

149894

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDEKİ ANTIOKSİDAN MADDE
MİKTARININ BELİRLENMESİ VE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAHİT GENÇER
149894

Balıkesir, Ağustos-2004

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**FARKLI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDEKİ ANTIOKSİDAN MADDE
MİKTARININ BELİRLENMESİ VE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAHİT GENÇER

**Bu tez Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir.**

Balıkesir, Ağustos-2004

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDEKİ ANTIOKSİDANT MADDE
MİKTARININ BELİRLENMESİ VE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAHİT GENÇER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 03.08.2004

Jüri Üyeleri: Prof.Dr. Oktay ARSLAN

Yrd.Doç.Dr.Feray KÖÇKAR

Yrd.Doç.Dr.Turgut KILIÇ

Balıkesir, Ağustos-2004

ÖZET

FARKLI ZEYİN ÇEŞİTLERİNDEKİ ANTIOKSİDAN MADDE MİKTARININ BELİRLENMESİ VE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nahit GENÇER

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi /Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Balıkesir, 2004

Bu çalışmada 5 farklı zeytin çeşitinden elde edilen yağlardaki α -tokoferol, kafeik asit, ferulik asit ve tirozol gibi antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşiklerin miktarları HPLC ile tayin edilmiş ve bu bileşiklerin en fazla uslu zeytin çeşidinde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca söz konusu zeytinlerdeki enzimatik kararmanın başlıca sorumlusu olan polifenol oksidaz (PPO) enziminin kinetik özellikleri araştırılmıştır. Katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri Linewear-Burk yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek katalitik aktiviteye sahip zeytin çeşitinin uslu zeytini olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda herbir zeytin çeşitindeki polifenol oksidaz enziminin katekol substratı kullanılarak optimum pH değerleri tespit edilmiştir. Domat zeytini PPO için optimum pH 7.0 bulunurken, uslu, kiraz, gemlik ve edremit çeşitleri için bu değer 6.5 olarak saptanmıştır.

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliği için farklı sıcaklıklarda (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, ve 80°C) aktiviteler ölçülmüş ve zamana karşı enzimin koruduğu yüzde aktivite değerleri tespit edilmiştir. Termal kararlılığı en yüksek PPO edremit zeytinde bulunmuştur. Denatürasyon çalışmasında kullanılan enzim çözeltileri ilgili sıcaklıklarda bekletildikten sonra 22°C'ye soğutularak

renatürasyon özellikleri araştırılmıştır. Her bir zeytindeki PPO, 40 ve 50 °C'lerde renatüre olurken bu sıcaklığın üzerinde renatürasyon gözlenmemiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Zeytin, antioksidanlar, polifenol oksidaz



ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AMOUNTS IN VARIOUS OLIVE CULTIVARS WITH REGARD TO POLYPHENOL OXIDASE LEVELS

NAHİT GENÇER

Balıkesir University , Institute of Science, Department of Chemistry

(M.Sc. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Balıkesir, Turkey, 2004

In this study, levels of phenolics that have antioxidant activity, such as α -tocopherol, caffeic acid, ferulic acid, and tyrosol from oil of five different olive cultivars, have been determined using HPLC. The cultivar called "uslu zeytin" has been found to contain the highest levels of these compounds. The biochemical properties of polyphenol oxidase (PPO) which is known to be the primary reason for enzymatic browning, has also been investigated. For catecol, K_M and V_{max} values were calculated using Lineweaver-Burk plot. The uslu cultivar were also determined to have the highest activity.

The optimum pH values of PPO activity for catecol in each olive cultivar were determined as 7.0 for domat cultivar, and 6.5 for uslu, kiraz, gemlik and edremit cultivars.

For heat effect on denaturation of PPO, activity measurements at different temperatures were performed, and the percent activity levels with time have been determined. Heat resistance was found to be highest in edremit cultivar. Renaturation properties of PPO have been determined by cooling the solutions to 22°C after holding them at high temperatures (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, ve 80°C). PPO in all cultivars renatured at 40-50°C while no renaturation occurred at temperatures above 50°C.

KEY WORDS: Olive, antioxidants, polyphenol oxidase.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iv
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin ve Zeytin Yağı	3
1.2 Zeytin yağındaki Fenol Bileşikleri	6
1.3 Antioksidanlar	8
1.3.1 Zeytin yağındaki Antioksidanlar	10
1.3.1.1 Tokoferoller	10
1.3.1.2. Ferulik Asit	12
1.3.1.3. Kafeik asit	13
1.3.1.4. Tirozol	14
1.4 Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Etkileri	14
1.5 Enzimatik Kararma	14
1.5.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyası	16
1.5.1.1 Adlandırılması	16
1.5.1.2 Tabiattaki Dağılımı	17
1.5.1.3 Katalizlediği Reaksiyonlar	17
1.5.1.4 Substratları	18
1.5.2 Enzimin Ekstraksiyonu	21
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	23
2.1 MATERYALLER	23
2.1.1 Kullanılan Bitkisel Materyal	23
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.1.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar	23
2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	24
2.2 YÖNTEMLER	25
2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması	25
2.2.2 PPO Enziminin Aktivite Tayini	26
2.2.3 PPO Enzimi İle ilgili Kinetik Çalışmalar	26
2.2.4 Enzimin Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi	26
2.2.5 Enzimin Karakterizasyonu ve Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	27
2.2.6 PPO'nun Sıcaklığa Bağımlı Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması	27
2.2.7 Zeytinlerden Yağ Eldesi	28

2.2.8 Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	28
2.2.9 Tokoferollerin Ekstraksiyonu	28
2.2.10 HPLC Analizi	29
3. BULGULAR	31
3.1 DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO Enzimlerinin Optimum pH Tayini	31
3.2 DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilite Özelliğinin Araştırılması	37
3.3. HPLC ile Antioksidan Maddelerin Miktar Tayinleri	61
3.3.1 Tirozol, Kafeik asit, Ferulik asit ve Tokoferol İçin Standart Eğriler ve Elde Edilen Kromatogramlar	61
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
5. KAYNAKLAR	85



SEMBOL LİSTESİ

Sembol	Adı
PPO	Polifenol oksidaz enzimi
DZPPO	Domat zeytini polifenol oksidaz enzimi
EZPPO	Edremit zeytini polifenol oksidaz enzimi
GZPPO	Gemlik zeytini polifenol oksidaz enzimi
KZPPO	Kiraz zeytini polifenol oksidaz enzimi
UZPPO	Uslu zeytini polifenol oksidaz enzimi
E.C.	Enzim kod numarası
U	Enzim Ünitesi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Fenolik antioksidan radikallerinin rezonans kararlılığı	10
Şekil 1.2	Melanin pigmentlerinin oluşum mekanizması	16
Şekil 1.3	Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi	17
Şekil 1.4	Tirozölün polifenol oksidaz enzimi ile katalizi	18
Şekil 3.1	DZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği	32
Şekil 3.2	EZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği	33
Şekil 3.3	GZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği	34
Şekil 3.4	KZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği	35
Şekil 3.5	UZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği	36
Şekil 3.6	DZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	40
Şekil 3.7	DZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı %aktivite grafiği	40
Şekil 3.8	EZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	43
Şekil 3.9	EZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	43
Şekil 3.10	GZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	46
Şekil 3.11	GZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	46
Şekil 3.12	KZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	49
Şekil 3.13	KZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	49
Şekil 3.14	UZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	52
Şekil 3.15	UZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	52
Şekil 3.16	DZPPO enzimi için Lineweaver-Burk grafiği	55

Şekil 3.17	EZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği	55
Şekil 3.18	GZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği	58
Şekil 3.19	KZPPO için Linewear-Burk Grafiği	58
Şekil 3.20	UZPPO için Linewear-Burk Grafiği	60
Şekil 3.21	Tirosol standartları için HPLC kromatogramı	62
Şekil 3.22	Tirozol için hazırlanan standart eğri	63
Şekil 3.23	Kafeik asit standartları için HPLC kromatogramı	64
Şekil 3.24	Kafeik asit için hazırlanan standart eğri	65
Şekil 3.25	Ferulik asit standartları için HPLC kromatogramı	66
Şekil 3.26	Ferulik asit için hazırlanan standart eğri	67
Şekil 3.27	Tokoferol standartları için HPLC kromatogramı	68
Şekil 3.28	Tokoferol için hazırlanan standart eğri	69
Şekil 3.29	Domat zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı	70
Şekil 3.30	Edremit zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı	71
Şekil 3.31	Gemlik zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı	72
Şekil 3.32	Kiraz zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı	73
Şekil 3.33	Uslu zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı	74
Şekil 3.34	Domat zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı	75
Şekil 3.35	Edremit zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı	76
Şekil 3.36	Gemlik zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı	77
Şekil 3.37	Kiraz zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı	78
Şekil 3.38	Uslu zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı	79

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Zeytin yağının yağ asitleri bileşimi	4
Çizelge 1.2	Zeytin yağı bileşenleri	5
Çizelge 3.1	DZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	32
Çizelge 3.2	EZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	33
Çizelge 3.3	GZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	34
Çizelge 3.4	KZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	35
Çizelge 3.5	UZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	36
Çizelge 3.6	DPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları	38
Çizelge 3.7	DZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları	39
Çizelge 3.8	EZPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları	41
Çizelge 3.9	EZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları	42
Çizelge 3.10	GZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları	44

Çizelge 3.11	GZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları	45
Çizelge 3.12	KZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları	47
Çizelge 3.13	KZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları	48
Çizelge 3.14	UZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları	50
Çizelge 3.15	UZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları	51
Çizelge 3.16	DZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M v V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltileri hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	53
Çizelge 3.17	EZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	54
Çizelge 3.18	GZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M v V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltileri hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[s]$ değerleri	56
Çizelge 3.19	KZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M v V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltileri hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[s]$ değerleri	57
Çizelge 3.20	UZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M v V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltileri hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	59
Çizelge 3.21	Her bir zeytin türü PPO enzimi için elde edilen sonuçlar	60
Çizelge 3.22	Hazırlanan standart bileşiklerin geliş zamanı v konsantrasyonları	61
Çizelge 3.23	Herbir zeytin türündeki antioksidanların mg/kg cinsinde değerleri	80

ÖNSÖZ

Araştırma görevlisi olarak göreve başladığım andan itibaren çalışmalarında her sorunumla ilgilenen, bilimsel deneyimleriyle yönlendiren, çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof.Dr. Oktay ARSLAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarında karşılaştığım problemlerimi paylaşan, destek olan , yazımda büyük emeği geçen, deneyimlerinden en çok yararlandığım ve yardımını gördüğüm arkadaşım Arş. Gör. Selma SİNAN 'a teşekkür gönül borcumdur.

Bu tez Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu 2004/15 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, zeytinlerden yağ çıkarmada makinelerini kullandığımız Zeytincilik Araştırma Enstitüsüne teşekkür ederim.

Son olarak bana her şeyin başarılabilir olduğuna inandıran ve her zaman bana destek olan aileme, özellikle zeytinleri gönderen sevgili babam Nizamettin GENÇER'e sonsuz teşekkürler.

Balıkesir, 2004

Nahit GENÇER

1. GİRİŞ

Son yıllarda katkısız ve sağlıklı ürünlere duyulan ilgi giderek artmaktadır. İnsanlar, gıda üretiminde ve dağıtımındaki modern metotları sorgulamaya başlamıştır. Popülaritesi artan organik gıdaların besinsel, tatsal ve sağlığa faydalarının farkına varılmıştır. Organik bir besin olan zeytin ve zeytin yağı, insanlık tarihinin başlangıcından bu güne kadar insanların beslenme rejimlerindeki önemini korumuş, günümüzde kaliteli ve lezzetli bir besin kaynağı olarak önemini sürdürmektedir [1].

Zeytinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri türlerine, yetiştiği toprağa, coğrafi alanına bağlıdır. Bitkinin yaşı, karakteristik türü, iklim şartları, yetiştiği yer, genel coğrafi alan ve toprakta bulunan organik ve inorganik bileşikler zeytinlerin ve zeytin yağının kalitesinde çok etkilidir. Ayrıca olgunlaşma derecesi de zeytinlerin kimyasal bileşiminde direkt bir etkiye sahiptir [2].

Son yıllarda zeytin yağının faydalı özelliklerini tanımlayan çalışmalar dikkate değer bir artış göstermiştir. Daha önceki görüşlerin yanında zeytin yağının bileşiminin kaderini etkileyen yapılmış sayısız çalışmalarda zeytin yağının daha sağlıklı bileşimlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Zeytin yağı tüketiminin bazı kanser türlerinin ve kronik damar rahatsızlıklarının olma olasılığını azalttığı tahmin edilmektedir. Yunanistan, İtalya ve İspanya'da kronik damar rahatsızlıklarının, prostat ve kolon kanserinin görülme olasılığının düşük olma nedeninin Akdeniz diyeti ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Akdeniz diyeti tabii olarak vejetaryendir ve zeytin yağı vücuttaki yağın başlıca kaynağıdır [3].

İyi kaliteli zeytinlerden üretilen saf zeytin yağı rafine edilmeden tüketilir. Bu yüzden saf zeytin yağı diğer sebze yağlarından rafinasyon basamakları sırasında genellikle uzaklaşan fenolik bileşikler içerir [4].

Fenolik bileşiklerin ; duyuşal kaliteye olan etkilerinin yanında faydalı biyolojik aktiviteye ve zeytin yağının oksidatif dengesinin korunmasında büyük bir öneme sahiptir [5]. Bu nedenle fenolik bileşikler antioksidan özellik gösterirler.

Antioksidan özellikteki fenolik bileşiklerin, yağ moleküllerini saran oksidatif sıra içinde farklı seviyelerde bulunduğu bilinir. Bitkisel gıdalar önemli doğal antioksidanları içermeleri, vücutta biyolojik olarak zararlı oksidasyon reaksiyonlarını inhibe etmeleri ve kanseri önleyici ajanlar olarak etki göstermeleri yüzünden daha fazla ilgi çekmektedir [6].

Çoğu bitkilerde, fenolik bileşikler oksijen varlığında kinonlara polifenol oksidaz , PPO (EC 1.14.18.1), enzimi ile yükseltgenir. Bu bileşikler daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlarla koyu renkli pigmentlere dönüştür. Bu olaya enzimatik kararma denir [7,8].

Enzimatik kararma bazı ürünlerde üretim ve tüketim için ekonomik bir problemdir. Oksidasyondan daha da önemlisi, bu olayın kurbanı antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerin olmasıdır. Bu bileşiklerin gıdalardaki konsantrasyonu son derece önemlidir. Bitkilerde organik madde kompozisyonu oldukça değişkendir. Bu bileşiklerin bitkilerdeki kompozisyonunun belirlenmesi besin değeri açısından çok önemlidir. Bitki dokularında kararma, antioksidan özelliğindeki fenolik bileşikler uzaklaştırdığı için besin değerini düşürür [9,10,10].

Fenolik maddeler antioksidan özelliği ile insan vücudunda oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirdikleri için oldukça önemlidirler. Bu maddelerin PPO enzimi ile yok olmaları önlenirse bitkilerin antioksidan kapasiteleri artacaktır.

Bu çalışmada ülkemizde sıkça tüketilen farklı zeytin türlerindeki PPO enziminin kinetik özellikleri incelenecektir. Ayrıca bu zeytinlerden elde edilen yağlardaki bazı önemli antioksidan maddelerin konsantrasyonları tespit edilecektir. Bu şekilde en yüksek antioksidan madde içeren zeytin türü saptanacaktır.

Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir:

- ◆ Her bir zeytin ekstraktındaki enzimin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) belirlenecektir.
- ◆ Her bir türdeki enzimlerin aktivitesi üzerine pH ve sıcaklık etkisi araştırılacaktır.
- ◆ Söz konusu zeytin türlerinden elde edilen yağlardaki α -tokoferol, ferulik asit, kafeik asit ve tirozol antioksidanlarının konsantrasyonları HPLC ile saptanacaktır.
- ◆ Her bir türdeki antioksidan madde miktarı ile PPO'nun aktivitesi arasındaki korelasyon incelenecektir.

1.1 Zeytin ve Zeytin Yağı

Zeytin (*Olea europea L.(Oleaceae)*) gıda olarak, zeytin yağının eldesin de ve yenilebilir meyveleri için yetiştirilmektedir [12].

Zeytin, halk arasında yaprakları sıtma gibi ateşli hastalıklar için kullanılan şifalı bir bitkidir. Yapılan alışmalar, zeytin yaprağı ekstraktının hayvanlarda kan basıncını dűřüren etkiye sahip olduğunu [13] ve kalp damarlarında kanın akışını arttırdığını, kas ağrılarını önlediğini göstermektedir [14].

Zeytin yağı, ham maddesi zeytin olan doğal bir üründür. Zeytin yağı, zeytin ağacının olgun meyvelerinden sıkılmak sureti ile elde edilen oda sıcaklığında (20-25 C) sıvı olan ve yemeklik olarak kullanılan yağdır. Zeytin yağı, iyi kalitede taze, olgun meyveden presleme, santrifüjleme ve süzme ile mekanik olarak elde edilmektedir.

Zeytin yağı, kalori değerı yüksek, esansiyel yağ asitlerinin kaynağı ve yağda özünen A,D,E,K vitaminlerinin deposudur. Zeytin yağının yağ asitleri bileşimi izelge 1.1'de verilmiştir. Zeytin yağındaki trigliseritleri oluşturan temel yağ asitleri

oleik, palmitik, linoleik, stearik ve palmitoleik asitlerdir, bununla birlikte çok az miktarda linolenik, araşidik, behenik, lignoserik ve eikosenik yağ asitleri de zeytin yağının bünyesinde bulunmaktadır. Zeytin yağının kompozisyonu çizelge 1.2’de verilmiştir. [15].

Çizelge 1.1 Zeytin yağının yağ asitleri bileşimi

ASİT	KS	İzomerler	MA	AD	SD	ID
Palmitik	16:0		256,4	218,8	208,5	0,00
Palmitoleik	16:1	<i>Cis</i>	254,4	220,5	210,1	99,78
Stearik	18:0		284,5	197,2	188,8	0,00
Oleik	18:1	<i>Cis</i>	282,4	198,6	190,1	89,87
Linoleik	18:2	<i>Cis-cis</i>	280,4	200,0	191,4	181,04
Linolenik	18:3	<i>cis-cis-cis</i>	278,4	201,5	192,7	273,52
Araşidik	20:0		312,5	179,5	172,5	0,00
Eikosenoik	20:1	<i>cis</i>	310,4	180,7	173,6	81,75
Behenik	22:0		340,6	164,7	158,8	0,00
Lignoserik	24:0		368,6	152,2	147,1	0,00

KS=Karbon sayısı; AD=Asit değeri; MA=Molekül ağırlığı;
ID=İyot değeri; SD=Sabunlaşma değeri

Çizelge 1.2 Zeytin yağı bileşenleri

Ana Bileşenler (% 99) Sabunlaşan Maddeler	Yan Bileşenler (% 1) Sabunlaşmayan Maddeler
Yağ Asitleri Oleik Asit (% 56 - 83) Linoleik Asit (% 3,5 - 20) Palmetik Asit (% 7,5 - 20) Stearik Asit (% 0,5 - 5,0) Linolenik Asit (% <1,5)	Alfa Tokoferol (Vit E) (12-150mg/kg)
Gliseridler OOO, POO, OOL, POL, SOO	Steroller (180-260 mg/ 100 g yağ) Beta- Sitosterol (% 96) Kampasterol (%3) Stigmasterol (% 1)
	Fenolik Bileşikler (30-50 mg/ kg) Tirozol ve Hidroksitirozol
	Hidrokarbonlar (mg / 100 g yağ) Squalen (136 - 708) Beta – Karoten (3 - 36)
	Triterpenik Alkoller (225 mg / 100 gr yağ) Siklo – Artenol
	Alifatik Alkoller (290 mg / 100 gr yağ)
	Fosfolipidler (40 – 135 mg / kg)
	Aroma Bileşenleri (250 – 500 mg / kg)
	Renk Vericiler Klorofiller (1- 10 mg / kg) Feofitinler (0,2-24 mg /kg)

Akdeniz diyeti olan zeytin ve zeytin yağı sağlık ve besinsel değeri ile daha duyarlı tüketiciler sayesinde dünyanın her yerinde değer kazanmıştır. Plazma lipit/lipoprotein oranını düzenleyen oleik asit ve antioksidan madde içeriği, zeytin yağının popüleritesinin artmasında ana nedenlerdir [16,17].

Akdeniz ülkelerinde, kolon kanseri ve kalp hastalıklarına Kuzey Avrupa ülkelerine göre daha az rastlandığı bilinmektedir. Buna ilaveten Fransa'da kanserden ölümlerde kuzey ve güney bölgeleri arasında dikkate değer bir fark vardır. Güneydeki Herault bölgesinde, Kuzeydeki Bas-Rhin ve Haut-Rhin bölgelerine göre kolon kanserine yakalanma oranının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni doymuş yağların az tüketimi, saf zeytinyağların, daha yüksek miktarda rafine olmamış karbohidratların, diğer potansiyel koruyucu gıdaların, vitaminler ve minerallerin birleşiminin fazla tüketilmesi olarak açıklanabilir. Ayrıca sözü edilen farklar her bir şehrin yanında bulunan komşu ülkelerden kaynaklanmaktadır [18].

Zeytin yağı tüketiminden sonra, hayvanlarda ve insanlardaki kanser oranının az olması hakkında birçok araştırma vardır. Lipworth ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda zeytin yağının diğer yağlara göre kanser riskini azalttığı sonucuna varılmıştır [19].

Zeytin yağı kompozisyonu başlıca triaçilgliserol ve %0,5-%1,0 gliserid olmayan bileşenlerden oluşur. Zeytin yağı aynı zamanda, yağı oksidatif bozunma ile oluşan ekşiliğe karşı koruyan en az 30 fenolik bileşiği içerir. Saf zeytin yağının oksidatif kararlılığı ile fenolik bileşikler arasında doğrudan bir ilişkinin var olduğu bulunmuştur. Zeytin yağının fenolik bileşenleri bir çok faktöre, temel olarak yağ stoku ve ürün saflaştırmasına bağlıdır. Saf zeytin yağındaki toplam fenol bileşeni, rafine zeytin yağındakinden daha fazladır [20].

1.2 Zeytin yağındaki Fenol Bileşikleri

Saf zeytin yağı, 50 ile 1000 mg/kg arasında basit ve kompleks fenol bileşikleri içerir [21]. Bu bileşiklerin göreceli oranları; meyvenin tür, bölge, olgunluk derecesi, ekstraksiyon prosedürü gibi bir çok faktöre bağlıdır [22]. Saf zeytin yağının besleyici ve kalite değeri açısından bu bileşiklerin miktarı kadar türü de son derece önemlidir [23].

Gıdalarda biyoaktif bileşenlerinden daha ziyade doğal antioksidanlara karşı ilgi her geçen gün artmaktadır. Meyve ve sebzelerdeki zengin diyetlerin bazı kanserlere ve kalp hastalıklarına karşı koruma etkileri onların antioksidan içeriğine özellikle de fenolik bileşiklere bağlıdır [24].

Yapılan çalışmalar bu fenolik bileşiklerin hücre dışı ortamda kuvvetli bir LDL oksidasyon inhibitörü olduğunu göstermiştir [25,26]. Hücre içi LDL oksidasyonu, kronik damar rahatsızlıklarının ilerlemesini arttıran, atheroselotik hastalıkların dizilişi ile bağlantılıdır [27.]

Zeytin meyvesindeki polifenoller ile ilgili ilk çalışma Vazquez tarafından yapılmıştır [28]. Zeytin yağındaki toplam fenol bileşeni hakkında literatürde bir çok çalışma yapılmıştır. Bununla beraber bulunan sonuçlarda tutarsızlıklar vardır. Bunun sebebi genellikle toplam fenol bileşimini belirlemeye yarayan iki yöntemin hataları olabilir. Bu yöntemler; UV analizlerini takip eden Folin-Ciocalteau belirteci (fenoller için spesifik değildir) ve yağın ekstraksiyonu ile HPLC analizidir (ekstraksiyon prosedürünün ve fenolik bileşenlerinin ayrılması güçlüğüne getirdiği sınırlamalar) [29].

Zeytin yağı; tokoferoller, karotenoidler, steroller ve fenolik bileşikler gibi doğal antioksidanları içerir. Fenolik bileşikler arasında Ferulik asit, kafeik asit, gallik asit, p-kumarik asit, syringik asit, homovanilik asit, protokatekeik asit, hidroksitirozol ve tirozol en çok bulunur [21,30]. Bu bileşikleri içermesinden dolayı zeytin yağı diğer sebze yağlarına göre yemek için daha uygun ve de depolama sırasında daha dayanıklıdır [31]. Zeytin yağının depolanması sırasında oksidatif kararlılığa fenolik bileşikler ile tokoferollerin etkisi incelendiğinde; fenolik bileşiklerin etkisinin daha fazla olduğu bulunmuştur [32,33]. Saf zeytin yağında α -tokoferol toplam tokoferolün %95 'ini oluşturur [34]. Hem fenoller hem de tokoferoller yağın kararlılığına dikkate değer bir katkıda bulunurlar [35]. α -tokoferol ve oleuropein gibi fenolik bileşikler yararlı biyolojik aktiviteye sahip oldukları için incelenmiştir [25]. Bu bileşiklerin izolasyonu ve miktarının tayini bu yüzden büyük öneme sahiptir [4].

1.3 Antioksidanlar

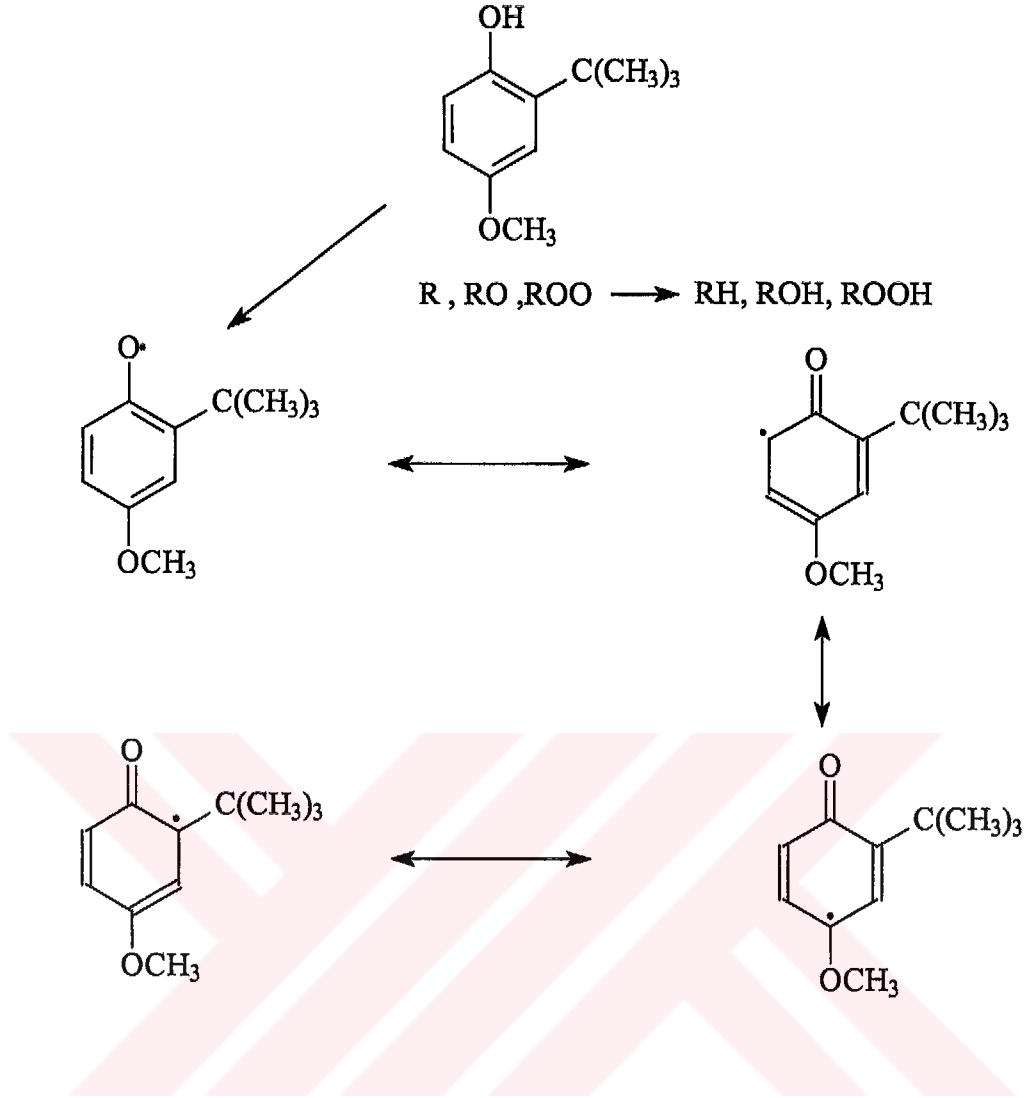
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “Antioksidan Savunma Sistemleri” veya kısaca “Antioksidanlar” olarak bilinir. Antioksidanlar, oksidasyon zincir reaksiyonlarını önleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler [36]. Vücuda dışarıdan alınan E ve C vitaminleri, selenyum gibi mineraller, karotenoidler, polifenoller ve vücudumuzda doğal olarak bulunan, süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksiksidaz (GSH_PX), glutatyon disülfid redüktaz, glutatyon-S tranferaz, metiyonin sülfoksit redüktaz, peroksiksidaz gibi enzimler antioksidan olarak görev yaparlar [37].

Antioksidanlar, oksidatif stresle oluşan ve serbest radikaller olarak adlandırılan zararlı moleküllere karşı koruyucu etkiye sahiptirler. Serbest radikaller hem vücudun için de hem de vücudun dışındaki etmenler tarafında meydana gelir. Oksijenli solunum, metabolizma ve enfeksiyon gibi vücut içinden kaynaklanan olayların yanında; sigara, alkol, x-ışınları, güneş ışını ve kirlilik gibi dış kaynaklı çevresel faktörlerin etkisi ile de serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir [38]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), alkil radikali ($R\cdot$), alkoksil radikali ($RO\cdot$) ve peroksil radikali ($ROO\cdot$)’dir [39].

Serbest radikaller oldukça reaktif maddelerdir. Hem redüktan hem de oksidan olarak ve bazen her iki etkiyi birlikte göstererek, hücre hasarına neden olurlar. Serbest radikaller, savunma mekanizmasının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. DNA içindeki bazların modifikasyonuna ve proteinlerin $-SH$ gruplarının $-S-S$ gruplarının oksidasyonu ile kanserojenik ve mutajenik olaylara ve biyolojik aktivitenin kaybına neden olmaktadır. Karbohidratlar üzerine etkiyerek monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana

gelir. Okzaldehydler DNA, RNA ve proteinlere bağlanma özelliklerinden dolayı kansere neden olabilirler. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. H₂O₂ hücre zarından kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir [40]. Bununla beraber en önemli kalıcı zarar hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonudur. Membran lipitlerinin peroksidasyonu, lipitleri daha az hidrofobik yapar ve buda zarın akışkanlığını, esnekliğini ve transport özelliğini etkiler. Lipit peroksidasyonu oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [41].

Gıdalardan sürekli olarak almamız gereken antioksidanlar, serbest radikallerin meydana getirdiği bu tip hasarları kendilerini feda ederek önlerler. Antioksidanlar şekil 1'de kısaca gösterildiği gibi serbest radikallerden bir elektron alarak kendileri yükseltgenirler. Böylece serbest radikalleri nötralize etmesi ile oluşan fenolik radikaller rezonans kararlılığına sahiptir [37].

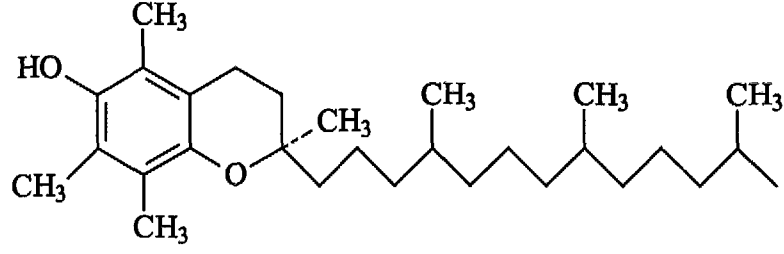


Şekil 1. 3. Fenolik antioksidan radikallerinin rezonans kararlılığı (37)

1.3.1 Zeytin yağındaki Antioksidanlar

1.3.1.1 Tokoferoller:

E vitamini hücre membranlarında bulunan en büyük zincir kıran antioksidandır. Aşırı derecede düşük konsantrasyonda olmasına rağmen, kalp hastalıkları, kanser, katarakt ve sinir hastalıkları gibi rahatsızlıkların gelişmesini önlemede çok etkilidir. Vitamin E; tokoferol ve tokotrienol türevlerinin genel bir adıdır ve bu bileşikler E vitamininin aktivitesine sahiptir. Bu yüzden, gösterdikleri aktiviteler yukarıda söz edilen hastalıklarda antioksidan etkilerinin olduğunu ispatlamak için oldukça önemlidir [42].



α -tokoferol

Tokoferolün farklı izomerlerinin lipoproteinler ile taşınmasının yada bağırsaklarda emiliminin eşit olmadığı son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Ayrıca belli dokular tarafından da eşit olarak alınmazlar [43].

Apolar bir yapıya sahip olmalarından dolayı yağda çözünen yani lipit fazında bulunan tokoferoller, hücre membranlarının doğal yapıtaşlarıdır [44].

Tokoferoller; hücre membranı içindeki doymamış yağ asitlerini ve LDL'nin okside olmasını önlerken kalp hastalıklarının azalmasında, alzaimer hastalığını geciktirmede ve kanserin önlenmesinde çok fazla etkiye sahiptir [45].

Tokoferollerin antioksidan mekanizması, aromatik halkada bulunan 6-hidroksil grubundaki bir hidrojen atomunu singlet oksijen ve diğer reaktif tür oksijen içeren serbest radikallere transfer ederek onları etkisiz hale getirmesinden oluşmaktadır. Tokoferoller, vücutta bulunan antioksidan etkiye sahip olan askorbik asitlerinde tekrar rejenere olmasını sağlar. Tokoferolün uzun hidrokarbon zinciri membran ikili tabaka arasına girerken aktif kroman halka membran yüzeyine sıkı bir şekilde tutunur. Antioksidan etkilerini gerçekleştirebilmek için mebranda ancak bu şekilde yer alır [46].

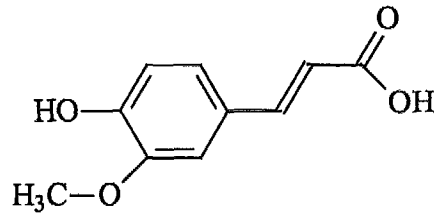
Protein bağlı α -tokoferolün toksik tutucularda bulunabileceği ortaya çıkmıştır. Belli bir süre sonra şilomikron artıkları ile karaciğere dönen α -tokoferol hücresel bağlı proteinlere spesifik bir şekilde bağlanır [47]. Vitamin E'nin farklı formları hücre membranında farklı derecelerde antioksidan etki gösterir α -tokoferol en çok bulunan, vücutta en yüksek canlı potansiyeline ve en kuvvetli etkiye sahip

izomerdir. Bu izomer, yağda çözülebildiği için hücre membranının yapısının çoğunu oluşturan yağ asitlerinin serbest radikaller ile zarar görmesini önleyen tek formudur [48].

Yapılan çalışmaların çoğu E vitamininin kalp hastalıklarındaki rolünü araştırmaya yöneliktir [49]. Egzersiz yaparken meydana gelen serbest radikallerin oluşum mekanizmaları son yıllarda araştırılmıştır [50]. Egzersiz, kaslar için mekaniksel ve morfolojik tehlikeleri yüzünden metal katalizli serbest radikallerin üretimine yada elektron taşıma zincirinde meydana gelen O₂'nin artışına sebep olarak serbest radikallerin üretimini tetikler. Ayrıca egzersiz süresince çok katlanarak çoğalan daha yüksek seviyedeki katekolaminler otooksidasyon prosesi içerisinde potansiyel olarak serbest radikaller üretebilirler [51]. Spin elektron rezonans teknikleri egzersizin kaslarda ve karaciğerdeki serbest radikal üretimine yol açabileceğini göstermiştir [52].

1.3.1.2. Ferulik Asit:

Ferulik asit ilk olarak Ferula foetida regel'den 1866'da izole edilmiş olup fenil propiyonik türevidir. Kendisi ile türevleri bitkilerin hücre duvarlarının lignin formalarını öncüsüdür [53,54]. Ferulik asit çoğu bitkilerin çeşitli sistemleri içerisinde serbest, ester olarak yada eser miktarda lignin tipi formunda kurucu olarak geniş bir şekilde sıralanır. Ferulik asit, antioksidan etkiyi sağlamak için fenolik OH grupları ile serbest radikallere hidrojenler verir. [55]. Ferulik asit lesitine eşdeğer bir antioksidan etkiye sahiptir.



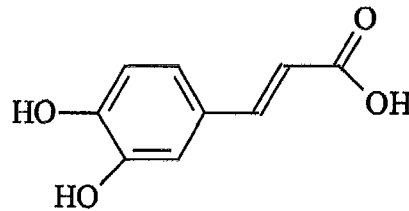
Ferulik asit

Ferulik asit bir aktif oksijeni etkisiz hale getirme fonksiyonuna sahiptir ve bu etki aktif oksijenin toksitesinden canlı vücudu koruyan enzim olarak bilinen superoksit dismutaza benzer bir şekilde olabileceği yayımlanmıştır. Ferulik asitin tirozini engellemesi ile melanin üretiminin durdurduğuna inanılır, çünkü onun kimyasal yapısı tirozine çok benzer [56]. O aynı zamanda zararlı uzun dalga boylu ultraviyole bandları güçlü bir şekilde absorblaması ile ortaya çıkmaktadır [57]. Doğal bir bileşik olan ferulik asidin birçok bulgular tarafından diskolarasyonu önleyici ajan yada antioksidan olarak kullanılmasına başlamak için “ Gıda Katkı Listesi” ’ nde oksidasyon önleyicisi olarak yazılmıştır [58,59].

Ferulik asitin geniş bir uygulama alanı vardır. Radikal ve aktif oksijenleri yok etme etkisine sahip olan ferulik asit, aktif oksijen üretimine sebep olan ultraviyole ışığı absorblar. Uzun dalga boylu ultraviyole ışınları absorblama fonksiyonu onu kullanım alanlarını arttırır. Bu özelliğinden dolayı güneş kremlerin de kullanılır. Kozmetikte beyazlatıcı ajan olarak kullanıldığında çok etkili olduğu görülmüştür [60]. Son yıllarda vitamin E'nin esteri olan ferulik asit melanin üretimini aşırı derecede azalttığı rapor edilmiştir [61].

1.3.1.3. Kafeik asit:

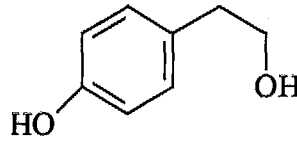
Kafeik asit, zeytinlerin kimyasal oksidasyonu süresince okside olur ve bu sırada ortamda bulunan tirosol, vanilik asit ve p-kumarik asit reaktif değildir [62]. Bu nedenle oksidasyon zeytin yağında da, kafeik asit ve benzer moleküllerin oksidasyonu yüzünden kısmen devam edebilir [63].



Kafeik asit

1.3.1.4. Tirozol:

Tirozol, 4-(2'- Hidroksietil) fenol olarak da bilinir. Bu bileşik zihinsel ve fiziksel yorgunluklarda hafıza kayıplarında yardımcı etkiye sahiptir. Diğer fenolik bileşikler gibi yapısındaki hidroksil grubundan bir hidrojeni serbest radikallere vererek onları etkisiz hale getirir. Bunun sonucunda da kendisi okside olur [64].



Tirosol

1.4 Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Etkileri

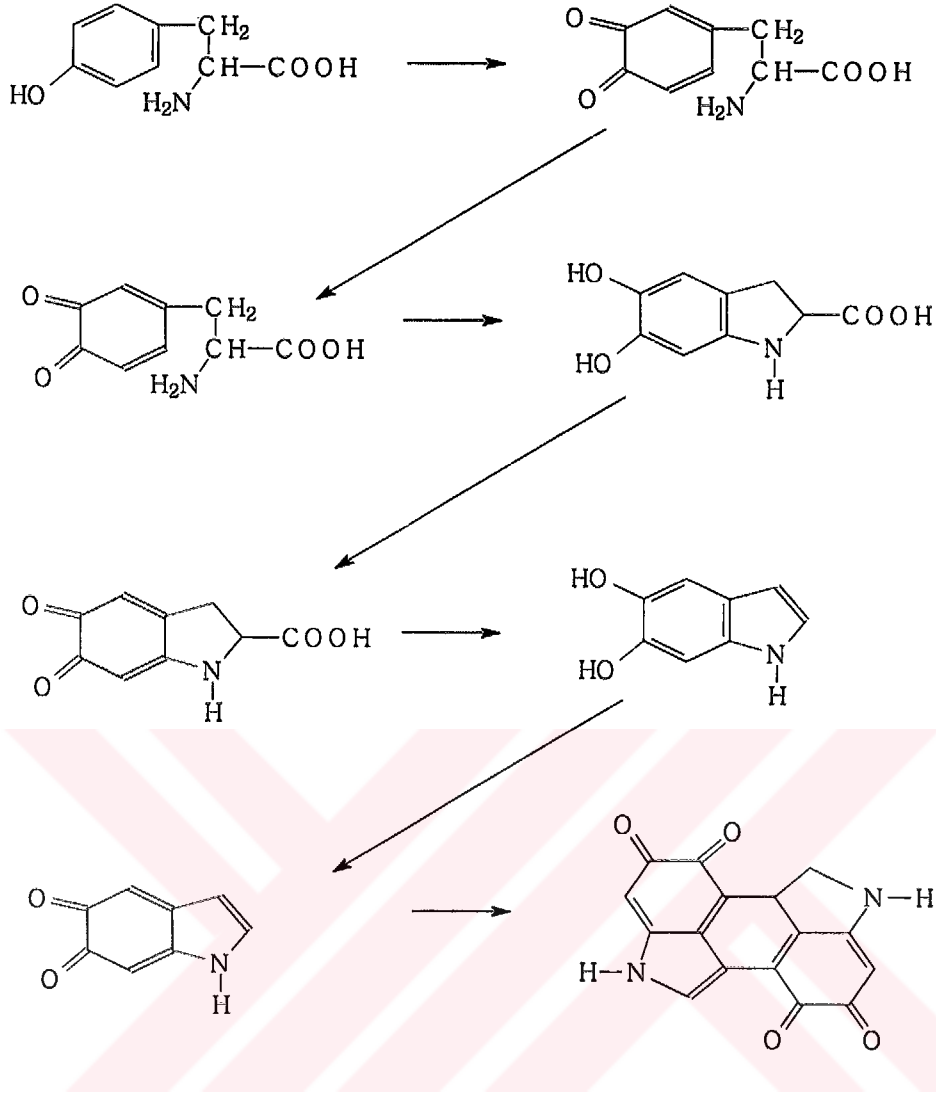
Zeytin yağındaki fenol bileşenlerinin günümüzde ilgi odağı olmasından dolayı, bu bileşiklerin antioksidan özellikleri üzerine yapılan sayısız çalışma bulunmaktadır. Antioksidan aktivitelere sahip ortodifenolik (katekolik) yapıların parçası olan bileşiklerin ve bu yapıyı barındıran zeytin yağında bulunan birçok bileşenin olduğu yaygın olarak bilinir. Hücre dışında zeytin yağının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi ve ayrı bileşenleri birçok yayında incelenmiştir[29].

1.5 Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi siyaha kadar olan farklı tonlardaki bu renk değişimlerine kararma denir. PPO, o-kinonlara yükseltgenen ve daha sonra bitkide bulunan doğal bileşenlere bağlı olarak kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentlere polimerleşen monofenollerin; o-difenollere hidroksilasyonu katalizler [65].

Enzimatik kararırma reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozulmasına sebep olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve bunlar sonra büyük moleküllü bileşiklere polimerize olurlar. İşte, renk bozulmasının esas nedeni esmer renkli olan bu polimerlerdir [66,67].

Enzimatik kararırmanın olabilmesi için polifenol oksidaz enzimi, bunun etkilediği fenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik kararırma; fenolik madde, moleküler oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılmasıyla durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfit ve askorbik asit gibi bazı bileşiklerin ilavesi, ortamın pH'ının değiştirilmesi veya yüksek basınç uygulanması ile nlenebilir [68].



Şekil 1.4 Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması

1.5.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyası

1.5.1.1 Adlandırılması

Enzimin sistematik adı; monofenol L-dopa:oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.1.1) şeklindedir. Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre az kullanılan adları da vardır. Bunlardan bazıları; tirozinaz, kresolaz, fenolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, odifenolaz, pirkatekol oksidaz, dopo oksidaz, monooksidaz, o-difenil oksido redüktaz ve klorafenik oksidazdır [69].

1.5.1.2 Tabiattaki Dağılımı

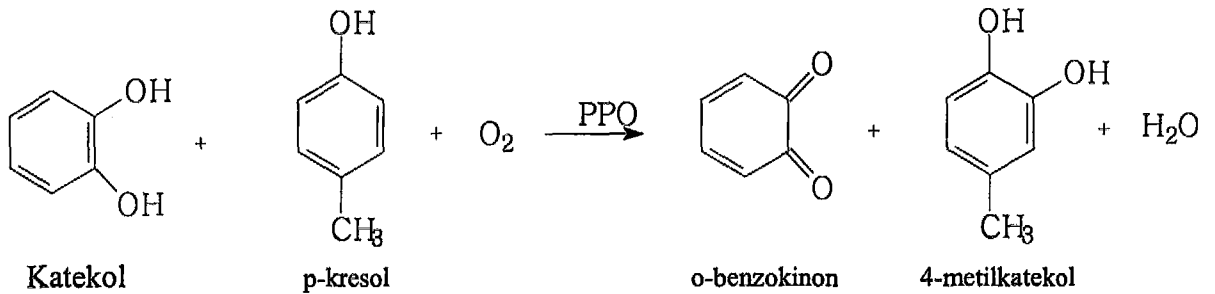
PPO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur [70]. Polifenol oksidaz ve fenoller bitkiler aleminde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalarda özellikle mantarlaada ve bazı hayvansal organizmalarda bulunabilirler [71]. Polifenol oksidaz bitkisel gıdalarda enzimatik esmerleşmeye neden olurken, hayvansal gıdalarda enzimatik esmerleşme söz konusu değildir [72].

1.5.1.3 Katalizlediği Reaksiyonlar

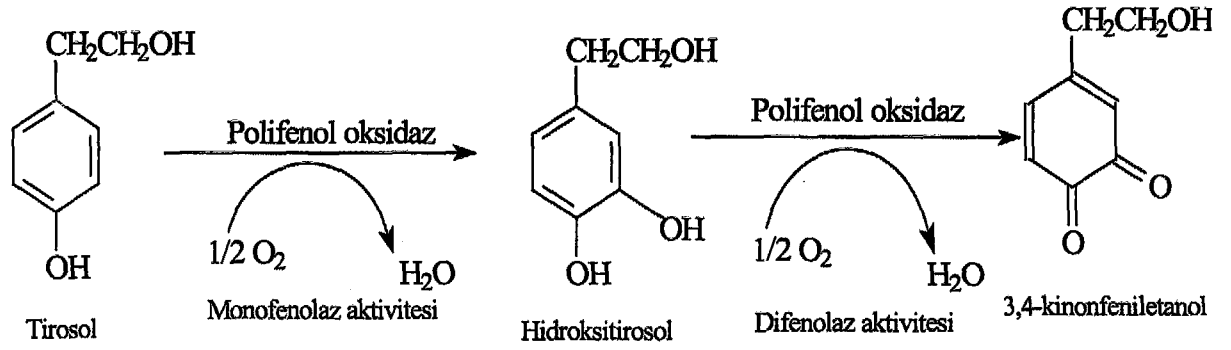
Enzim moleküler oksijen içeren iki farklı oksijen katalizler: Birincisi monofenollerin o-difenollere o-hidroksilasyonunu (kresolaz aktivitesi) ve onu izleyen ikincisi o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi) [73].

Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip olduğu bilinmektedir [74].

PPO enziminin kataliz reaksiyonu Vomos-Vigyazo tarafından önerilen reaksiyon şekil 1.2'de verilmiştir. Ayrıca tirosolün polifenol oksidaz enzimi ile katalizi şekil 1.4'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5 Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi



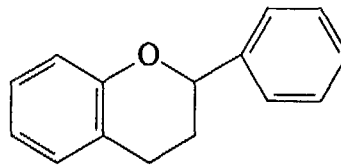
Şekil 1.6 Tirozölün polifenol oksidaz enzimi ile katalizi

1.5.1.4 Substratları

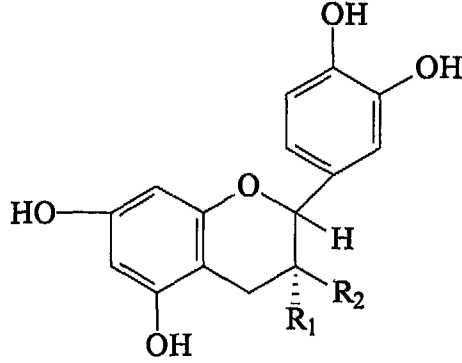
Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerin geniş bir karışımını içerirler. Bununla beraber bunların çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olarak uygundur [75].

Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyon sonucu sebze ve meyvelerde renk bozulmalarına sebep olmalarının yanı sıra, meyvelerin tatlarına da etkileri vardır. Polifenol bileşikler, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına sebep olurlar. Bu bileşiklerden bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden otooksidasyona uğrarlar ve oluşan bileşikler polimerleşerek koyu renkli makro molekülleri oluştururlar [76,77].

Pek çok araştırmacı farklı bitki dokularındaki PPO'ların farklı substrat spesifikliği ve inhibisyon derecesi gösterdiğini bildirmişlerdir [78]. PPO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerler gibi basit fenollerdir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenil alanin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir [79].



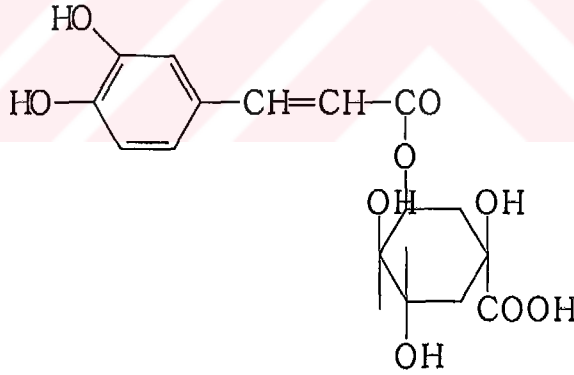
Katekinler flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir. Katekinler doğada (+)-katekin ve onun stereoizomeri olan (-)-epikatekin olarak bulunurlar. Katekinlerin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.



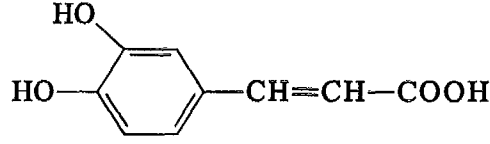
(+)-Katekin (R₁=H, R₂=OH)

(-)-Epikatekin (R₁=OH, R₂=H)

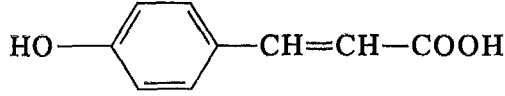
PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorogenik asittir. Klorogenik asidin yapısı aşağıdaki gibidir.



Klorogenik asitin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmınının p-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PPO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir [80].



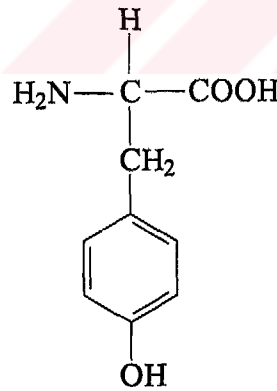
Kafeik Asit
(3,4-dihidroksi sinamik asit)



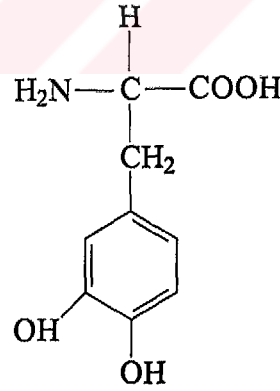
p-kumarik asit
(4-hidroksi sinamik asit)

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil alanin) bitki dokularında mevcuttur.

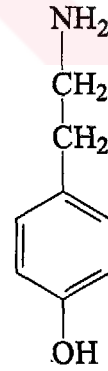
Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PPO, LDOPA'yı dehidrogenasyona uğratar. Ancak tirozine karşı aktivite göstermezken, p-kresolu hidroksiller [81].



L-tirozin



L-DOPA



Dopamin

(3,4-dihidroksifenil etilamin)

Doğal fenolik substratların her birinin sebze ve meyvede sebep oldukları enzimatik kararmaya katkıları fenollerin konsantrasyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olduğu kadar, farklı kinonlardan elde edilen makromoleküller pigmentlerin renk

şiddetinde bağlıdır. Bazı meyve ve sebzelerde PPO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde bulunmayan fenolik bileşiklerdir [81,82].

Substrat spesifikliğı yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değil aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiğı kısmına ve yetiştirilişine de bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler [83,84].

1.5.2 Enzimin Ekstraksiyonu

PPO'nun bitki materyallerinden ekstraksiyonu işleminde üç ana problemle karşılaşılır;

Enzimin inaktif formda olması,

Hücre organellerine bağlı enzimin çözündürleştirilmesi,

Bitkilerde bulunan fenollerin enzim ile oksidasyonu sonucu polimerizasyonu ve enzim üzerine çökmesinin engellenmesi.

Birçok bitki türünde PPO aktif formda bulunmaktadır. Hücre organellerine bağlı inaktif enzim, kafein-sodyum benzoat ile hem aktive edilebilir hemde çözündürülebilir [85]. Avocado'dan elde edilen ham ve kısmen saflaştırılmış preparasyonlardaki inaktif PPO sodyum dodesil sülfat (SDS) ile aktive edilebilir [86]. Çözündürme işlemi genelde, tween-80 veya Triton X-100 gibi deterjanlarla gerçekleştirilir. Elma mitokondrial PPO'su için digitonin kullanılabilirken, koroplast PPO'su için Triton x-100'ün kullanımı iyi sonuçlar vermiştir [87].

Çözünür bir PPO preparasyonu eldesinde aşılması gereken en büyük zorluk; bitki materyalinin ekstraksiyonu ve taşınması esnasında pigment oluşumunun ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler enzim proteinin üzerine çökebilirler ve enzimin çözünmemesine sebep olabilirler. Buna ek olarak, enzimin dönüşümsüz inaktivasyonuna sebep olabilirler. Bu tehlikeleri en az seviyeye indirmek için bütün ekstraksiyon adımları mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır. Taşıma ve homojenizasyon genelde sıvı azot veya azot atmosferinde yapılmaktadır. Bazı durumlarda materyalin ani dondurulması ve dondurularak

kurutulması enzim ekstraksiyonu işleminde ilk basamak olarak tavsiye edilmektedir [81,88]. Aseton çöktürmesini takiben tampon ekstraksiyonu en çok kullanılan metotlardan birisidir [89]. Şeftalilerde aseton çöktürmesi ve ekstraksiyonun verimi karşılaştırıldığında, aseton çöktürmesi metodu aktivitede 20 kat daha fazla artışa sebep olmaktadır. Aktivitedeki bu son derece yüksek artış asetonun bir inhibitörü elimine etmesi yada enzimin proteinini aktif forma dönüştürmesi ile açıklanabilir [90].

Bazen uygun bir tamponla ekstraksiyon asetonla çöktürme adımının önüne geçer [91]. Ekstraksiyon için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir [89]. Ekstraksiyon sistemini enzimatik polifenol oksidasyonundan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler yada kinon bağlayıcılar da katılır. Askorbik asit, sistein, sodyum metabisülfid, DIECA ve sukroz veya bazen de bu bileşiklerin karışımı kullanılmaktadır [92].

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili bir yolu da ortamdaki substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlamada en yaygın kullanılan madde polivinilpirolidon'dur(PVP) [93].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Bitkisel Materyal

Araştırmada kullanılan zeytinler Akhisar'ın Osmaniye Köyü'nden olgunlaşma evrelerinde her bir çeşit için 6'şar kilo olarak toplandı ve meyveler çalışmalarda kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan sodyum hidroksit, sodyum sitrat, sodyumdihidrojen fosfat, potasyum fosfat, sodyumbikarbonat, polietilenglikol, katekol Merck A.G.'den; α - tokoferol, ferulik asit, kafeik asit, tirozol, metanol, izopropanol, asetonitril, asetik asit Sigma 'dan sağlandı.

2.1.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

pH metre	(Orion-model 920A)
UV-Spektrofotometre	(CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN)
Manyetik Karıştırıcı	(IKA Combimag RCO)
Kronometre	(Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr)
Terazi	(libror, AEG-220 (Shimadzu))
Otomatik Pipetler	(fischer)
Homojenize Edici	(Ev tipi blender)
Derin Dondurucu	(Sanio Medical Freezer)
HPLC	(Agilent 1100 Series)

2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı;

1)Ekstraksiyon tamponu: % 0.5 PEG (400), 10 mM askorbik asit içeren 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.3); 8.7 g (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 g polietilen glikol (PEG), 0.176 g (0.001 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi ve son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2)Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler: pH 4-4.5 aralığında 0.1 M sitrat / 0.2 M K_2HPO_4 tamponu; Bu tampon için 2.94 g sodyum sitrat (0.01 mol), 3.48 g (0.02mol) K_2HPO_4 80 mL saf suda çözülerek 1 M NaOH veya 1 M HCl yardımıyla istenen pH'a kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 5-7 aralığında 0.2 M fosfat tamponu; Bu tampon çözelti için 3.12 g NaH_2PO_4 80 mL saf suda çözüldü, 1 M NaOH ile çözelti istenen pH'a ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 7.5-9 aralığında 0.2 M Tris tamponu; Bu tampon çözelti için 12.114 g (0.1 mol) Tris 400 mL saf suda çözülerek, bu çözeltilerden 40'ar mL alındı, 0.1 m HCl ile çözelti istenen pH'a ayarlandıktan sonra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı ve böylece değişik pH'lı seri Tris tamponları hazırlandı.

3) Substrat Çözeltileri: Katekol çözeltisi 10 ml, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 g (1.10^{-3} mol) katekol alınarak son hacim 10 ml olacak şekilde destile su ile çözüldürüldü.

4) HPLC Çözeltilerinin Hazırlanışı: Kullanılan elüsyon çözeltileri A (%2 asetik asit su içinde), B (metanol), C (asetonitril) ve D (izopropanol)'dir.

5)HPLC Analizinde Kullanılan Standartlar:

a) **Kafeik Asit Çözeltisi:** 25 ml'lik balon joje içerisinde metanol çözücüsü kullanarak 901 ppm'lik stok çözelti 0.0225 g kafeik asit alınarak hazırlandı. Bu stoktan sırasıyla 6.01, 12.01, 18.02, 24.03, 36.04, 54.06, 72.08, 90.01, 108.12, 126.14 ppm ara stok çözeltileri hazırlandı.

b) **Ferulik Asit Çözeltisi:** 10 ml'lik balon joje içerisinde metanol çözücüsü kullanarak 1942 ppm'lik stok çözelti 0.0194 g ferulik asit alınarak hazırlandı. Bu stoktan 19.42, 38.84, 58.26, 97.1, 135.94, 155.36 ppm ara stok çözeltileri hazırlandı.

c) **Tirozol Çözeltisi:** 10 ml'lik balon joje içerisinde metanol çözücüsü kullanarak 550 ppm'lik stok çözelti 0.0055 g tirozol alınarak hazırlandı. Bu stoktan sırasıyla 5, 15, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115 ppm ara stok çözeltileri hazırlandı.

d) **α -Tokoferol Çözeltisi:** 25 ml'lik balon joje içerisinde metanol çözücüsü kullanarak 1845 ppm'lik stok çözelti 0.0480 g tokoferol alınarak hazırlandı. Bu stoktan 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ppm ara stok çözeltileri hazırlandı.

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Araştırmada kullanılan zeytinler Akhisar'ın Osmaniye Köyü'nden temin edildi. Meyveler çalışmalarda kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g meyve 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.30) içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbenkten süzüldü. Süzüntü 20000xg'de +5 °C'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Bitki

duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.2 PPO Enziminin Aktivite Tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.2 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2.8mL tampon + substrat (0.1 M katekol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (U) reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0.001'lik artış olarak tanımlanmıştır. Aktivite birimi olarak " 1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişme " kullanıldı..

2.2.3 PPO Enzimi İle İlgili Kinetik Çalışmalar

PPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için iki katekol substrat için, optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak değişik pH'lardaki aktivasyon enerjileri bulundu. Enzimin sıcaklığa bağımlı denatürasyon ve renatürasyon özellikleri araştırıldı. Kullanılan her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri saptandı.

2.2.4 Enzimin Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) katekol substratı kullanarak 20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C' deki reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlendi. Her ölçüm iki kez tekrarlanıp çıkan değerlerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler hesapladık. Böylece PPO enzimi için optimum pH ve sıcaklık değerleri tek bir çalışma ile tespit edildi. Elde edilen sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

2.2.5 Enzimin Karakterizasyonu ve Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması:

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol substratının beş farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik Micheales-Menten denklemi kullanılarak çizilmektedir.

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

Bu Micheales-Menten denkleminin her iki tarafı da ters çevrilirse aşağıdaki Lineweaver-Burk denklemi elde edilmektedir.

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

Bu denklem, $y = ax+b$ şeklinde bir doğru denklemi gibi düşünülmektedir ve; $y = 1 / V$; $a = K_M / V_{Max}$; $x = 1 / [S]$; $b = 1 / V_{Max}$; olmaktadır. Bu grafik çizildiği zaman yukarıda belirtilen değerler hesaplanabilmektedir.

Denklemlerde kullanılacak K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.

2.2.6 PPO'nun Sıcaklığa Bağımlı Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla; 40, 50, 60, 70, 80 C 'lerde 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu aktivite değerleri, 10 mM katekol substratı kullanarak , standart aktivite ölçümü koşullarında saptandı.

Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

Renatürasyon işlemlerinde ise denatürasyon çalışmasında kullanılan ve bahsedilen sıcaklıklarda bekletildikten sonraki enzim çözeltileri 22°C'ye kadar soğutuldu. 22°C'de enzim aktiviteleri 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika zaman aralıklarında, 10 mM katekol substratı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü. 22°C'deki inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği çizildi.

2.2.7 Zeytinlerden Yağ Eldesi

Akhisar'ın Osmaniye köyünde yetişen 5 farklı zeytin çeşidinden elde edilen zeytin yağları analiz için kullanıldı. Herbir zeytin çeşidi ilk önce mekanik parçalayıcıda tamamen parçalara ayrıldı. Oluşan hamura hacminin onda biri kadar ılık su ilave edildi ve karışım 15 dakika homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra oluşan karışımdan bir santrifüj sistemi kullanılarak yağlar ayrıldı.

2.2.8 Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Fenolik bileşikler ekstraksiyonunda Gutfinger (1981) metodu kullanıldı. Metoda göre, her bir zeytin çeşidinin yağından 10gr yağ örneği 50ml heksanda çözüldü ve karışım %60 sulu metanolün 3 tane 20'şer ml'lik hacimleri kullanılarak ayrıldı. Birleştirilen ekstraktlar 40°C'de evapore edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı ve kalıntı 5ml metanolde çözülerek HPLC'de analiz edildi.

2.2.9 Tokoferollerin Ekstraksiyonu

Her bir zeytin çeşidinin yağından 10gr saf zeytin yağı örnekleri mutlak metanolün 2 adet 25'er ml kısımları ile oda sıcaklığında ekstrakte edildi. Kalıntı 2 tane 25'er ml metanol/izopropanol (80:20 , v/v) çözeltileri ile aynı koşullarda tekrar ayrıştırıldı. Ekstraktlar birleştirildi ve bir vakum rotarlı evaporatörde 40° de sıvı

kısım uzaklaştırıldı. Kalıntı 5 ml'lik bir metanol / izopropanol / hekzan karışımında (1:3:1, v/v/v) çözüldü ve fenolik bileşikler ve tokoferol içeriği HPLC ile analiz edildi.

2.2.10 HPLC Analizi

HPLC cihazı, bir Agilent 10100 model HPLC sistemidir. Bu sistem, bir çift dalgıç pompa, UV dedektör, kolon fırını ve 20 µl enjeksiyon ilmiğinden oluşmaktadır. HPLC'de kullanılacak kolon 5 µm paketleme ile bir Apex oktadesil 104 C₁₈ (25 x 0,4 cm ID) kolonudur.

HPLC'de analiz için aşağıda belirtilen metod kullanıldı;

Hem α-tokoferol hemde fenoller için 280 nm de tayin yapıldı. Kullanılan elüsyon çözeltileri A (%2 asetik asit su içinde), B (metanol), C (asetonitril) ve D (izopropanol) 'dür. Örnekler aşağıdaki orana göre elue edildi.

%95 A / %5 B → 2 dakika içinde

%60 A / %10 B / %30 C → 8 dakika içinde

%25 B / %75 C → 22 dakika içinde

ve bu oran 10 dakika devam ettirildi, daha sonra;

%40 C / %60 D → 10 dakika içinde ve bu

oran 15 dakika devam ettirildi.

%25 B / %75 C → 2 dakika içinde ve son

olarak;

%95 A / %5 B → 3 dakika içinde kolondan

çıkış sağlandı.

Akış oranı 1 ml / dk ve çalışma süresi 72 dakikadır. Çalışma 32°C de yapıldı. Örnek enjeksiyon hacmi 20µl 'dir. Bileşiklerin tespit edilmesi onların standartları ile alıkonma süreleri kıyaslanarak yapıldı. Miktar tayinleri ise her bir madde için standart eğriler oluşturularak tespit edildi..



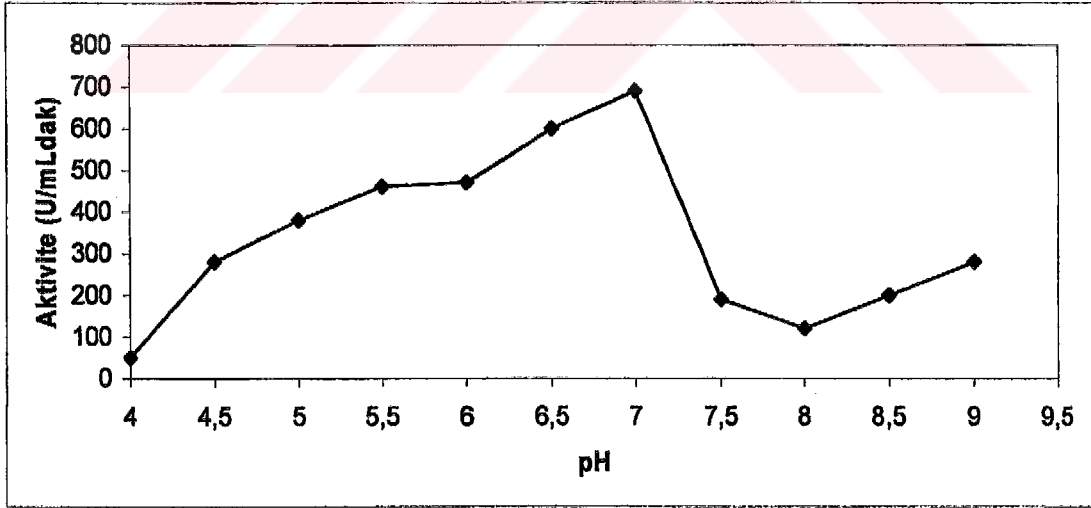
3. BULGULAR

3.1 DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO Enzimlerinin Optimum pH Tayini

DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) katekol substratı kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 DZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri.

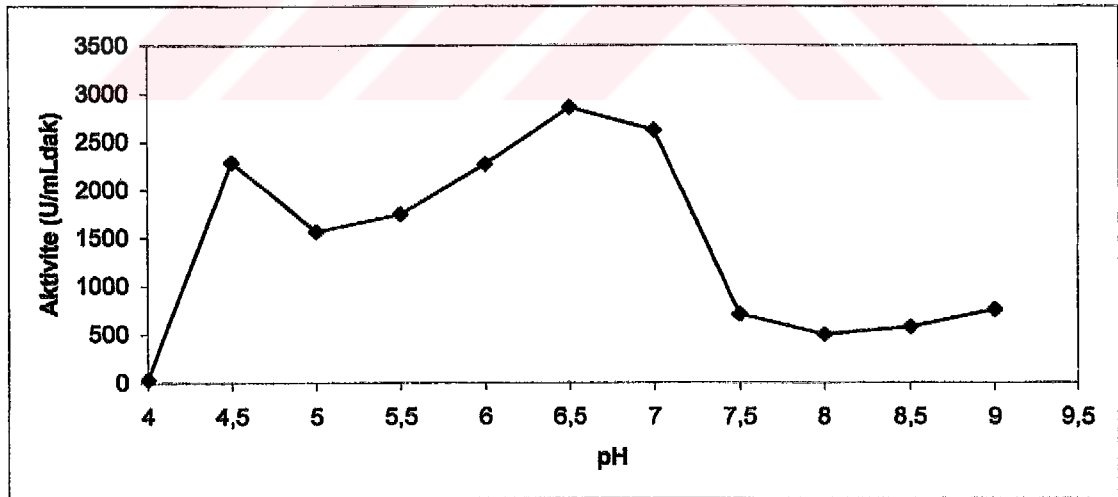
pH	DOD (420 nm)	U	Aktivite (U / mL.dak)	% Aktivite
4	0.005	5	50	7.24
4.5	0.028	28	280	40.58
5	0.038	38	380	55.07
5.5	0.046	46	460	66.66
6	0.047	47	470	68.11
6.5	0.060	60	600	86.95
7	0.069	69	690	100
7.5	0.019	19	190	27.53
8	0.012	12	120	17.39
8.5	0.020	20	200	28.98
9	0.028	28	280	40.58



Şekil 3.1 DZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.2 EZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

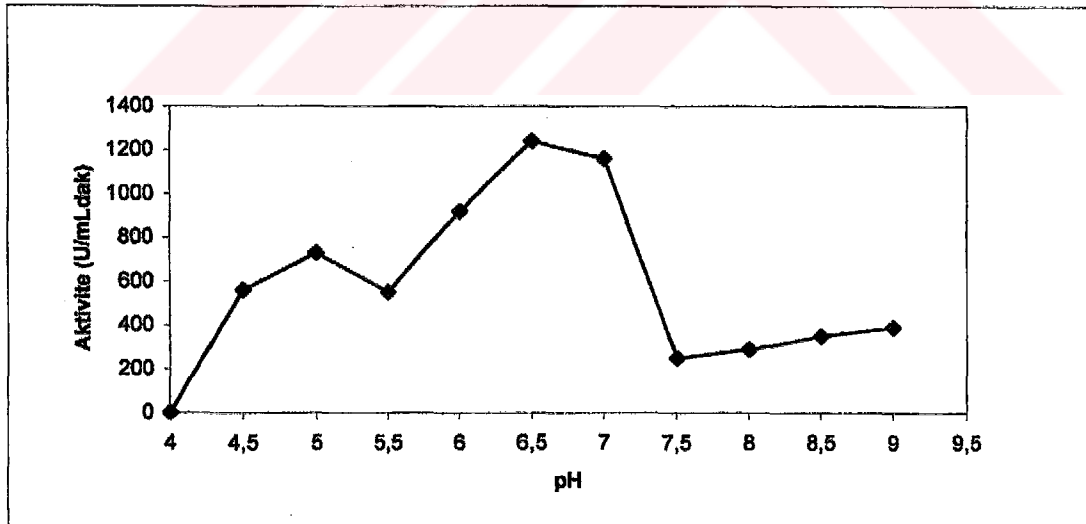
pH	DOD (420 nm)	U	Aktivite (U / mL.dak)	% Aktivite
4	0.003	3	30	1.05
4.5	0.229	229	2290	80.07
5	0.157	157	1570	54.90
5.5	0.175	175	1750	61.19
6	0.227	227	2270	79.37
6.5	0.286	286	2860	100
7	0.262	262	2620	91.61
7.5	0.071	71	710	24.83
8	0.050	50	500	17.48
8.5	0.058	58	580	20.28
9	0.076	76	760	26.57



Şekil 3.2 EZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.3 GZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

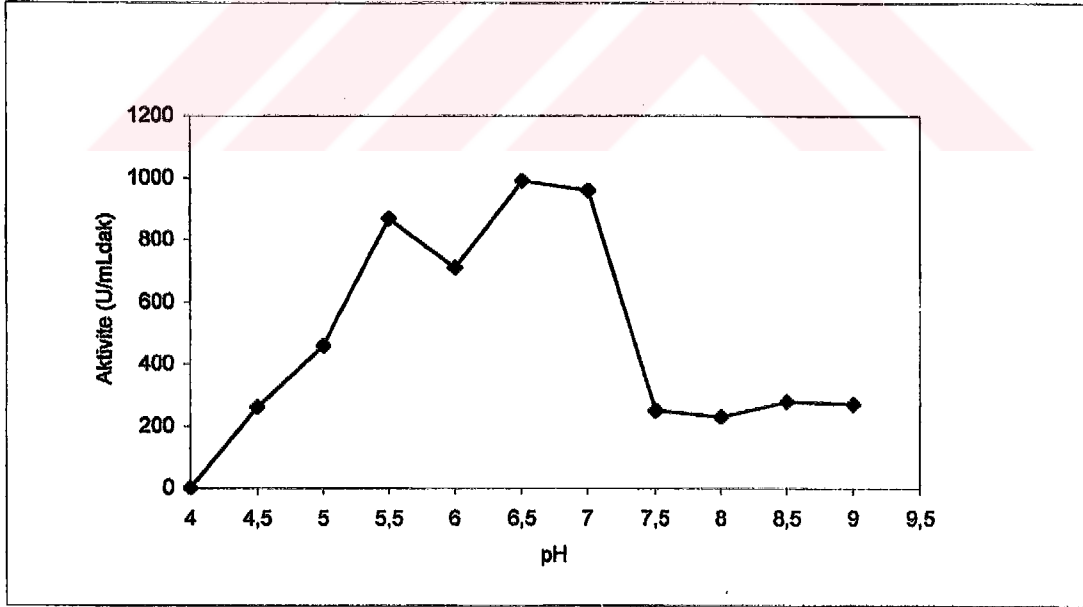
pH	DOD (420 nm)	U	Aktivite (U / mL.dak)	% Aktivite
4	0	0	0	0
4.5	0.056	56	560	45.16
5	0.073	73	730	58.87
5.5	0.055	55	550	44.35
6	0.092	92	920	74.19
6.5	0.124	124	1240	100
7	0.116	116	1160	93.55
7.5	0.025	25	250	20.16
8	0.029	29	290	23.39
8.5	0.035	35	350	28.22
9	0.039	39	390	31.45



Şekil 3.3 GZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.4 KZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

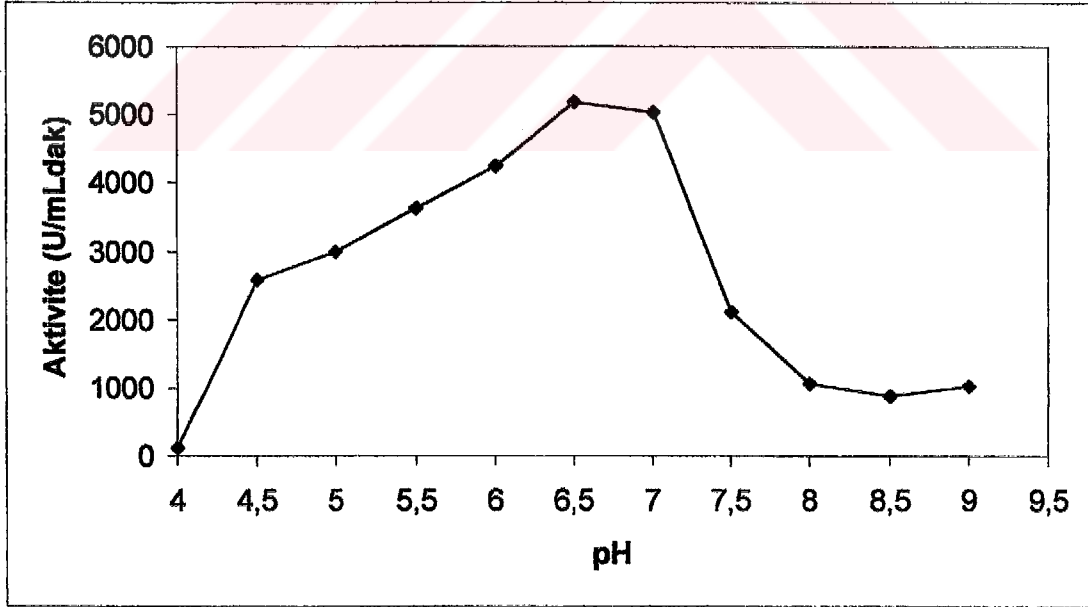
PH	DOD (420 nm)	U	Aktivite (U / mL.dak)	% Aktivite
4	0	0	0	
4.5	0.026	26	260	26.26
5	0.046	46	460	46.47
5.5	0.087	87	870	87.88
6	0.071	71	710	71.72
6.5	0.099	99	990	100
7	0.096	96	960	96.97
7.5	0.025	25	250	25.25
8	0.023	23	230	23.23
8.5	0.028	28	280	28.28
9	0.027	27	270	27.27



Şekil 3.4 KZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.5 UZPPO enzimi için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

pH	DOD (420 nm)	U	Aktivite (U / mL.dak)	% Aktivite
4	0.011	11	110	2.12
4.5	0.257	257	2570	49.61
5	0.298	298	2980	57.53
5.5	0.364	364	3640	70.27
6	0.424	424	4240	81.85
6.5	0.518	518	5180	100
7	0.504	504	5040	97.30
7.5	0.212	212	2120	40.92
8	0.104	104	1040	20.08
8.5	0.088	88	880	16.99
9	0.101	101	1010	19.49



Şekil 3.5 UZPPO enziminin katekol substratı için pH-aktivite grafiği

3.2 DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilite Özelliğinin Araştırılması

DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO enzimlerinin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliklerini belirlemek amacıyla 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de 10,20,30,40,50 ve 60 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler saptandı. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü. (Çizelge 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10). Zamana karşı % aktivite grafikleri çizildi. (Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10). DZPPO, EZPPO, GZPPO, KZPPO ve UZPPO enzimlerini sıcaklığa bağımlı ranatürasyon özelliklerini belirlemek amacıyla denatürasyonda çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiğikleri çizildi.

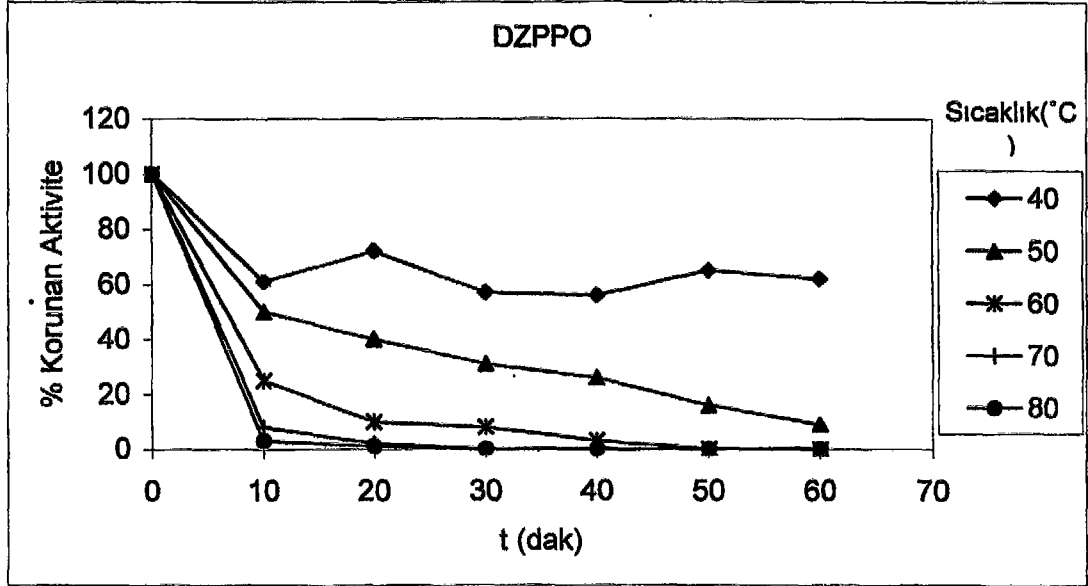


Çizelge 3.6 DPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları

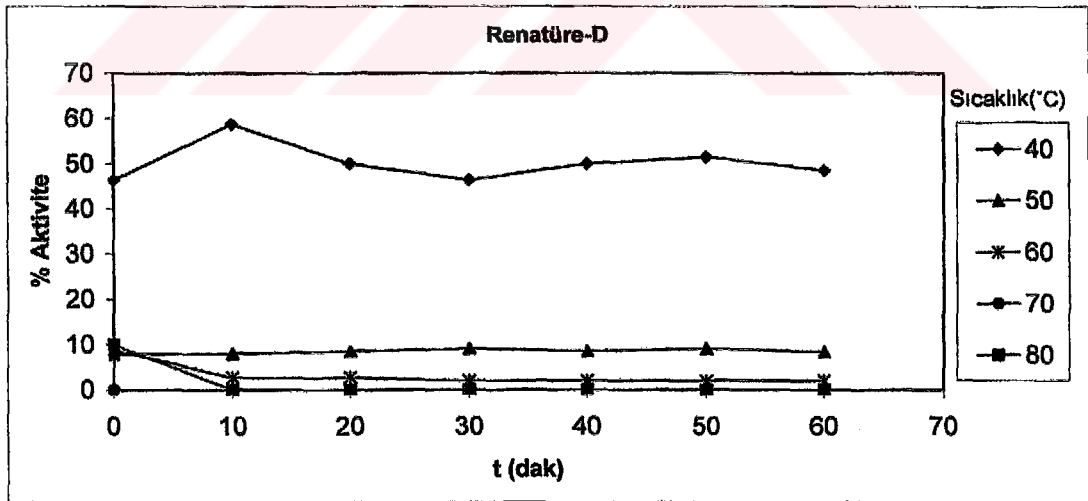
Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.0690	100	0.3580	100	0.146	100	0.3010	100	0.3420	100	-	-	-	-	
10	0.0420	61	0.1780	50	0.036	25	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.0495	72	0.1430	40	0.015	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.039	57	0.1110	31	0.012	8	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.0385	56	0.0940	26	0.005	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.0445	65	0.0570	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.0430	62	0.0325	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 3.7 DZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.032	46.4	0.0285	7.9	0.013	8.9	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	0.0405	58.7	0.0290	8.0	0.004	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.0345	50.0	0.0305	8.5	0.004	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.032	46.4	0.0325	9.1	0.003	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.0345	50.0	0.0305	8.5	0.003	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.0355	51.5	0.0325	9.1	0.003	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.0335	48.6	0.0300	8.4	0.003	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	



Şekil 3.6 DZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi



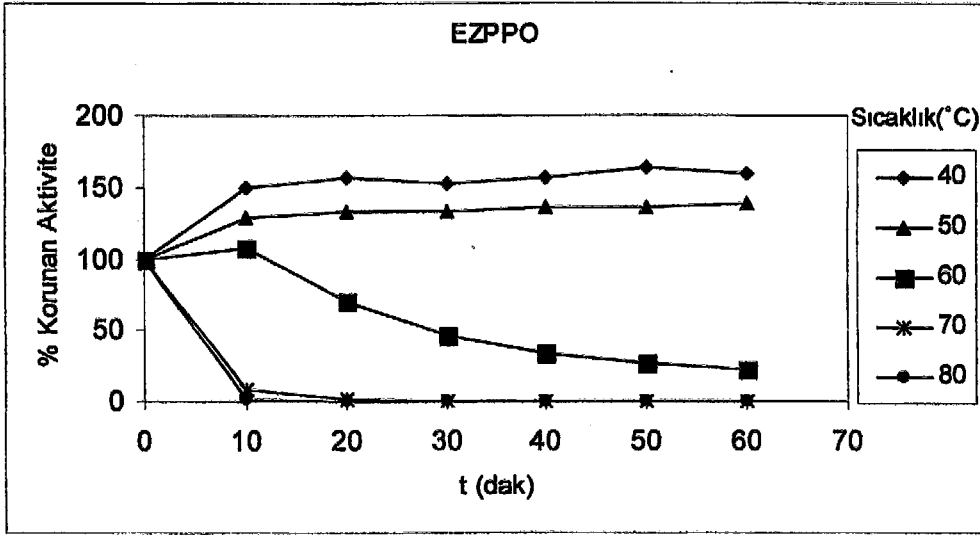
Şekil 3.7 DZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

Çizelge 3.8 EZPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları

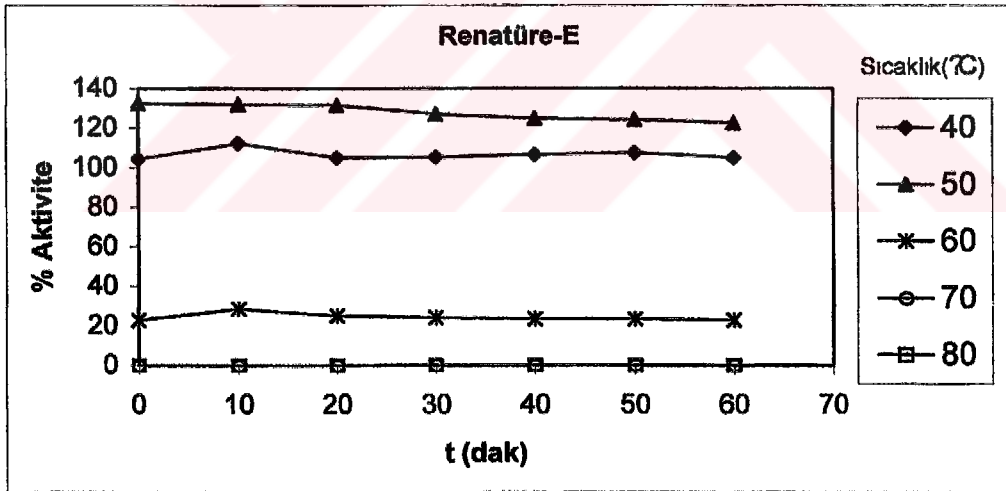
Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite
0	0.164	100	0.4440	100	0.2755	100	0.313	100	0.2925	100	0.2925	100	0.2925	100	
10	0.245	149	0.5700	128	0.2940	107	0.009	2.9	-	-	-	-	-	-	
20	0.256	156	0.5900	133	0.1940	70	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.249	152	0.5895	133	0.1275	46	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.258	157	0.6035	136	0.0895	33	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.267	163	0.5995	135	0.072	26	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.262	160	0.6160	139	0.064	23	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 3.9 EZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.2500	104.2	0.5885	132.5	0.0630	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	0.2695	112.3	0.5855	131.9	0.0790	28.7	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.2520	105.0	0.5800	131.8	0.0685	24.9	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.2530	105.4	0.5640	127.0	0.0670	24.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.2560	106.7	0.5540	124.8	0.0650	23.6	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.2580	107.5	0.5515	124.2	0.0650	23.6	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.2520	105.0	0.5450	122.8	0.0630	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	



Şekil 3.8 EZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi



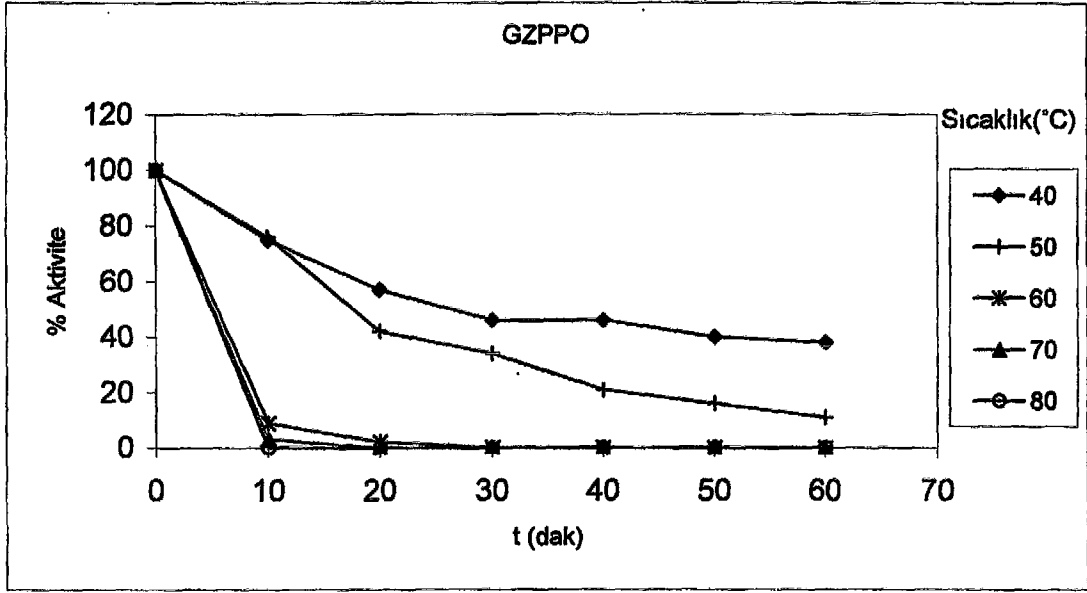
Şekil 3.9 EZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

Çizelge 3.10 GZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları

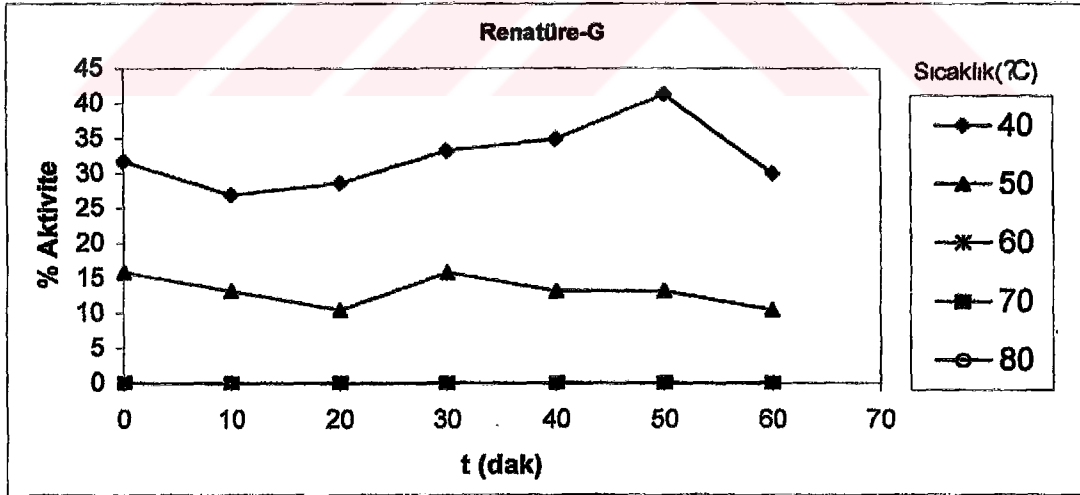
Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.063	100	0.038	100	0.043	100	0.026	100	0.065	100	-	-	-	-	
10	0.047	75	0.029	76	0.008	9	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.036	57	0.016	42	0.01	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.029	46	0.013	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.029	46	0.008	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.025	40	0.006	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.024	38	0.004	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 3.11 GZPPO enzimi için renatürasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite
0	0.020	31.7	0.006	15.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0.017	26.9	0.005	13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0.018	28.6	0.004	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	0.021	33.3	0.006	15.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	0.022	34.9	0.005	13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	0.026	41.3	0.005	13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	0.019	30.0	0.004	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 3.10 GZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi



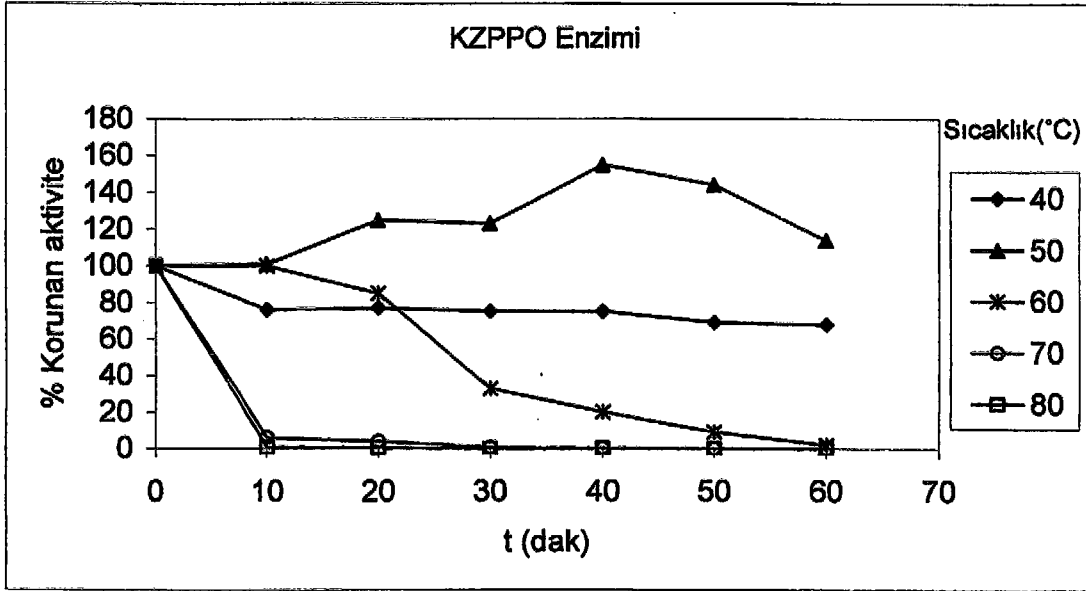
Şekil 3.11 GZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

Çizelge 3.12 KZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları

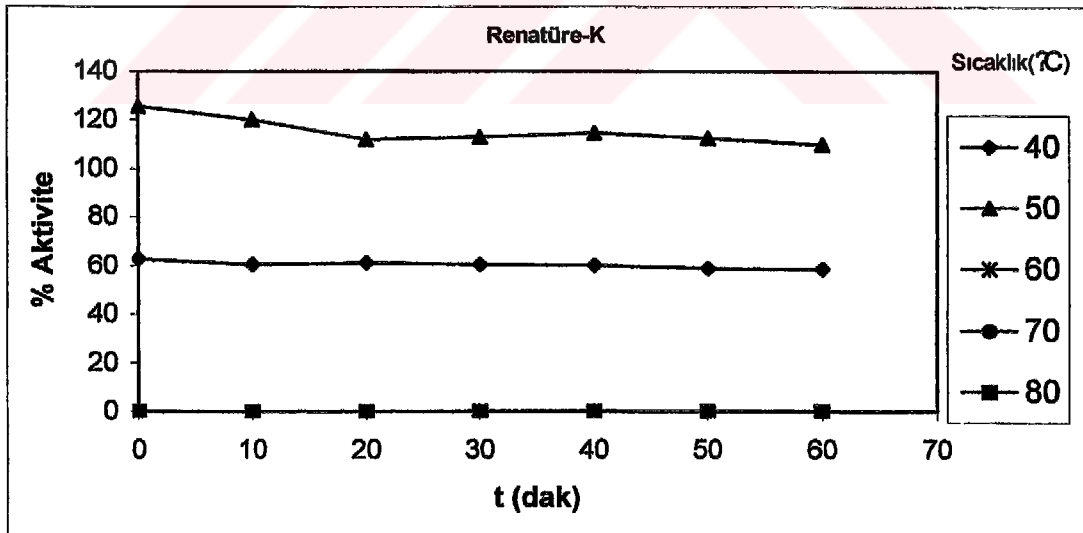
Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.0620	100	0.092	100	0.0660	100	0.173	100	0.2450	100	0.0025	100	0.0013	100	
10	0.0470	76	0.093	101	0.0660	100	0.010	6	0.0025	6	0.0025	1.0	0.0013	0.5	
20	0.0480	77	0.115	125	0.0560	85	0.006	4	0.0013	4	0.0013	0.5	0.0013	0.5	
30	0.0465	75	0.113	123	0.0215	33	0.001	0.6	-	0.6	-	-	-	-	
40	0.0465	75	0.143	155	0.0130	20	0.000	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.0430	69	0.132	144	0.0060	9	0.000	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.0425	68	0.105	114	0.0015	2	0.000	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 3.13 KZPPO enzimi için renatirasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	AOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.039	62.9	0.1155	125.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	0.0375	60.5	0.1105	120.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.038	61.3	0.1030	111.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.0375	60.5	0.1040	113.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.0374	60.3	0.1055	114.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.0365	58.9	0.1035	112.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.0363	58.5	0.1010	109.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Şekil 3.12 KZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi



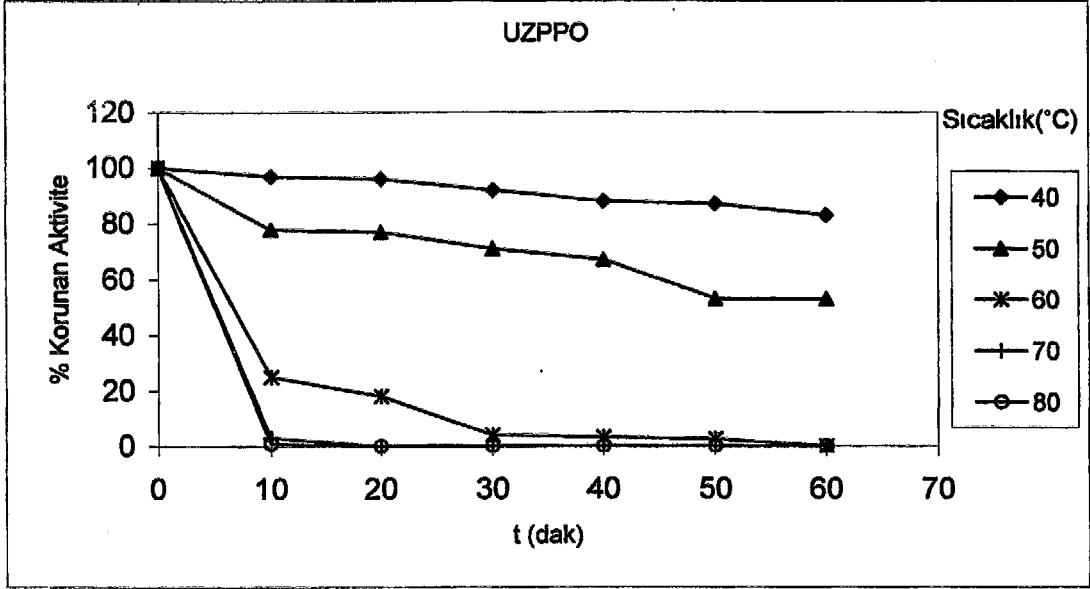
Şekil 3.13 KZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

Çizelge 3.14 UZPPO enzimi için denatürasyon çalışmasının sonuçları

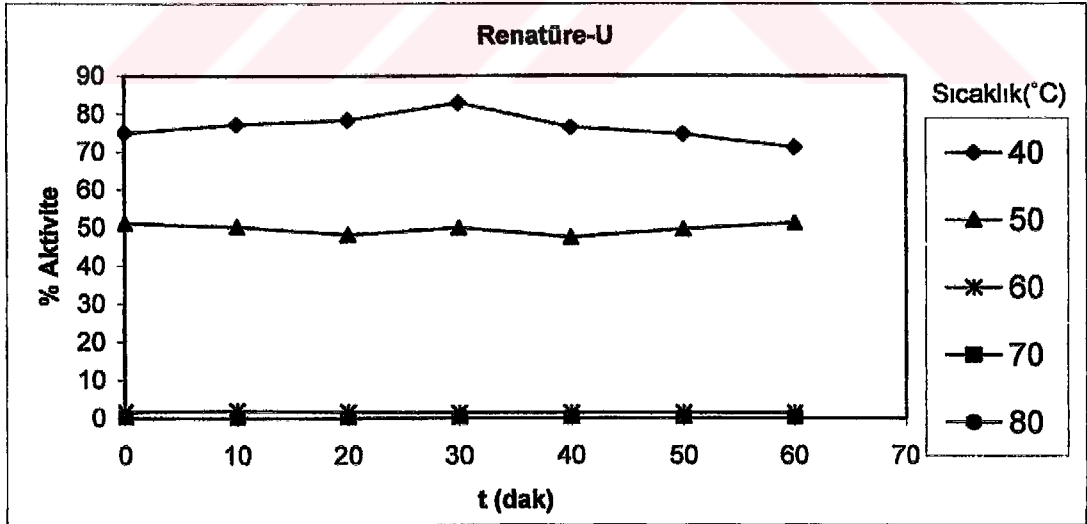
Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.541	100	0.5310	100	0.360	100.0	0.5955	100	0.5540	100	-	-	-	-	
10	0.523	97	0.4150	78	0.091	25.0	0.002	0.3	-	-	-	-	-	-	
20	0.521	96	0.4065	77	0.066	18.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.500	92	0.3775	71	0.016	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.475	88	0.3545	67	0.011	3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.468	87	0.2800	53	0.009	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.451	83	0.2795	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 3.15 UZPPO enzimi için renatirasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi (dak)	Sıcaklık														
	40°C			50°C			60°C			70°C			80°C		
	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	ΔOD (420nm)	%Aktivite	
0	0.4058	75.0	0.272	51.2	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	0.4180	77.3	0.267	50.3	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	0.4240	78.4	0.256	48.2	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	0.4485	82.9	0.2655	50.0	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	0.4140	76.5	0.252	47.5	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	0.4040	74.7	0.264	49.7	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	0.3860	71.3	0.273	51.4	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Şekil 3.14 UZPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi



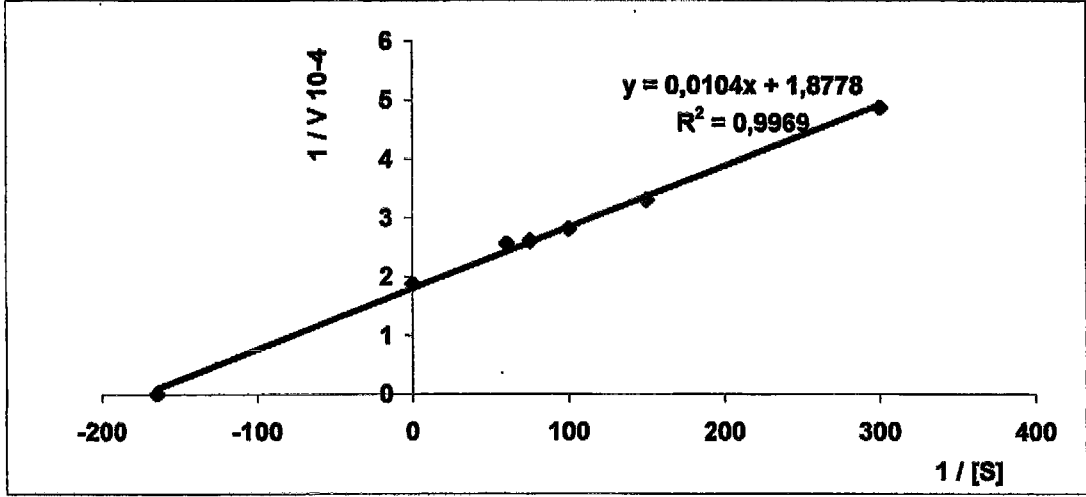
Şekil 3.15 UZPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22°C'ye düşürülmesi üzerine elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

Çizelge 3.16 DZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

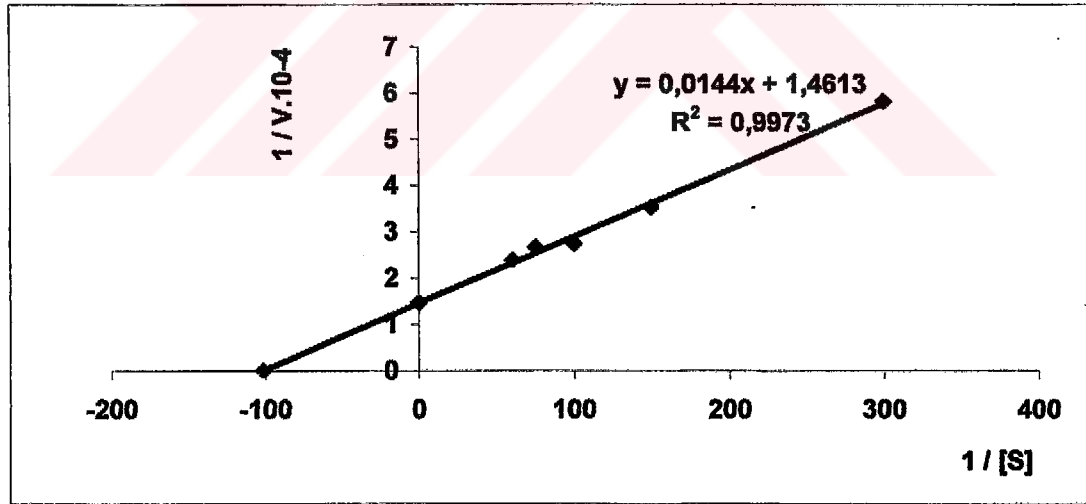
0.2 M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi Hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki Toplam Hacim (mL)	Küvetteki Substrat Konst.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.1	0.1	3	3.33	0.2053	205.3	2053	4.871	300
2.7		0.2		6.67	0.3030	303.0	3030	3.300	150
2.6		0.3		10.00	0.3550	355.0	3550	2.817	100
2.5		0.4		13.33	0.3830	383.0	3830	2.611	75
2.4		0.5		16.67	0.3910	391.0	3910	2.558	60

Çizelge 3.17 EZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

0.2 M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi Hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki Toplam Hacim (mL)	Küvetteki Substrat Konst.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.1	0.1	3	3.33	0.156	156	1716	5.826	300
2.7		0.2		6.67	0.285	285	2830	3.534	150
2.6		0.3		10.00	0.364	364	3640	2.747	100
2.5		0.4		13.33	0.375	375	3750	2.667	75
2.4		0.5		16.67	0.419	419	4189	2.387	60



Şekil 3.16 DZPPO enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



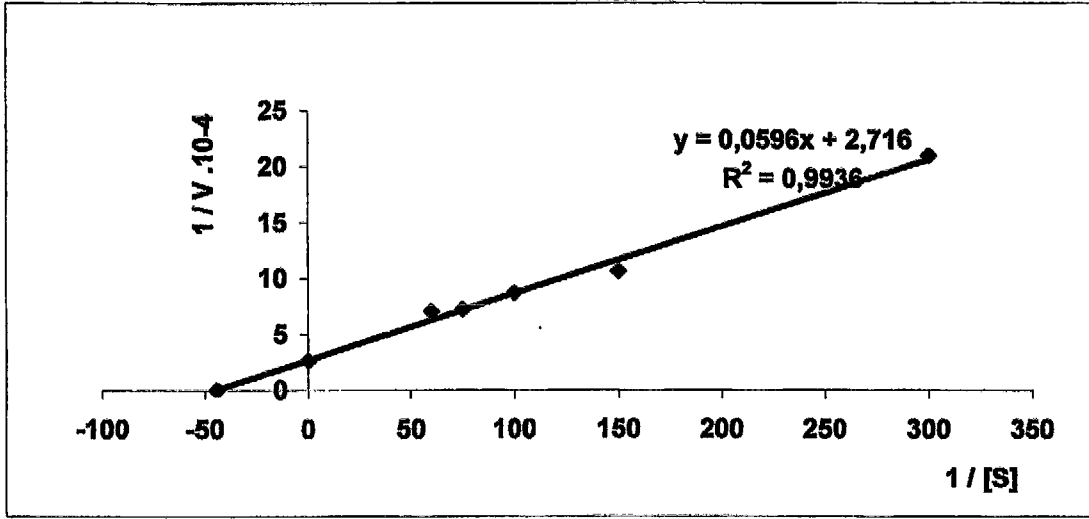
Şekil 3.17 EZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği

Çizelge 3.18 GZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

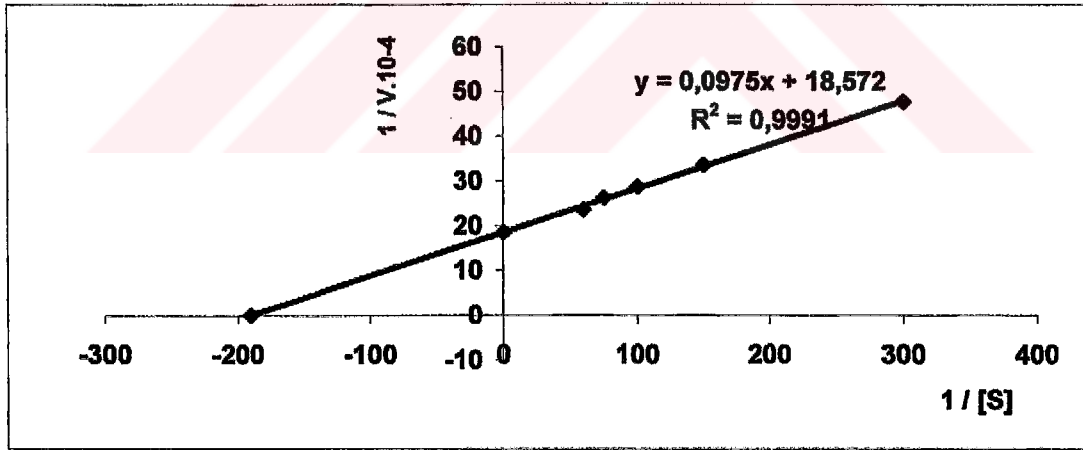
0.2 M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi Hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki Toplam Hacim (mL)	Küvetteki Substrat Konst.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.1	0.1	3	3.33	0.04775	47.75	477.5	20.942	300
2.7		0.2		6.67	0.0940	94.00	940.0	10.638	150
2.6		0.3		10.00	0.1150	115.00	1150.0	8.696	100
2.5		0.4		13.33	0.1380	138.00	1380.0	7.246	75
2.4		0.5		16.67	0.14225	142.25	1422.5	7.030	60

Çizelge 3.19 KZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

0.2 M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi Hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki Toplam Hacim (mL)	Küvetteki Substrat Konst.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.1	0.1	3	3.33	0.0210	21.0	210	47.619	300
2.7		0.2		6.67	0.0298	29.8	298	33.557	150
2.6		0.3		10.00	0.0349	34.9	349	28.658	100
2.5		0.4		13.33	0.0381	38.1	381	26.233	75
2.4		0.5		16.67	0.0424	42.4	424	23.596	60



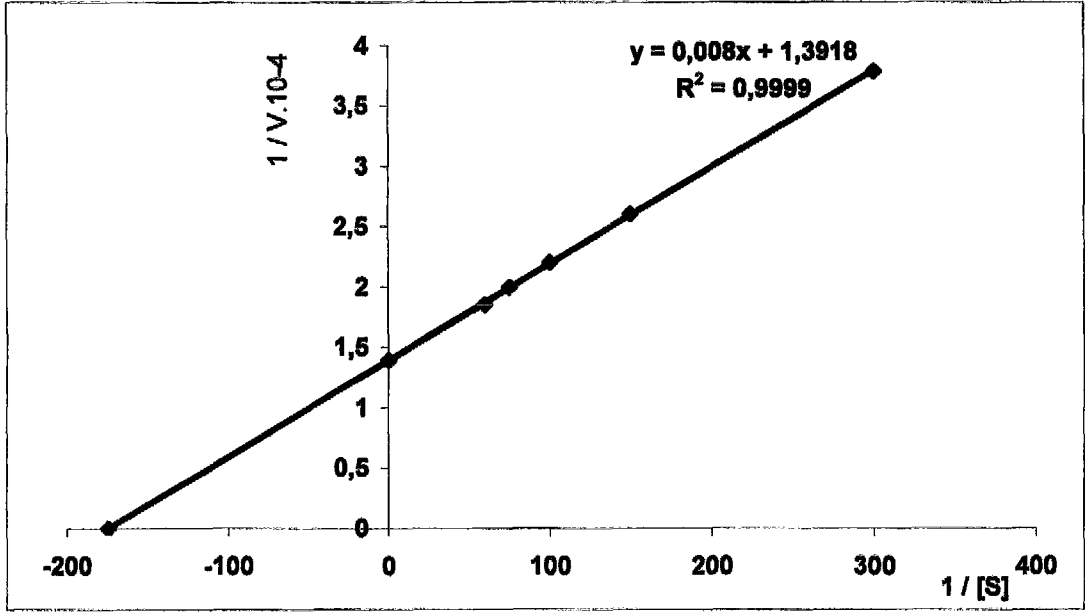
Şekil 3.18 GZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 3.19 KZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği

Çizelge 3.20 UZPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

0.2 M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi Hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki Toplam Hacim (mL)	Küvetteki Substrat Konst.[S] (mM)	ΔOD (420nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.1	0.1	3	3.33	0.2642	264.2	2642	3,785	300
2.7		0.2		6.67	0.3845	384.5	3845	2.601	150
2.6		0.3		10.00	0.4543	454.3	4543	2.201	100
2.5		0.4		13.33	0.5005	500.5	5005	1.998	75
2.4		0.5		16.67	0.5400	540.0	5400	1.852	60



Şekil 3.20 UZPPO için Lineweaver-Burk Grafiği

Çizelge 3.21 Her bir zeytin türü PPO enzimi için elde edilen sonuçlar

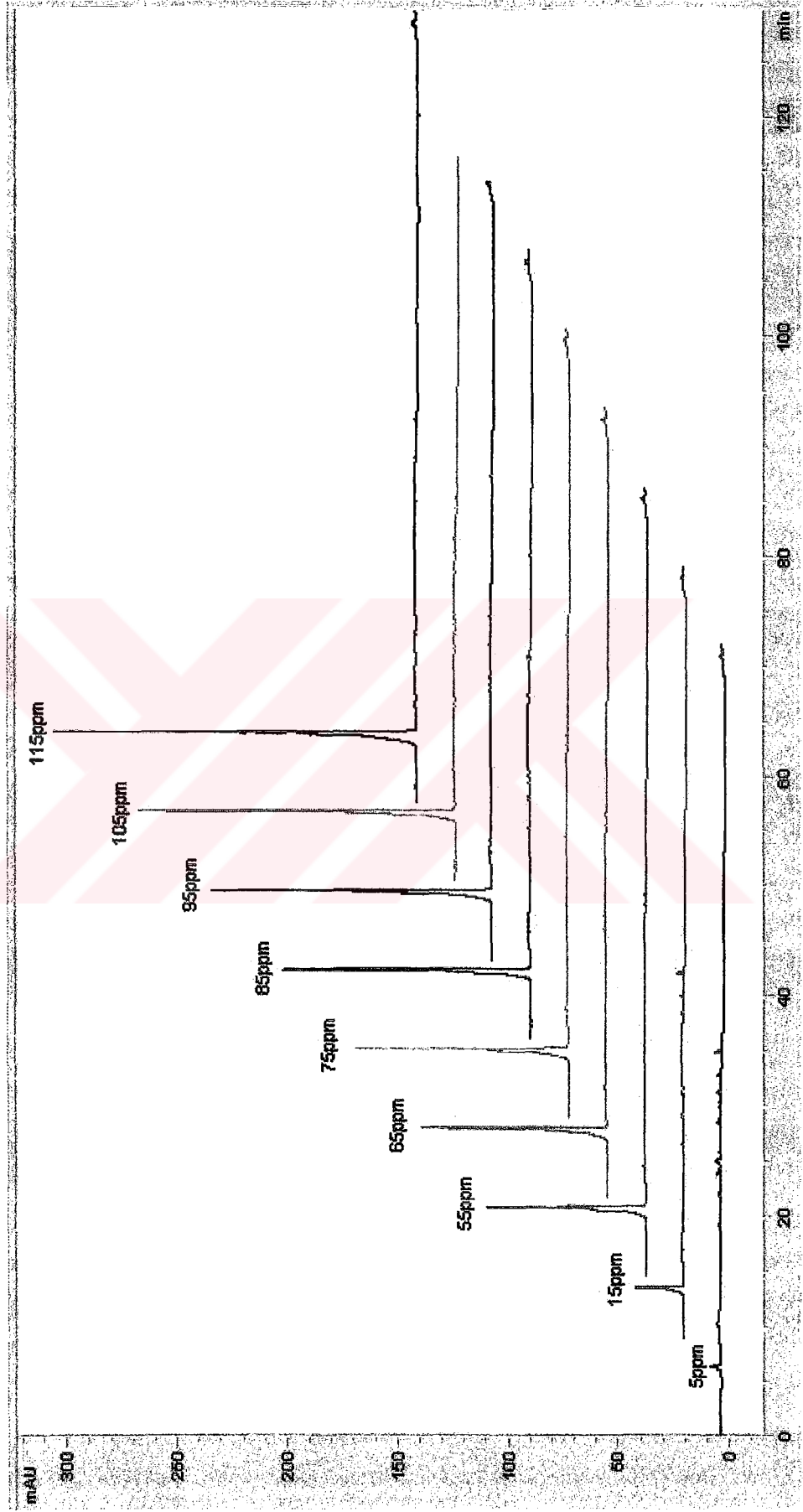
Enzim Kaynağı	Optimum pH	Km (mM)	Vmax (U/mLdak)	Vmax / Km
GZPPO	6.5	22.491	3681.890	163.71×10^3
EZPPO	6.5	13.691	810.180	59.18×10^3
UZPPO	6.5	5.747	7183.392	1249.94×10^3
DZPPO	7.0	6.098	5325.381	$873,30 \times 10^3$
KZPPO	6.5	5,251	538.474	$102,55 \times 10^3$

3.3 HPLC ile Antioksidan Maddelerin Miktar Tayinleri

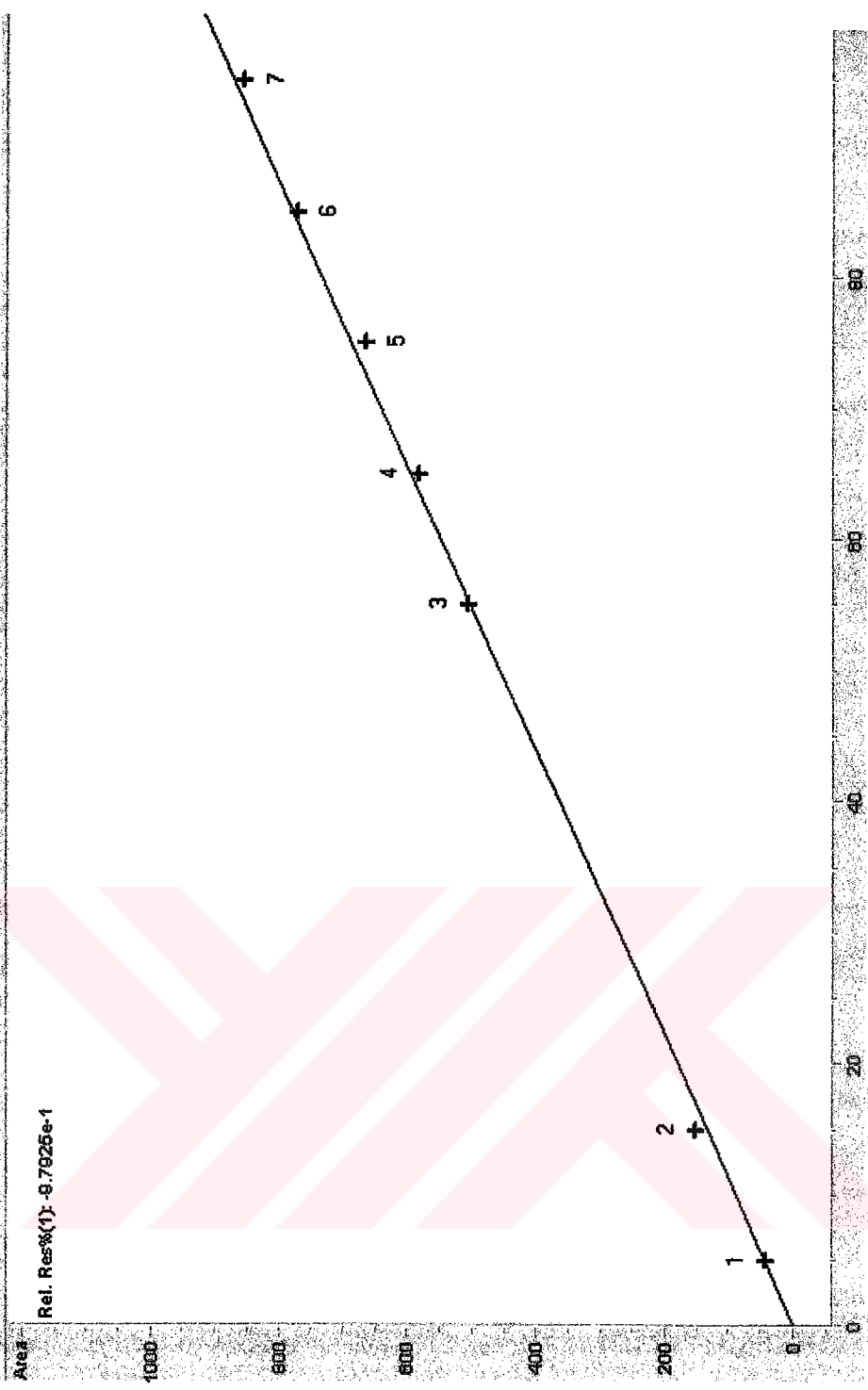
3.3.1 Tirosol, Kafeik asit, Ferulik asit ve Tokoferol İçin Standart Eğriler ve Elde Edilen Kromatogramlar: Her bir antioksidan madde için çizelge 3.22'de verilen standartlar hazırlandı ve HPLC analizine sunuldu. Oluşturulan kalibrasyon eğrileri aşağıda verildi. Daha sonra bu eğriler ile her bir zeytin yağındaki antioksidanların miktarları tayin edildi.

Çizelge 3.22 Hazırlanan standart bileşiklerin geliş zamanı ve konsantrasyonları

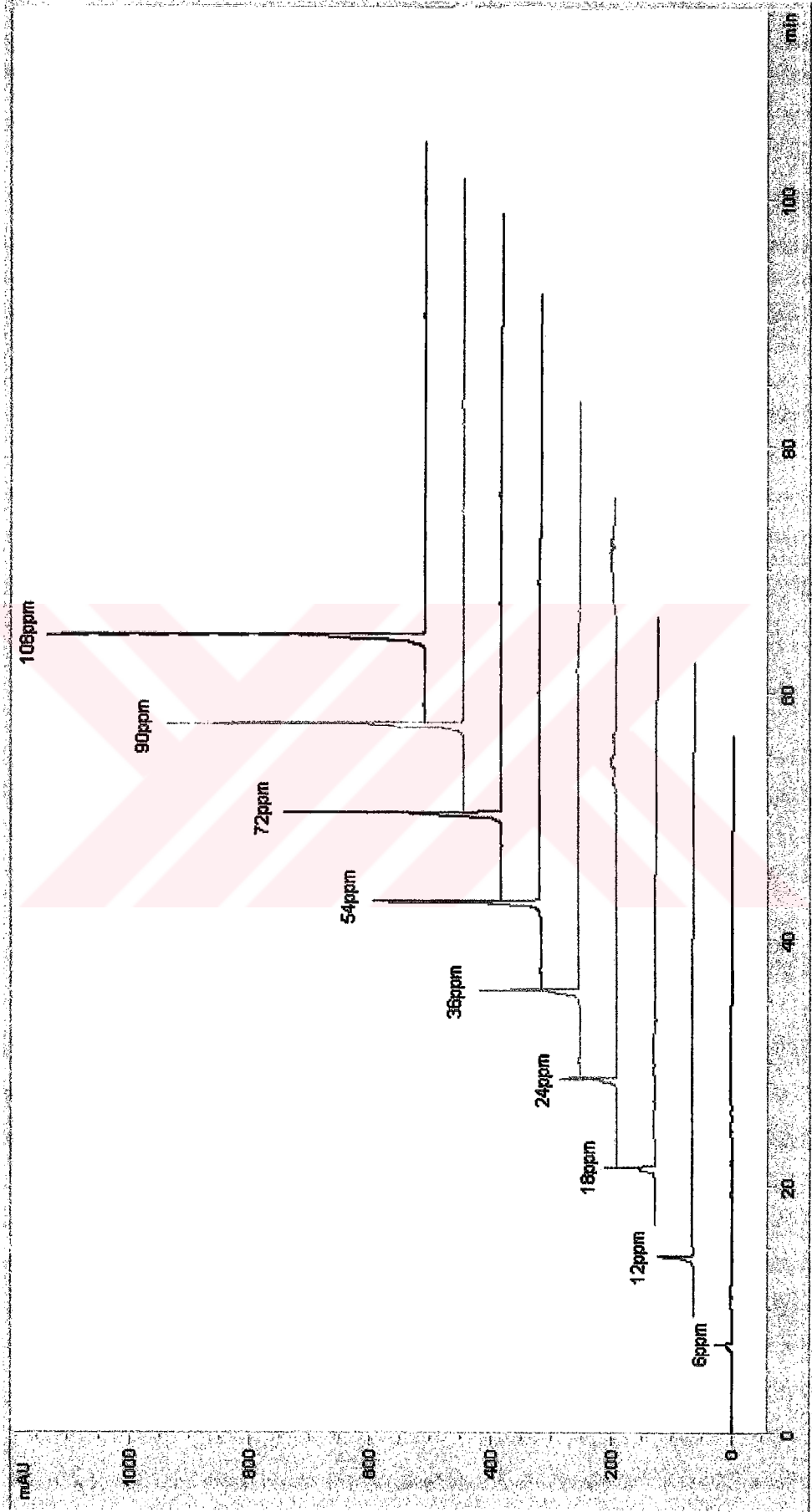
Bileşik Adı	Pikin Gelme Zamanı(dk.)	Adet	Standart Konsantrasyonları (ppm)
Tirosol	6.276	1	5
		2	15
		3	55
		4	65
		5	75
		6	85
		7	95
		8	105
		9	115
Kafeik asit	7.208	1	6
		2	12
		3	18
		4	24
		5	36
		6	54
		7	72
		8	90
		9	108
Ferulik asit	9.041	1	19
		2	39
		3	58
		4	97
		5	136
		6	155
Tokoferol	38.061	1	10
		2	20
		3	40
		4	60
		5	80
		6	100
		7	120
		8	140
		9	160
		10	180



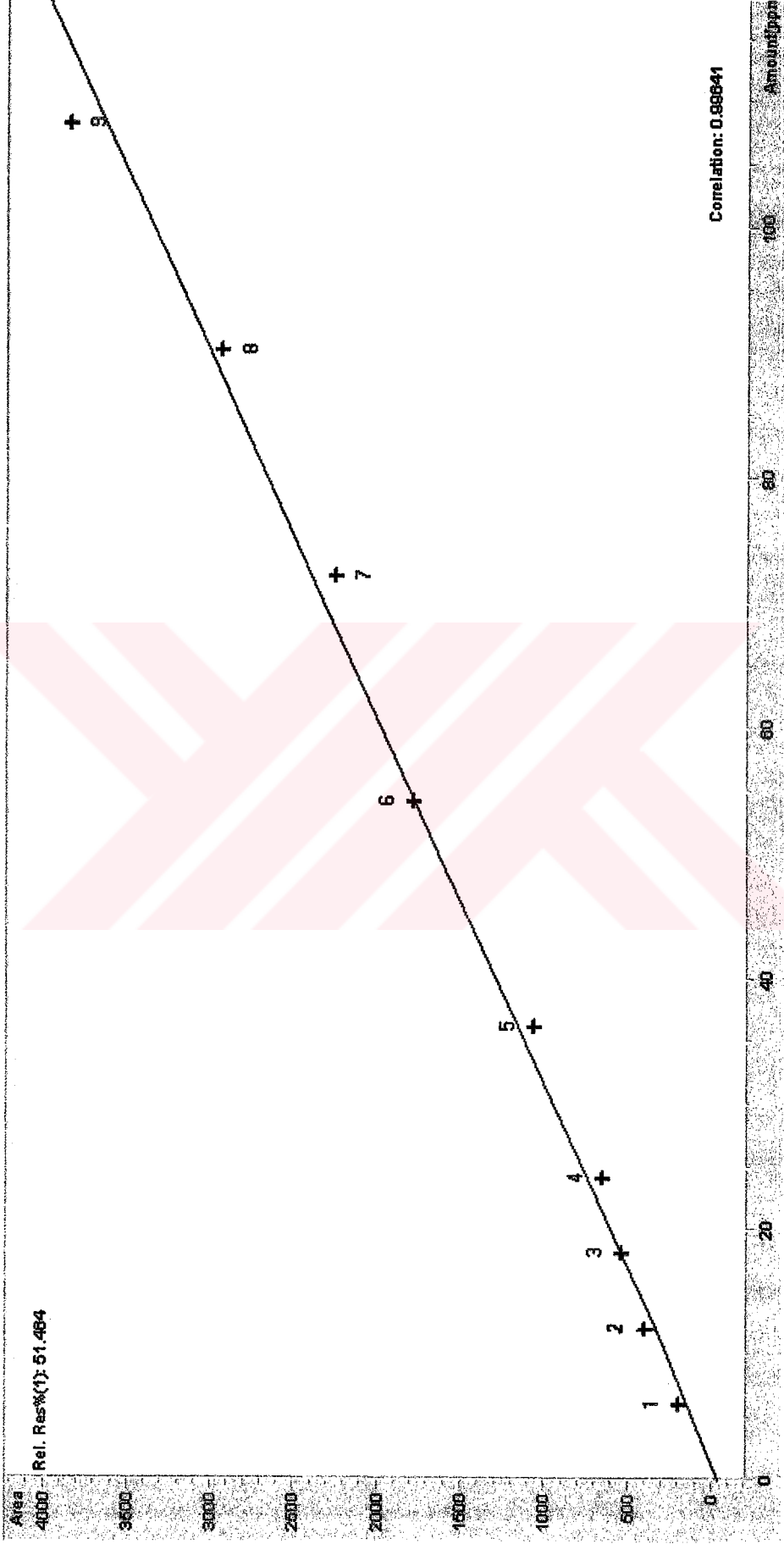
Şekil 3.21 Tirozol standartları için HPLC kromatogramı



Şekil 3.22 Tirozol için hazırlanan standart eğri



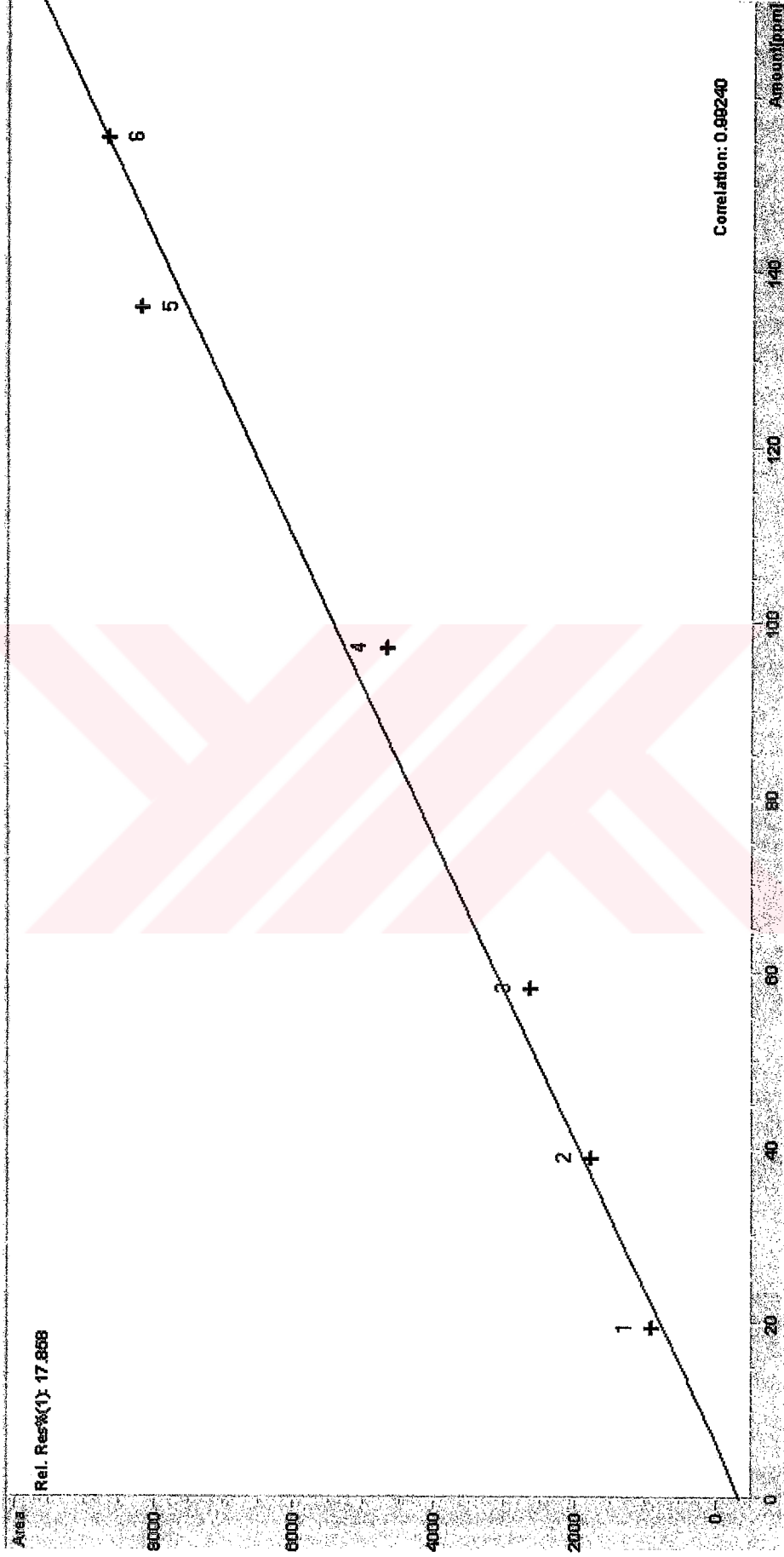
Şekil 3.23 Kafeik asit standartları için HPLC kromatogramı



Şekil 3.24 Kafeik asit için hazırlanan standart eğri



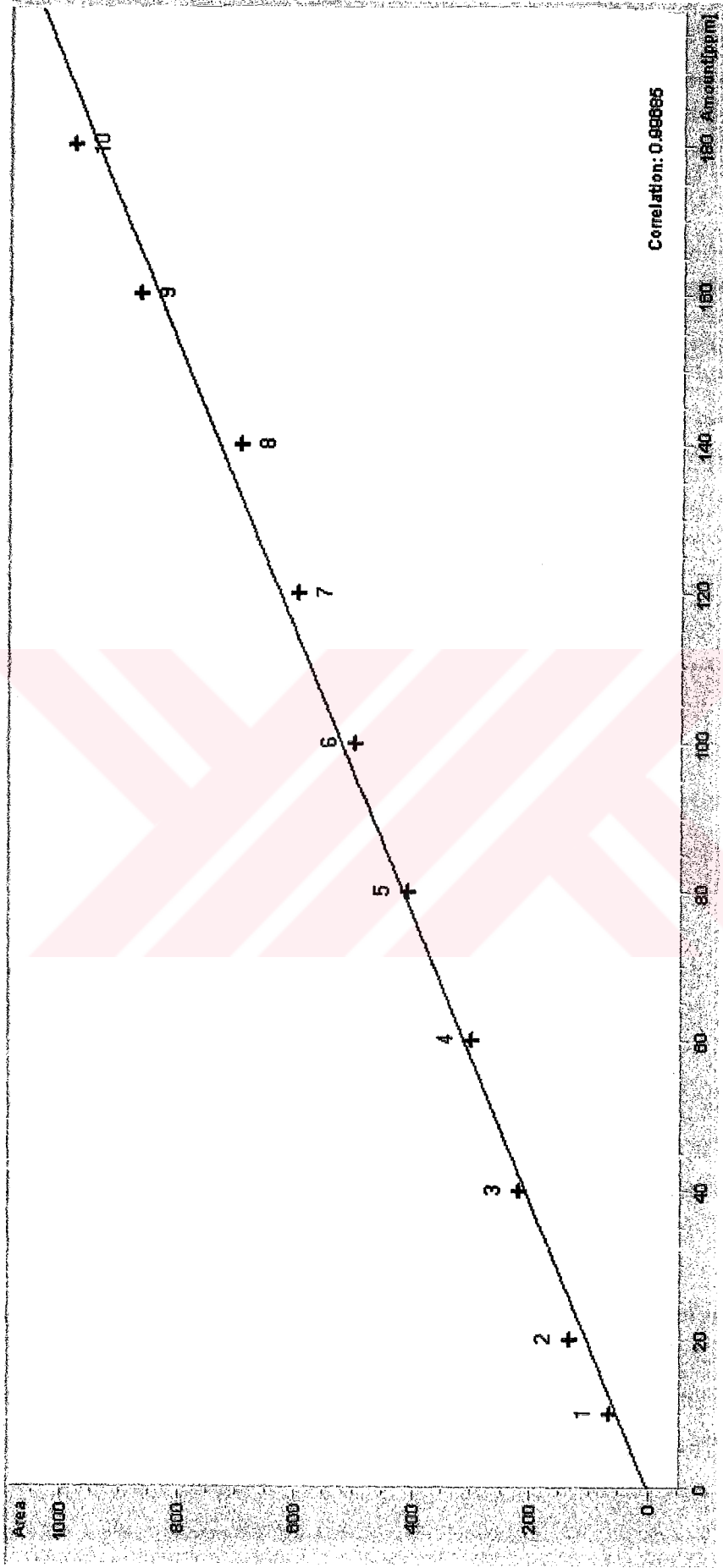
Şekil 3.25 Ferulik asit standartları için HPLC kromatogramı



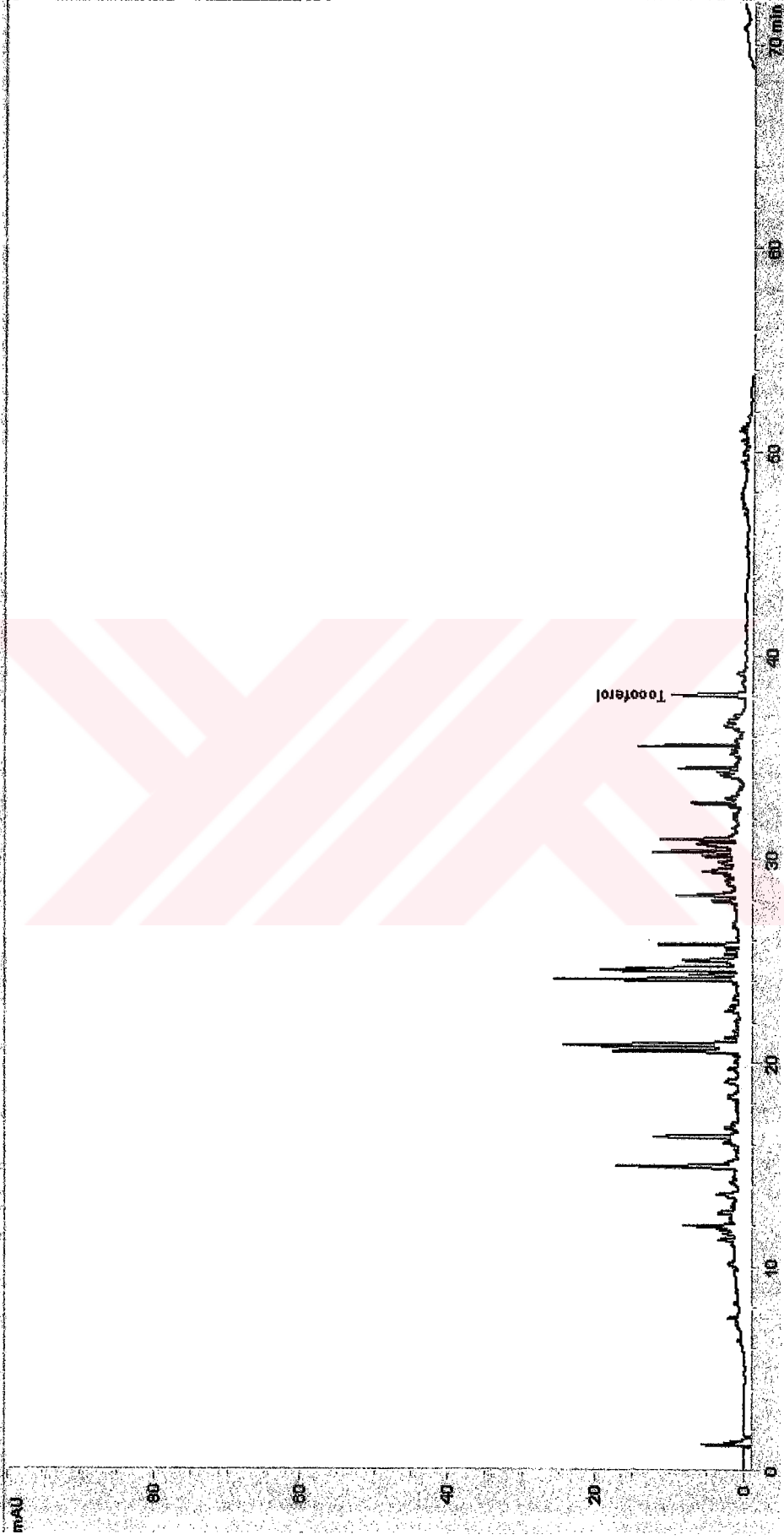
Şekil 3.26 Ferulik asit için hazırlanan standart eğri



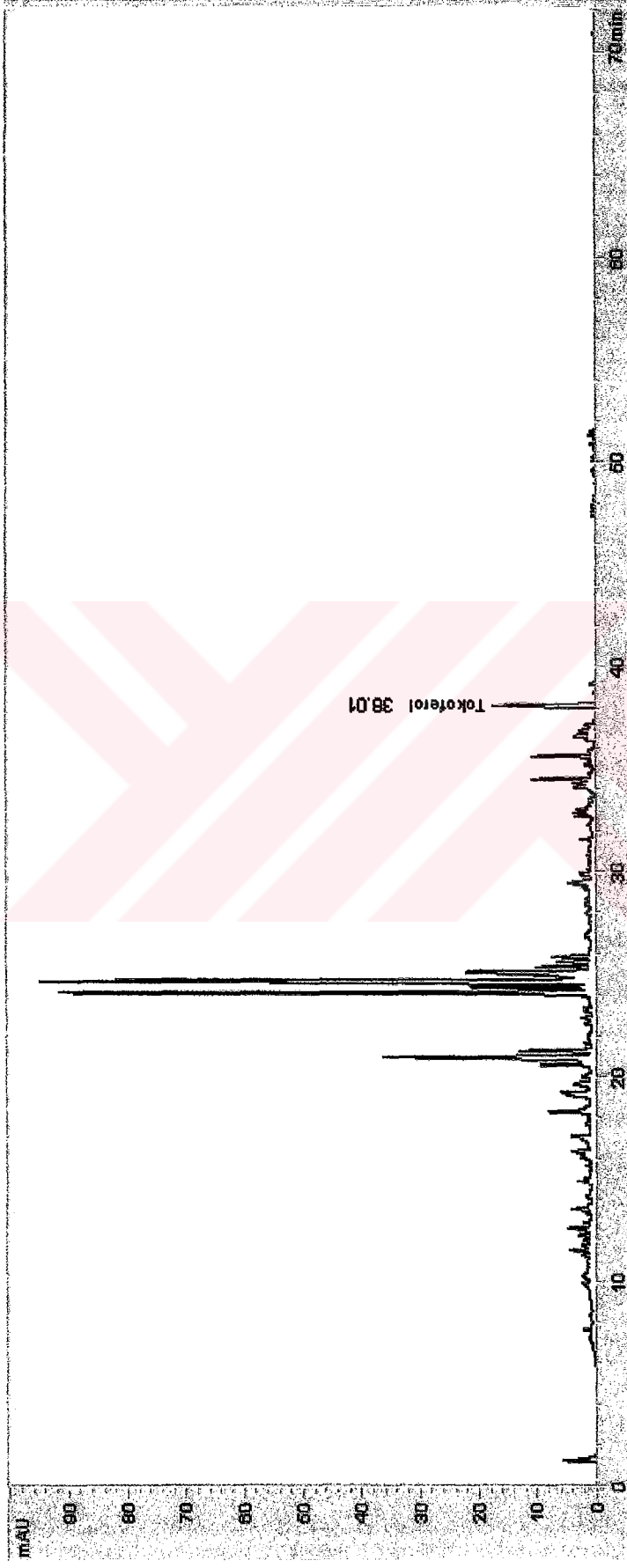
Şekil 3.27 Tokoferol standartları için HPLC kromatogramı



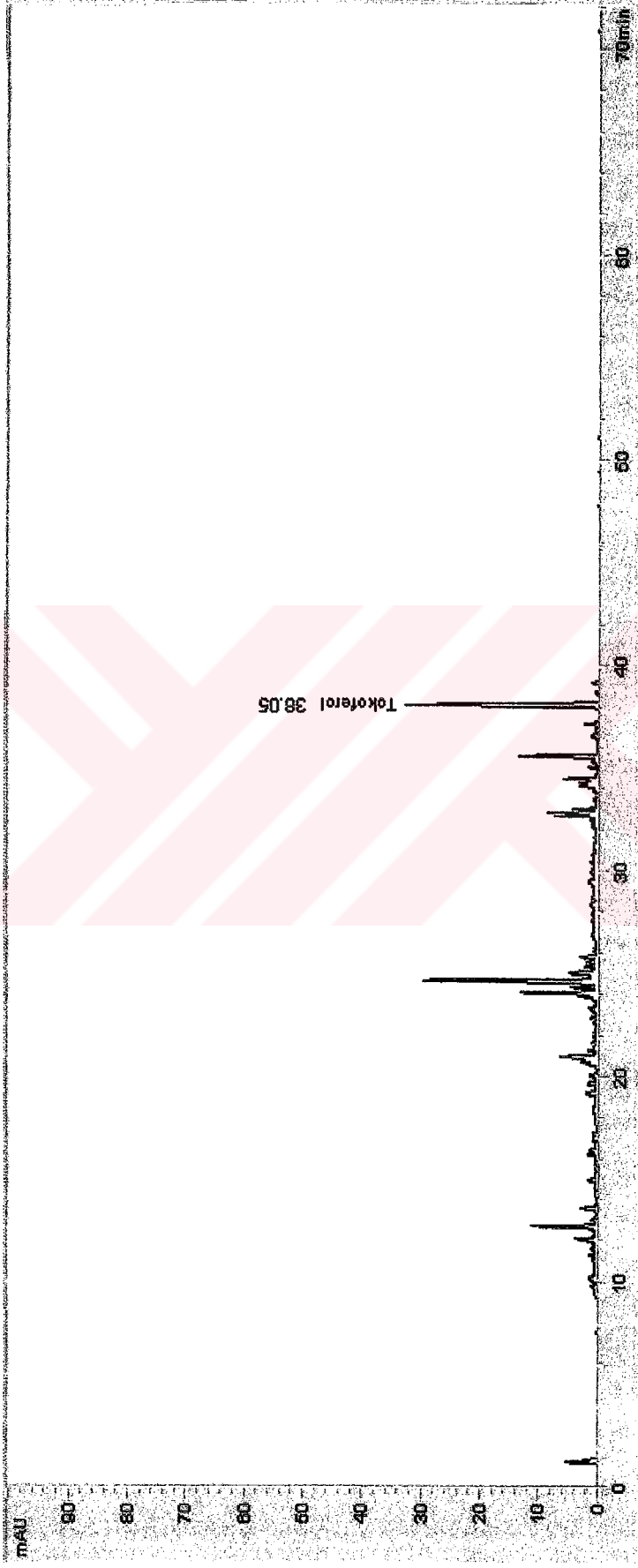
Şekil 3.28 Tokoferol için hazırlanan standart eğri



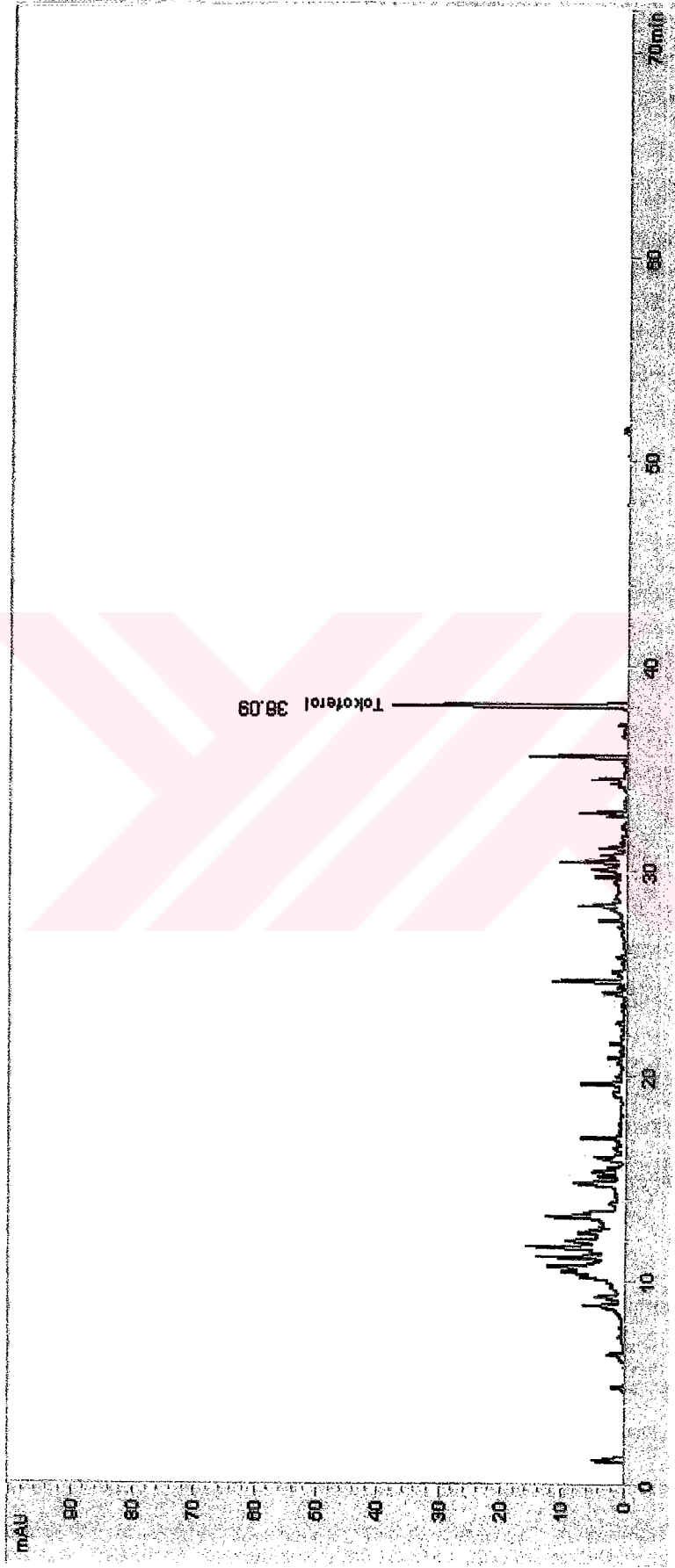
Şekil 3.29 Domat zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı



Şekil 3.30 Edremit zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı



Şekil 3.31 Gemlik zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı



Şekil 3.32 Kiraz zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı



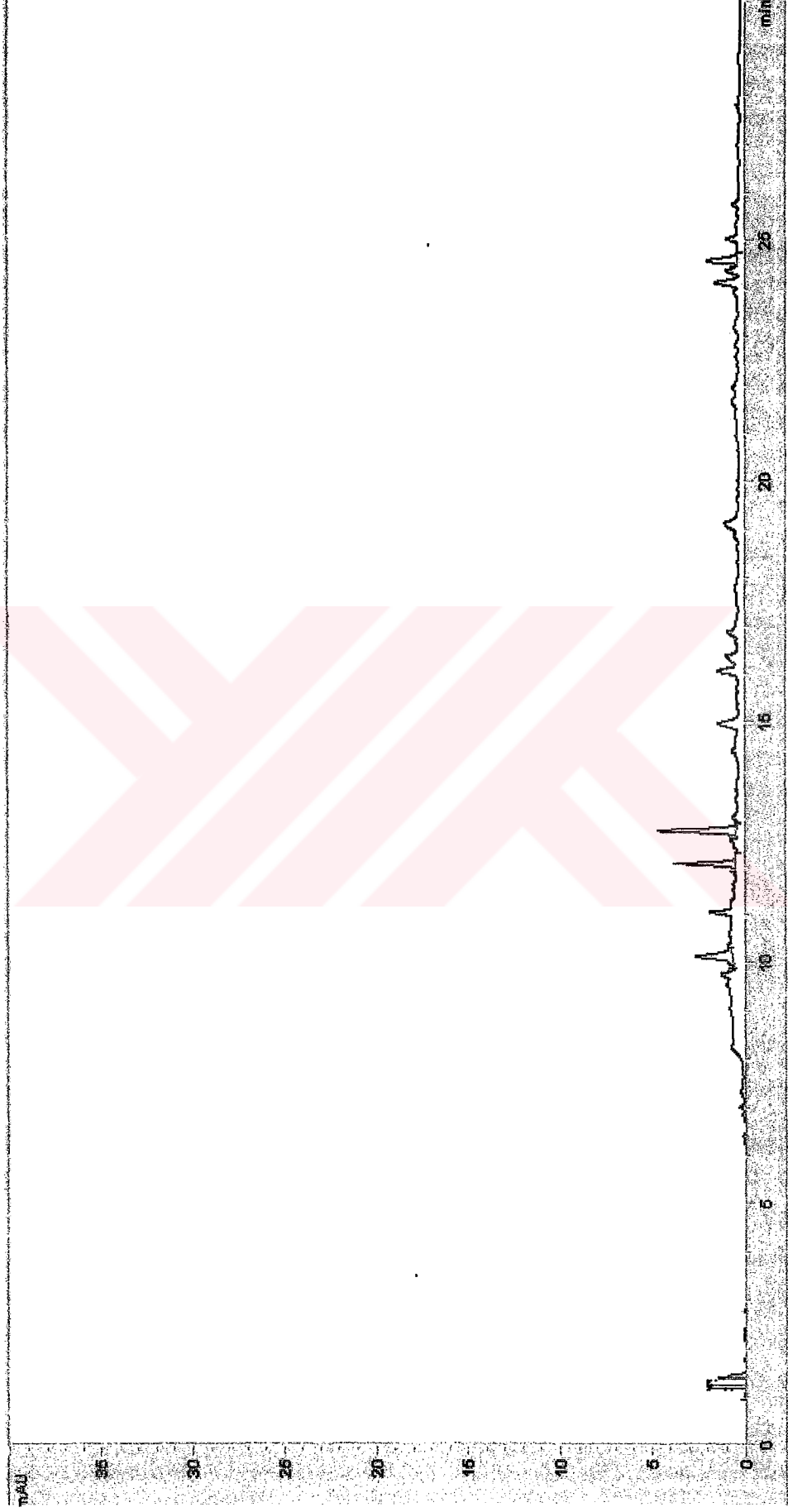
Şekil 3.33 Uslu zeytin yağında tokoferol için HPLC kromatogramı



Şekil 3.34 Domat zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı



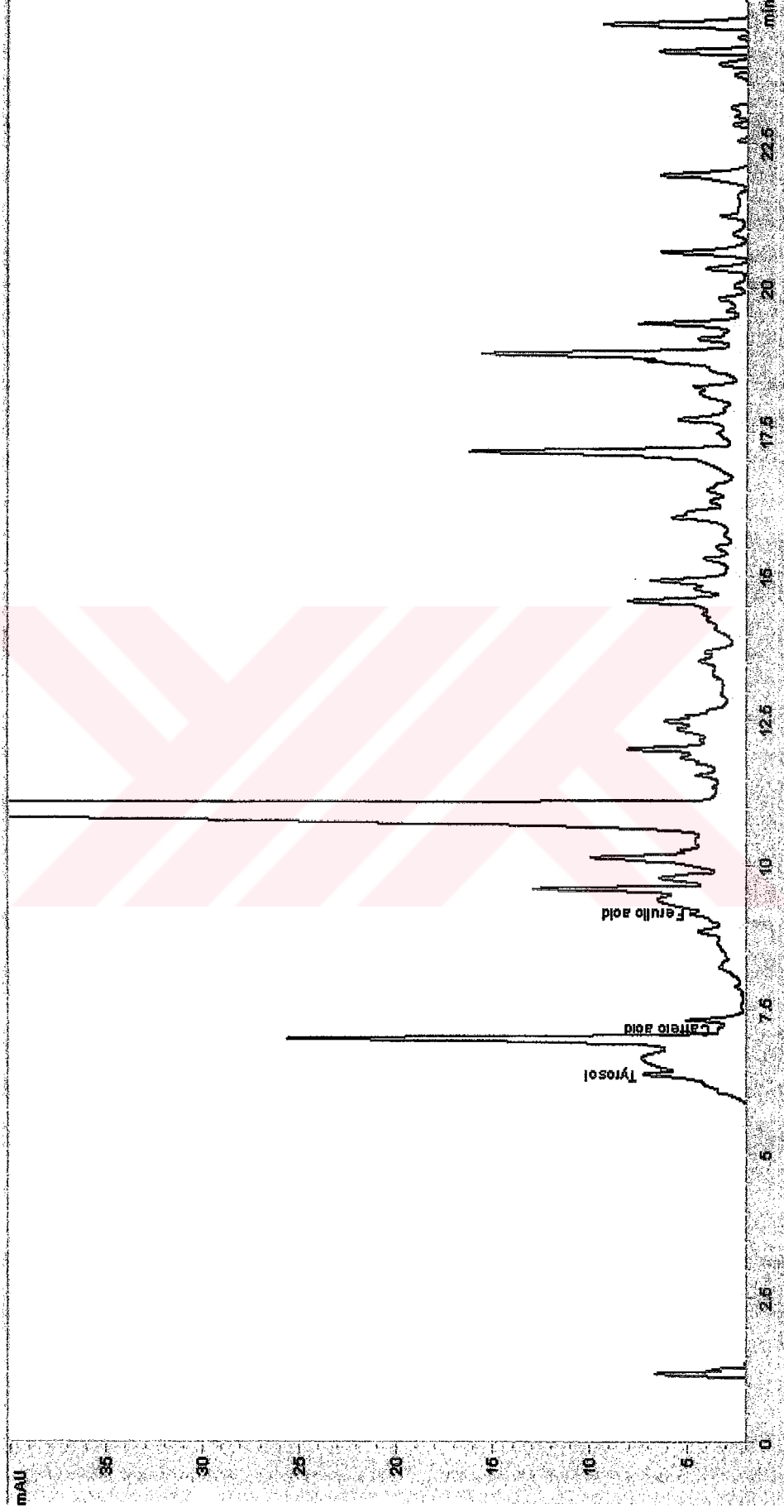
Şekil 3.35 Edremit zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı



Şekil 3.36 Gemlik zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı



Şekil 3.3.7 Kiraz zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı



Şekil 3.38 Uslu zeytin yağında tirozol, kafeik asit ve ferulik asit için HPLC kromatogramı

HPLC ile yapılan deneyler sonucunda elde edilen değerler seyrelme oranı ile çarpılarak 10g yağ için mg/kg cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.23'de verildi.

Çizelge 3.23 Herbir zeytin türündeki antioksidanların mg/kg cinsinden değerleri

Zeytin türü	Tirozol (mg/kg)	Kafeik asit (mg/kg)	Ferulik asit (mg/kg)	Tokoferol (mg/kg)
Domat	1.34	1.69	3.43	6.35
Edremit	-	1.56	-	11.3
Gemlik	-	-	-	22.0
Kiraz	1.1	-	3.54	26.5
Uslu	9.84	1.51	3.68	33.7

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde ölümlerin en önemli sebebinin kanser olduğudur. Bu nedenle kansere karşı en etkili doğal ilaçlar olan antioksidanları içeren gıdaların önemi giderek artmaktadır. Bu gıdaların başında Akdeniz diyetinde önemli bir yeri olan zeytin ve zeytinyağı gelmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde yetiştirilen farklı zeytin çeşitlerindeki (domat, edremit, gemlik, kiraz, uslu) antioksidan maddelerin miktarı araştırılmıştır. Araştırmamızda antioksidan maddeler olarak, α -tokoferol, tirozol, kafeik asit ve ferulik asit seçilmiştir. Bu tercihin en önemli nedeni söz konusu bileşiklerin gıdalardaki yapısal kararlılığının ve miktarının fazla olmasıdır. Ayrıca çalışmamızda, gıda endüstrisinde çoğu zaman istenmeyen enzimatik reaksiyonların başlıca sorumlusu olan PPO enziminin bu zeytin çeşitlerindeki kinetik özellikleri incelenmiştir. Söz konusu zeytinlerdeki PPO aktivitesi ile antioksidan maddelerin miktarları arasındaki korelasyon araştırılmıştır.

Günümüzde, fenolik bileşiklerin çeşidini ve miktarını belirlemede kullanılan en popüler ve en güvenilir yöntem olan HPLC diğer yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. Bu nedenle zeytinyağında bulunan antioksidanların (fenolik bileşikler) miktarı HPLC analizi ile belirlenmiştir. HPLC, UV dedektörünü de içine alan kompleks bir sistemdir. Bu sistemde fenolik bileşiklerin maksimum absorpsiyon gösterdiği 280nm'de ölçüm yapılmıştır [94].

Zeytin yağındaki fenolik bileşiklerin analizi HPLC ile direkt olarak yapılamamaktadır. Zeytin yağından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için literatürde genellikle su, metanol ve izopropanol gibi çözücü karışımı kullanılmaktadır [4,94]. Araştırmamızda iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Standart olarak seçilen tokoferolün ekstraksiyonu için metanol-izopropanol çözücü karışımları kullanılırken, tirozol, kafeik asit ve ferulik asit

için daha polar olan su-metanol karışımı kullanılmıştır. Konsantrasyonları bilinen fenolik bileşiklerin HPLC'de 280nm'deki absorbansları ile gelme zamanlarına karşı standart grafikler kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu standart eğrilerden zeytin yağlarındaki ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin miktarı belirlenmiştir.

Antioksidan özelliği bakımından birbirine benzer aktivite gösteren, tirozol, ferulik asit ve kafeik asit en fazla uslu zeytin çeşidinde saptanmıştır. Ancak gemlik zeytininde sözkonusu antioksidan maddelerin tayin sınırlarının altında olduğu görülmüştür. Literatürde farklı yağlardan bu antioksidanların miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca rafinasyon işleminin ve ısıyla yağlardaki antioksidanların miktarlarındaki değişimler gözlenmiştir [4,5].

E vitamini aktivitesine sahip olan α -tokoferol çalışılan zeytin çeşitlerinin tümünde tespit edilmiştir. Zeytin yağında en fazla bulunan antioksidan çeşidi olan α -tokoferol en çok uslu (33.7mg/kg) zeytin çeşidinde görüldürken, en az domat (6.35mg/kg) zeytin çeşidinde tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada Yunanistanda yetişen 6 çeşit zeytin yağındaki α -tokoferol miktarı tespit edilmiştir. Bu çalışmada α -tokoferol miktarının farklı çeşit zeytinlerde farklı miktarlarda değiştiği bulunmuştur [4].

PPO enziminin neden olduğu kararma gıda işletmeciliğinde karşılaşılan en önemli problemlerden birisidir. Bu zeytinlerdeki, enzimlerin kinetik özelliklerinin saptanması ile antioksidan kapasiteyi düşüren enzimatik kararmayı önleyerek daha etkili metotların geliştirilmesine yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

Söz konusu kaynaklardan elde edilen PPO aktivitesi üzerine pH etkisi araştırılmıştır. DZPPO için optimum pH:7.0 olarak saptanırken diğer enzimler için bu değer 6,5 olarak belirlenmiştir. Ancak genel olarak bütün türlerden elde edilen PPO, pH=5,0-8,5 aralığında önemli ölçüde aktivite gösterdiği şekil 3.1-3.5' lerde açıkça görülmektedir. Diğer kaynaklardan elde edilen PPO'nun optimum pH değerleri tarafımızdan bulunan değerlere oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Örneğin şeftalide optimum pH değeri 6.2 iken yer elmasında ve

dutta 7.0 olduğu literatürde verilmiştir [95,96,97]. Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH sınırın bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceği düşünülebilir

Enzimin substrata karşı ilgisini gösteren K_M ve katalitik gücün bir ölçüsü olan V_{max} değerleri herbir enzim için tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada substrat olarak katekol kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu değerlerin türden türe önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir. Katalitik gücü en yüksek enzim uslu zeytin çeşitinde (7183 U/mL'dak) bulunurken, edremit zeytin çeşidindeki katalitik gücün (810 U/mL'dak) en düşük olduğu belirlenmiştir. Literatürde söz konusu kinetik sabitler Malatya kayısı, hurma ağacı ve yali armudundan izole edilen PPO enzimleri için katekol substratı ile bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 833, 91, 766 U/mL'dak olarak verilmiştir [98]. Bu sonuçlardan uslu zeytinindeki katalitik aktivitenin çok yüksek olduğu söylenebilir. Domat, Edremit, gemlik, kiraz ve uslu zeytinleri için K_M değerleri sırasıyla 6.098, 13.691, 22.491, 5.251 ve 5.747 mM olarak bulunmuştur. Uslu, kiraz ve domat çeşitlerinden elde edilen enzimlerin katekol substratına karşı afinitelerinin hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Gemlik zeytininden elde edilen enzim ise söz konusu substrata karşı ilgisinin zayıf olduğu bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin katekol substratı için 0.011 mM'dan 84.2 mM'a kadar değişen K_M değerleri bildirilmektedir [99].

Yapılan çalışmalar sonucunda uslu zeytininin en yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğu bulunurken gemlik zeytininde en düşük katalitik aktivite tespit edilmiştir.

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğinin araştırılması amacı ile 40,50,60,70 ve 80°C'lerde 10,20,30,40,50 ve 60 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler bulunmuştur. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü ve zamana karşı %aktivite grafikleri çizildi. Bütün zeytin çeşitlerindeki PPO enzimlerinin 70°C'nin üzerine çıktığında denatüre olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ısıya en fazla dayanıklı olan

enzimin EZPPO olduğu görülmüştür. Sıcaklığa en hassas olan enzim ise GZPPO'dir.

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı renatürasyon özelliğinin araştırılması amacı ile denatürasyon çalışmasında kullanılan ve ilgili sıcaklıklarda bekletildikten sonraki enzim çözeltileri 22°C'ye kadar soğutuldu. 22°C'deki enzim aktiviteleri 10,20,30,40,50 ve 60 dakika zaman aralıklarında katekol substratı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü. 22°C'deki inkübasyon süresine karşılık % aktivite grafikleri elde edildi. Bütün enzimler genellikle 40 ve 50°C'lerde renatüre olurken bu sıcaklıkların üzerinde renatürasyon gözlenmemiştir.

Substrat spesifikliğı ve optimum pH'ta olduğu gibi PPO nun ısı stabilitesi de büyük oranda enzim kaynağına bağılıdır. Genelde, PPO yüksek derecede ısıya dayanıklı enzimlerden değildir [100]. Çözelti veya dokulardaki enzimin, kısa bir süre için , 70–90 °C arasındaki sıcaklıklara maruz bırakılması enzimin katalitik fonksiyonunun kısmen veya tamamen dönüşümsüz olarak kaybına sebep olur. Enzimatik kararmayı düşük sıcaklıklara maruz bırakarak engellemeden önce, meyve ve sebze dokularındaki PPO enzimi genellikle ısı ya da kimyasallarla inaktive edilir.

Gıda endüstrisinde enzimatik kararma PPO nun termal inaktivasyonu ile önlenabilir. Ancak bazı gıda ürünlerindeki PPO enziminin renatüre olması bu yöntemin uygulanmasını sınırlamaktadır. Ayrıca ısı uygulamasının gıda ürünündeki doku yumuşamasına ve tat kaybına sebep olması bir diğer sorun olarak ortaya çıkmaktadır[1]. Bu çalışmada endüstriyel öneme sahip bu zeytinlerin işlenmesinde enzimatik kararmanın termal denatürasyon ile belirli ölçüde engellenebileceğı sonucu elde edilmiştir.

Araştırmamızda farklı çeşit zeytinlerin PPO aktiviteleri ile antioksidan madde miktarı arasındaki korelasyon incelenmiştir. Zeytin yağında miktar ve çeşit olarak en yüksek antioksidan içeriğe sahip olan uslu zeytinindeki PPO'nun katalitik aktivitesi de en yüksektir.

KAYNAKLAR

- [1] Wiseman, S., Weisgerber, U., Tijburg, L., and Korver, O 'The Food Industry and Functional Foods'in Antioxidants Food Supplements in Human Healty (Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikava, T., eds), , *Academic Pres*, San Diego, USA.2,(1999), 445
- [2] Bianco, A., Mazzei, A.R., Meichioni, C., Scarpati, M.L., Romeo, G., Uccella, N., 'Mirocomponents of olive oil.PartII:Digalactosyldiacylglycerols from *Olea europaea*' *Food Chemistry*, **3**, (1998) 343
- [3] Quaranta, G.,and Rotundo, V., Economic and commercial prospect for olive oil in view of the changes in the common market organisation (CMO) (Part one), *Olivae* **91**, (2000), 20
- [4] Margari, M-T., Okogeri, O., 'Simultanrous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection' *Food Chemistry*, **74**, (2001) 377
- [5] Brenes, M., Garcia,A., Garsia, P., Rios, J.J., & Carrido, A. 'Phenolic compounds in spanish olive oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, (1999). 3535
- [6] Madhavi, D., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D.K., *Food Antioxidants*. Nee York:Marcel Dekker.Inc. **4**, (1996) 155
- [7] Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billiot, J., Fruit Phonolics; *CRC Press, Boca Raton, FL*, **2**, (1990) 120
- [8] Matheis, G. and Belitz.H.D., Z.Lebens, *Unters.Forsch.*, **163**, (1997), 92
- [9] Fridman, M. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, (1996), 69
- [10] Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Sakiroğlu, H., *Biochem*, **56**, (1992), 1705-1710
- [11] Kahn, V. *J.Food Sci.* **50**, (1985), 111
- [12]. Aziz, N.H, Farag, S.E., Mousa, L.A., Abo Zaid, M.A., *Microbios* **93** (1998), 43
- [13] Samuelsson, G., The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea Europaea*. *Farmaceutisk Revy.* **15**, (1951). 229
- [14] Zarzuelo, A. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica.* **57**, (1991). 417

- [15] Ataman, P., ' Dengeli beslenmede Zeytin yağının önemi' , 1.Uluslar arası Altmoluk 'Antandros' Zeytincilik Sempozyumu Kitabı, Atlantis İletişim Tasarımı, Ankara, (2000), 9
- [16] Delplanque, B., Jusselin, I., Le Roy, B., & Motta. C., Interet nutritional des huiles d'olive. *Oleagineux Corps Gras Lipides*. 6, (1999). 86
- [17] Fito, M., Covas, M. I., Lamuela-Raventos, R.M., Vila, J., Orrents, J., De La Torre, C., & Marrugat, J. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids*, 35, (2000). 633
- [18] Keys, A. 'Mediterranean Diet and Public Health Personal Reflections' in *Am.J.Chim. Nutr.* 61, (1995) 1321
- [19] Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Attei R., E.A. Carlini, Protective effect of Oleuropein, and olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits, *Lipids* 35, (2000) 45
- [20] Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E, Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., The antioxidants/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Europ.J.Cancer* 36, (2000) 1235
- [21] Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1.Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, (1992a). 1571
- [22] Caponio, F., Alloggio, V., & Gomes, T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64, (1999). 203
- [23] Cinquanta, L., Esti, M., & La Notte, E. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemist's society*, 10, (1997). 1259
- [24] Hertog, M.G.L., Feskeens, E.J.M., Hollman, C.H., Katan, M.B., & Kromhout, D. Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease: de Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, (1993). 1007
- [25] Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., Gali, C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents, *Athero-sclerosis*. 117, (1995) 25
- [26] Visioli, F., Gali, C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation, *Life Sci*. 55, (1994) 1965

- [27] Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A., Zappia, V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells, *J. Nutr.* **127**, (1997) 286
- [28] Vazquez, A., Graciani, E., Maestro, R. *Grasas Aceites* **25**, (1974) 269
- [29] Tuck, K.L., Hayball, P.J., 'Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and healthy effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, (2002) 636
- [30] Mannino, S., Cosio, M.S., Bertuccioli, M. High performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oil using amperometric detection. *Ital. J. Food Sci.* **4**, (1993), 363
- [31] Fedeli, E. The behaviour of olive oil during cooking and frying. In *Frying of Food, principles, Changes, New Approaches*; Varela, G., Bender, A.E., Morton, I.d., *Ellis Horwood Press: Chichester, England*. **2**, (1998), 52
- [32] Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, (1981), 966
- [33] Baldioli, M., Servili, M., Peretti, G., Montedoro, G.F. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* **73**, (1996), 1589
- [34] Boskou, D. Olive oil: chemistry and technology. *Champaign, IL: AOCS Press* **2**, (1996), 59
- [35] Papadopoulos, G., & Boskou, D. Antioxidant effects of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* **68**, (1991), 669
- [36] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross C.E. Free Radicals Antioxidants and Human disease: Where are we now? *J. La Clin Med.* **119(6)**, (1992), 598
- [37] Lee, J., Koo, N., and Min, D.B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**, (2004) 210
- [38] Gürsoy, G. 'H₂O₂ ile muamele edilen eritrositlerde SOD, GSH-Px Enzim aktivitelerinin ve MDA düzeylerinin saptanması' *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Adana*, (2000)
- [39] Chui, D., Kuypers, F., Lubin, B. Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage and Antioxidant Therapy, *Lancet*. **23**, (1984), 1396.
- [40] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S. *J. Biol. Chem.* **193**, (1951), 265.

- [41] Valenzuela, A. The Biological Significance of Malondialdehyde Determination In The Assessment of Tissue Oxidative Stres, *Life Sciences*, **48**, (1990), 30309.
- [42] Packer, L. Vitamin E:biological activity and healty benefits:overwiev. In:Packer L, Fuchs, J. Vitamin E in health and disease. *New York: Marcel Dekker*, 1,(1992), 977
- [43] Biorneboe A, Biorneboe G. Drevon C. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *Eur J Nutr* **120**, (1990), 233
- [44] Watkins TR, Bierenbaum ML, Giampalolo A. Tocotrienols:Biological and healty effects. Antioxidants status, diet, nutrition, and healty. *Boca Raton, Fla.:CRC Pres.* **4**,(1999), 479
- [45] Meydani, M. Effect of functional food ingredients:Vitamin E modülation of cardiovascular disease and immune status in the elderly. *Am. J Clin Nutr* **71**, (2000), 1665S
- [46] Papas, AM.. Other antioxidants. Antioxidants status, diet, nutrition, and healty. *Boca Raton, Fla: CRC Press.***3**, (1999c), 231
- [47] Traber, M., Kayden H. Preferential incorporation of α -tocopherol vs gammatocopherol in human lipoprotein. *Am J Clin Nutr*;**49**, (1989), 517
- [48] Serbinova, E., Kagan, V., Han, D., Packer, L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Free Radical Biol Med* **10**, (1991), 263
- [49] Janero, D.R. Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biol Med* **10**, (1991), 315
- [50] Packer, L., Singh, V.N. Nutrition and exercise:introduction and overview. *J Nutr* **122**, (1992), 758
- [51] Singh, V.N. Acurrent perspective on nutrition and exercise. *J Nutr* **122**, (1992), 760
- [52] Davies, K.J.A. Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, (1982),1198
- [53] Hlaswets, H. *Ueber einige Harze Ann.*, **138**, (1866), 61
- [54] *Encyclopedic Dictionary of Chemistry*, Tokyo Kagaku Dojin, (1974)
- [55] Grupta, S., Sukhija P.S., *Milchwissenschaft*, **34**, (1979), 205
- [56] Ibata., Y. *Fragrance Journal* .**45**, (1980), 92
- [57] Imokawa, G. *Fragrance Journal*, .**129**, (1991), 41

- [58] Tsuchiya, S. *Jpn.Kokai Tokyo Koho* 12, (1975) 68560
- [59] Teramoto, S. *JpnKokai Tokyo Koho* 2, (1984), 3181
- [60] Syaku, M. *Jpn.Kokai Tokyo Koho* 4, (1984), 13016
- [61] Funasaka Y. *Fragrance Journal* .26, (1997), 9
- [62] Brenes-Balbuena, M., Garcia-Garcia, P., Garrido-Fernandez, A. 'Phenolic compounds related to the black color formed during thr processin of ripe olives'. *J. Agric Food Chem* 40, (1992), 1192
- [63] Diena, S., Gessa, C., Marchetti, M., Usai, M. Phenolic acid redox properties:pH influence on iron (III) reduction by caffeic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, (1995), 1301.
- [64] Storozhok, N.M. Gureeva, N.V., Krysin, A.P., Daryukhina, E.N., Dolgikh, M.P.,and Popova, L.P. Antioxidant properties of aureole (tyrosol C). *Pharmaceutical Chemistry Journal* . 2, (2002), 14
- [65] Laurila, E., Kervinen R., and Ahvenainen, R., "The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits", *Postharvest News and Information*, 9, (1998), 53.
- [66] Mcweeny, D.J., 'The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites', *J.Sci.Food Agric.*25, (1974), 735
- [67] O'brein, J., Morrissey, P. A., 'Nutritional and toxicological aspects of the Mailard browning reaction in food', *CRC Crit Rev. Food Science and Nutrition*, 3 (1989), 211
- [68] Pekyardımcı, Ş., "Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları", *Gıda*, 17(3), (1992), 181.
- [69] White J.S., and White, D.C.,Source Book of Enzymes, *CRC Pres LLC*, Florida, (1997), 33431.
- [70] Whitaker.J.R., 'Principles of Enzymolgy for the Food Sciences', *Marcel Dekker*. New York, 22,(1972), 124
- [71] Brown, B.R., 'Biochemical aspect of oxidative coupling of phenolic in oxidative coupling of phenols', 'Taylor, W.I. And Battersby.A.R.,eds.', *Marcel Dekker*, New York, Chap.4, (1967) 144
- [72] Cemeroğlu,B. 'Meyve ve Sebze İşletme Teknolojisi'. *Gıda Teknolojisi Derneği*. 6, (1988), 85

- [73] Kahn, V., 'Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning' *J Food Agric.*, **28**, (1977), 233
- [74] Garret, B.C., 'Reinvestigation of phenol oxidase activity by improved analytical techniques', *Diss.Abst.*, **36(7)**, (1976), 3340-B
- [75] Herrmann, K., 'Über Verfärbungen des Gemüses durch phenolische Inhaltsstoffe', *Disch. Lebensm.Rdsch.*, **72**, (1976), 90
- [76] Matheis, G. And Belitz, H.D. 'Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E.C. 1,14,18,1 monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase', *Z.Lbensm. Unters.Forsch.*, **163**. (1977), 191
- [77] Herrmann, K., 'Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydantein', *Fete. Scifen.Anstrichm.*, **75**, (1973), 499.
- [78] Sondheimer. E., 'Chlorogenic acids and related depsides', *Bot. Rev.*, **30**, (1964), 667
- [79] Şakiroğlu. H., Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, *Doktora Tezi Atatürk Üniv., Fen Bilimleri ENS., Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, (1994)
- [80] Sato, M., 'The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid', *Phytochemistry*, **8**, (1962), 353
- [81] Stelzig, D.A., Akhtar, S. And Riberio, S. "Catechol oxidase of Red Delicious Apple Peel", *Phytochemistry*, **11**, (1972), 535.
- [82] Martin, W. And Ruberte, R., "The polyphenol of *Dioscorea alata* (yam) tubers associated with oxidative browning", *J. Agric. Food. Chem.* **24**, (1976), 67.
- [83] Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre, G. and Neumman, J., "Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase", in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. E. Ed. *Pergamon Press., Oxford*, **1**,(1963), 33.
- [84] Vamos-Vigvazo, L. and Gejzago, L. "Substrate specificity of the enzymatic browning of apples", *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, **7**, (1978), 79.
- [85] Mayer, A.M., "Polyphenol oxidase in plants-Recent progress", *Phytochemistry*, **26**, (1987),11.
- [86] Kahn, V., "Latency properties of polyphenol oxidase activities in two avocado cultivars differing in their rate of browning", *J. Food Agric.*, **28**, (1977), 233.

- [87] Harel, E., Mayer, M. And Shain, Y., " Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in devolving apples", *J. Sci. Food Agric*, **17**, (1996), 389.
- [88] Gross, D. And Coombs, J. " Enzymatic colour of formation in beet and cane juices", Paper presented at the 15th *General Assembly of C.I.T.S.*, (1975)
- [89] Vamos-Vigvazo, L. " Polyphenol oxidase ans peroxidase in fruits and vegetables ", *CRC, Critical rewiews in Food Science and Nutrition* , **14**, (1981), 44.
- [90] Flurkey, F.H. and Jen, J.J. " Peroxidase and polyphenol oxidase activities in devolving peaches ", *J. Food Sci.*, **43**, (1978) 1826.
- [91] Palmer, J.K., " Banana polyphenol oxidase. Preperation and properties", *Phys., Plants* **38**, (1963) 508.
- [92] Walker, J.R.L., " Enzymatic browning in food. A Rewiev", *Enzyme Technol. Dig.*, **4(3)**, (1975), 89.
- [93] Loomis, W.D., "Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes", *Methods Enzymeol.*, **13**, (1968), 555.
- [94] Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. And Miniati, E., " Simple and hyrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC", *J. of Agric Food Chem.* **40**, (1992a)1571.
- [95] Euclides, J.L., and Valdir, A.N., 'Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenol Oxidase from Palmito', *J.Sci.Food Agric.* **52**, (1990), 249.
- [96] Beena, P., and Gowda, L.R., 'Purification and Characterization of polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean', *J.Agric.Food Chem.*, **48**, (2000), 3839
- [97] Erzengin, M., 'Farklı kaynaklardan afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi' Doktora Tezi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enst Kimya Anabilim Dalı(2001)*
- [98] Nagai, T., and Suzuki, N., 'Partial Purification of polyphenol Oxidase from Chines Cabbage' , *J.Agric.Food Chem.*, **49**, (2001), 3922
- [99] Jharna, R.D., Santhoor, G.B., and Lalitha, R.G., 'Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Kew Cultivar of Indian Pineapple Fruit' *J.Agric. Food Chem.*, **45**, (1997), 2031
- [100] Voight. J., and Noske, R., 'Zur Bestmmung der Polyphenoloxidase aktivitat. H.Orientierende Versuche zur Anwendbarken der Methode mit Besthorns Reagens in Apfeln', *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, **130**, (1986), 9