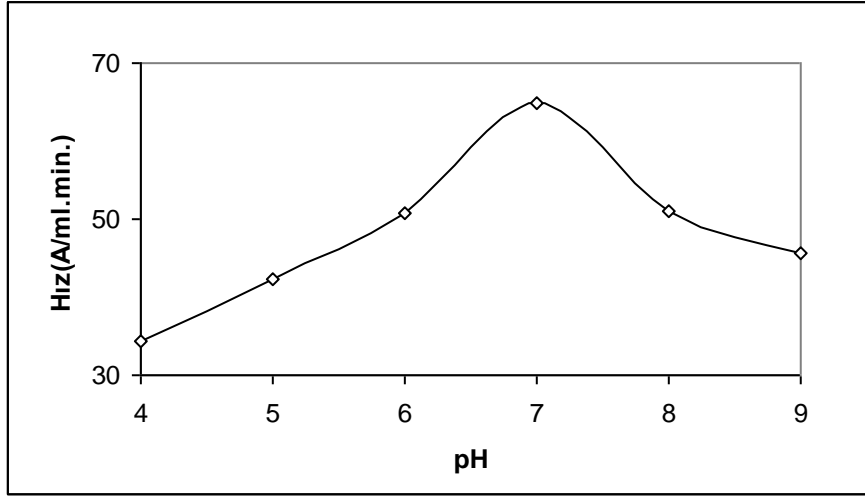
Şekil 4.2. (a) PPO, (b) POD ve (c) LOX enzimlerine ait optimum sıcaklık grafikleri

4.2.2. Optimum pH derecesi

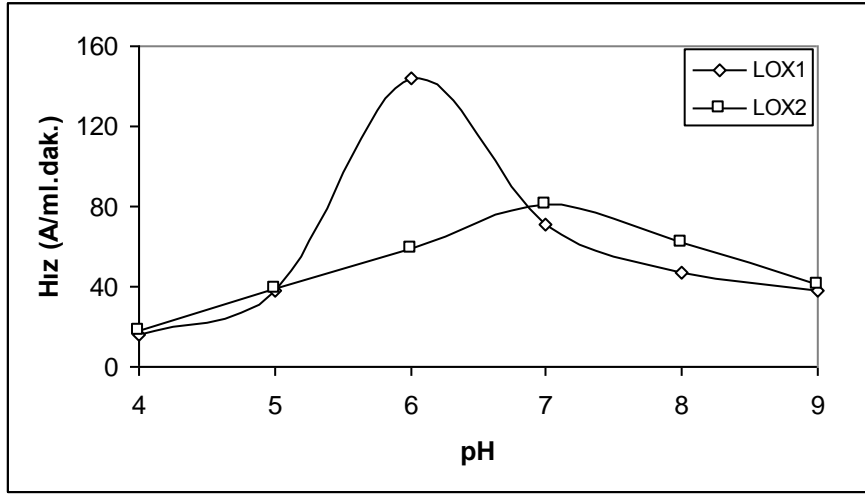
Bu amaçla pH'sı 4.0 ve 9.0 arasında değişen ortamlarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.'de gösterilmiştir da pH 7'de optimum düzeyde çalışabildiği tespit edilmiştir. LOX1 ve LOX2 fraksiyonları için sırasıyla 6 ve 7 olarak bulunmuştur. PPO enzimleri için bulunan değer ham ekstraktan elde edilen değer ile aynıdır (Altunkaya and Gökmen, 2008). Marul POD enzimleri için optimum pH aralığının 6-8.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (Fang et al.,2008). Bu kadar geniş bir aralıkta yer alması, izoenzimlerin farklı pH değerlerinde optimum aktivite göstermesinden kaynaklanabilmektedir. LOX izoenzimleri ise asidik koşullarda, nötral ortamlara göre daha stabil olmaktadır. Soya fasülyesi LOX enzimlerinin de benzer pH değerlerinde optimum aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Civello et al.,1995).



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.3. (a) PPO, (b) POD ve (c) LOX enzimlerinin optimum pH değerleri

4.2.3. Vmax ve Km değerleri

Km ve Vmax değerleri bir enzimin substratına karşı olan kinetik davranışı hakkında bilgi veren değerlerdir. Km değeri bir enzimin substratına karşı olan afinitesini göstermekte olup, bu değerlerin düşük olması afinitenin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Diğer yandan Vmax değeri, ortamdaki tüm enzimin substratıyla birleştiği zaman, gelişen reaksiyonun maksimum hızıdır. Bu hızın yarısına ulaşmak için, substrat konsantrasyonunun Km değerine eşit olması gerekmektedir.

Km değeri ayrıca, bir enzimin dokunun original ortamdaki substrat konsantrasyonu hakkında da bilgi veren bir değerdir. Dokudaki substrat konsantrasyonunun çoğu zaman Km değerine yakın olduğu bildirilmektedir (Segel,1976).

Literatürde, pek çok fenolik bileşiğin PPO enzimlerinin substratı olarak davrandığı gösterilmiştir (Doğan and Doğan, 2004). Bu bağlamda, dihidroksi ve trihidroksi fenoller sırasıyla kateşol, klorojenik asit, kafeik asit, kateşin ve gallik asitin marul PPO enzimlerine karşı substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonları bu konuda yapılmış diğer araştırmalarda genellikle kullanılmış değerler dikkate alınarak seçilmiştir. Marul PPO enziminin en aktif formları (PPO1 ve PPO4) için apparent kinetik parametreler belirlenmiştir (izelge 4.4.). Marul PPO enzimleri dihidroksi fenollerini substrat olarak kullanırken trihidroksi fenollere karşı herhangi bir aktivite tespit edilmemiştir. Katalitik etkinliğin açıklanabilmesi için V_{max}/K_m değerleri hesaplanmıştır. Yine tablodan da görüleceği gibi V_{max}/K_m değerleri her iki fraksiyon için farklılık göstermektedir. Substrat afinitesi PPO1 izoenzimi için sırasıyla klorojenik asit>kafeik asit>kateşin>kateşol>gallik asit olarak bulunmuştur. PPO4 izoformu için bu sıralama kateşol>kateşin>kafeik asit>klorojenik asit>gallik asit şeklinde tespit edilmiştir. PPO1 ve PPO4 izoformlarının her ikisinde gallik aside karşı bir aktivite belirlenmemiştir. Klorojenik asitin, kahve yaprağından elde edilen PPO enzimleri içinde en iyi substrat olduğu bildirilirken kateşol de pek çok bitki için aynı özelliği göstermektedir (Rapeanu et al.,2006; Mdluli, 2005). Substrat spesifikliğine ilişkin bu sonuçların daha anlamlı bir nitelik kazanması için marul örneğinin fenolik bileşik profile de belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili çalışma ileri bölümlerde yer alacaktır.

POD enzimine ait kinetik parametreler, indirgeyici substrat olarak guayakol kullanılarak belirlenmiştir. POD aktivitesi değişen H_2O_2 konsantrasyonları için Michaelis-Menten ilişkisi göstermektedir (izelge 4.5.). Marul POD için K_m 0.33 ve V_m 0.24 olarak bulunmuştur. H_2O_2 için düşük k_m değeri, enzimin aktif bölümündeki hem grubu ile substrat arasındaki hidrofobik etkileşimleri yansıtmaktadır (Onsa et al., 2006).

LOX enzimlerine ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için de 0-12 mM arasında değişen linoleik asit konsantrasyonlarında Michaelis-Menten eğrileri elde edilmiştir (Çizelge 4.6.). LOX1 için K_m 0.33 ve V_m 0.24 olarak bulunurken LOX için K_m 0.98 ve V_m 0.24 olarak tespit edilmiştir. LOX1 için substrat afinitesinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.4. Marul PPO1 ve PPO4 izoenzimlerinin farklı substratlar için kinetik parametreleri (K_m ve V_m)

	K_m (mM)		V_m (1/dak.)		V_m/K_m	
	<i>PPO1</i>	<i>PPO4</i>	<i>PPO1</i>	<i>PPO4</i>	<i>PPO1</i>	<i>PPO4</i>
Klorojenik asit	2.18	0.22	31.25	0.01	14.33	0.05
Kateşol	15.00	0.14	75.18	0.08	5.02	0.57
Kateşin	22.90	0.09	114.94	0.01	5.01	0.13
Kaffeik asit	2.15	0.19	2.15	0.08	1.00	0.41
Gallik asit	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Çizelge 4.5. Kısmen saflaştırılmış POD için K_m ve V_{max} değeri

$K_m(H_2O_2)$ (mM)	V_m (1/dak.)	V_m/K_m
6.486	0.0458	7.6×10^{-3}

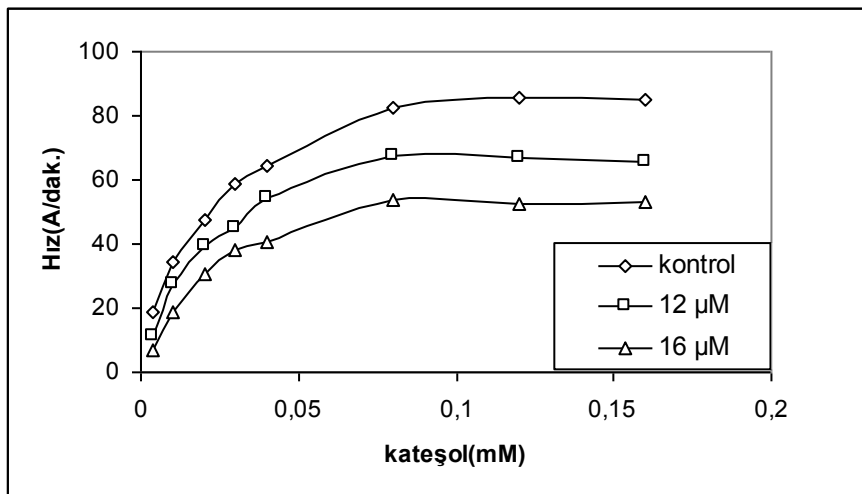
Çizelge 4.6. Marul LOX1 ve LOX2 izoenzimlerine ait kinetik parametreler (V_{max} ve K_m)

	K_m (mM)		V_m (1/min)		V_m/K_m	
	LOX1	LOX2	LOX1	LOX2	LOX1	LOX2
Linoleik asit	0.33	0.98	0.24	0.24	14.33	0.05

4.2.4. PPO ve LOX aktivitelere inhibitörlerin etkisi

Dört farklı inhibitörün askorbik asit (0.012-0.040 mM), sistein (0.001-0.003 mM), okzalik asit (0.04-0.80 mM) ve sitrik asitin (0.04-0.80 mM) marul PPO1 ve PPO4 aktivitelere olan etkisi araştırılmıştır. İnhibisyon tipleri ve inhibisyon sabitleri (k_i) Çizelge 4.7’de verilmiştir. Kullanılan inhibitörler arasında marul PPO1 ve PPO4 aktivitelere karşı en etkin inhibitörün sistein olduğu tespit edilmiştir. Her iki fraksiyon için askorbik asit ve sistein rekabetçi (competetive), sitrik ve okzalik asit ise rekabetçi olmayan(non-kompetetive) inhibisyon etkisi göstermişlerdir. Burada rekabetçi inhibisyon tipine örnek olarak askorbik asit, rekabetçi olmayan inhibisyon tipine örnek olarak da okzalik asit verilerek kinetic analiz açıklanmıştır.

Kontrol (inhibitör olmayan durum) ile kıyaslandığında askorbik asitin marul PPO1 enzimi üzerine etkisi Michaelis-Menten eğrisi (Şekil 4.4.) ve Linewear-Burk grafiği (Şekil 4.5.)’de açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.4. Oksidasyon reaksiyonu ortamına farklı konsantrasyonlarda askorbik asit ilave edildiğinde oksidasyon hızında oluşan değişimler

Askorbik asit ile gerçekleşen PPO inhibisyonunun tipini belirlemek için Eşitlik1 de verilen Michaelis-Menten hız ifadesinin doğrusallaştırılmış formu olan Linewear-Burk eşitliği (Eşitlik 2) kullanılmıştır.

Michaelis-Menten Hız eşitliği:

$$V = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Michaelis-Menten hız eşitliğinin doğrusal formu, Linewear-Burk eşitliği:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]}$$

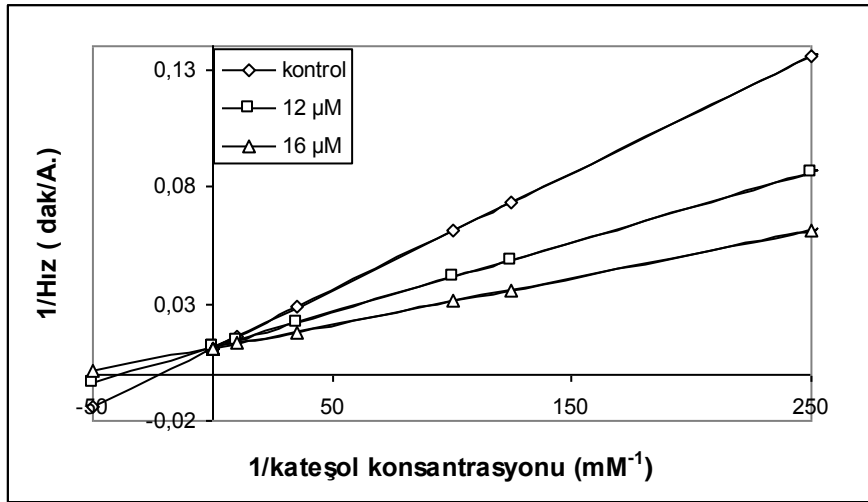
Burada;

V_{\max} = Maksimum hız (1/dak.)

K_m = Maksimum hızın yarısına ulaşmak için gerekli kateşol konsantrasyonu (mM)

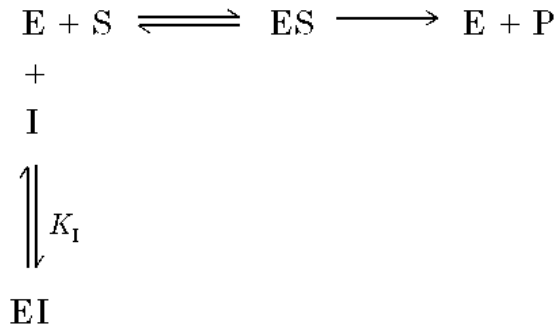
$[S]$ = kateşol konsantrasyonu (mM)

Askorbik asit varlığında elde edilne kinetik veriler Michaelis-Menten modelinin doğrusallaştırılmış formu olan Linewear-Burk modeline göre ele alınıp, 1/kateşol konsantrasyonuna karşı 1/ reaksiyon hızı grafikleri çizildiğinde x-ksenini kestiği noktaların değiştiği ancak y eksenini kestiği noktaların değişmediği görülmektedir (Şekil 4.5.). Bu durum inhibitör varlığında marul PPO1 enzimi için K_m değerlerinin arttığı ve V_{\max} değerlerinin değişmediğini göstermektedir. Marul PPO1 enziminde görülen bu davranış, askorbik asit varlığında gözlenen inhibisyonun rekabetçi inhibisyon modeline uyduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. Askorbik asit varlığında marul PPO1 enzimine ait Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 4.6.'de rekabetçi inhibisyonun reaksiyon mekanizması şematik olarak gösterilmiştir. Rekabetçi inhibisyon modelinde inhibitör enzimin aktif bölgesine substratla yarışarak bağlanmaktadır. Enzim ile inhibitör kolaylıkla bağlanmakta ancak ürün oluşmamaktadır. Ortamdaki substrat konsantrasyonu arttıkça enzimin inhibitöre olan ilgisi azalmakta ve inhibisyon ortadan kalkmaktadır. Dolayısıyla K_m değeri azalırken V_{max} değeri değişmemektedir (Copeland, 2002).



Şekil 4.6. Rekabetçi inhibisyon modeli

Rekabetçi enzim inhibisyon modelinde Michaelis-Menten hız eşitliği eşitlik 3'deki gibi ifade edilmektedir.

Eşitlik 3:

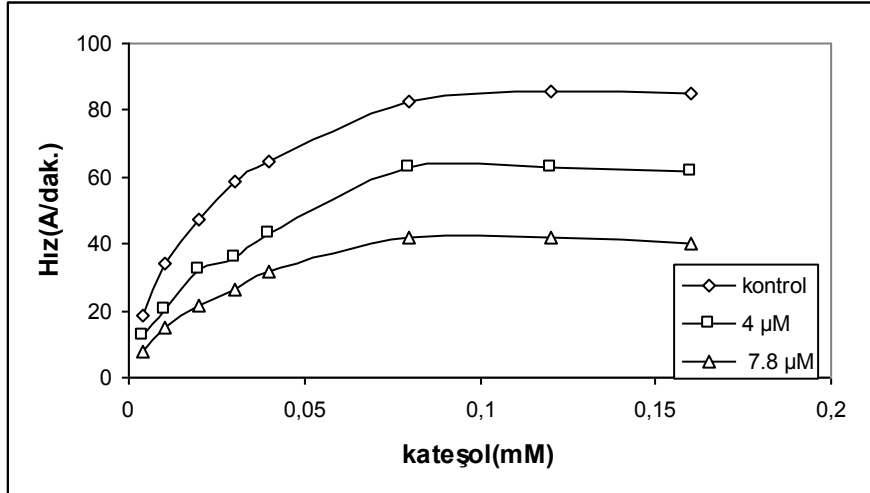
$$V = \frac{V_{\max}[S]}{S + Km \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)}$$

Eşitlik 3 doğrusallaştırıldığında ise Eşitlik 4 elde edilmektedir:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{I}{Ki}\right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

Eşitlik 3 ve 4'de gösterilen [I] inhibitör konsantrasyonu, Ki inhibitör dissosiasyon sabitini belirtmektedir. Ki değeri düştükçe inhibitörün etkinliği artmaktadır.

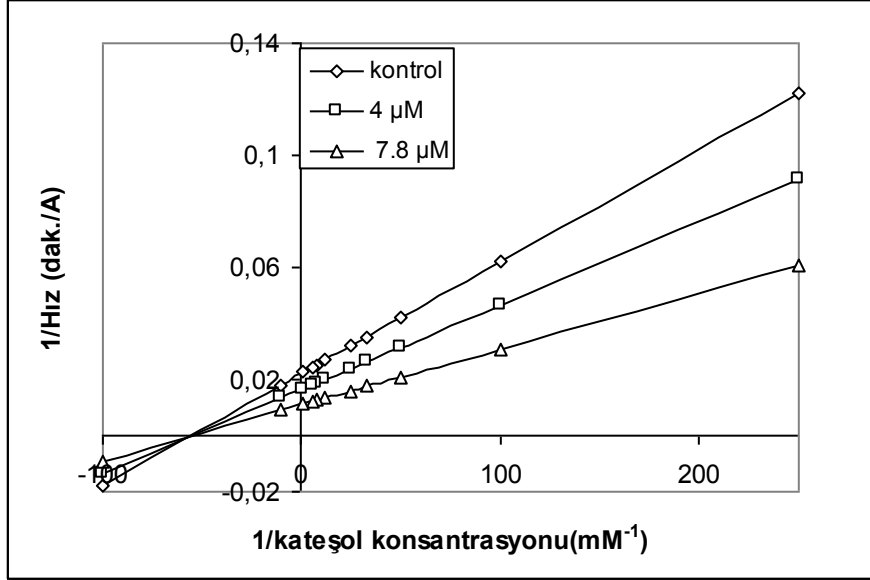
Oksidasyon ortamına okzalik asit ilave edildiğinde elde edilen Michaelis-Menten eğrisi ise şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda okzalik asit ilave edildiğinde oksidasyon hızında oluşan değişim

Yine aynı yöntemle elde edilen Michaelis-Menten eğrisi doğrusallaştırıldığında elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri ise Şekil 4.8'de görülmektedir. Burada

askorbik asitle elde edilen grafikten farklı olarak y-eksenini kestiği noktaların değiştiği ancak x-eksenini kestiği noktaların aynı olduğu görülmektedir. Bu durum, okzalik asit varlığında marul PPO1 enzimi için V_{max} değerlerinin azaldığını buna karşılık K_m değerlerinin değişmediğini göstermektedir.



Şekil 4.8. Okzalik asit varlığında marul PPO1 enzimine ait Lineweaver-Burk grafikleri

Rekabetçi olmayan enzim inhibisyon modelinde Michaelis-Menten hız eşitliği, Eşitlik 5'deki gibi ifade edilmektedir:

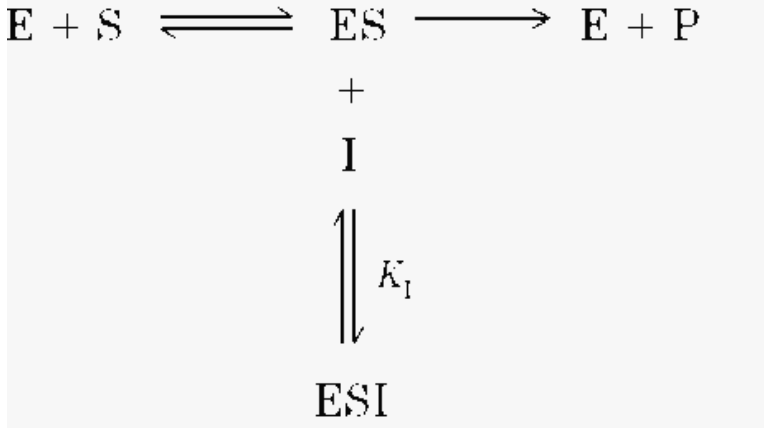
$$V = \frac{V_{\max}[S]}{([S] + K_m) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Bu eşitlik doğrusallaştırıldığında ise Eşitlik 6 elde edilmektedir

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Rekabetçi olmayan enzim inhibisyon modelinde inhibitör madde, enzim veya enzim-substrat kompleksine etki ederek ürün oluşumunu engellemektedir. Ortama

ilave edilen inhibitör konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak enzim inhibisyonu gerçekleşmekte, ortamda bulunan inhibe olmamış enzim miktarına bağlı olarak ise ürün oluşmaktadır. Bundan dolayı enzim kinetiğine ait parametrelerden K_m değeri değişmezken V_{max} değeri azalmaktadır (Copeland, 2000).



Şekil 4.9. Rekabetçi olmayan inhibisyon modeli

Çizelge 4.7. Farklı inhibitörlerin PPO1 ve PPO4 izoenzimlerini inhibisyon tipi

	I (mM)		K_i (mM)		İnhibisyon tipi	
	PPO1	PPO4	PPO1	PPO4	PPO1	PPO4
Askorbik asit	1.2×10^{-2}	2.8×10^{-2}	9.2×10^{-2}	7.5×10^{-2}	Rekabetçi	Rekabetçi
	1.6×10^{-2}	4.0×10^{-2}				
L-sistein	1.1×10^{-3}	2.0×10^{-3}	3.0×10^{-3}	2.0×10^{-3}	Rekabetçi	Rekabetçi
	2.4×10^{-3}	3.6×10^{-3}				
Okzalik asit	4.0×10^{-2}	1.5×10^{-2}	1.5×10^{-1}	4.7×10^{-1}	Rekabetçi olmayan	Rekabetçi olmayan
	7.8×10^{-2}	2.5×10^{-2}				
Sitrik asit	4.1×10^{-2}	1.5×10^{-2}	1.1×10^{-1}	4.17×10^{-1}	Rekabetçi olmayan	Rekabetçi olmayan

$$8.0 \times 10^{-2} \quad 2.5 \times 10^{-2}$$

Enzimatik esmerleşme, en önemli kalite kriterlerinden biri olduğundan, önlenmesi için çeşitli yaklaşımlar söz konusudur. Isıl işlem bu bağlamda önerilen yöntemlerden biri olmakta ancak olası olumsuz etkilerinden dolayı kimyasal inhibitörler daha çok tercih edilmektedir (Richard-Forge et al., 1992). Yapılan çalışmalarda PPO enzimlerinin katalizlediği bitkilerin enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının, oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktantların uzaklaştırılması ile engellenebileceğini göstermektedir (Gawlik-Dziki et al., 2008).

Askorbik asit en önemli besin öğelerinden biri olmakla beraber depolama esnasında kolaylıkla ayrışmaktadır. Sıcaklık, pH, oksijen konsantrasyonu, metaller (demir, bakır) ve ışık gibi faktörlerin askorbik asitin parçalanmasını hızlandırdığı bildirilmektedir (Jung et al., 1995). Askorbik asitin parçalanması hem besinsel değerlerin azalmasına hem de renk değişimine yol açmaktadır.

Askorbik asit, indirgen bir moleküldür ancak PPO'ya karşı direkt etki etmemektedir. Enzimatik oksidasyonla birlikte oluşan o-kinonları difenollere indirgemekte ve bu işlem "reaksiyon deaktivasyonu" olarak adlandırılmaktadır. Ancak askorbik asit esmerleşmeyi geçici olarak önlemektedir (Santerre et al., 1988 ; Rapeau et al., 2006). Öncelikle dehidroaskorbik asite dönüşmekte daha sonra da 2,3 diketoglukonik asite parçalanmaktadır (Gonzalez- Aguilar et al., 2005). Marul aynı zamanda askorbik asit oksidaz enzimini de içermekte ve marul parçalanıp oksijenle temas başladıktan sonra askorbik asiti dehidroaskorbik asite dönüştürmektedir. Askorbik asit miktarı bu nedenle oksidasyonla birlikte azalmaktadır (Yamaguchi et al., 2003). Sonuç olarak, enzimatik esmerleşme ve fenol kaybının önlenmesi açısından askorbik asitin depolama esnasındaki stabilitesi ciddi bir sorun olarak gözükmektedir (Larisch et al., 1996).

PPO ile ilgili yapılan deneysel çalışmada, askorbik asitin spektrofotometrik davranışı model ortamda incelendiğinde reaksiyonun başında, lag periyod gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Dinçer et al., (2002) tarafından da bulunmuştur.

Askorbik asit bu aşamada bir enzim inhibitöründen çok antioksidan gibi aktivite göstermektedir. Çünkü oluşan o-kinonları, difenollere bitkide original formuna indirgemektedir. Lag periyodun ardından yaklaşık olarak askorbik asit dehidroaskorbik asite çevrildikten sonra, PPO aktivitesi ile oluşan o-kinon miktarı artmaktadır. Kinonlar daha sonra polimerize olmakta ve/veya diğer amino grupları ile birleşerek yüksek molekül ağırlıklı ve esmer renkli pigmentleri meydana getirmektedirler (Duangmal and Owusu Apenten, 1999). Aydemir and Kavrayan (2001), askorbik asitin nane ve Aydemir (2004) enginar PPO aktivitesine karşı kompetatif inhibisyon gösterdiğini bulmuşlardır. Benzer bulgular ham enzim marul PPO aktivitesine karşı da bulunmuştur (Altunkaya and Gökmen,2008).

Sistein, PPO'a karşı bilinen en etkili inhibitördür (Eidhin et al., 2006). Sisteinin davranışı oldukça komplekstir. Enzimatik oksidasyon esnasında, o-kinonlara tutunarak kinon-sistein kompleksini oluştururlar (cysteinil adduct). Polagrafik çalışmalarla, bu kompleksin PPO substratı olmamasına rağmen PPO aktivitesine karşı kompetatif bir inhibisyon gösterdiği aynı zamanda fenollere göre de afinitesinin de yüksek olduğunu belirlenmiştir.

Fazla miktarda sistenin kullanıldığı durumda (sistein/fenol>1), fenoller tamamen kinon-sistein kompleksine dönüşmektedir. Sistein/fenol<1 olduğu durumda ise, fazla miktarda o-kinon oluşmakta ve kinonlar, kinon-sistein kompleksi ile reaksiyona girerek fenollerin rejenerasyonunu sağlamakta dolayısıyla esmer renkli pigment oluşumuna neden olmaktadır. Bundan dolayı, kritik konsatrasyon aşıldıktan sonra, sistein PPO aktivitesi üzerinde kalıcı bir inhibisyon etkisi göstermektedir (Richard-Forget et al., 1992; Rapeanu et al., 2006).

L-sisteinin, PPO aktivitesinin önlenmesinde kinonlarla yada direkt olarak enzimle reaksiyona girip girmediği araştırılmıştır. Palmito PPO, L-sistein varlığında spektrofotometrik olarak karakterize edilmiştir. 4-metilkateşolün substrat olarak kullandığı bu çalışmada yapılan kinetik analizler sonucunda, PPO enziminin L-sistein varlığında geri dönüşsüz olarak inhibi edildiği tespit edilmiştir. Bu durum, protein yapısı ve/veya enziminin iyonizasyonunun değişmesi şeklinde

açıklanmıştır (Robert et al., 1996). Aynı zamanda enzimatik oksidasyon esnasında sisteinin 5-pozisyonuna yer değiştirdiği de belirtilmektedir. Zincir yapıdaki karboksil grubu, sisteinin 2 pozisyonunda yer değiştirmesine olanak tanımamaktadır (et al.,_1991).

Dolayısıyla sistein varlığında PPO inhibisyonu, birincil olarak sistein-kinon kompleksinin PPO üzerine kompetatif inhibisyon etkisi, ikincil olarak da kinonların bu kompleksle reaksiyona girerek fenollerini rejenere etmesi şeklinde açıklanabilmektedir. Tüm bu durumlarda, sistein-kinon kompleksinin oluşumu, fenol kaybı ile orantılıdır (Robert and Cadet,1996).

Gorny et al. (2002), sülfidlerin pH 4'ün altında indirgeyici ajan olarak davrandığını pH 4 değerinin üstünde ise kinonlar sülfid, sistein yada glutatyon ile renksiz kompleksler oluşturduğunu göstermişlerdir. Sebze pH değerleri genellikle nötral yada nötral pH değerine yakın olduğu için enzimatik esmerleşmeye karşı sistein tek başına daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Okzalik asit; kuşkonmaz, brokoli, havuç, sarımsak, marul, soğan, maydonoz, bezelye, patates, ıspanak, domates gibi pek çok bitkinin doğal bileşenlerinden biridir. Bitkinin gelişimi esnasında fonksiyonel bir öneme sahiptir (Ilarslan et al., 1997).

Son et al. (2001); dikarboksilik asitleri üç kategoride incelemiş ve enzimatik esmerleşme reaksiyonlarındaki etkinliklerine göre en iyi, orta ve zayıf olarak sınıflandırmışlardır. Bu göre okzalik asitin en iyi inhibitör olduğu bildirilmiştir. Dikarboksilik asitlerin inhibisyon etkisi; zincir uzunluğu, dissosiasyon sabitleri, daha uzun zincirlerde stearik engelleme olasılığı ve çözeltideki iyonizasyon derecesine göre belirlenmiştir. Dolayısıyla okzalik asitin inhibisyon etkisi, kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır.

Okzalik asit varlığında PPO inhibisyonu, okzalik asitin enzimin aktif bölgesindeki bakıra bağlanarak enzimi inaktif hale getirmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Prenen et al., 1984). İnhibisyon etkinliği, okzalik asit konsantrasyonu ve pH'nın düşmesi ile sağlanmaktadır. Okzalik asit; kateşol-kinon oluşumu azaltarak kinonlarda renk açılmasını sağlamaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO aktivitelerine karşı okzalik asit farklı inhibisyon mekanizmaları göstermektedir. Son et al. (2001), mantar PPO aktivitesine karşı kompetatif inhibisyon tipi gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, enginar PPO aktivitesine karşı non-kompetatif, kereviz PPO aktivitesine karşı ise kompetatif inhibisyon gösterdikleri tespit edilmiştir (Aydemir,2004; Aydemir & Akkanlı, 2006).

Okzalik asit, insan sağlığına zararlı olabilmektedir. Diyetle yer aldığı zaman kalsiyum, potasyum, magnezyum gibi önemli mineralleri bağlayabilmekte ve okzalat olarak adlandırılan az çözünür tuzları oluşturmaktadırlar (Palaniswamy et al., 2004). Dolayısıyla okzalik asitin enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına karşı kontrollü olarak kullanımı önerilmektedir.

Sitrik asitin; minimal işlenmiş meyve ve sebzelerde, PPO aktivitesine karşı inhibitör özelliği yoğun bir şekilde bahsedilmektedir (Ahvenainen, 1996). Okzalik asitte olduğu gibi sitrik asitte, enzimin aktif bölgesindeki bakıra zayıfca bağlanarak ve pH'yı düşürerek çift etki göstermektedir (Ibrahim et al., 2004). Bu çalışmada marul PPO aktivitesine karşı sitrik asit, non-kompetatif bir etki göstermiştir.

Marulda bulunan LOX1 ve LOX2 enzimlerine β -karotenin (0.110-0.992 mM) etkisi de belirlenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asit oksidasyon reaksiyonunun, ortamda β -karoten bulunması halinde inhibe olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.8.). β -karotenin marul LOX aktivitesine etkin bir şekilde etki ettiği belirlenmiştir. Reaksiyon boyunca β -karoten ko-oksidasyonu gerçekleşmiş ve bu reaksiyon sonucunda ortamdaki β -karoten tamamen okside olmuştur. LOX1 için ki değeri 0.804 iken LOX2 için 0.290 olarak

bulunmuştur. Her iki izoform için β -karoten non-kompetatif bir inhibisyon özelliği göstermiştir.

Çizelge 4.8. β -karoten varlığında LOX1 ve LOX2 enzimlerinin inhibisyon

	I (mM)		K _i (mM)		İnhibisyon tipi	
	LOX1	LOX2	LOX1	LOX2	LOX1	LOX2
β -caroten	6.6x10 ⁻⁷	9.92x10 ⁻⁷	0.804		Non-kompetatif	Non-Kompetatif

LOX katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin hidroperoksidasyon reaksiyonunda β -karoten etkin bir rol oynamaktadır. Buna göre, β -karoten reaksiyon başlangıcında oluşan linoil radikali(L●) ile reaksiyona girerek konjuge dien oluşumunu (LOO●) engellediği ve bu etkinin linoleil radikale β -karoten molekülü tarafından hidrojen transferi şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Serpen and Gökmen, 2006). Böylelikle linoleil radikali başlangıç formuna(LH) dönerken, bir hidrojen atomu kaybeden β -karoten molekülü β -karoten radikale (β -karoten●) dönüşmektedir. Bu sırada LOX enzimi doğal çevrimini tamamlayamadan Fe(II) formunda kalarak inactive olmaktadır. İnaktive olan enzim miktarı ise reaksiyon ortamında bulunan β -karoten miktarına bağlıdır (Serpen and Gökmen, 2007).

4.2.5. PPO inhibitörlerinin toplam antioksidan aktiviteye olan etkisi

Marul ekstraktının toplam antioksidan aktivitesi; askorbik asit, sistein, sitrik asit ve okzalik asit varlığında 4 ve 25 °C'lerde 24 saat süreyle izlenmiştir. Toplam antioksidan aktivite TEAC yöntemiyle belirlenmiştir. Şekil 4.5. farklı depolama koşullarında marul ekstraktının toplam antioksidan aktivitesindeki azalmayı göstermektedir.

Marulun antioksidan aktivitesi, yapısında bulunan fenollerden kaynaklanmaktadır. Flavonoidler, fenol türevi olup marulun yapısında önemli miktarlarda bulunmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Doğal yada sentetik pek çok flavonoidin antioksidan aktivitesinin, özellikle süperoksit radikallerine karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Süperoksit radikali, fenoller tarafından çok yavaş fakat etkin bir şekilde sönmülmektedir. Çünkü fenollerin redoks potansiyeli süperoksit radikallerinden daha yüksektir. Bir başka deyişle, flavonoid radikallerinin redoks potansiyeli, alkilperoksil ve süperoksit radikallerinin redoks potansiyelinden daha düşüktür. Böylece, flavonoidler oksil türlerini kolayca inaktive etmekte ve bu reaksiyonların meydana getirebileceği olumsuzlukları da önlemektedirler (Jovanovic et al., 1994).

Maruldaki toplam antioksidan aktivitenin her iki sıcaklıkta da azaldığı gözlenmiştir. Marul ve brokolinin radikal sönmeme kapasitesinin zamana bağlı değişimi üzerinde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Yamaguchi et al.2003). Örnekler parçalandıktan sonra ilk 15 dakika içinde radikal sönmeme kapasitesinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir.

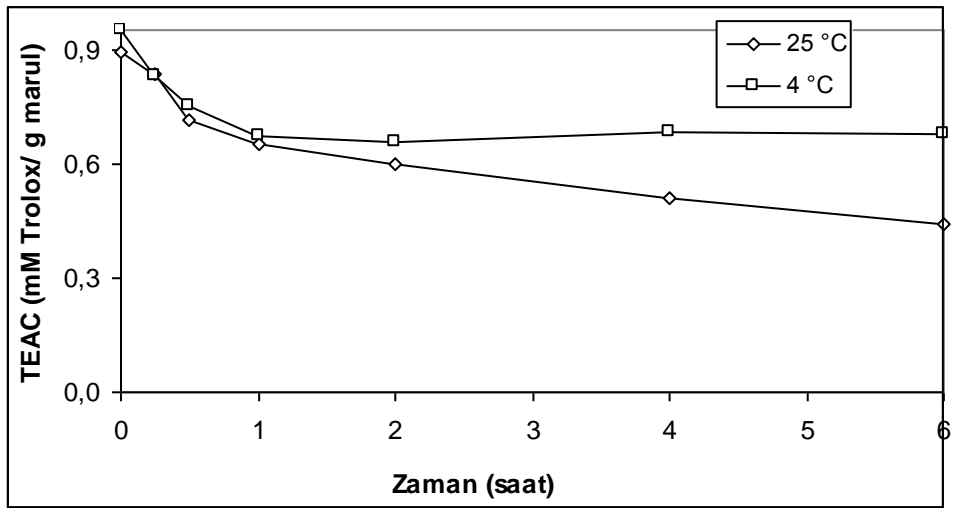
Toplam antioksidan aktivitenin, 25°C sıcaklıkta 4°C sıcaklığa göre daha hızlı bir azalma göstermiştir. Soğuk koşullar, fenolik bileşik ve aynı zamanda toplam antioksidan aktivite kaybını azaltmaktadır. Ancak askorbik asit, sistein, sitrik asit ve okzalik varlığında bu bileşiklerin antioksidan olmasından dolayı artış göstermiştir.

Askorbik asit, pek çok gıda maddesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Askorbik asit, askorbil radikalleri oluşturarak serbest radikalleri sönmlemektedir (Yamaguchi et al., 1999). Askorbik asitin ene-diol yapısı, radikallerin sönmlemesinde önemli rol oynamaktadır (Darkwa et al., 1998). Fenolik bileşiklerle birlikte sinerjizm göstermektedir. Miller and Rice-Evans (1996), portakal, elma ve karadut gibi meyve içeceklerindeki C vitamininin oksidatif

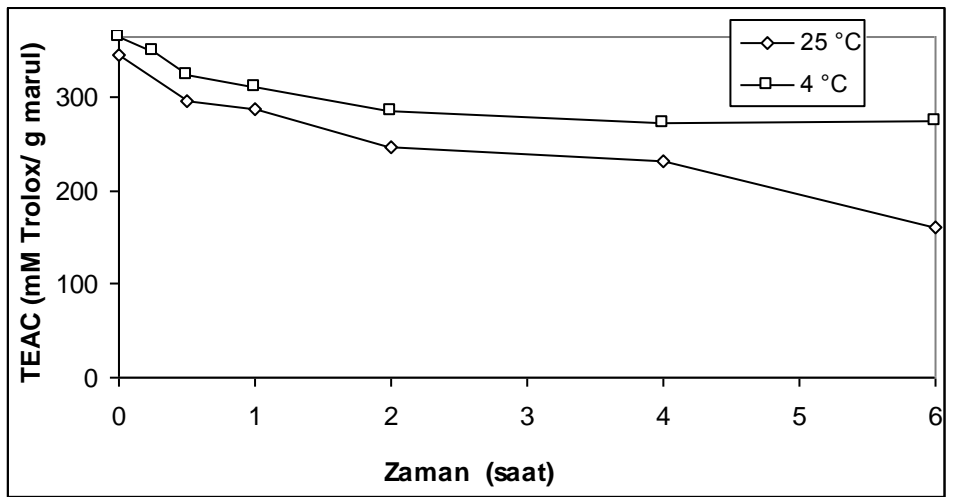
parçalanmanın gecikmesinde bu içeceklerin yapısında bulunan fenollerin askorbat koruyucu etkisinden kaynaklandığını bildirmişleridir. Buna ek olarak, hafif oksidasyon koşullarında, 24 saat sonunda antioksidan aktivite değerinde önemli bir azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Fenolik bileşiklerin içinde kuersetinin askorbik asit üzerinde en yüksek koruyucu etkiyi sahiptir. Heimler et al., 2007; farklı marul türlerinde önemli miktarlarda kuersetin olduğu bulmuşlardır. Bazı çay ekstraktlarına askorbik asit eklenerek yapılan bir diğer çalışmada ise antioksidan aktivitenin lineer olarak arttığı bildirilmiştir (Majchrzak et al., 2004).

Sistein, yapısındaki bulunan tiyol grubundan dolayı radikal sönümlenme özelliği gösteren bir aminoasittir. Üç adet reaktif merkezi bulunmaktadır: karboksilik asit, amino grubu ve sülfür içeren merkez. Reaktivitenin fizyolojik önemi merkezindeki sülfürden kaynaklanmaktadır. Sisteinin özellikle reaktif oksijen türleriyle olan reaksiyonu ve serbest radikalleri sönümlenmesi, kendisinin tiol radikale dönüşümü şeklinde gerçekleşmektedir (Darkwa et al., 1998). Bassil et al. 1995, fenolik hidroksillerle zayıf O-H bağlarının oluşumu ile sisteinin antioksidan aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Yine sistein ile bitki polifenollerinden protekateşuik asit arasındaki sinergistik etki Saito and Kawaba (2004) tarafından da doğrulanmıştır.

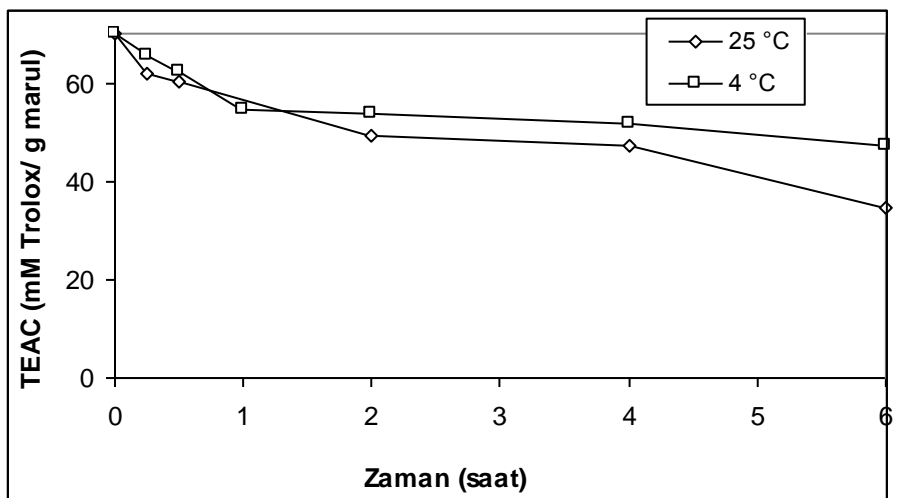
Sitrik ve okzalik asitin ise marulun antioksidan aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu asitler pH yı önemli ölçüde düşürmektedirler. Düşük pH aynı zamanda PPO aktivitesini de azaltmakta dolayısıyla fenoller okside olmamaktadırlar. Benzer şekilde askorbik asitte pH yı düşürmektedir ancak askorbik asit sitrik ve okzalik asitten farklı olarak indirgen bir özelliğe sahiptir (Yamaguchi et al., 2003).



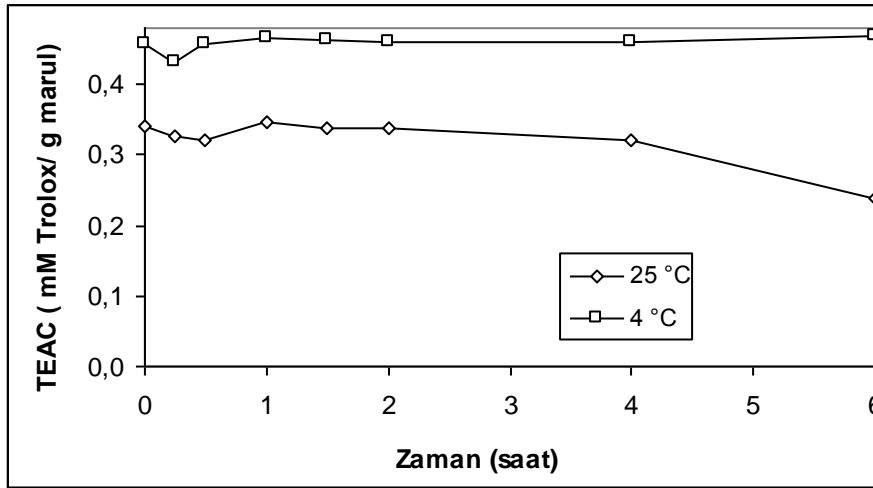
(a)



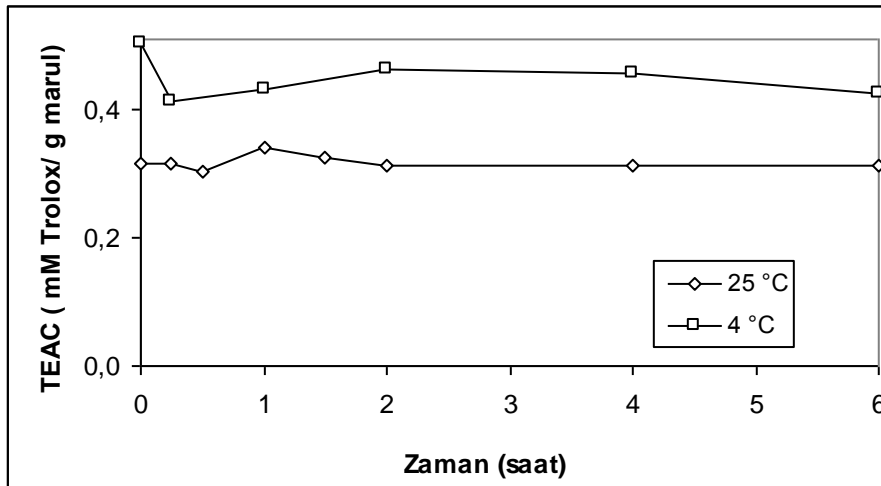
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 4.5. (a) kontrol, (b) %0.5 askorbik asit, (c) %0.05 sistein, (d) %0.5 sitrik asit ve (e) %0.5 okzalik asit varlığında 6 saat süreyle 4 ve 25 °C'lerde marulun toplam antioksidan aktivitesindeki değişim

4.2.6. PPO inhibitörlerinin toplam fenol içeriğine olan etkisi

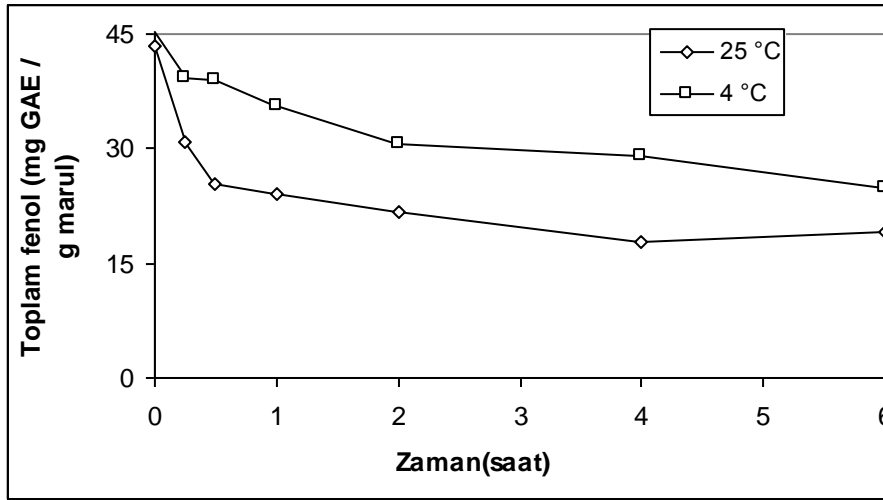
Toplam fenol içeriğindeki değişim % 0.5 askorbik asit, % 0.05 sistein, % 0.5 sitrik asit ve % 0.5 okzalik asit varlığında 4 ve 25 °C'lerde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Marulun fenol içeriğini belirlemek için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır.

Toplam fenol içeriğinin zaman bağılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Fenol miktarı 4°C sıcaklıkta, 25°C'ye göre daha yavaş bir azalma göstermiştir. Çünkü düşük sıcaklık, solunum, etilen oluşumu ve enzim aktivitesi gibi pek çok metabolik faaliyeti yavaşlatmaktadır. Uygun depolama sıcaklığı tür ve çeşide göre değişim gösterebilmektedir. Ancak özellikle yapraklı sebzeler için 4 °C, optimum depolama için en çok tercih edilen sıcaklık değeridir. Düşük sıcaklık, hasattan hemen sonra kalitenin korunması için mutlaka sağlanmalıdır (Ferrante and Maggiore, 2007).

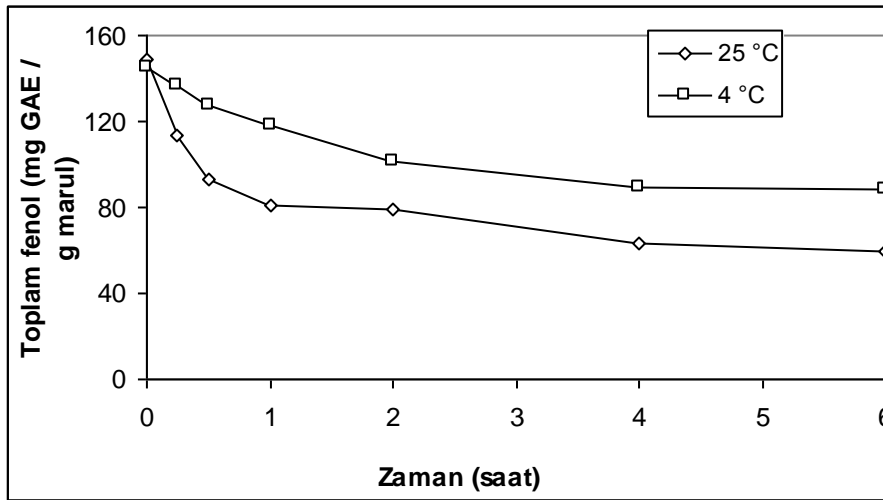
Yamaguchi et al. (2003), ısıtılmış ve ısıtılmamış marullardaki toplam fenol içeriğini incelemiştir. Isıtılmış marul örneklerinde fenol miktarı hemen hemen aynı kalırken, ısıtılmamış örneklerde belirgin bir azalma olduğunu belirlemiştir. Marulun yapısında bulunan bazı fenolik bileşikler PPO'ın en iyi substratlarından biri olduğundan, fenol içeriğindeki azalma PPO'ın oksidasyonundan kaynaklanmış olabilmektedir.

Asorbik asit ve sistein varlığında, fenol miktarı artmaktadır. Bu durum bir önceki bölümde anlatılan fenollerle aralarındaki sinerjizmden kaynaklanabilmektedir. Okzalik ve sitrik asit varlığında ise fenol miktarında çok az bir azalma görülmüştür. Bu durumda pH'daki azalmadan kaynaklanabilmektedir. Okzalik ve sitrik asit varlığında fenol içeriğindeki yavaş azalma, fenollerin oksidasyonunun önlenmesi şeklinde açıklanabilir.

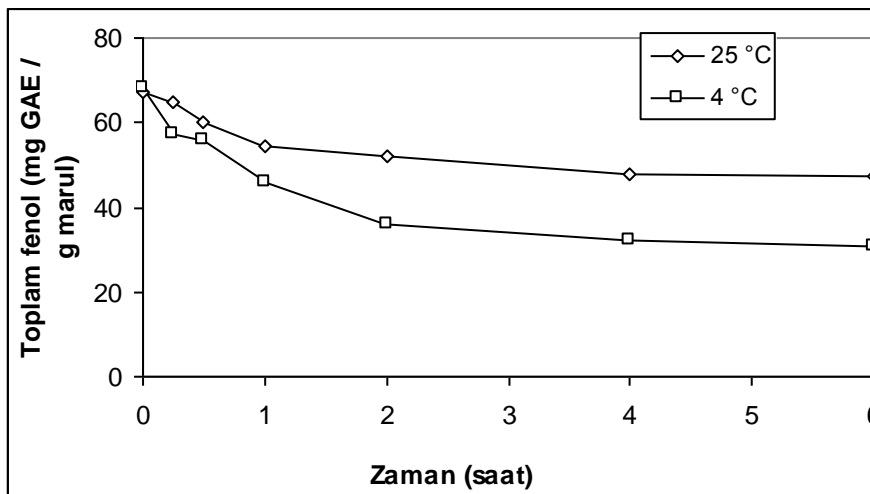
Toplam antioksidan aktivite ve fenol içeriğindeki azalma paralellik göstermektedir. Dolayısıyla toplam antioksidan aktivite ve fenol içeriği arasında askorbik asit ve sistein varlığında çok iyi bir korelasyon bulunmaktadır ($r>0.90$). Ancak sitrik ve okzalik varlığında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.



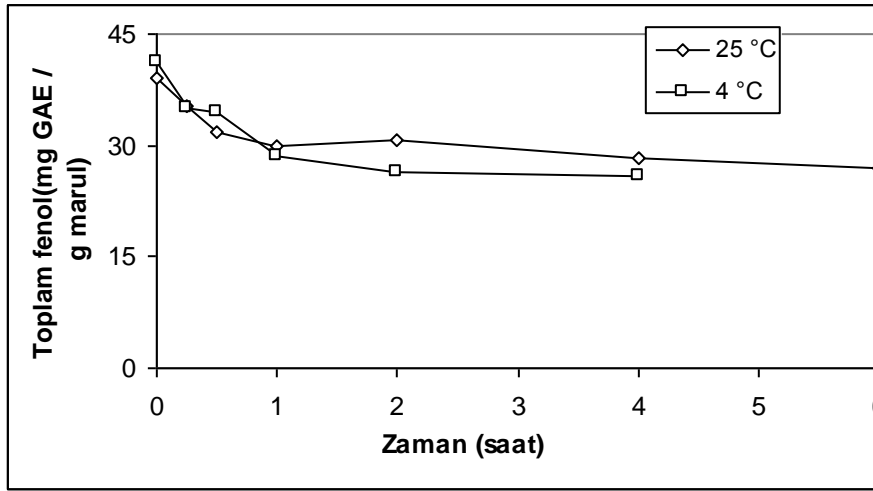
(a)



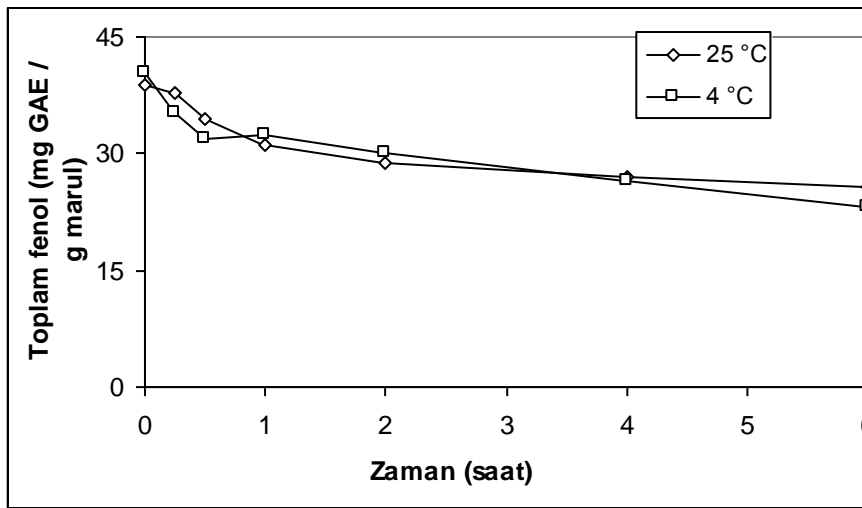
(b)



(c)



(d)



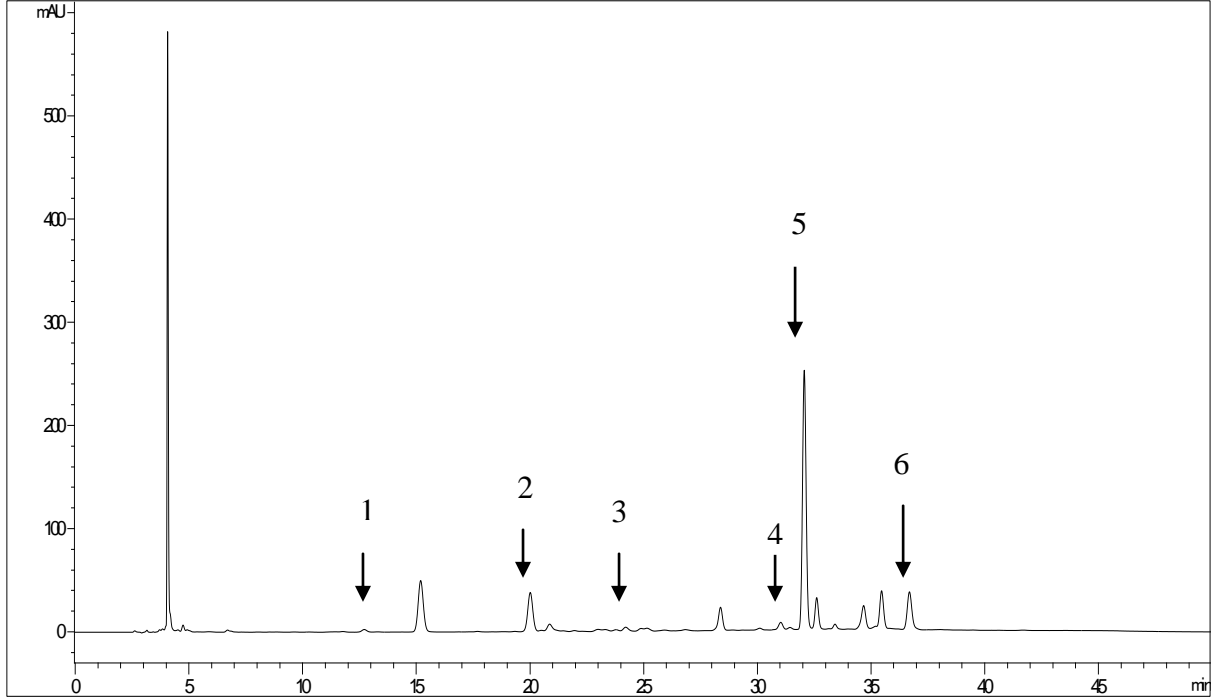
(e)

Şekil 4.6. (a) kontrol, (b) askorbik asit, (c) sistein, (d) sitrik asit ve (e) okzalik varlığında 4 ve 25 °C'lerde 6 saat süreyle toplam fenol içeriğinde meydana gelen değişim.

4.2.7. PPO inhibitörlerinin marulun fenolik bileşik profiline olan etkisinin kromotografik olarak incelenmesi

Marul ekstraktının fenolik bileşik profili, HPLC analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Her bir fenolik bileşiğin % 0.5 askorbik asit, %0.05 sistein,% 0.5 sitrik ve okzalik asitler varlığındaki değişimi 25 °C' de izlenmiştir. Protekateşuik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve floridzin, bu bileşiklerin saf çözeltilerinin alıkonma süreleri karşılaştırılarak incelenen marul örneğinde

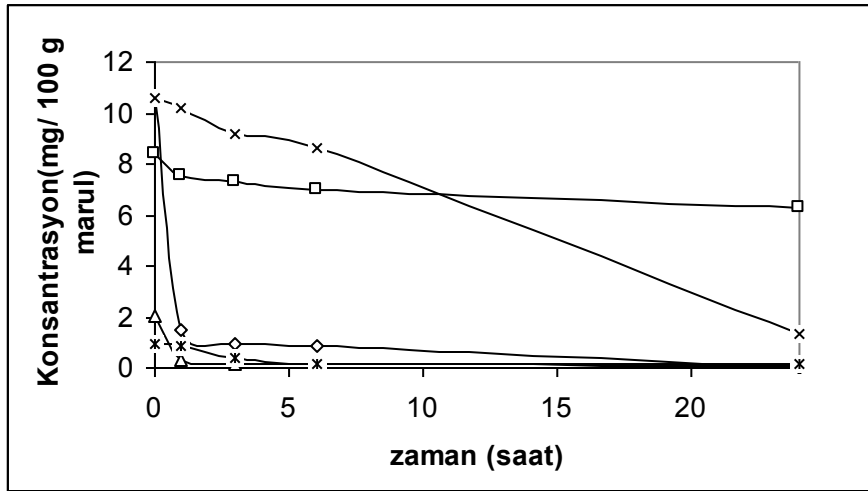
belirlenmiştir. Belirlenen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları daha sonra, saf çözeltilerlerinin UV spektrumu alınarak doğrulanmıştır.



Şekil 4.7. t=0 anında marulun fenolik bileşik profili

Belirlenen fenolik bileşikler: 1. protocatechuik asit; 2. klorojenik asit; 3. kaffeik asit; 4. *p*-kumarik asit ; 5. ferulik asit; 6. floridzin

Askorbik asit, sistein, sitrik ve okzalik asitler varlığında depolama süresince fenollerin oksidasyonu gecikmektedir. Şeki 4.8.'de klorojenik asitin inhibitörler varlığında ve inhibitör olmaksızın miktarında meydana gelen değişim görülmektedir. Bu sonuçlar toplam fenol içeriği ile ilgili yapılan sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Altunkaya and Gökmen, 2008).



Şekil 4.8. İnhibitörler varlığında 24 saat süreyle klorojenik asit miktarında meydana gelen değişim (◇:kontrol, X: 0.5 % askorbik asit, Δ: 0.05 % sistein, ¥: 0.5 % sitrik asit, □: 0.5 % okzalik asit)

Marulda belirlenen her bir fenolik bileşiğin kaybı, birinci dereceden parçalanma hızı (k) ile ifade edilmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.9.'da özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Nourian et al., 2003 tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bitki hücresinde PPO ve fenoller farklı organellerde bulunmaktadır. Bitki dokusu hasara uğradığında, fenoller ve PPO birbirleriyle temas etmekte dolayısıyla fenoller de izomerize olmaktadır (Rigal et al., 2000). Dolayısıyla, enzimatik oksidasyonun sonucunda fenolik bileşik miktarında ciddi azalmalar görülmektedir.

Çizelge 4.9. Marulda belirlenen fenolik bileşiklerin birinci dereceden parçalanma hızları

Fenolik bileşik	Hız sabitleri, 1/dak.				
	Kontrol	Askorbik asit	Sistein	Sitrik asit	Okzalik asit
<i>Protokateşuik asit</i>	0.557	0.056	0.576	0.447	0.083
<i>Klorojenik asit</i>	0.333	0.036	0.667	0.434	0.055
<i>p-kumarik asit</i>	0.668	0.030	0.386	0.183	0.080
<i>Ferulik asit</i>	0.890	0.016	0.929	0.862	0.396
<i>Phloridzin</i>	0.985	0.027	0.113	0.167	0.068

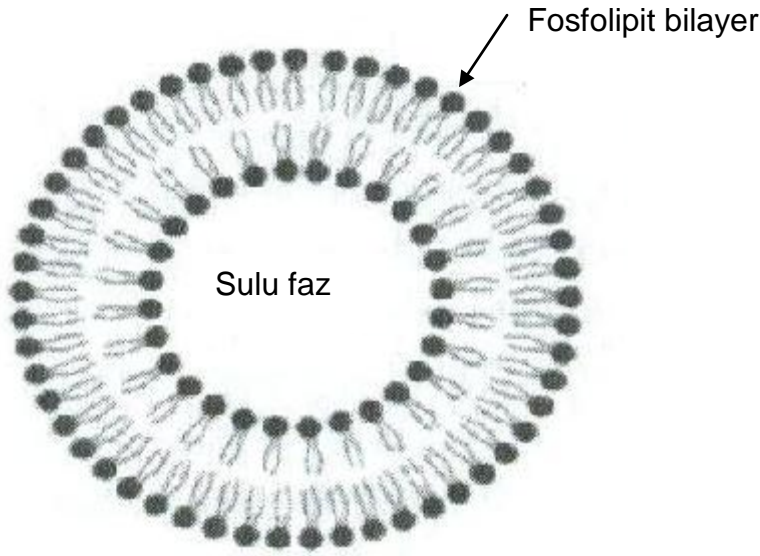
Her bir fenolik bileşimin enzimatik oksidasyon esnasındaki kaybı, birinci dereceden kinetik modele uygun parçalanma göstermektedir. Bozunma hızı değerleri her bir fenolik bileşik için bulunmuştur. Buna göre, sisteine varlığında elde edilen bozunma hızı, askorbik asit, sitrik ve okzalik avrlığında elde edilen değerlerden 10 kat daha fazladır. Yüksek *k* değeri daha hızlı bir bozunmaya işaret etmektedir. Okzalik ve askorbik asit, bu sonuçlara göre en etkin inhibitörler olarak görülmektedir. Ancak, askorbik, sitrik ve okzalik asitler enzimatik esmerleşmesinde ve fenolik kaybının önlenmesi bakımından önerilebilir.

Sistein varlığında elde edilen bozunma hızı, kontrol ile benzerlik göstermektedir. Sistein, enzimatik esmerleşmeyi önlemekte ancak fenol kaybına engel olamamaktadır. Besinsel kalite kaybının önlenmesi bakımından fenol kaybı da istenmeyen bir durumdur.

4.3. Lipozom Sistemde Marul Ekstraktı ile Fenolik Antioksidanlar Arasındaki Sinerjizm

Heterojen sistemlerde oksidasyon, su ve yağ fazı arasındaki arayüzde gerçekleşmektedir. Bu tür sistemlerdeki oksidatif stabilite, arayüzün kompozisyon ve yapısına önemli ölçüde bağlıdır (Schwarz et al., 2001). AAPH, peroksil radikallerinin sulu fazda membran dışında oluşumunu sağlarken AMVN lipit fazda ve mebran içinde oksidatif strese neden olabilmektedir (Tsuchiya et al., 2001).

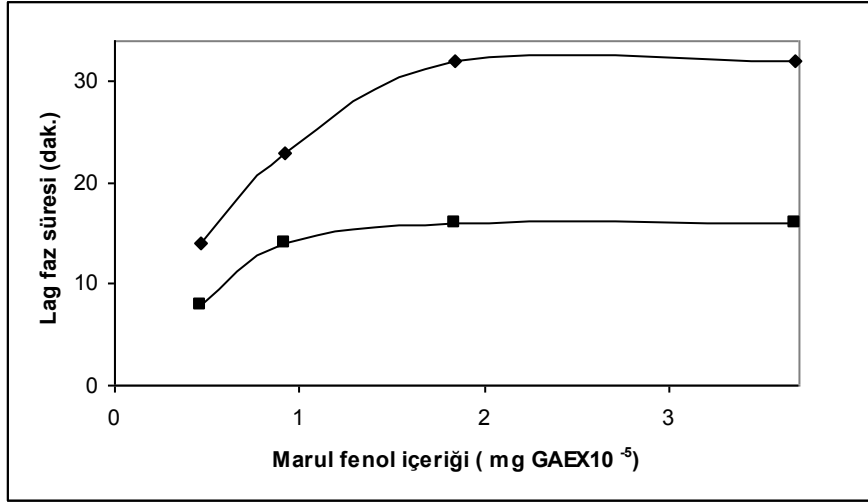
Suda çözünen marul ekstraktının farklı polaritedeki antioksidanlarla (kuersetin, α - tokoferol ve askorbik asit) etkileşimi, soya fosfoditil kolinden yapılan lipozomun lipit peroksdasyonunu inhibe etme kabiliyetleri araştırılmıştır. Oksidasyon, 234 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile konjuge dienlerin oluşumu üzerinden incelenmiştir. Konjuge dien oluşumu AAPH yada AMVN eklenmesiyle başlamaktadır. Lipozom biyolojik membranlar için bir modeldir ve su ve yağda çözünen antioksidanların aynı sistemde araştırılmasına olanak verdiği için seçilmiştir (Hassimotto, Genovesse & Lajolo, 2005).



Şekil 4.9. Lipozomun şematik gösterimi

4.3.1. Lipozom peroksidasyon sistemine marul ekstraktı konsantrasyonu ve depolama sıcaklığının etkisi

Farklı fenol içeriğine sahip marul ekstraktları lipozom sistemine ilave edilerek oksidasyon AAPH ve AMVN varlığında izlenmiştir (Şekil.4.9.). Lipozom sistemde 30 dakika süresince oluşan toplam radikal miktarı R_i (mol/L/s) = 1.36×10^{-6} [AAPH] (Niki, 1990) ve R_i (mol/L/s) = 3.88×10^{-6} [AMVN] (Shi et al., 1999) eşitlikleri kullanılarak hesaplandığında AAPH varlığında 1.8×10^{-6} mol/L ve AMVN varlığında 2.6×10^{-6} mol/L'dir. Bu bağlamda AMVN varlığında oluşan radikal miktarı, AAPH varlığında oluşan radikal miktarından 1.5 kat daha fazladır. Dolayısıyla AMVN varlığında oluşan lag faz, AAPH varlığında oluşan lag fazdan daha azdır.



Şekil 4.10. Farklı miktarlarda fenol içeren marul örneğinin pH 7.4 ve 37 °C de AAPH (◆)ve AMVN(■)öncüğünde soya fosfoditil kolin lipozomla gerçekleştirilen oksidasyonunda konjuge dienlerin spektrofotometrik olarak ölçümü ile elde edilen lag fazlar

Marul ekstraktının AAPH öncülüğünde oksidasyonu ile daha iyi bir antioksidan etkinin görülmesi polifenollerin su fazda veya arayüzde yer alması ile su fazdaki radikallerin lipitleri koruması şeklinde açıklanabilir. Lag faz, marul fenol içeriğine bağlı olarak artmakta ve 1.84×10^{-5} mg GAE/L düzeyinde doygunluğa (Şekil 4.3.).

Marul ekstraktının oksidasyona etkisi, hazırlandıktan hemen sonra ve 24 saat sonra oda ve buzdolabı sıcaklıklarında ve 80°C de 10 dakika ısıtma işlemi uygulandıktan sonra belirlenmiştir. Marul ekstraktının antioksidan etkisi, artan sıcaklık ve zamana bağlı olarak azalmaktadır. Isıl işlem uygulamış marul örneklerinde ise hemen hemen taze örnekle aynı lag fazı göstermiştir (Çizelge 4.3.). Depolama esnasında sıcaklığın gözlenen etkisi, düşük sıcaklıklarda solunum, etilen üretimi ve genellikle enzim aktivitesi gibi bitkideki metabolik faaliyetlerin azalması ile açıklanabilir (Ferrante and Maggiore, 2007) ki bu durumda marul ekstraktının antioksidan içeriğini etkilemektedir. Yamaguchi et al., (2003) , ısıl işlem görmüş ve görmemiş marul örneklerindeki toplam fenol içeriği ve radikal söndürme kapasitesini incelemişlerdir. Isıl işlem görmüş örneklerde bu değerler sabit kalırken, ısıl işlem uygulanmamış olanlarda ciddi düşüşler gözlemişlerdir. Bu bulgular yapılan çalışmada da gözlenmiştir ki PPO enziminin inaktivasyonuna bağlı olarak fenol içeriği ve radikal söndürme kapasitesinde azalma olmamıştır. Isıl işlemle inaktive olan PPO enzimlerinin substratları olarak

bilinen fenolik bileşiklerin kaybının önlenmesi bakımından ısı işlem önemli taşımaktadır. Fenolik içeriği ve radikal söndürme kapasitesindeki azalma PPO enzimlerinin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. PPO ve polifenoller bitki hücresinde farklı organellerde bulunmaktadır. Bitki dokusu herhangi bir hasar uğradığında bunlar reaksiyona girmekte ve fenol içeriği ile antioksidan aktiviteyi azaltmaktadırlar (Takenaka et al., 2006).

4.3.2. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının α -tokoferolle etkileşimi

AAPH ve AMVN varlığında, 1 mol % TOH için gözlenen lag fazlar; 90 ± 1 ve 42 ± 1 dakika iken 1.84×10^{-5} mg GAE fenol içeriğine sahip marul ekstraktı ile sırasıyla 132 ± 1 ve 68 ± 2 dakikadır. TOH ve marul ekstraktının kombinasyonunda oluşa lag faz, her bir bileşenin lag fazları toplamından daha uzundur. Bu durum sinerji olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (α -tokoferol:TOH, marul ekstraktı:ME)

örnek	Depolama koşulları		Lag faz süresi (dak.)			
	zaman	sıcaklık	AAPH		AMVN	
			<i>deneysel</i>	<i>hesaplanan</i>	<i>deneysel</i>	<i>hesaplanan</i>
Kontrol	0	-	3 ± 1	-	4 ± 1	-
ME	0	-	32 ± 1	-	16 ± 2	-
ME	24 s	4°C	14 ± 1	-	9 ± 2	-
ME	24 s	25°C	8 ± 2	-	5 ± 1	-
ME	10 dak.	80°C	31 ± 1	-	15 ± 1	-
TOH	0	-	90 ± 1	-	42 ± 1	-
TOH+ME	0	-	132 ± 1	122 ± 1	68 ± 2	58 ± 2
TOH+ME	24 s	4°C	108 ± 2	104 ± 1	58 ± 1	51 ± 2
TOH+ME	24 s	25°C	96 ± 1	98 ± 2	45 ± 2	47 ± 1

TOH+ME	10	80 °C	141±1	121±1	64±2	57±1
	dak.					

Antioksidanların oksidasyona karşı sağladıkları göreceli koruma etkisi sadece yapısal özelliklere değil aynı zamanda gıda sistemlerinde sinerjiye olanak sağlayan antioksidanların bulunduğu yere de bağlı olmaktadır. Heterojen sistemlerde TOH ile polifenoller arasındaki sinerjistik etki, farklı fazlarda antioksidanların bulunduğu yer ve farklı çözünürlüklerinden kaynaklanmaktadır (Zhou et al., 2005). TOH, arayüze yakın olan lipid fazda yer almakta ve sulu fazdaki polifenollerden kolayca etkilenebilmektedir. Böylece sinerji gerçekleşmektedir (Murakami et al., 2003).

TOH ile farklı koşullarda depolanmış marul ekstraktı bileşiminde, gözlenen lag fazlar, oda sıcaklığında depolanmış marul örneği için buzdolabı koşullarında depolanmış ve 80 °C de 10 dakika ısıtılmış marul örneğinden daha kısadır. 24 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilen marul örneği ile TOH arasında sinerjistik etki görülmemiştir. TOH ile 80 °C de 10 dakika süreyle ısıtılmış marul örneği arasında en yüksek sinerji gözlenmiştir. Bu durum bu sıcaklıkta PPO enzimlerinin inaktivasyonu ile açıklanabilir (Yamaguchi et al., 2003). Soğuk koşullar, fenol kaybını önleyebilmekte dolayısıyla TOH ile buzdolabı koşullarında saklanan marul örneği arasında da sinerji gözlenebilmektedir (Altunkaya and Gökmen, 2007).

4.3.3. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının kuersetin ile etkileşimi

Lipozom sistemde kuersetin, AAPH ve AMVN öncülüğünde gerçekleştirilen oksidasyonunda 171±1 ve 117±1 dakika lag faz gösterirken 1.84×10^{-5} mg GAE enol içeriğine sahip marul ekstraktı ile 212±1 ve 143±1 dakika lag faz bulunmuştur (Çizelge 4.11.). Kuersetin ve marul ekstraktı kombinasyonunda elde edilen lag fazlar, her bir bileşenin lag fazları toplamından fazla olduğundan sinerji göstermişlerdir.

Çizelge 4.11. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (kuersetin:QC, marul ekstraktı:ME)

Sample	Depolama Koşulları		Lag faz süresi (dakika.)			
	zaman	sıcaklık.	AAPH		AMVN	
			<i>deneysel</i>	<i>hesaplanan</i>	<i>deneysel</i>	<i>hesaplanan</i>
QC	0	-	171±1	-	117±1	-
QC+ME	0	-	212±1	203±1	143±1	133±1
QC+ME	24 s.	4°C	198±1	185±1	134±2	126±2
QC+ME	24 s.	25°C	184±1	178±2	121±3	123±1.4
QC+ME	10 dak.	80°C	224±2	202±1	147±3	132±1

Marul ekstraktının 24 saat oda ve buzdolabı sıcaklığında bekletildikten ve 80 °C de 10 dakika süreyle ısıtılmasından sonra kuersetin ile kombinasyonu da incelenmiştir. 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra marul ekstraktı ile kuersetin kombinasyonunda herhangi bir sinerji gözlenmemiştir. Marul pek çok fenolik bileşik ve PPO içermektedir. Bunlar pişirme veya bazı işlemler esnasında az veya çok reaksiyona girmektedirler. Sıcaklığa bağlı olarak marul ekstraktının fenol içeriğinin değişmesi, kuersetin-marul ekstraktı arasındaki sinerji etki derecesini de değiştirmektedir (Takenaka et al., 2006).

4.3.4. Lipozom peroksidasyon sistemde marul ekstraktının askorbik asit ile etkileşimi

% 1 mol askorbik asitin AAPH ve AMVN varlığında lag fazı 72±1 ve 34±1 dakika iken of 1.84×10^{-5} mg GAE fenol içeriğine sahip marul ekstraktı ile 74±1 ve 45±1 dakika olarak bulunmuştur. Askorbik asitin marul ekstraktı ile olan kombinasyonunda elde edilen lag faz, sadece askorbik asitle elde edilen lag fazla hemen hemen aynıdır (Çizelge4.12.).

Çizelge 4.12. pH 7.4 ve 37 °C de AAPH veya AMVN varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin spektrofotomtrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (askorbik asit:AA, marul ekstraktı:ME)

örnek	Depolama koşulları		Lag faz süresi (dak.)			
	zaman	sıcaklık	AAPH		AMVN	
			<i>deneysel</i>	<i>hsaplanan</i>	<i>deneysel</i>	<i>hesaplanan</i>
AA	0	-	72±1	-	34±1	-
AA+ME	0	-	104±1	74±1	45±1	50±2
AA+ME	24 s	4°C	71±1	86±1	38±2	43±2
AA+ME	24 s	25°C	72±1	80±2	37±1	39±1
AA+ME	10 dak.	80°C	82±3	103±1	41±2	49±1

Farklı sıcaklıkta bekletilen marul ekstraktı ile askorbik asit arasında sinerjistik etki görülmemiştir. Askorbik asit, antioksidan etkisinin yanında, marulda bulunan PPO enzim ürünlerinin de indirgenmesinde rol almaktadır. (Dinçer et al., 2002).

Lipozom sistemde askorbik asit, AAPH tarafından oluşturulan radikallerle ve PPO ürünleri ile reaksiyona girebilmektedir. Aynı zamanda düşük redoks potansiyelinden dolayı polifenollerin tekrar rejenerasyonuna da neden olabilmektedir. Rejenerasyon yada sinerji oluşabilmesi için, askorbik asit ve polifenoller diğer reaksiyonlarla etkin bir şekilde yarışmalıdırlar. Sinerjinin olmaması, askorbik asit ile enzimin ürünleri arasındaki reaksiyonun daha hızlı olmasından kaynaklanabildiği gibi askorbik asit konsantasyonun düşük olmasından da olabilir

Marul ekstraktının α -tocoferol, kuersetin and askorbik asit ile kombinasyonunda oksidasyon derecesi , sulu fazda lipit fazdan daha fazladır. Kuersetin ve TOH gibi antioksidanlar arayüze yakın bir yerde yer aldıkları için kuersetin ve TOH ile sinerji oluşturabilmektedirler. Buna karşın, AA gibi suda çözünen antioksidanlar bunu

yapamazlar. Marul lipit oksidasyonuna karşı koruyucu doğal antioksidanlar bakımından oldukça zengindir. Marul ekstraktındaki polifenoller, oksidasyona karşı dirençlidirler. Marul ekstraktındaki fenol içeriği arttıkça oksidasyona karşı direnç artmış ve 1.84×10^{-5} mg GAE/L konsantrasyonunda doygunluğa ulaşmıştır. Marul ekstraktının 24 saat süreyle 4°C ve 25°C de bekletildikten sonra antioksidanlarla – askorbik asit hariç-oluşturan kombinasyonlarında, antioksidatif etkinin depolama süre ve sıcaklığının artışıyla azaldığı gözlenmiştir. 80°C de 10 dakika süreyle ısıtıldıktan sonraki marul ekstraktının antioksidan aktivitesinde ise belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Isıtılmış marul ekstraktının antioksidanlarla kombinasyonu ise en yüksek sinerjiyi göstermiştir.

4.4. Marulun pH'ya Bağlı Olarak Antioksidan Aktivitesindeki Değişim ve Fenolik Antioksidanlarla Sinerjismi

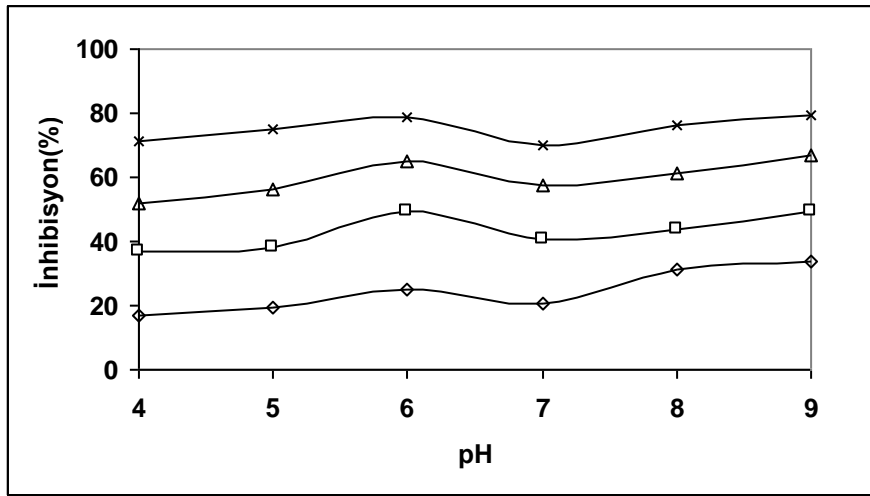
Marul ekstraktının kuersetin, ÜÇE ve YÇE ile radikal sönmleme kapasitesi farklı pH değerlerinde araştırılmıştır. Lipit oksidasyonu ve radikal sönmleme kapasitesini temel alan metotlar bu bölümde kullanılmıştır.

Heterojen sistemlerde oksidasyon, su ve yağ fazı arasındaki arayüzde gerçekleşmektedir. Bu tür sistemlerdeki oksidatif stabilite, arayüzün kompozisyon ve yapısına önemli ölçüde bağlıdır (Schwarz et al., 2001). AAPH, peroksil radikallerinin sulu fazda membran dışında oluşumunu sağlarken AMVN lipit fazda ve membran içinde oksidatif strese neden olabilmektedir. (Tsuchiya et al., 2001).

ESR, serbest radikal konsantrasyonunu direkt olarak ölçen bir metottur. Fremy's salt radikalini sönmlemek için gerekli antioksidan kapasite, ESR sinyallerinin ortamda herhangi bir antioksidan yokken ölçülen sinyale göre azalmasına bağlı olarak belirlenir. Fremy's salt, bazı ürünlerde fenol ve flavonoid gruplarının miktarı ile orantılı sinyal veren, yarı stabil bir radikaldir. Bu radikal aynı zamanda çok iyi bir hidrojen donördür (Gardner et al.,1999).

4.4.1. Marul ekstraktının antioksidan aktivitesine pH'nın etkisi

Marul ekstraktının a) soya fosfoditil kolinden yapılan lipozomun lipit peroksidasyonunu suda çözünen AAPH radikali varlığında b) Fremy's salt radikalini sönmleme kabiliyeti farklı pH değerlerinde araştırılmıştır. Lipit oksidasyonu, 234 nm de UV-Vis spektrofotometre ile konjuge dienlerin oluşumu üzerinden incelenmiştir. Fremy's salt radikalini sönmleme kapasitesi ise ESR' da izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı pH'larda taze marulun inhibisyonu(%) (◇:1.15 mg GAE, □: 2.3 mg GAE, △: 3.45 mg GAE. X: 4.6 mg GAE)

Marul ekstraktının antioksidan kapasitesi ortam pH'sının artışına bağlı olarak artış göstermektedir. Sadece pH 7'de çok az bir azalma belirlenmiştir. Marul gibi pek çok bitkinin PPO aktivitesi için optimum pH değeri nötral yada nötrale yakındır. pH, enzimatik aktivitenin karakterize edilmesinde kullanılan en önemli parametrelerden biridir. Amino asit zincirleri yada substratların iyonizasyonunu değiştirebilmektedir. pH 7'de antioksidan aktivitenin azalmasının nedenlerinden biri PPO aktivitesinin bu noktada fenol parçalanmasını maksimize etmesi olabilir (Doğan and Salman, 2006).

Marul ve benzeri bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesi fenol içeriklerinden kaynaklanmaktadır. *Lactuca sativa*, *Cicorium intybus*, *Plantago coronopus*, *Eruca sativa* ve *Diplotaxis tenuifolia* gibi marulun farklı genotiplerinin olduğu bildirilmiştir.

Kuersetin, kaempferol, luteolin, apigenin ve krisoriol gibi fenolik bileşikler de incelenen genotiplerde tespit edilmiştir (Heimler et al., 2007). Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi içerdikleri OH grupları ve hidrojen radikali verme kabiliyetlerine bağlı olabilmektedir (Lemanska et al., 2001).

Ortamın pH değeri, fenolik bileşiklerin radikal sönmeme kapasitesini etkileyebilmektedir (Borkowski et al., 2005). Lipit peroksidasyonu ve ESR sonuçlarında pH'ya bağlı olarak antioksidan kapasite de görülen artış en basit anlamda yapıki OH grubunun, proton vermesi (deprotonation) sonucunda gerçekleşmektedir. Proton veren formların antioksidan aktivitesi, hidrojen atomu ve/veya elektron vermelerinden kaynaklanmaktadır.

Muzolf et al.,(2008) kateşindeki kimyasal bağların ayrışma enerjisini (BDE) farklı pH değerlerinde (TEAC metodu ile) araştırmışlardır. Kateşinin proton vermesine bağlı olarak BDE değerlerinde belirgin bir azalma gözlemlemişlerdir. Buna göre, BDE değerleri temel alındığında, sadece hidrojen atomu verme kabiliyetine bağlı olarak antioksidan aktivitenin açıklanmasında yeterli olamamaktadır. Buna ek olarak, antioksidan aktiviteyi yansıtan temel parametrenin iyonizasyon potansiyeli (IP) olduğunu belirlemişlerdir. IP değeri, kateşinin proton veren formlarında nötral formlarına göre daha düşüktür. pH'ya bağlı olarak radikal sönmeme kapasitesindeki artış bu şekilde açıklanmaktadır.

Pek çok fenolik asit ve esterin antioksidan aktivitesi organik çözelti ve fosfotidil kolin lipozom sistemde AAPH radikali varlığında incelenmiştir. Fosfotidil kolin lipozom sistemde, antioksidan aktivite kesin olarak ortam pH'sına bağlı olmaktadır. Asit ortamda (pH 4) tüm fenol ve esterleri, lipit peroksidasyonunu çok zayıf bir şekilde inhibe ederken, pH artışına bağlı olarak antioksidan aktivitenin arttığını gözlemlemişlerdir (Amorati et al., 2006).

Yüksek pH değerlerinde görülen yüksek antioksidan aktivite fenolat iyonunun (I^{-2}) oluşumundan kaynaklanmaktadır. (I^{-2}) 'nun peroksil radikalleri ile reaksiyonu, düşük pH değerlerindeki fenol türlerine göre daha hızlı olmaktadır. Örneğin kateşol pH 7.2 de, pH 8 değerine göre daha az (I^{-2}) içerdiği için daha az reaktiftir. Bazik

ortamda yan zincirlerden daha bağımsız hale gelerek daha reaktif olmaktadır. Bu sonuçlar I^{-2} anyonunun, daha düşük pH lardaki türlerine göre daha aktif olduğunu göstermektedir (Amorati et al., 2006). Benzer şekilde Mukai et al.,(2008) tarafından da kateşinin aroksil radikalleri ile reaksiyonu farklı pH değerlerinde incelenmiştir. İyonize türlerdeki hidroksil gruplarının daha reaktif olmasının O^{-} grubunun daha yüksek oranda elektron vermesi ile OH gruplarının daha aktif hale gelmesi şeklinde açıklamışlardır.

Bazik ortamda gözlemlenen daha yüksek antioksidan aktivite, I^{-2} anyonundan peroksil radikallerine daha hızlı bir elektron transferi sonucunda gerçekleşmektedir (Amorati et al., 2006).

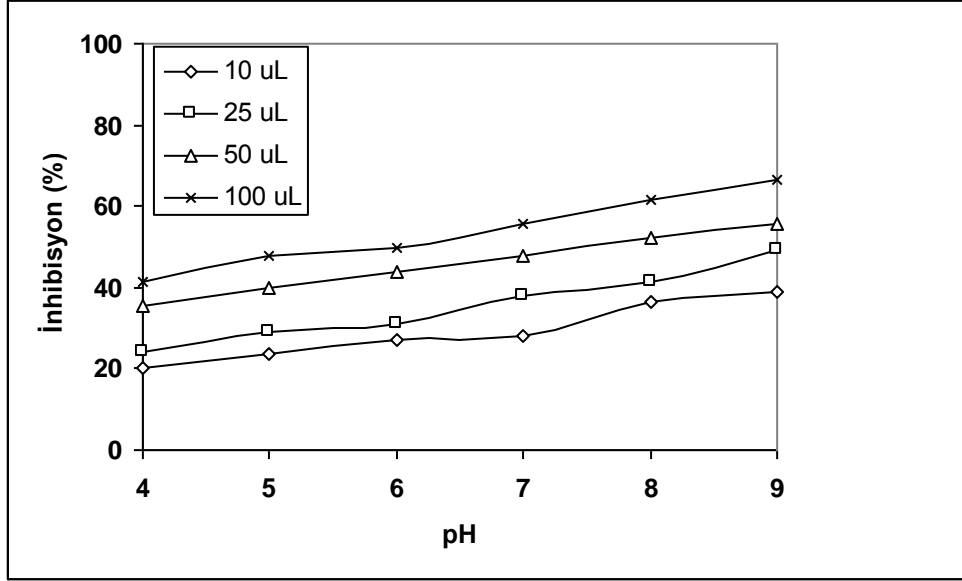
Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından misel peroksidasyonu (Roginsky and Barsukova, 2001), flow kolon elektroliz (Hotta, Sakamoto, Nagano, Osaki and Tsujino,2001), TEAC (Tyrakowska and Soffers,1999) veya DPPH (Nanjo et al., 1996) yöntemlerinde fenollerin antioksidan aktivitesi çalışılarak da gösterilmiştir. Misel peroksidasyonu ve flow kolon elektroliz çalışılarak elde edilen sonuçlarda antioksidan aktivitenin artışı, fenollerin polimerizasyon reaksiyonlarında yeralmalarından dolayı alkali çözeltilerde stabilizasyonu ile açıklanmıştır (Roginsky and Barsukova, 2001; Hotta et al.,2001). Fenolik antioksidanların polimerizasyon reaksiyonları ile polimerize ürünlerde okside olabilen OH grupları meydana gelebilmektedir. Yüksek antioksidan aktivite bu OH gruplarının oluşumundan kaynaklanabilmektedir.

4.4.2. Marul ve kuersetin etkileşimine pH' nın etkisi

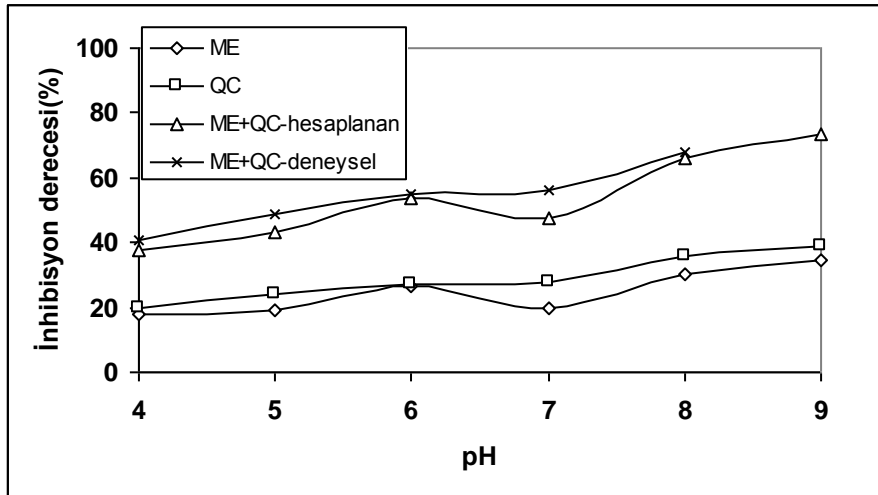
Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), pek çok meyve ve sebze de bulunan bir bioflavonoiddir (Bors et al., 1990).

pH'daki artışa bağlı olarak kuersetin ve marul ekstraktı-kuersetin kombinasyonunun radikal sönümlenme kapasitesi yukarıda bahsedilen her iki metodla incelenmiştir. Kuersetin ve marul ekstraktı-kuersetin kombinasyonunun sönümlenme kabiliyetinin pH artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.). Marul ekstraktı-kuersetin kombinasyonundan elde edilen lag fazın

pH artışıyla birlikte, her bir bileşenin lag fazlarının toplamından daha fazla olduğu görülmüştür ki bu durum sinerjizm olarak nitelendirilmektedir (hesaplanan lag faz, Çizelge 4.13.). ESR metodu kullanılarak hesaplanan inhibisyon derecesinin de marul ve kuersetin inhibisyon dereceleri toplamından daha fazla olduğu saptanmıştır. Kuersetin ve marul ekstraktı içeren tüm pH değerlerinde sinerjizm görülmüştür. En yüksek oranda sinerjizm ise pH 9 değerinde gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Kuersetinin farklı pH değerlerinde inhibisyonu



Şekil 4.13. Kuersetin-marul ekstraktının farklı pH değerlerinde inhibisyonu

Çizelge 4.13. 37 °C'de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (Kuersetin: 1 mol % QC, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

pH	ME	QC	Deneysel	Hesaplanan
4	14±1	105.5±2	122.5±2	119.5±2
5	19±1	121.5±1	156±1	140.5±1
6	27±1	130±1	180±1	157±1
7	23.5±1	153±3	202.5±1	176.5±3
8	31.5±2	172.5±2	231±2	204±2
9	37.5±1	202.5±1	275±2	240±1

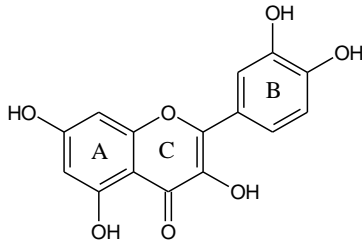
Kuersetin-marul ekstraktı arasındaki sinerjizm, lipozom interfazında kuersetinin yerleşim yerinden kaynaklanmaktadır (Beer et al., ;2005; Becker et al., 2008). Bu bulgu, diğer çalışmalarda da görülmüştür. Spin etiketleme (spin labelling) tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda, 1,2- diasil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) akışkanlığına kuersetinin etkisi araştırılmıştır. Kuersetinin membran içindeki yerleşimin pH ve konsantrasyona bağlı olduğu gösterilmiştir (Movileanu et al., 2000). Kuersetin, asit ortamlarda lipit tabakanın hidrofobik merkezinde yer almaktadır. Bu durumda, kuersetin tam olarak ayrışmamakta ve yağda çözünür formda bulunmaktadır. Nötral yada alkali ortamlarda ise kuersetinin proton vermesi gerçekleşmekte ve flavonoid hidrofilik bölüme geçmektedir. Negatif yüklü kuersetin molekülü, polar gruplar arasında sandviç pozisyonunda bulunmaktadır. Ollila et al.(2002)'da membranın su fazındaki pH artışına bağlı olarak hidrofilik karakterinin arttığını ve dolayısıyla hidroksil gruplarının proton vermesinin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda daha çok hidroksil grubu içeren flavonoidin DPPC membranı arafazı ile daha çok etkileşime girdiğini bu sayede hidrofilik flavonoidlerin daha çok bağlandığını belirtmektedirler (Ollila et al.,2002; Pawlikoeska-Pawleka et.al., 2007).

Lemanska et al.(2001), pH değerindeki artışa bağlı olarak hidroksiflavanoidlerin TEAC değerlerinde görülen artış flavonoidlerin proton vermesine bağlı olarak elektron verme kabiliyetinin artması şeklinde açıklamışlardır. Hesaplanan IP değerleri ile de bu açıklamayı desteklemektedirler. Proton verme genellikle BDE ve IP değerlerindeki azalmaya bağlı olarak hidroksiflavanoidlerin antioksidan aktivitesini arttırmaktadır.

Hidroksiflavanoidlerin antioksidan aktivitesine pH'nın etkisi, kullanılan metoda bağlı olmayıp proton vermesine bağlı olmakta dolayısıyla flavonoidlerin radikal

sönümlenme kapasiteleri artmaktadır. Çünkü deprotonasyon, hidroksi flavonoidlerin antioksidan aktivitesini ve IP ve BDE değerlerini de azaltmaktadır. Elektron verme kabiliyetinin hidroksiflavonoidlerin proton vermesinden sonra antioksidan aktivitelerinin artmasındaki en baskın mekanizma olduğu sonucuna varılabilir (Tyrałowaska et al., 1999; Peyrad-Maillard et al., 2003).

Radikal sönümlenme kapasitesindeki artışın bir diğer nedeni de, hidroksil gruplarının pKa değerlerini etkileyen OH substituentlerinin sayısı ve pozisyonlarıdır. pKa değerleri, fizyolojik pH'da deprotonasyona duyarlı C4' ve C7' deki hidroksil gruplarını göstermektedir. Bu nedenle, C4' ve C7'deki hidroksil gruplarının pKa değerleri pH'ya bağlı radikal sönümlenme aktivitesinin ölçümlerinde dikkate alınması gereken faktörlerden biri olabilmektedir (Borkowski et al., 2005). Kuersetinin radikal sönümlenme kapasitesinde yapısındaki 3 farklı grup etkili olmaktadır. Bunlar: B halkasındaki ortodihidroksi grup, C halkasındaki okso fonksiyonu ve C halkasındaki 3-hidroksil grubudur. Dolayısıyla, B halkasındaki hidroksil substituentlerinin sayısı ve pozisyonu pKa değerlerini etkilemektedir (Bors et al., 1990).



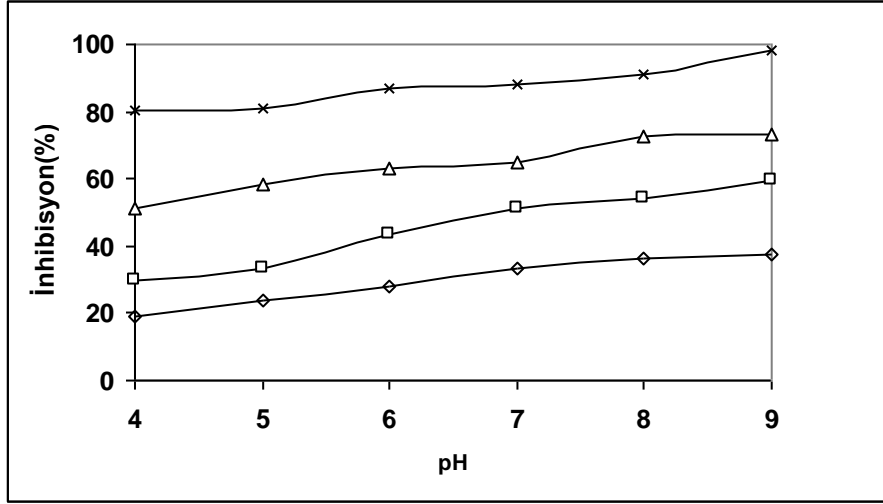
Şekil 4.14. Kuersetinin kimyasal yapısı

4.4.3. Marul ve yeşil çay ekstraktı etkileşimine pH' nın etkisi

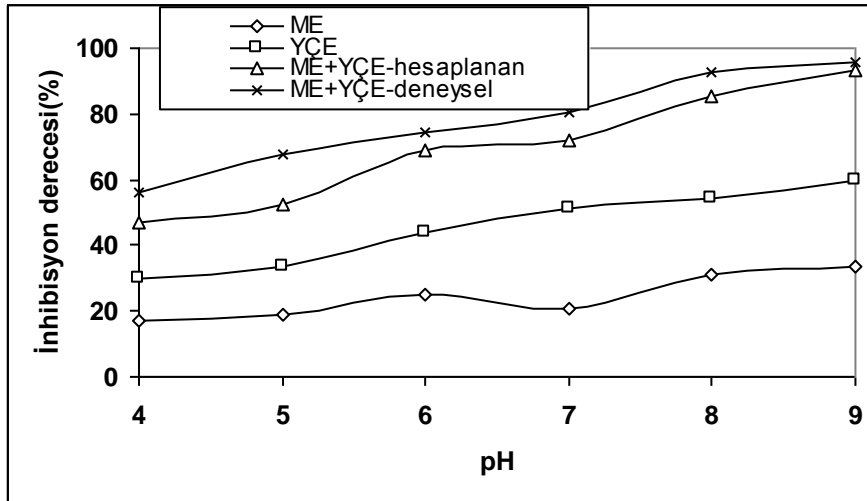
YÇE ve marul ekstraktı-YÇE kombinasyonunun radikal sönümlenme kapasitesine pH'nın etkisi ESR sinyallerinin Fremy's salt radikali ile indirgenmesi ve lipozom metotları kullanılarak araştırılmıştır.

YÇE tek başına yada marul ekstraktı-YÇE kombinasyonunun antioksidan aktivitesinin pH arttıkça artmaktadır (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16.). Bununla beraber,

YÇE'nin marul ekstraktı ile kombinasyonu, her bir bileşenin tek başına oluşturduğu lag fazlar toplamına hemen hemen eşit olduğu gösterilmiştir (hesaplanan lag faz, Çizelge 4.14). YÇE ve marul ekstraktı arasında çok düşük düzeyde sinerjizm gözlenmiştir. YÇE-marul ekstraktı kombinasyonu ESR spektroskopisi ile izlendiğinde de inhibisyondaki azalma benzer şekilde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.15. Farklı ph değerlerinde yeşil çay ekstraktının inhibisyonu (◇:0.187 mg GAE, □: 0.6545 mg GAE, △: 0.935 mg GAE. X: 1.87 mg GAE)



Şekil 4.16. Marul ekstraktı-yeşil çay ekstraktının farklı pH'larda inhibisyonu

Çizelge 4.14. 37 °C'de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (GTE: 9.35×10^{-4} mg GAE/L GTE, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

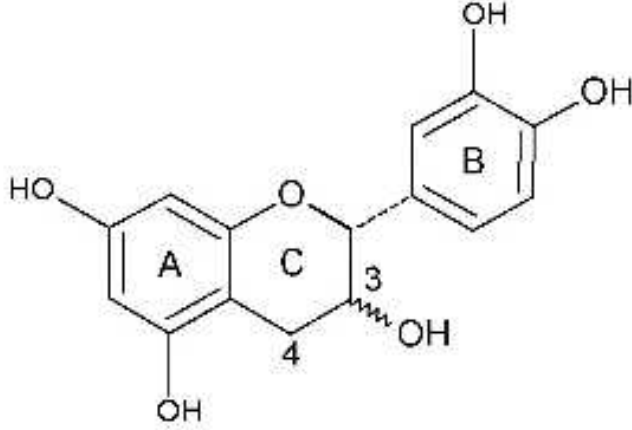
pH	GTE	Deneysel	Hesaplanan
----	-----	----------	------------

4	31±2	51±2	45±2
5	39±2	67±2	58±2
6	48±1	89±2	75±1
7	61±2	99±2	84.5±2
8	72±2	118±1	103.5±2
9	79±1	130±1	116.5±1

Elde edilen bulgular, heterojen sistemlerde bitkisel kaynaklı fenol çiftleri ile gözlenen küçük sinerjistik etkilerle ve pirogallol ve galloil grup içeren kateşinlerde TEAC metodu kullanılarak elde edilen toplama etki (additive effect) sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Muzolf et al., 2008; Peytar-Maillard et al., 2003). Linoleik asit peroksidasyonu esnasında sulu dispers sistemde fenol çiftleri arasında oluşan sinerjistik etki, kısmen de olsa, rejenerasyon mekanizması, molekülün kimyasal yapısı ve sitabil aramolekül komplekslerinin oluşum ile açıklanabilmektedir. Moleküllerin polaritesi, antioksidanların lipitlerle peroksidasyon hızı, mikro çevrenin etkisi, oksidasyon esnasında etkin antioksidan konsantrasyonu gibi nedenler de bu sinerjistik etkinin açıklanması için sayılabilir (Peyrad-Maillard et al., 2003). pH 3.5 in üzerinde YÇE'nin pH ya bağlı olarak TEAC profili incelendiğinde, C3 pozisyonunda flavon-3-ol'e bağlanan galloil grubunun radikal sönümlene kapasitesini artırıcı etki yaptığı sonucuna varılmıştır. TEAC değerlerinde pH'ya bağlı olarak meydana gelen artış, OH grubundaki proton verme kabiliyeti ile kısmen de olsa açıklanabilmektedir. Kolay ayrışabilen OH grubunun proton vermesi ile kateşinler daha iyi bir antioksidan haline gelmektedirler. Her bir kateşin molekülü bağımsız bir radikal sönümlene grubuna sahip olduğundan toplama (additive) bir sönümlene etkisi ile sonuçlanmaktadır (Muzolf et al., 2008).

Çay kateşinleri, flavonoid grubuna ait olup taze çay yapraklarının en temel bileşeni ve yeşil çayın çözünen kısmını oluşturmaktadırlar. Yeşil çayda bulunan kateşinler; (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epikatelin gallat ve (-)-epigallokateşingallat olarak sıralanabilir. Flavonoid grubunun bir üyesi olarak, kateşinler(flavan-3-ol) difenilpropan(C₆C₃C₆) iskeleti içerirler ancak 4-okso fonksiyonuna sahip değildir ve doymuş heterosiklik halkaları bulunmamaktadır (şekil 4..). Bu yapısal özellikler A ve B halkaları arasında elektron delokalizasyonunu da engellemekte dolayısıyla elektron verme esnasında oluşan fenonil radikallerinin de sitabilizasyonunu

sağlamaktadır. Bu lokalizasyon aynı zamanda flavonoidlerin antioksidan aktivitesini arttıran bir faktör olarak da incelenmektedir (Miller and Rice-evans,1996; Tsuchiya, 2001). Çay kateşinleri hidrojen atomu vererek, serbest radikalleri sönmümlendirerek, oksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek ve metallerle kelat oluşturarak antioksidan aktivite göstermektedirler (Gramza et al.,2006).



Şekil 4.17. Kateşinin kimyasal yapısı

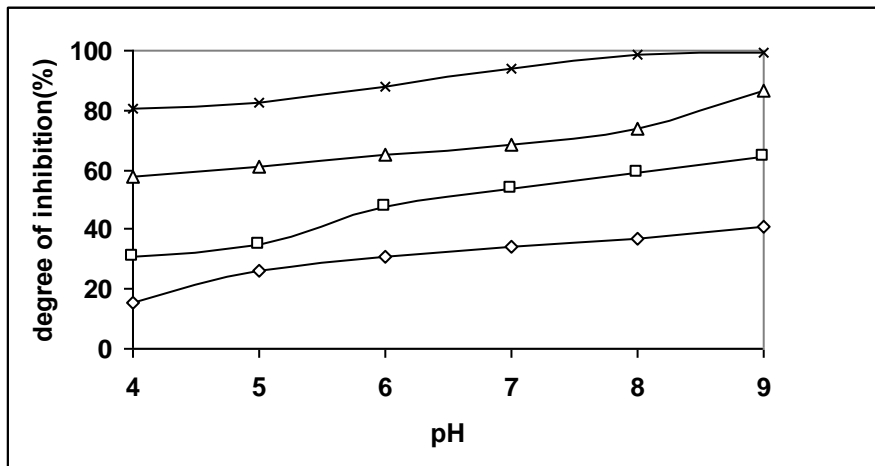
Çay kateşinlerinin ve epimerize, asile ve glikosile türevlerinin DPPH radikali üzerine etkileri ESR spektroskopisi ile araştırılmıştır. Her bir kateşinin sönmümlene kabiliyetinin pH arttıkça arttığı belirlenmiştir. Farklı pH'larda kateşinle DPPH radikali arasındaki reaktivitenin, B halkasındaki orto-trihidroksil grubu ve flavan-3-ol iskeletinin 3 pozisyonunda galloil grubundan kaynaklandığı düşünölmektedir . Trihidroksil grup ve galloil grubunun önemi süperoksit anyonlarının ve ABTS (2,2-azanobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu) radikalinin sönmümlenmesinde de görölmüştür (Salahet al.,1995).

Çay kateşinlerinin sönmümlene etkisi, kimyasal yapıya bağlıdır. Epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallakateşin gallat çok geniş pH aralıklarında etkin radikal sönmümlene kapasitesine sahipken kateşin ve epikateşinin etkisi nötral ve alkali pH larda sınırlı kalmaktadır. Bu kateşinler arasındaki reaktivite farkı, bileşiklerin redoks potansiyeli ile açıklanabilmektedir (Jovaniviç et al., 1994; Hasanaki et al.,1994). YÇE'ındaki antioksidan aktivitenin % 70 den fazlası da yine epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallakateşin gallattan gelmektedir (Salah et al.,1995).

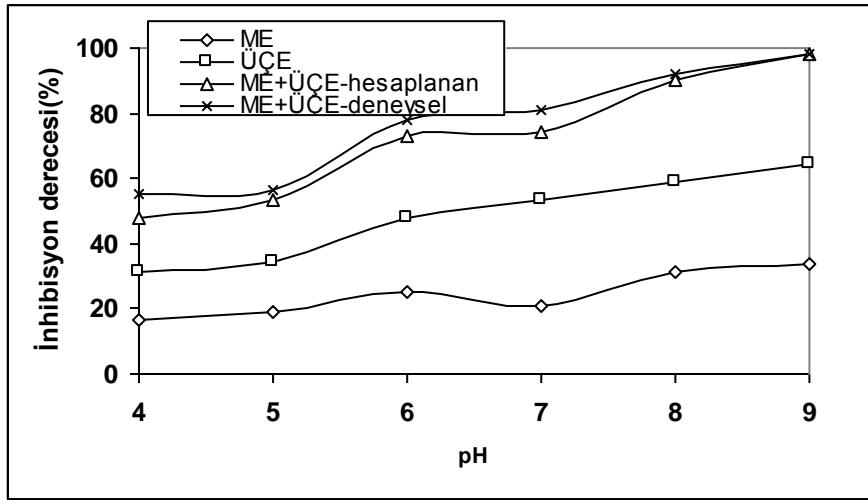
Bu nedenle, polarite, iyonizasyon durumu, sterik engelleme ve enzim inhibisyonu gibi antioksidan özelliklerin radikal sönümlenme üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Hasanaki et al.,1994).

4.4.4. Marul ve üzüm çekirdeği ekstraktı etkileşimine pH'nın etkisi

ÜÇE ve ÜÇE-ME kombinasyonunun radikal sönümlenme kapasitesine pH'nın etkisi AAPH radikali kullanılarak lipid peroksidasyonu ve Fremy's salt radikalının ESR spektroskopisi ile indirgenmesi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. ÜÇE ve ÜÇE-marul ekstraktı kombinasyonunun radikal sönümlenme kapasitesinin pH arttıkça arttığı bulunmuştur (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.). ÜÇE-marul ekstraktı kombinasyonuna ait lag faz, her bir bileşenin lag fazları toplamından fazladır ki bu durum sinerjizm olarak tanımlanmaktadır. Sinerjistik etki pH artışıyla birlikte artmaktadır (hesaplanan lag faz, Çizelge 4.15.). İnhibisyon derecesi de ÜÇE ve marul ekstraktı değerlerinin toplamından fazla bulunmuştur. ÜÇE ve marul ekstraktı içeren tüm pH değerlerinde sinerjistik etki gözlenmiştir. En yüksek sinerjistik etki pH 9'da görülmüştür.



Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde üzüm çekirdeği ekstraktının inhibisyonu (◇:0.321 mg GAE, □: 0.642 mg GAE, △: 1.285 mg GAE. X: 2.57 mg GAE)



Şekil 4.20. ÜÇE-marul ekstraktının farklı pH'larda inhibisyonu

Çizelge 4.15. 37 °C'de AAPH varlığında fosfoditil kolin lipozom ile oluşan konjuge dienlerin farklı pH değerlerinde spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen lag fazlar (ÜÇ: 9.35×10^{-4} mg GAE/L ÜÇE, marul ekstraktı: 1.84×10^{-5} mg GAE/L ME)

pH	ÜÇE	Deneysel	Hesaplanan
4	58±2	83±2	72±2
5	69±1	98±1	88±1
6	85±2	135±3	112±2
7	140±1	176±1	163.5±1
8	148±2	193±3	179.5±2
9	162±3	223±2	199.5±3

Üzüm çekirdeği ekstraktı özellikle oligomerik proantosiyandinler (OPCs) denilen antioksidan maddeleri ve çeşitli polifenollerini konsantre halde içermektedir (Nawaz et al., 2006; Mielnik et al., 2006; Guendez et al., 2005; Amico et al., 2004; Cao and Ito, 2003; Yamakoshi et al., 2002; Jayaprakasha et al., 2001; Bagchi et al., 2000; Shrikhande, 2000; Bonilla et al., 1999; Lu and Foo, 1999; Foo et al., 1998). Üzüm çekirdeği ekstraktının antioksidan kapasitesi içerdiği flavanoller ve proantosiyandinlerden (kondense taninler) kaynaklanmaktadır (Bozan et al., 2008). Bilimsel çevreler OPCs'in C, E vitaminleri ve beta-karotenden daha güçlü antioksidanlar olduğunu kabul etmektedir. OPC'leri de içeren üzüm çekirdeği ekstraktının kalp-damar, beyin, deri ve göz sağlığını artırdığı ve antibakteriyel, anti-viral ve ateş düşürücü etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Shaker, 2006; Sreemantula et al., 2005; Amico et al., 2004; Negro et al., 2003; Bonilla et al., 1999; Palma and Taylor, 1999).

Üzüm çekirdekleri kateşin, epikateşin ve epikateşin-3O-gallat gibi monomerler ile dimer, trimer ve tetramer prosiyanidinler açısından kabuğa göre daha zengindir. Kabuk kateşinleri ve gallokateşinleri içerir, oysaki çekirdek esas olarak kateşinleri içermektedir (Mulinacci et al., 2008; Cerpa-Calderon and Kennedy, 2008; Bañón et al., 2007; Shrikhande, 2000).

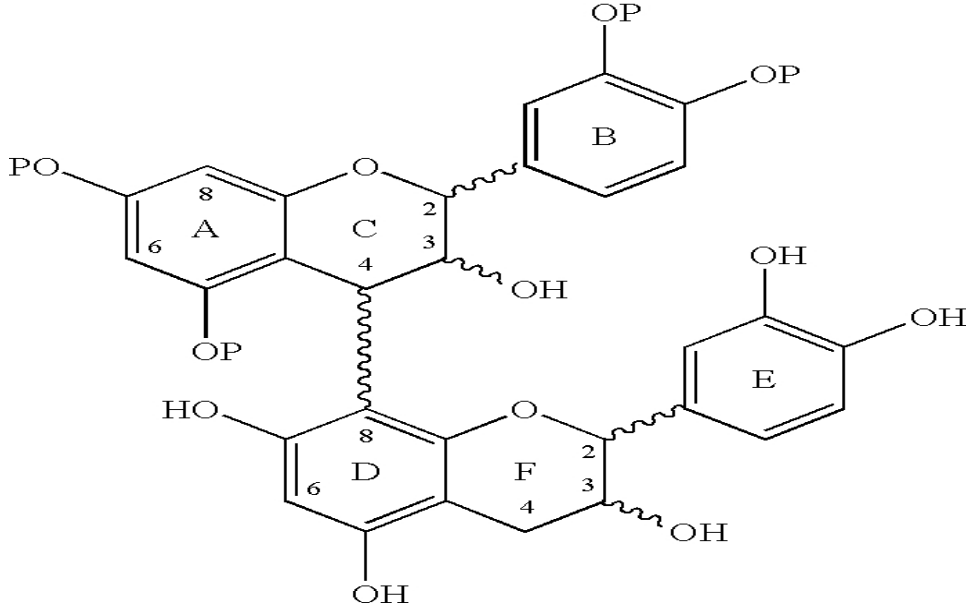
Hu et al. (2004) % 0.2 peynir altı suyu protein izolatu içeren su-yağ emülsiyonunda pH 3.0-7.0 aralığında proantosiyanine zengin ÜÇE'nin antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Emülsiyon sistemde, (+)kateşin ve askorbik asitin (620 µM) pH 3.0'da pro-oksidatif, pH 7.0 da ise herhangi bir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Ancak, ÜÇE'nin her iki pH değerlerinde lipit peroksidasyonu ve propanal oluşumunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. ÜÇE'nin antioksidan aktivitesi yapısındaki monomerik gruplara göre daha yüksek antioksidan aktivite gösteren oligomerik proantosiyanisinden kaynaklanmaktadır.

Üzümdeki fenolik bileşikler, potansiyel sinerjistik etkiye sahiptirler. Fenolik bileşikler, serbest radikallerle reaksiyona girerek ve/veya metallerle kelat oluşturarak primer antioksidan olarak davranırlar (Yi et al.,1997). Buna ek olarak, yüksek molekül ağırlıklı prosiyanisidler, lipit peroksidasyonunu hızlandıran yağda çözünen peroksil radikallerini etkin bir şekilde inhibe etmektedirler. (+)kateşin ve (-)-epikateşinin daha büyük oligomerlerinin de yağda çözünen veya yüzey aktif olabileceği düşünülmektedir. Apolar antioksidanlar lipit tarafında yer aldığından polar antioksidanlar daha etkin olmaktadır (Sarni-Manchado et al.,1999). Bu durum marul ekstraktı fenollerini ile ÜÇE'nin sinerjistik etkisi açıklamaktadır. Proton vererek OH gruplarının da eklenmesi ile hem ÜÇE hem de ÜÇE-marul ekstraktı kombinasyonunun antioksidan aktivitesini arttırmaktadır.

ÜÇE, özellikle proantosiyanisince zengin doğal olarak oluşan bitki bileşenleridir. Proantosiyanidinlerin, prosiyanidin tipi sadece üzüm çekirdeğinde mevcuttur (Yamakoshi et al., 2002). Üzüm çekirdeği proantosiyanidinleri (prosiyanidin veya kondense tannin) (+)kateşin, (-)-epikateşin ve (-)-epikateşin-3-gallatın gallik asitle asilasyonu ile oluşan bileşiklerdir(şekil..) (Vidal et al., 2004). Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidin % 55'i 5 den fazla monomer biriminden ve 2.4 ile 16.7

arsasında değişen polimerizasyon derecesinden oluşmaktadırlar (Prieur et al., 1994).

Proantosiyamidinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri yapılarına ve polimerizasyon derecelerine bağlı olmaktadır (Hellstrom and Matrila, 2008). Proantosiyamidinler, polifenolik yapılarından dolayı çok güçlü antioksidanlardır. OPCs(oligomerik proantosiyamidiler)in antioksidan özellikleri askorbat/demir radikali varlığında fosfotidil kolin peroksidasyonu ve sulu fazda ABTS radikalini sönümleme kapasitesi incelenmiştir. Lipit fazdaki antioksidan aktivitenin gallik asitin lipit peroksidasyonunda çok zayıf bir inhibitör olmasından dolayı azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşın, sulu fazdaki antioksidan aktivite monomerlerden trimerlere doğru artmakta ve trimerlerden tetramerlere doğru azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni, ester yapısındaki çift bağın karbonil adjacent fonksiyonudur. Bu moleküke şeker grubunun eklenmesi, B halkasının hidroliz kabiliyetini azaltmakta ve böylece hidrojen verebilmektedir. Yapısal farklılıklar aynı zamanda lipit fazdaki aktiviteyi de etkilemektedir (Plumb et al., 1998). Ricardo Da silva et al.(1992) farklı yapıdaki antosiyamidinlerin süperoksit ve hidroksil radikalleri varlığında antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, gallik asitle yapılan esterifikasyon işleminin dimer prosiyanidinlerde süperoksit ve hidroksil radikallerini sönümleme kapasitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır. 3 pozisyonundaki esterifikasyon, daha yüksek radikal sönümleme sağlamaktadır. Bu nedenle, prosiyanidin B2-3'-O-gallat en etkin antioksidan olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. Prosiyanidin kimyasal yapısı

ÜÇE'nin radikal sönmleme kapasitesinde en önemli faktörlerden biri pH olmaktadır. Prosiyanidin B-3'ün antioksidan kapasitesi linoleik asit- β -karoten-su sisteminde asit ortamda (pH 3-5), nötral yada hafif alkali ortamlara (pH 7-9) göre oldukça zayıf olarak bulunmuştur (Ariga and Hamano, 1990). Bu sonuçlar, bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzerlik göstermekte ve durumun prosiyanidin B-3 yapısındaki orto-trihidroksil grubunun olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, yapıya bağlı olarak yüksek antioksidan aktivite yada radikal sönmleme kapasitesi yüksek pH değerlerinde elde edilebilmektedir.

Şarap antosiyanidinlerinin radikal sönmleme kapasitesine pH'nın etkisi araştırılmış pH arttıkça artış gösterdiği tespit edilmiştir (Borkowski et al., 2005). Sulu fazda antosiyanidinler; pelargonidin, siyanidin ve delfidin gibi farklı moleküllerin karışımı şeklinde bulunmaktadır. Pelargonidin, siyanidin ve delfidin TEAC profilleri incelendiğinde, orto pozisyonunda bulunan B halkasında bulunan OH gruplarının artışı ile antioksidan aktivitenin arttığını gözlemlemişlerdir. Antosiyanidinlerin bu profili, pH ya bağlı olarak radikal sönmleme kapasitesindeki artışı açıklamaktadır ki bu durum düşük pH da daha baskın olan flavylum katyonunun da dönüşümü ile de ilişkilidir. pH arttıkça flavylum katyonu; kuidoinal baza, sonra karbinol pseudo baz ve en son olarak da E-şalkona dönüşmektedir.

Bu bileşikler antioksidan aktiviteyi daha da arttırmakra ki bu sonuçta TEAC değerlerine yansımaktadır.

pH'ya bağılı olarak radikal sönümlene kapasitesi biyolojik olarak da önemli bir olaydır. Vücut sıvısı pH'sı mide de 1, ince bağırsak da 5.3, ağız florasında 6.8, kan ve doku sıvısında 7.4, kalın bağırsak da 8, pankreasta 7-8.7 ve düodenum da 8.3-9.3 civarındadır. Asidik koşullarda, test edilen fenolik bileşikler etkin bir radikal sönümlene göstermemektedirler. Diğer taraftan, kan yada hücre dışı sıvılarda pH 7-8'e ulaştığında bu fenoliklerin daha iyi bir antioksidan olarak davranmaları beklenebilmektedir (Muzolf et al., 2008).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fenolik bileşikler içeren çeşitli bitki materyallerinin model sistemlerde etkili antioksidan özellik gösterdiği ve en etkin antioksidan bileşikler olan flavanoidlerin çeşitli sebze, meyve, otlar ve çay yapraklarında bulunduğu belirtilmektedir. Marul da antioksidan bakımından zengin materyallerden biridir. Ancak yapısında doğal olarak bulunan oksidatif enzimler (POD,PPO,LOX), hidrojen donör olarak davranabilen, radikal söndürme kapasitesine sahip bu tür bileşiklerin okside olmalarına ve bu şekilde toplam antioksidan aktivitenin azalmasına neden olmaktadır.

Dolayısıyla marulun yapısında bulunan oksidatif enzimlerin saflaştırılması ve kinetik karakterizasyonu önem taşımaktadır. Enzimlerin mekanizmalarının anlaşılması, raf ömrü hatta tazeye yakın kalitenin korunması için uygun koşulların belirlenmesinde kullanılabilir.

Yapılan bu çalışma ile gıdalarda antioksidan aktivite veya radikal söndürme kapasitesinin raf ömrü süresince korunması konusuna açıklık getirilmeye çalışılmıştır. Oksidatif bozulmaların önlenmesinde kullanılan çeşitli inhibitörler, aynı zamanda ürünün besinsel kalitesini de raf ömrü süresince korumaktadırlar. Askorbik asit, sistein, okzalik ve sitrik asit bu amaçla önerilmektedir. Ancak kullanılan inhibitör konsantrasyonu önem taşımaktadır. Sistein bilinen en etkin inhibitör olmasına rağmen fazla miktarda kullanıldığı durumda marul fenol içeriğini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Pek çok çalışmada bitki polifenollerinin bitkideki diğer antioksidanlarla sinerjistik bir etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız araştırma da da marul ekstraktının α -tocoferol, kuersetin and askorbik asit gibi kimyasal kaynaklı antioksidanlar ile yeşil çay ekstraktı ve üzüm çekirdeği gibi doğal kaynaklı antioksidanlar ile kombinasyonunda lipit oksidasyonuna ve Fremy's salt radikalinin indirgenmesine karşı sinerjistik etki gösterdikleri bulunmuştur.

Kuersetin, yeşil çay veya üzüm çekirdeği ekstraktının tek olarak yada marul ekstraktı ile kombinasyonunda antioksidan aktivitenin pH ya bağlı olarak arttığı her iki yöntemde de gözlenmiştir. Bundan dolayı bu tür bulgular, marul yada benzeri gıda madeelerinin antioksidan aktivite ve antioksidanların korunmasında veya arttırılmasında kullanılabilir.

Marul lipit oksidasyonuna karşı koruyucu doğal antioksidanlar bakımından zengindir. Marul ekstraktındaki polifenoller, oksidasyona karşı dirençlidirler. Marul ve benzeri bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, polifenol içeriklerinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi ise yapılarındaki OH grupları ve bu grupların hidrojen verme kabiliyetleri ile ilişkilendirilmektedir.

Marul yüksek miktarda oksidatif enzim aktivitesi içermektedir. Antioksidan aktivite ve fenol içeriği oksidasyonla birlikte azalmaktadır. Elde edilen bulgular, raf ömrü süresince iz miktarda bulunan değerli bileşenlerin korunması için kullanılabilir. Ancak kullanım dozları önem taşımaktadır.

Taze meyve sebzeler ile bunlardan üretilen çeşitli ürünler yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmalarından dolayı giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, sözkonusu

Bu çalışmada çeşitli meyve ve sebzelerin yapılarında doğal olarak bulunan oksidatif enzimlerin farklı izoformları iyon değiştirme kromatografisi teknikleri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış izoenzimlerin model reaksiyon koşullarında askorbik asit, β -karoten ve çeşitli fenolik (gallik asit, kateşin, epikateşin, kumarik asit, klorojenik asit, kuersetin, floridzin gibi) bileşiklerin dolaylı olarak oksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmiştir. Bu amaçla POD, PPO ve LOX enzimlerinin primer oksidasyon reaksiyon koşullarında ortama ilave edilen askorbik asit, çeşitli karotenoidler ve fenolik bileşiklerin uğradığı değişim spektrofotometrik ve kromatografik olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu değişimler ile antioksidan aktivite arasında ilişki ortaya konulmuştur. Sıcaklık, pH ve oksijen konsantrasyonu gibi

parametrelerin sekonder oksidasyon reaksiyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında meyve ve sebzelerde başlangıç POD, LOX ve PPO aktivitesi, ürün kompozisyonu ve depolama koşullarına bağlı olarak raf ömrü süresince meydana gelebilecek toplam antioksidan aktivite kayıplarının belirlenmesi mümkün olmuştur.

Fenolik antioksidanların, antioksidan aktivitesindeki pH ya bağlı olarak gözlenen artış proton verme kabiliyetinin bir sonucudur.

Yine yüksek pH değerlerinde fenolate iyonu oluşumuna bağlı olarak da antioksidan aktivite artmaktadır.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acar, J. and Gökmen, V. 2004. Meyve ve sebze işleme teknolojisi, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, Ankara.
- Adams, J.B., 1991. Review: enzyme inactivation during heat processing of food stuffs. *International journal of Food Science and Technology*, 26, 1-20.
- Andersen, F., Lygren B., Maage A. Waagbø R., 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts, *Aquacultura*, 161(1-4), 437-451.
- Ahvenainen, R., 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 7(6), 179-187.
- Amico V., Napoli E.M., Renda A., Ruberto G., Spatafora C., Tringali C., 2004, Constituents of Grape Pomace from the Sicilian Cultivar 'Nerello Mascalese', *Food Chemistry*, 88, 599-607.
- Amorati, R., Pedulli, G.F., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L., 2006. Solvent and pH effect of the antioxidant activity of caffeic acid and other phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2932-2937.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, total phenol content and total antioxidant activity of lettuce. *Food Chemistry*, 107(3), 1173-1179.
- Ariga, T., Hamano, M., 1990. Radical scavenging action of its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 54, 2499-2504.
- Aydemir T., 2004, Partial Purification and Characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, *Food Chemistry*, 87, 59-67.
- Aydemir, T., Akkanlı, G., 2006. Purification and Characterization of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens*) and the investigation on enzyme activity of some inhibitors. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(9), 1090-1098.
- Aziz, S., Wu, Z., Robinson, D.S., 1999, Potato Lipxygenase Catalysed Co-oxidation of β -carotene, *Food Chemistry*, 64, 227-230.

- Baracat-Pereira, M.C., Oliveira, M.G.A., Barros, E.G., Moreira, M.A., Santoro, M.M., 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: Presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 2, 91-98.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., 2000. Pruess H.G., Free Radicals and Grape Seed Proanthocyanidin Extract: Importance in Human Health and Disease Prevention, *Toxicology*, 148, 187-97.
- Banon, S., Diaz, P., Rodriguez, M., Garrido, M.D., Price, A., 2007. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*, 77, 626-633.
- Baker, J., Bridle, P., Garcaviaguera, C., Kallithara, S., 1995. Survey solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Physicochemical Analysis*, 6, 265-267.
- Bassil, D., Makris, D. P., Kefalas, P., 1999. Oxidation of caffeic acid in the presence of L-cysteine: isolation of 2-S-cystinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(4), 395-402.
- Becker, E.M., 2007. Interactions between natural antioxidants in lipid systems of increasing structural organization, PhD Thesis, University of Copenhagen, Faculty of Life Science, Department of Food Science-Food Chemistry, Denmark.
- Becker, E. M., Ntouma, G., Andersen, M.L., Skibsted, L. H., 2008. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chemistry*, 103, 1288-1296.
- Beer D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M., 2005. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 90, 569-577.
- Bonilla F., Mayen M., Merida J., Medina M., 1999, Extraction of Phenolic Compounds from Red Grape Marc For Use As Food Lipid Antioxidants, *Food Chemistry*, 66, 209-15.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I.M.C.M., Tyrakowska, B., 2005. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5526-5534.

- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination radical-scavenging efficiencies. *Methods of Enzymology*, 186, 343-355.
- Bozan B., Tosun G., Özcan D., 2008 Study of Polyphenol Content in the Seeds of Red Grape (*Vitis Vinifera* L.) Varieties Cultivated in Turkey and Their Antiradical Activity, *Food Chemistry*, 109, 426-430.
- Britton, G., 1996. carotenoids in natural food colorants, Hendry, G.A.F., Houghton, J.D.(eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, 348p.
- Buta, J.G., Moline, H.E., Spaulding, D.W., Wang, C.Y., 1999. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1-6.
- Burnett, F.S., 1977, Peroxidase and Its Relationship to Food flavor and Quality: A Review, *Journal of Food Science*, 42, 1-6.
- Calligaris, S., Falcone, P., Anese, M., 2002. Color changes of tomato purées during storage at freezing temperatures. *Journal of Food Science*, 67, 2432-2435.
- Cantos E., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A., 2001. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 1, 322-330.
- Cao X., Ito Y., Supercritical Fluid Extraction of Grape Seed Oil and Subsequent Separation of Free Fatty Acids by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1021, 117-24, (2003).
- Cerpa-Calderon F.K., Kennedy J.A., 2008, Berry Integrity and Extraction of Skin and Seed Proanthocyanidins during Red Wine Fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 19, 9006-14.
- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., Anon, M.C. 1995, Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria annassa-duch*)-partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 10, 2596-2601.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-Carmona, F., 1997, Kinetic study of the Suicide of Latent Polyphenoloxidase from Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa*) Induced by 4-tert-butylcatechol in the Presence of SDS, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1339, 297-303.

- Chen, B.H., Liu, M.H., 1998. Relationship between chlorophyll a and b-carotene ,in a lipid containing model system during illumination. *Food Chemistry*, 63, 207-213.
- Cosetang, M.Y., Lee, C.Y.,1978. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52,985.
- Copeland, R.A.,200. *Reversible Inhibitors in Enzymes*. Wiley-VCH, 398p.
- Cuperus, F.P., Kramer,G.F.H., Derksen,J.T.P., Bouwer,S.Th., 1995, Activity of Immobilized Lipoxygenase Used for the Formation of Perhydroxyacids, *Catalysis Today*, 25, 441-445.
- Darkwa, J., Mundoma, C., Simoti, R.H., 1998. Antioxidant chemistry reactivity and oxidation of DL cysteine by some common oxidants. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 94(14), 1971-1978.
- Desorby, S.A., Netto, F.M., Labuza, T.P., 1998. Preservation of b-carotene from carrots. *Critical Reviews in Food science and Technology*, 38, 381-396.
- Dincer, B., Çolak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S. ,2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*, 77(1), 1-7.
- Ding,C.,Chachin,K.,Ueda, Y.,Wang,C.Y.,2002, Inhibition of Loquat enzymatic Browning,by Sulfhydryl Compounds, *Food chemistry*, 76, 213-218.
- Dogan, S., Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69–77.
- Duangmal,K., Apenten,R.K.O., 1999, A comparative Study of Polyphenoloxidases from Taro(*Colocasia esculenta*) and Potato(*Solanum tuberosum* var.Romano), *Food Chemistry*,64,351-359.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The carotenoids as antioxidants- A Review. *Journal of Photochemistry and photobiology B: biology*, 41, 189-200.
- Ege, S., 1984. *Organic Chemistry*, Third edition, D.C. Heath and Company Lexington, 1398p.

- Eidhin, D.M., Murphy, E., O'beirne, D., 2005. Polyphenoloxidase from apple (*malus domestica* Borkh. Cv Bramley's Seedling): purification strategies and characterization. *Journal of Food Science*, 7(1), 51-58.
- Einbond, L.S., Reynertson, K.A., Luo, X.D., Basile, M.J., Kennely, E.J., 2004, Anthocyanin Antioxidants From Edible Fruits, *Food Chemistry*, 84, 23-28.
- El, S.N., Karakaya, S., Taş, A.A., 1999, Bazı Gıdalardaki Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin in vivo Koşullarda Saptanması, Proje no TOGTAG-1658, 40s.
- Eriksson, C., 1975. Aroma compounds derived from oxidized lipids. Some biochemical and analytical aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 126-128.
- Fang, L., Jiang, B. Zhang, T., 2008. Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase. *Food Chemistry*, 109, 802-807.
- Ferrante, A., Maggiore, T., 2007. Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of Valerina leafy vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 73-80.
- Foo L.Y., Lu Y., Wong H., 1998, Biphenyl-Linked Biflavanoids from Grape Pomace, *Phytochemistry*, 47 (6), 1137-40.
- Garcia-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits, *Food Chemistry*, 84, 13-17.
- Gardner, P.T., McPhail, D.B., Crozier, A., Duthie, G.G., 1999. Electron spin resonance (ESR) spectroscopic assessment of the contribution of quercetin and other flavonols to the antioxidant capacity of red wines. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 79, 1011-1014.
- Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., Świeca, M., 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chemistry*, 107, 129-135.
- Greenberg, E.R., baron, J.A., Stuket, T.A., Stevens, M.M., Mandel, J.S., Spencer, S.K., Ellias, P.M., Lowe, N., Nierenberg, D.W., bayrd, G., Vance, J.C., Freeman, D.H., Clendenning, J.W.E., Kwan, T., The Skin cancer prevention studt group, 1990. Clinical trial og b-carotene to prevent basel-

cell and squamous cell cancers of skin. *New England Journal of Medicine*, 323, 789-795.

Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., Korczak, J., 2006. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 351-362.

Graversen, H.B., Becker, E.M., Skibsted, L.H., Andersen M.L., 2007. Antioxidant synergism between fruit juice and α -tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*). *European Food Research and Technology* (in press).

Golan-Goldrich, A. & Whitaker, J.R. (1984). Inactivation of mushroom polyphenol oxidase. *J. Biochem.* 54, 107-116.

Gonzalez-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S., Soto-Valdez, H., Vazquez-Ortiz, F., Pacheco-Aguilar, R., Wang, C.Y., 2005. Biochemical changes of fresh-cut pineapple slices treated with antibrowning agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 377-383.

Goulart, P.F., Alves, J.D., Magalhães, M.M., Lima L.C.O & Meyer, L.E., 2003. *Food Chemistry*, 83, 1, 7-11.

Gorny, J.R., Hess-Pierce, B., Cifuentes, R.A., Kader, A.A., 2002. Quality changes in fresh-cut pear slices as effected by controlled atmosphere and chemical preservatives. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 271-278.

Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N., Acar, J., 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.

Grosch, W., Laskawy, G., Weber, F., 1976, Formation of Volatile Carbonyl Compounds and Cooxidation of β -carotene by Lipoxygenase from Wheat, Potato, Flax and Beans. *J. agric. Food. Chem.*, 24, 456-459.

Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P., Kefalas P., Determination of Low Molecular Weight Polyphenolic Constituents in Grape (*Vitis Vinifera* Sp.) Seed Extracts: Correlation with Antiradical Activity, *Food Chemistry*, 89, 1-9, (2005).

- Güneş, B., Bayındırlı, A., 1993. Peroxidase and Lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots, *Lebensmittel-Wiss*, 26, 406-410.
- Han, R., Tian, Y., Becker, E.M., Andersen, M.L., Zhang, J., & Skibsted, L.H., 2007. Puerarin and conjugate bases as radical scavengers and antioxidants: molecular mechanism with β -caroten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2384-2391.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effect of flavanoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845-850.
- Heimler, D., Isolani L., Vignolini P., Tombelli S., Romani A., 2007. Polyphenol content and antioxidant activity some species of freshly consumed salads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1724-1729.
- Hellstrom, J.K., Matrila, P.H., 2008. HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56,17, 7617-7624.
- Hemeda, H.M., Klein, B.P., 1991. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of food Science*, 55, 184-192.
- Hiner, N.P.A., Raven, E.L., Thorneley, R.N.F., Garcia-Canovas, F., Rodriguez-Lopez, J.N., 2002, Mechanism of Compound I in Heme Peroxidases, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 9 1, 27-43.
- Hoshino C., Nagao A., Terao J., 1995. Synergetic effects of quercetin and α -tocopherol in the inhibition of myoglobin – induced oxidation of fish oil-bile salt emulsion. 21 st World Congress and Exhibition of International Society for Fat Research (ISF). Hague. The Netherlands.
- Hotta, H., Sakamoto, H., Nagano, S., Osakai, T., Tsujino, Y., 2001. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 159-167.
- Hu, M., McClements, J.D., Decker, E.A., 2004. Antioxidant Activity of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seed in Whey Protein Isolate Stabilized Algae Oil-in-Water Emulsions . *J. Agric. Food Chem.*, 52 (16), 5272 -5276,

- Huang, S.W., Frankel, E.N., Schwarz, K., German, J.B., 1996. Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2496-2502.
- Hunter, J.K., Fletcher, J.M., 2002, The Antioxidant Activity and Composition of Fresh, Frozen Jarred and Canned Vegetables, *Innovative Food science and Emerging Technologies*, 3, 399-406.
- Ibrahim, R., Osman, A., Saari, N., Abdul-Rahman, R. A., 2004. Effects of anti-browning treatments on the storage quality of minimally processed shredded cabbage. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2(2), 54-58.
- Ilarslan, H., Palmer, R.G., Imsande, J. Horner, H.T., 1997. Quantitative determination of calcium oxalate in developing seeds of soybean (Luguminosae). *American Journal of Biology*. 84, 1042-1048.
- Ihl, M., Aravena L., Scheuermann E., Uquiche E., Bifani, V., 2003. Effect of immersion solution on shelf-life of minimally processed lettuce. *Lebensm-Wiss. U.-Technol*, 36, 591-599.
- Ikediobi, C.O., Snyder, H.E., 1977. Co-oxidation of β -carotene by an isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 124-127.
- İyidoğan, N.F., Bayındırlı, A., 2003, Effect of L-Cysteine, Kojic acid and 4-Hexylresorcinol Combination on Inhibition Enzymatic Browning in Amasya Apple, *Journal of Food Engineering*, Article in Press.
- Jan, C.Y., Takahama, U., Kimura, M., 1991. Inhibition of photooxidation of α -tocopherol by quercetin in human blood cell membranes in the presence of hematoporphyrin as a photosensitizer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1086, 7.
- Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., 2001, Antioxidant Activity of Grape Seed (*Vitis Vinifera*) Extracts on Peroxidation Models in Vitro, *Food Chemistry*, 73, 285-90.
- Jeren-Galan, M., Carmona-Ramon, C., Minguéz-Mosquera, M.I., 1999, Interaction Between Chloroplast Pigments and Lipoxygenase Enzymatic Extract of Olives, *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 2671-2677.

- Jiang, Y., Pen, L. & Li, J., 2004. Use of citric acid for shelf life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut. *Journal of Food Engineering*, 63, 325-328.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G., 1994. Flavonoids as antioxidants. *Journal of American Chemical Society*, 116, 4846-4851.
- Jørgensen, L.V., Skibsted, L.H., 1998. Flavanoid deactivation of ferrimyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltammetry. *Free Radical Research*, 28, 335.
- Jørgensen, L.V., Madsen, H.L., Thomsen, M.K., Dragsted, L.O., Skibsted, L.H., 1999. Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: an ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radical Research*, 30, 207-218.
- Leja, M., Mareczek, A., Ben, J., 2003. Antioxidant Properties of Two Apple Cultivars During Long-Term Storage. *Food Chemistry*, 80, 303-307.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A.E.M.F., Rietjens, I.M.C.M., 2001. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 869-881.
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., 2007. Kendall Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *Food Science and Technology*, 40(3), 552-557.
- Lu, Y.R., Foo, L.Y., 1999. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.
- Kavrayan, D., Aydemir, T., 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from Peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*, 74, 147-154.
- Kayashima, T., Katayama, T., 2002. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1573, 1-3.
- King D.L., Klein B.P., 1987. Effect of flavonoids and related compounds on soybean lipoxygenase-1 activity. *Journal of Food Science*, 52, 1, 220-221.

- Klein, B.P., Grossman, S., King, D., Cohen, B.S., Pinsky, A., 1984. Pigment bleaching , carbonyl production and antioxidant effects during the anaerobic lipoxygenase reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 793, 72-79.
- Knekt,P., Heliovara, M., Rissasen, A., 1992. Serum antioxidant vitamins and risks of cataract. *British Medical Journal*, 305, 1392-1394.
- Krinsky, N.I., 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
- Kortowski, W., Sarna, T., Kalyanaraman, B., Sealey, R. C. (1987). Tyrosinase catalysed oxidation of dopa and related catechol (amines): A kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilisation and spin label oximetry. *Biochim. Biophys. Acta.*, 924, 383-392.
- Kuo, J.M., Hwang, A., Yeh, D.B., Pan, M.H., Tsai, M.L., Pano, B.S, 2006. Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9- position. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3151-3156 .
- Lattanzio, V., Linsalata, V., 1989. The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*. 33,93-106.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 56,658.
- Lu Y., Foo L.Y., 1999, The Polyphenol Constituents Of Grape Pomace, *Food Chemistry*, 65, 1-8.
- Majchrzak, D., Mitter, S., Elmadfa, I., 2004. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chemistry*, 88(3), 447-451.
- Martin-Diana, A.B., Rico, D., Barry-Ryan, C., Mulcahy, J., Frias, J., Henehan, G.T.M., 2005. Effect of heat shock on browning-related enzymes in minimally processed iceberg lettuce and crude extracts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(9), 1677-1685.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195-200.

- Mathews- Roth, M.M., Krinsky, N.I., 1987. Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 46, 507-509.
- Mayer, A. M. 1987. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 32, 253-273.
- Mdluli, K.M., 2004, Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Marula Fruit (*Sclerocarya Birrea* subsp. *Caffra*), *Food Chemistry*, Article in Press.
- Melo, G.A., Shimizu, M.M., Mazzafera, P., 2006. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, 67 (3), 277-285
- Mielnik, M.B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D.; Skrede, G., 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT Food Science and Technology*, 39, 191-198.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-794.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331-337.
- Minguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerro, L., Jaren-Galan, M., 2002b. Carotenoids and provitamin A in functional foods in *Methods of analysis for functional foods and neuroceuticals*, Husrt, W.J. (ed.), CRC Press LLC, Florida, 416p.
- Miranda, M.V., Magri, M.L., Navarro del Canizzo, A.A., Cascone, O., 2002, Study of Variables Involved in Horseradish and Soybean Peroxidase Purification by Affinity Chromatography on Concanavalin A-Agarose, *Process Biochemistry*, 28, 537-543.
- Molnar-Perl, I., Friedman, M., 1990, Inhibition of Browning by Sulfur amino Acids.3. Apples and Potatoes, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1652-1656.

- Montero, P., Avalos, A., Perez-Mateos, M., 2001, Characterization of Polyphenoloxidase of Prawns (*Penaeus Japonicus*). Alternatives to Inhibition: Additives and High Pressure Treatment, *Food Chemistry*, 75, 317-324.
- Movileanu, L., Neagoe, I., Flonta, M.L., 2000. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 205, 135-146.
- Mukai, K., Mitani, S., Ohara, K., Nagaoka, S. I., 2005. Structure- activity relationship of the tocopherol regeneration reaction by catechins. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 1243-1256.
- Mulinacci N., Santamaria A.R., Giaccherini C., Innocenti M., Valletta A., Ciolfi G. Pasqua G., 2008, Anthocyanins and Flavan-3-ols from Grapes and Wines of *Vitis Vinifera* Cv. Cesanese d'Affile, *Natural Product Research*, 22, 1033-39.
- Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, M.C.M., Tyrakowska, B., 2008. pH dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 816-823.
- Murakami M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., 2003. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *Journal of Food Science*, 68 (5), 1622-1625.
- Nagawa, K., Kawagoe, M., Yoshimura, M., Arata, H., Minamikawa, T., Nakamura, M. & Matsumoto, A., 2000. Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice. *Journal of Health Science*, 46(6), 509-512.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y., 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 21, 895-902.
- Nawaz H., Shi J., Mittal G.S., Kakuda Y., Extraction of Polyphenols from Grape Seeds and Concentration By Ultrafiltration, Separation and Purification Technology, 48, 176-81, (2006).
- Negresalvayre, A., Affany, A., Hariton, C., Salvayre, R., 1991. Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane like systems are potentiated by rutin. *Pharmacology*, 42, 262.

- Negro C., Tommasi L., Miceli, A., 2003, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Red Grape Marc Extracts, *Bioresource Technology*, 87, 41-4.
- Niki, E., 1990. In *Methods In Enzymology*,(Packer. L., Glazer, A.N.Ed)., vol 186, pp 100-108. Academic press, San diego.
- Nourian, F., Ramaswamy, H.S., Kushalappa, A.C., 2003. Kinetics of change associated with potatoes stored at different temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*,36, 49-65.
- O'Connor, T.P., O'Brien, N.M., 1991. Significance of Lioxygenase in Fruits and Vegetables in *Food Enzymology*, Volume1. fox, P.F.(ed.). Elsevier science Publishers Ltd. 636p.
- Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H., Slotte, J.P. 2002. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arc. Biochem. Biophys.*, 99, 103-108.
- Oliver, J., Palou, A., 2000. Chromographic determination of carenetoids in foods. *Journal of Chromotography A*, 881, 543-555.
- Omnenn, G.S., Goodman, G.E., Thorquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, J.S., Hammar, S., 1996. Effects of a combination of b-caronete and vitamin A on lung cancer and cardiovascular diseases. *New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, N., 2006. Purification of characterization membrane-bound peroxidase from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365-376.
- Osmianski, J., Lee, C.Y., 1990. Inhibiton of polyphenoloxidase activity and browning by honey. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 38, 1892-1895.
- Padiglia,A., Cruciani,E., Pazzaglia,G., Medda,R., Floris,G., Purification and Characterization of OPUTIA Peroxidase, *Phytochemistry*, 38, 295-297.
- Palaniswamy, U.R., Bible, B., McAvoy, R.J., 2004. Oxalic acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae* L.) is altered by the stage of harvest and the nitrate to ammonium ratios in hydroponics. *Future for Medicinal and Aromatic Plants*, 629, 299-305

- Palma M., Taylor L.T., 1999, Extraction of Polyphenolic Compounds from Grape Seeds with Near Critical Carbon Dioxide, *Journal of Chromatography A*, 849, 117-24.
- Palmer, T., (1995). Kinetics of single substrate enzyme catalyzed reactions. In *Understanding Enzymes* (pp. 107-127). Hertfordshire: Prentice Hall/Ellis Horwood.
- Pati, S., Losito, I., Palmisano, F., Zambonin, P.G., 2006. Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1102, 184-192.
- Pawlikowska-Pawlega, B., Gruczecki, W.I., Misiak, L., Paduch, R., Piersiak, T., Zarzyka, B., Pawelec, J., Gawron, A., 2007. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1768, 2195-2204.
- Pedrielli P., Skibsted L.H., 2002. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (24), 7138–7144.
- Peter, M. G., Steigmann, H. B., Dao-Ba, H., Scheffler, K. 1985. Detection of semiquinone radicals of N-acyldopamines in aqueous solution. *Z. Naturforsch.* 40c, 535-538.
- Peytar-Maillard, M. N., Cuvelier, M. E., Berset, C., 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2-azobis(2-amidopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of American Chemical Society*, 80(10), 1007-1012.
- Piga, A., Agabbio F., Nicoli, G., Nicoli, M.C., 2002, Retention of Antioxidant Activity in Minimally Processed Mandarin and Satsuma Fruits, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 344-347.
- Plumb, G.W., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Williams, C., 1998. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*, 29, 351-358.
- Ponce, A.G., Valle, C.E., Roura, S.I., 2004. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft Und- Technologie*, 37, 199-204.

- Pomar, F., Bernal, a., Diaz, J., Merimo, F., 1997, Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase, *Phytochemistry*, 48, 1313-1317.
- Prenen, J.A.C., Boer, P., Mees, E.J.D. 1984. Absorption kinetics of oxalate from oxalate-rich food in man. *American Journal of Clinical Nutrition*. 40, 1007-1010.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheyney, V., Moutounet, M., 1994. Oligomeric and Polymeric Procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- Prigge, S.S., Boyinyon, J.C., Faig, M., Doctor, K.S., Gaffney, B.J., Amzel, L.M., 1997. Structure and mechanism of Lipoxygenases *Biochimie*. 79, 629-638.
- Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., Tacchini, M., Aubert, S., Hugues, M., Amiot, M.J., 1997. Phenolic composition, browning susceptibility and carotenoid content of various apricot varieties at maturity. *Hortscience*. 57, 958-962.
- Rapaka, R., Coates, P.M., 2006. Dietary supplements and related products: A brief summary. *Life Sciences*. 2003, 78, 2026-2032.
- Ratty, A.K., Sunamoto, J., Das, N.P., 1988. Interaction of Flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free-radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochemical Pharmacology*, 37, 989-995.
- Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M., 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, 94, 253-261.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., P, Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ricardo de Silva, J.M., Belchior, A.P., Spranger, M.I., Bourzeix, M., 1992. Oligomeric Procyanidins of 3 grapevine varieties and wines from Portugal. *Sciences des Aliments*, 12, 223-237.
- Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J., Lacombe, J.M., Pavia, A.A., 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning 1. isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of

- phenolics by apple polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(5),841-847.
- Rigal, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., 2000. Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armeniaca*, var Bergeron) during enzymatic browning: beta-carotene inhibition of chlorogenic acid degradation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(6), 763-768.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Slover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Robert, C., Cadet, F., 1996. The inhibition of studies on polyphenoloxidase by cysteine. *Biochemical Education*. 24(3),157-159.
- Roberts, W.G., Gordon, M.H., 2003. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 51, 1486-1493.
- Robinson,D.S., Wu,Z., Domoney,C., Casey,R., 1995, Lipoxygenases and the Quality of Foods, *Food Chemistry* , 54, 33-43.
- Robinson, D.S., 1991, Peroxidases and Catalyses in Foods in Oxidative Enzymes in Foods,Robinson,D.S., Eskin,N.A.M.(eds:) Elsevier Applied Science,London,314p.
- Roginsky, V., Barsukova, T. 2001. Superoxide dismutase inhibits lipid peroxidation in micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*,111,87-91.
- Saito, S., Kawabata, J., 2004. Synergetic effects of thiols and amines on antiradical efficiency of protocatechuic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8163-8168.
- Rontani, J.F., 2001. Visible light- dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescence: A review. *Photochemistry*, 58, 187-202.
- Shaker E.S., 2006, Antioxidative Effect of Extracts from Red Grape Seed and Peel on Lipid Oxidation in Oils of Sunflower, *LWT-Food Science and Technology*, 39, 8, 883-92.

- Sanchez-Ferre, A., Laveda, F., Garcia- Carmona, F., 1993. Partial purification of soluble potato polyphenoloxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 41, 1219-1224.
- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C., 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*, 322, 339-346.
- Santerre, C.R., Cash, J.N., Vannorman, D.J., 1988. Ascorbic acid/Citric acid combinations in the processing of frozen apple slices. *Journal of Food Science*, 53(6), 1713-1716.
- Sapers, G.M., Miller, R.L., 1995. Heated ascorbic/citric acid solution as browning inhibitor for pre-peeled potatoes. *Journal of Food Science*, 60, 762-776.
- Sarkar S., Das N., 2006. Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat brain, *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(4), 391-397.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M., 1999. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 42-47.
- Schilling, S., Sigolotto, C., Carle, R., Schieber, A., 2008. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 22, 441-448.
- Sayavedro-Soto, L.A., Montgomery, M.W., 1986, Inhibition of Polyphenoloxidase by Sulfite, *Journal of Food Science*, 51, 1531-1536.
- Schwarz, K., Huang, S.W., German J.B., Tiersch, B., Hartmann, J., Frankel E.N., 2000. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10): 4874-4882.
- Scweiggert U., Scieber A., Carle R., 2005. Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovate Food Science and Technologies*, 6, 4, 403-411.

- Serpen, A. and Gökmen, V. 2006. A proposed mechanism for the inhibition of soybean lipoxygenase by beta-carotene. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 401-406.
- Sheu S.C., Chen A.O., 1991. Lipoxygenase as blanching index for frozen vegetable soybeans, *Journal of Food Science*, 56,2,448–451.
- Singh N., Rajini,P.S., Free Radical Scavenging Activity of an Aqueous Extract of Potato Peel ,*Food Chemistry*, 85, 611-616.
- Shi, H. L., Noguchi, N., Niki, E., 1999. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol, against lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(3-4), 334-346.
- Shibata, D., Axelrod, B., 1995. Plant Lipoxygenase. *Journal of Lipid mediators and Cell signalling*,12, 213-228.
- Shrikhande A.J., 2000, Wine By-Products with Health Benefits, *Food Research International*, 33, 469-74.
- Smith,J.J., Linforth,R., Tucker,G.A., 1996, Soluble Lipoxygenase Isoforms from Tomato Fruit, *Phytochemistry*, 45, 453-458.
- Son, S.M., Moon, K.D., Lee, C.Y., 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 73(1), 23-30.
- Söderhall, I., söderhall, K., 1989. Purification of polyphenoloxidase from daucus carota cell cultures. *Phytochemistry*, 28, 1805-1808.
- Sreemantula S., Nammi S., Kolanukonda R., Koppula S., Boinil K.M., 2005, Adaptogenic and Nootropic Activities of Aqueous Extract of Vitis Vinifera (Grape Seed): An Experimental Study in Rat Model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 5, 1, 1-8.
- Takenaka, M., Nanayama, K., Isobe, S., Murata, M., 2006b. Changes in concentrations of phenolic compounds during growing, storing and processing of yacon. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* , 70(1), 172-174.
- Tbivonen, P.M.A, Brummell,D.A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48,1,1-14.

- Terao, J., Piskula, M., Yao, Q., 1994. Protective effect of epicatechin. Epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308, 278-284.
- Tsuchiya, H., 2001. Stereospecificity in membrane effects of catechin. *Chemico-Biological Interactions*, 134, 41-54.
- Tosun, İ., Yüksel, S., 2002, Üzümsü Meyvelerin Antioksidan Kapasitesi, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 13, 40-46.
- Tortoe, C., Orchard, J., Beezer, A., 2006. Prevention of enzymatic browning of apple cylinders using different solutions. *International Journal of Food Science and Technology*. 42, 12, 1475-1481.
- Tronc, J., Lamarche, F., Makhlouf, J., 1997. Enzymatic browning inhibition in cloudy apple juice by electro dialysis. *Journal of Food Science*, 62, 75-78.
- Tyrakowska, B., Soffers, A.E.M.F., Szymusiak, H., Boersma, M. G., Lemanska, K., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M, 1999. TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1427-1436.
- Uri, N., 1961. Mechanism of antioxidation. In Lundberg WO (ed) *Autoxidation and Antioxidants*, Wiley, New York, , pp 133–169.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC critical review in food Science and Technology*, 15, 49-127.
- Vernooy-Gerritsen, M., Bos, A.L.M., Velding, G.A., Wligerthart, J.F.G., 1984. Intracellular localization of Lipoxygenase-1 and -2 in germinating Soybean Seeds by Indirect Labelling with protein A-colloidal gold Complexes. *Plant Physiology*, 76, 1070-1079.
- Wanasundara, U.N., Amarowicz, R., Shahidi, F., 1995. Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. *Food Research International*, 28, 525-530.
- Wang, L., Zhang, W., Wei, L., Xu, C., 2000. A study of peroxidase and amylase isoenzymes in different radish cultivars during winter storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1767-1771.

- Wang, I., Kim, D., Park, J., 2003. Various antibrowning agents and green tea extract during processing and storage. *Journal of Food Processing Preservation*, 27, 213-225.
- Watada, A.E., Qi, L. 1999. Quality of fresh cut produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 201-205.
- Williams, D.C., Lim, M.H., Chen, A.O., Pangborn, R.M., Whitaker, J.R., 1986. Blanching of vegetables for freezing-which indicator Enzyme to Chootose. *Food technology*, 40, 130-140.
- Whitaker, J.R., 1991, *Lipoxygenase in Oxidative Enzymes in Foods*, Robinson, D.S., Eskin, N.A.M. (eds:) Elsevier Applied Science, London, 314p.
- Wong, D.S., 1995a, *Peroxidase in Food Enzymes*, Wong, D.S. (ed.), Chapman and Hall, New York, 390p.
- Wong, D.S., 1995b, *Lipoxygenase in Food Enzymes*, Wong, D.S. (ed.), Chapman and Hall, New York, 390p.
- Wu, H., 1996, Affecting the Activity of Soybean Lipoxygenase-1, *Journal of Molecular Graphics*, 14, 331-337.
- Valero, E., Varon, R., Garcia-Carmona, F., 1991, A Kinetic study of Irreversible enzyme Inhibition by an Inhibitor That is Rendered Unstable by Enzyme Catalysis, *Biochem. J.*, 277, 869-874.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., Waters, E., 2004. Taste and mouth feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analitica Chimica Acta*, 513, 57-65.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Ariga, A., 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2544-2548.
- Yamaguchi, T., Katsuda, M., Oda, Y., Terao, J., Kanazawa, K., Oshima, S., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Takamura, H., Matoba, T., 2003. Influence of polyphenoloxidase and ascorbate oxidase during cooking process on the radical scavenging activity of vegetables. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 79-83.

- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., Kikuchi, M., 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 599-607.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 1998. Thermal stabilities of peroxidase from fresh pinto beans. *Journal of Food Science*, 63, 987-990.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L., 2002. Antioxidant and Pro-oxidant properties of Ascorbic acid and Gallic acid, *Food Chemistry*, 79, 307-31.
- Yılmaz, Y., Toledo, R.T., 2004. Major flavonoids in grape seeds: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 255-260.
- Yi, O.S., Meyer, A., Frankel, E.N., 1997. Antioxidant activity of grape seed in lecithin liposome system. *Journal of American Chemist's Society*, 74, 1301-1307.
- Yoon S., Klein B.P., 1979. Some properties of Lipoxygenase isoenzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2, 5, 955-962.
- Yoruk, R., Yoruk, S., Balaban, M.O., Marshall, M.R., 2004. Machine Vision Analysis of antibrowning potency for oxalic acid: a comparative investigation on banana and apple. *Journal of Food Science*, 69(6), 281-289.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M., 1991, *Polyphenoloxidase in Oxidative Enzymes in Foods*, Robinson, D.S., Eskin, N.A.M. (eds:) Elsevier Applied Science, London, 314p.
- Zhang Z., Pang, X., Xu, D., Ji, Z., Jiang, Y., 2005, Role of Peroxidase in Anthocyanin Degradation in Litchi Fruit Pericarp, *Food Chemistry*, 90, 47-52.
- Zheng, X.L., Tian, S.P., Gidley, M.J., Yue, H., Li, B.Q., Xu, Y., Zhou, Z.W., 2007. Slowing the deterioration of mango fruit during cold storage by pre-storage application of oxalic acid. *Journal of Horticultural science & Biotechnology*. 82(5). 707-714.
- Zhou, B., Wu, L.M., Yang, L., Liu Z.L., 2005. Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micells. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 78-84.

ÖZGEÇMİŞ

1.KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Arzu Altunkaya

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara -12.03.1974

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0312 359 34 80 (ev)
0312 297 71 00 (iş)
0536 881 97 15 (cep)

E-mail: arzualt@hacettepe.edu.tr

2. EĞİTİM BİLGİLERİ:

Doktora: Hacettepe Üniversitesi – Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi – Gıda Mühendisliği Bölümü

Lisans: Hacettepe Üniversitesi- Gıda Mühendisliği Bölümü -3.lük derecesi

Lise: Konya Gazi Lisesi

3. YABANCI DİL

İngilizce (Advanced)

Almanca (Elementary)

4. ARAŞTIRMA KONULARI

Gıda Kimyası

Enzim kinetiği ve enzimatik oksidasyon

Antioksidan sinerjismi

5. TEZLER:

Doktora tezi: Meyve ve sebzelerde bulunan oksidatif enzimlerin antioksidan kapasite ve antioksidan kapasite üzerine etkilerinin belirlenmesi

Yüksek Lisans: Malt β -glukanaz aktivitesi ve malt kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

6. YURTDIŐI ÇALIŞMALARI VE ALINAN BURSLAR

-Kopenhag Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümü (Danimarka)

(Şubat 2007- Temmuz 2007)- **ERASMUS Bursu**

-Kopenhag Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümü (Danimarka)

(Ağustos 2007- Ekim2007)- **Kopenhag Üniversitesi Bursu**

-Kopenhag Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümü (Danimarka)

(Haziran 2008- Ekim2008) - **COST Bursu (European Cooperation in the Field of Science and Technology)**

7. BİLİMSEL YAYINLAR

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanan Makaleler

ALTUNKAYA A., Gökmen, V. Effect of Various “Anti-browning Agents on Phenolic Compounds Profile of Fresh Lettuce (*L. sativa*)”, *Food Chemistry*, (accepted)

ALTUNKAYA A., Becker, E.M., Gökmen, V., Skibsted, L.H. “Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce”, *Food Chemistry*, 115(1), 163-168, 2009.

ALTUNKAYA A., Gökmen, V. “Effect of various inhibitors on enzymatic browning, phenol content and total antioxidant activity of fresh lettuce (*L.sativa*)”, *Food Chemistry*, 107(3), 1173-1179,2008.

ALTUNKAYA A., Çelik S., Köksel, H., Yalçın, E. “Effects of genotype and environment on malt β -glucanase activity”, *Journal of The Institute of Brewing*, 107(1), 27-30,2001.

8. YAYINA HAZIRLANMIŐ MAKALELER

ALTUNKAYA A., Gökmen, V. “Partial Purification and Characterization of Polypenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Fresh-cut Lettuce (*L.Sativa*)”, *Food Research International*

ALTUNKAYA A., Becker, E.M., Gökmen, V., Skibsted, L.H. “pH dependent antioxidant activity of lettuce(*L.sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

9. ULUSLAR ARASI TOPLANTILAR:

Euro Food Chem XV, July 5-8, 2009 Copeenhagen, Denmark.

International scientific Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, June 9-11, 2009, Zilina, Slovakia

2nd International Congress on Functional Foods and Nutraceuticals, May 4-6, 2006, İstanbul, Turkey

Blacksea and Central Asian Symposium on Food Technology, Ankara, Turkey, October12-16 ,2000.

10. BİLDİRİLER

Uluslar arası:

ALTUNKAYA, A., Becker, E.M., Gökmen, V., Skibsted, L.H. Interaction of various antioxidants with lettuce extract (*L.sativa*) in a liposom system” Euro Food Chem Congress, Copenhagen, Denmark, July 3-5,2009-**Sözlü Sunum** .

ALTUNKAYA, A., Gökmen, V. Effect of Various “Anti-browning Agents on Phenolic Compounds Profile of Fresh Lettuce (*L. sativa*)”, International scientific Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, June 9-11, 2009, Zilina, Slovakia

ALTUNKAYA, A., Gökmen, V., Effects of oxidative enzymes on natural antioxidant compounds in lettuce. 2nd International Congress on Functional Foods and Nutraceuticals, İstanbul,Turkey, May 4-6,2006.

ALTUNKAYA, A., Çelik S., Köksel, H., Yalçın, E, Malt α -glucanase activities of barleys grown in two different locations in Turkey, Food 2000 Blacksea and Central Asian Symposium on Food Technology, Ankara, Turkey, October12-16 ,2000.

11. TAMAMLANMIŞ PROJE:

“Meyve ve sebzelerde bulunan oksidatif enzimlerin antioksidan kapasite ve antioksidan madeler üzerin etkilerinin belirlenmesi” AŞKIN Oya (Yrd. Doç.Dr.) 100. Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar birimi, ZF-2003-001 (yardımcı araştırmacı)

12. POST-DOC PROJESİ

Kopenhag Üniversitesi işbirliği ile.

13. EDITORIAL BOARD

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Journal of Food Biochemistry

Plant Foods For Human Nutrition

Food Technology and Biotechnology

14. DİĞER AKTİVİTELER

Food Summer School programme- Technical University of Denmark Ağustos-
Ekim 2007