



**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN POSOF BADELE
ELMASINDAN(*Malus domestica* L.)
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
KİMYASALLARIN VE METAL İYONLARININ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayhan ÇİĞDEM
Yüksek Lisans Tezi

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER
2019

Her hakkı saklıdır

**T.C.
IĞDIR ÜNİVERSİTESİ**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN POSOF BADELE ELMASINDAN (*Malus domestica*
L.) SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN VE
METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayhan ÇİĞDEM

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

IĞDIR

2019

Her hakkı saklıdır

Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER danışmanlığında Ayhan ÇİĞDEM tarafından hazırlanan bu çalışma 30.12.2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Gıda Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER (Danışman)

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun / /2020 tarih ve 2020/ sayılı kararı ile onaylanmıştır.

(imza)

.....

Doç. Dr. Süleyman TEMEL

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ayhan ÇİĞDEM

Bu çalışma Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2017- FBE -L28

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

ÖZET

POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN POSOF BADELE ELMASINDAN(*Malus domestica* L.) SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN VE METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÇİĞDEM, Ayhan

Yüksek Lisans Tezi, Gıda mühendisliği Ana bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER

Aralık 2019, 84 sayfa

Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) yapılan bu çalışmada polifenol oksidaz (PPO) enzimi aseton çöktürmesi yöntemiyle kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra afinite kromatografisiyle saflaştırılıp karakterize edilmiş ve enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir. Saf enzim örnekleri SDS-PAGE yapıldığında PPO enzimi tek bir bant şeklinde gözlenmiş, enzimin saflaştırıldığı ispat edilmiştir. L-Tirozin, 4-metilkatekol (4-MK) ve katekol substratlarından faydalanılarak PPO'nun spesifik substratı tespit edilmiştir. PPO'nun 4-MK substratıyla optimum pH'sının 5,5 olduğu saptanmıştır. K_M ile V_{max} değerleri katekol substratıyla 33,3 mM ve 5,86 EU/mLdk, 4-MK substratıyla ise 8,53 mM ve 3,54 EU/mLdk olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık, pH kararlılığı, termal stabilitesi ve inhibisyon çalışmaları için PPO'nun aktivitesi 4-MK substratıyla ölçülmüştür. Enzimin stabil pH'sının 6,0, optimum sıcaklığının ise 10°C olduğu saptanmıştır. PPO'nun termal ısı kararlılığı incelendiğindeyse, 15 dakika arayla toplam 1 saat yapılan inkübasyonların ardından, 0-10-20-30°C sıcaklıklarında kararlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca saflaştırılan enzim üzerine bazı metal iyonlarının (Mg^{2+} , Al^{3+} , K^+ , Cu^{2+} ve Na^+) ve kimyasalların etkileri incelenmiştir. Al^{3+} ve Cu^{2+} metal iyonlarının enzimi aktive ettikleri tespit edilmiştir. K_i ile I_{50} değerleri hesaplanmış ve inhibisyon türleri tespit edilmiştir. Posof Badele elması (*Malus domestica* L.) PPO'su üzerine en kuvvetli inhibisyon etkisinin askorbik asit tarafından yapıldığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Posof Badele elması, Saflaştırma, Polifenol oksidaz, inhibisyon, karakterizasyon

ABSTRACT

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM POSOF BADELE APPLE (*Malus domestica* L.) AND INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME CHEMICALS AND METAL IONS ON ENZYME ACTIVITY

ÇİĞDEM, Ayhan

Master Thesis, Food Engineering Main Discipline

Thesis Adviser: Assist. Prof. Dr. Uğur GÜLLER

December 2019, 84 pages

In the current study, performed with Posof Badele apple (*Malus domestica* L.), polyphenol oxidase (PBPPPO) enzyme was partially purified by acetone precipitation method, then purified by affinity chromatography and kinetic properties of enzyme were investigated. When SDS-PAGE was done with pure enzyme samples, PPO was seen as a single band and purity of enzyme was proved. Specific substrat of PPO was determined by using L-Tyrosine, 4-methylcatechol (4-MK) and catechol substrates. The optimum pH of the polyphenol oxidase with 4-MK substrate was found as 5.5. K_M and V_{max} values for catechol were determined as 33.3 mM and 5.86 EU/mLmin, for 4-MK substrate these values were determined as 8.53 mM and 3.54 EU/mLmin respectively. For optimum temperature, pH stability, thermal stability, and inhibition studies enzyme activities were examined with 4-methyl catechol substrate. Stable pH of the enzyme and optimum temperature were found as 6.0 and 10°C respectively. When thermal stability of PPO was examined, it was found that after incubation for 1 hour at 15 minute intervals, it was stable at 0-10-20-30°C. Besides, effects of some metal ions (Mg^{2+} , Al^{3+} , K^+ , Cu^{2+} and Na^+) and chemicals on pure enzyme activity were investigated. Al^{3+} and Cu^{2+} metal ions were found to activate the enzyme. K_i and I_{50} values were calculated and inhibition types were determined. It was found that the strongest inhibitory effect on the PPO from Posof Badele apple (*Malus domestica* L.) was made by ascorbic acid.

Key words: Posof Badele apple, Purification, Polyphenol oxidase, inhibition, characterization

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Meyve ve sebzelerde PPO enziminden kaynaklanan esmerleşme reaksiyonu hakkında detaylı bir bilgi sunma adına Posof Badele elmasından (*Malus domestica L.*) PBPPO enzimini saflaştırıp bazı karakterizasyon işlemlerini uyguladıktan sonra bazı metal iyonları ve inhibitörlerin enzime karşı olan etkileri incelenmiştir. Yaptığımız çalışmayla ürünün tat lezzet ve görünüşünün bozulmasına yol açan esmerleşme reaksiyonunun engellenmesi için gerekli deneysel veriler sunulmuştur.

Yapmış olduğum tez çalışmaları boyunca benden bir an için bile olsa desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda bana bilgi ve deneyimleriyle danışmanlık eden sayın Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER'e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımda bana verdiği destekler için sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA'ya ayrıca teşekkür ederim.

Tezim için gerekli olan materyal ve kimyasalları sunduğu için Iğdır üniversitesine teşekkür ederim.

Ayhan ÇİĞDEM

Aralık, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar	33
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler.....	33
3.1.3.Kullanılan çözelti ve tamponlar	34
3.1.3.a. Protein tayini (Bradford Metodu) için kullanılan çözeltiler.....	34
3.1.3.b. Protein elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	34
3.1.3.c. Gümüş boyamada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	35
3.1.3.ç. Afinite jelinin sentezinde kullanılan kimyasallar ve tamponlar.....	35
3.1.3.d. Substrat çözeltileri	36
3.1.3.e. İnhibitör çözeltileri.....	36
3.1.3.f. Metal iyonları stok çözeltileri.....	36
3.1.3.g. Diğer çözelti ve tamponlar.....	36
3.2. Metot	37
3.2.1.PBPPO enziminin aktivite ölçüm yöntemi	37
3.2.2. Ekstraksiyon hazırlama ve asetonla çöktürme.....	37
3.2.3. Afinite jelinin sentezi.....	38
3.2.4. Ekstrakt çözeltisinin afinite kolona yüklenmesi ve enzimin elüsyonu	39
3.2.5. Protein tayini.....	40

3.2.5.a. Kalitatif protein tayini	40
3.2.5.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini	40
3.2.6. SDS Jel Elektroforezi	41
3.2.7. Gümüş Boyama	42
3.2.8. Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar	43
3.2.8.a. PBPPO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	43
3.2.8.b. PBPPO enzimine optimum iyonik şiddetin etkisi.....	43
3.2.8.c. PBPPO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	43
3.2.8.ç. PBPPO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	43
3.2.8.d. PBPPO enziminin pH kararlılığının incelenmesi	43
3.2.8.e. PBPPO enziminin ısı kararlılığının incelenmesi.....	44
3.2.8.f. PBPPO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	44
3.2.8.g. PBPPO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	44
3.2.8.ğ. PBPPO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin belirlenmesi	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik	46
4.2. PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	47
4.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	49
4.3.1. Polifenol oksidazın elektroforetik olarak karakterizasyonu	49
4.3.1.a. PBPPO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	52
4.3.1.b. PBPPO enzimine optimum iyonik şiddetin etkisi.....	53
4.3.1.c. PBPPO enziminin pH kararlılığının incelenmesi.....	54
4.3.1.ç. PBPPO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	55
4.3.1.d. PBPPO enziminin ısı kararlılığının incelenmesi	56
4.3.1.e. PBPPO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	57
4.3.1.f. PBPPO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	59
4.3.1.g. PBPPO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71

KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%.....	Yüzde
dk.....	Dakika
EÜ.....	Enzim ünitesi
EÜ/mgprotein.....	Enzimin spesifik aktivitesi
I.....	İnhibitör
I ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa.....	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Michaelis-Menten sabiti
mg.....	Miligram
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
M.....	Molar
UV.....	Ultraviyole
V _{max}	Enzimatik reaksiyonun ulaştığı maksimum hız
µL.....	Mikrolitre

Kısaltmalar

4-MK.....	4-Metil katekol
APS.....	Amonyum persülfat
BSA.....	Bovine Serum Albumin
DHPPA.....	3,4-dihidroksifenil propiyonik asittin

DMF	Dimethyl formamide
DOPA	Dihidroksi fenilalanin
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBPPO	Posof Badele polifenol oksidaz
PEG	Polietilen glikol
PHPPA	p-hidroksifenil propiyonik asit
PPO	Polifenol okidaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	Tetra etil metilen daimin
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Michaelis- Menten Denklemleri anahtar kilit modeli (Ruiz, 2019).....	3
Şekil 1.2. Michaelis-Menten grafiği.....	5
Şekil 1.3. Lineweaver-Burk grafiği.....	6
Şekil 1.4. Yarışmalı (competitive) inhibisyon şeması.....	7
Şekil 1.5. Yarışmalı (competitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği.....	8
Şekil 1.6. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması.....	8
Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği.....	9
Şekil 1.8. Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması.....	9
Şekil 1.9. Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği.....	10
Şekil 1.10. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması..	10
Şekil 1.11. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyonun Lineweaver Burk grafiği.....	11
Şekil 1.12. Esmerleşme için enzimatik ve müteakip enzimatik olmayan kümelenme işlemlerinin şematik gösterimi (Yoruk and Marshall, 2003)	15
Şekil 1.13. o-dihidroksifenol oluşumu.....	16
Şekil 1.14. o – benzokinon oluşumu.....	16
Şekil 1.15. PPO'nun 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH) içerisinde mono ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: o-kinon, N: MBTH, ND: MBTH -difenol renksiz katılma ürünü, NK: MBTH -kinon katılma ürünü) (Espin <i>et al.</i> , 1996).....	20
Şekil 3.1. Siyonojen bromürle aktifleştirilmiş Sepharose-4B'den afinite jelinin sentez basamakları.....	39
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif analizinde kullanılan standart grafik.....	46
Şekil 4.2. PBPPO'nun afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmasıyla elde edilen elüsyon grafiği.....	47
Şekil 4.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi, B: Saf Enzim Elüatı, A: Protein Standartı; (120 kDa E. Coli β -galaktozidaz, 85 kDa BSA, 50 kDa tavuk yumurtası ovalbümin, 35 kDa sığır eritrosit CA, 25 kDa inek sütü β -laktoglobulin ve 20 kDa tavuk yumurtası lizozim.....	50
Şekil 4.4. PBPPO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde	

kullanılan standart logMK-Rf grafiği.....	51
Şekil 4.5. 4-metil katekol substratı varlığında PBPPO aktivitesinin pH ile değişim grafiği.....	52
Şekil 4.6. PBPPO enziminin optimum iyonik şiddeti grafiği.....	53
Şekil 4.7. PBPPO'sunun pH kararlılığı.....	54
Şekil 4.8. PBPPO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi.....	55
Şekil 4.9. PBPPO enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık grafiği.....	54
Şekil 4.10. Katekol varlığında PBPPO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği.....	58
Şekil 4.11. 4-Metil katekol varlığında PBPPO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği.....	58
Şekil 4.12. PBPPO enzim aktivitesi üzerine askorbik asittin etkisini gösteren % aktivite(EÜ/mL) grafiği.....	59
Şekil 4.13. PBPPO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfittin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.....	60
Şekil 4.14. PBPPO enzim aktivitesi üzerine benzoik asittin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.....	60
Şekil 4.15. PBPPO enzim aktivitesi üzerine L-sistein etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.....	61
Şekil 4.16. PBPPO enzim aktivitesi üzerine askorbik asittin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	62
Şekil 4.17. PBPPO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfittin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	63
Şekil 4.18. PBPPO enzim aktivitesi üzerine benzoik asittin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	63
Şekil 4.19. PBPPO enzim aktivitesi üzerine L-sisteinnin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	64
Şekil 4.20. PBPPO enzim aktivitesi üzerine NaCl etkisini gösteren % aktivite (EÜ/ml) grafiği.....	66
Şekil 4.21. PBPPO enzim aktivitesi üzerine MgCl ₂ etkisini gösteren % aktivite	67

(EÜ/ml) grafiği.....	
Şekil 4.22. PBPPO enzim aktivitesi üzerine KCl etkisini gösteren % aktivite (EÜ/ml) grafiği.....	67
Şekil 4.23. PBPPO enzim aktivitesi üzerine CuCl_2 etkisini gösteren % aktivite (EÜ/ml) grafiği.....	68
Şekil 4.24. PBPPO enzim aktivitesi üzerine AlCl_3 etkisini gösteren % aktivite (EÜ/ml) grafiği.....	68
Şekil 4.25. PBPPO enzim aktivitesi üzerine NaCl'nin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	69
Şekil 4.26. PBPPO enzim aktivitesi üzerine MgCl_2 'ün inhibisyon türünü gösteren grafik.....	69
Şekil 4.27. PBPPO enzim aktivitesi üzerine KCl'nin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar	32
Çizelge 3.2. SDS-PAGE bileşenleri	42
Çizelge 4.1. PBPPO enzimi için saflaştırma tablosu.....	48
Çizelge 4.2. PBPPO'sunun aktivitesi üzerine dört farklı inhibitörle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen I_{50} değerleri.....	61
Çizelge 4.3. PBPPO'su üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal maddelerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	66
Çizelge 4.4. PBPPO enzimi için bulunan I_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	70
Çizelge 5.1. PBPPO enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, I_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	72

1. GİRİŞ

Hayvansal ve bitkisel hücrelerde üretilen biyolojik olaylarda kendisini değiştirmeden kimyasal reaksiyonlarını hızlandıran protein yapıdaki organik karmaşık maddelere enzim denmektedir (Topal, 1985).

Enzimler yaşamın katalizörleridir. Bütün yaşam sistemlerindeki (Tüm hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar) reaksiyonların çoğunu yaparlar. Hayatlarımız kesinlikle onlara bağlıdır. Oksijen alıp karbondioksiti vermek bile enzimlerine bağlıdır. Bitkilerimiz mineralleri, suyu ve havayı alır ve bunları meyve ve sebzelerimizi enzimlerle sağlamak için karbondioksit ve amonyakla birleştirir. Enzimler tüm yaşamın kilit noktasıdır. Bu nedenle, tüm organizmaların yüzlerce farklı enzim içermesi şaşırtıcı değildir. Nitelik bakımından aynı enzimatik aktiviteye sahip aynı organ içerisinde bir enzimin çoklu protein formları olan izoenzimleri yaygın olarak bulunmaktadır. İzoenzimler, aynı organda farklı genler tarafından üretilen bir enzimin farklı protein formlarıdır. Bu nedenle, her izoenzim farklı bir gen tarafından kodlanır. Enzimler, substratları (ve kofaktörleri) aktif bölgeye yakın stereospesifik olarak yönlendirilmiş bölünebilir bağla reaksiyonları gerçekleştiren katalitik gruplara birleştirir (Whitaker, 2002a).

Enzim proteinlerinin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için metaboliti tanıması gerekmektedir. Enzimin katalitik reaksiyonunun aktivitesi düzenlenebilir. Enzim proteininin substrat ile birleşmesi enzim substrat kompleksini meydana getirmektedir. Enzim çoğunlukla bir substratı katalize eder ve substratı ikinci bir ürüne dönüştürmesi, reaksiyon dengeye ulaşana kadar sürmektedir. Bu bakımdan her enzimin belirli bir substrat ve belirli bir etki spesifikliğı vardır. Enzimin birçok substrat içerisinde yalnızca birini seçmesine substrat spesifikliğı, enzimin substratı yapabileceğı birkaç dönüştürme biçimlerinden sadece birine göre olayı gerçekleştirmesine ise etki spesifikliğı denilmektedir (Topal, 1985).

Enzimlerin katalizleme ölçüsü turnover sayısıyla belirlenmektedir ve turnover sayısı ise 1 mol enzimin birim zamanda ürüne çevirdiğı substratın mol sayısı olarak ifade edilmektedir.

Enzimlerin miktarı, içlerinde var olan aktiviteleri dikkate alınarak enzim ünitesi (E.Ü) biçiminde ifade edilir. Yaygın bir E.Ü tanımı olmamakla beraber, normal şartlarda 1 mL'lik reaksiyon karışımı içerisinde dakikada 0,001 absorbans yükselişiyle sonuçlanan enzimin miktarı biçimde tanımlanmıştır (Özen, 2004). Enzimin saflık miktarının bir ölçüsü olan polifenol oksidazın spesifik aktivitesi; bir mg proteinde bulunan enzim ünitesi EU/mgprotein olarak tanımlanmıştır (Kolcuoğlu, 2012).

Enzimin substrata bağlanması, enzimin substratı tanıması ile mümkündür. Substratın enzim ile bağ kurması ise ancak enzim proteinin çok spesifik bir noktasından olabilir ve bu noktaya o enzime ait katalitik merkez denmektedir. Enzimin katalitik etkisi Michaelis ve Menten tarafından denkleştirilmiştir (Topal, 1985).

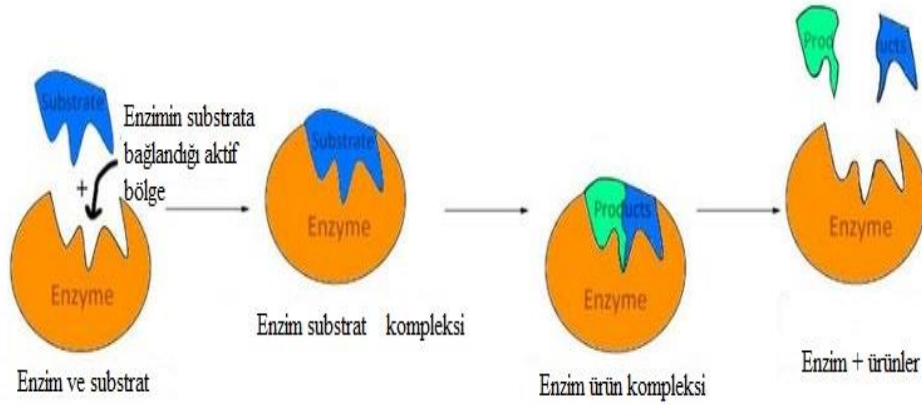
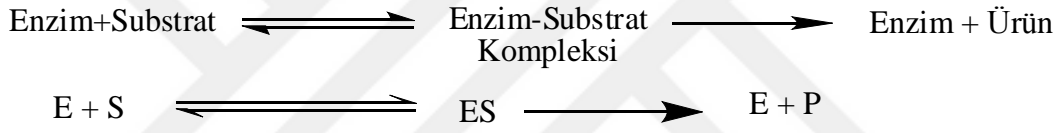
Substrat enzim katalizli reaksiyonlar için hız ifadesi, 1902'de Henri tarafından ve daha sonra bilinen ilk enzim ve substrat konsantrasyonları ve sabit reaksiyon kuvveti 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından geliştirilmiştir. Denklem 1.1'de ifade edildiği gibi S, bağlanmamış (serbest) substrat konsantrasyonu, V_{max} maksimum reaksiyon hızı ve K_M Michaelis-Menten doyma sabiti olacak şekilde formül haline getirilmiştir (Kargi, 2009).

Michaelis-Menten kinetiğine göre enzimatik reaksiyonların hızı enzim konsantrasyonu ile doğrusal olarak ve substrat konsantrasyonunun hiperbolik olarak değişmesiyle değişmektedir. Enzim molekülleri, substrat moleküllerinin enzim-substrat kompleksini oluşturmak için bağlandığı belirli sayıda aktif bölgeye sahiptir. Reaksiyon hızı, substrat bağlı enzim konsantrasyonu ile belirlenmektedir (Kargi, 2009).

Düşük substrat konsantrasyonlarında ($S \ll K_M$), enzim aktif bölgelerinin küçük bir kısmı, substrat molekülleri tarafından işgal edilir ve reaksiyon hızı, lineer olarak birinci dereceden bir reaksiyon kinetiği veren artan substrat konsantrasyonu ile artar (Kargi, 2009).

Yüksek substrat konsantrasyonlarında ($S \gg K_M$), enzimin tüm aktif bölgeleri substrat (doymunluk) tarafından işgal edilir ve substrat konsantrasyonundaki artışlar, sıfır dereceli reaksiyon kinetiği veren reaksiyon hızını arttırmaz yani $V = V_{max}$ olur (Kargi, 2009).

Enzim substrat katalizli reaksiyonları, E'nin enzim, S'nin substrat, ES'nin enzim-substrat kompleksi ve P'nin ürün olduğu aşağıdaki şekil 1.1 ile tarif edilir. İlk reaksiyonun ES kompleksini oluşturan hızlı bir dengeye ulaştığı varsayılmaktadır. Enzim, substrat üzerinde bazı değişiklikleri katalize eder ve ürünü reaksiyon ortamına bırakır. İkinci reaksiyon, ters reaksiyona neden olmak için kayda değer miktarda ürün üretilinceye kadar sadece ileri yöndedir. Enzim katalizli reaksiyonların ilk aşamaları için ikinci reaksiyonun sadece denge olmaksızın ileri yönde olduğu varsayılmaktadır. Bununla birlikte, ters reaksiyon, reaksiyonun sonraki aşamalarında önemli olabilmekte ve ikinci reaksiyon için bir denge kurulabilmektedir (Kargi, 2009).



Şekil 1.1. Michaelis- Menten Denklemi anahtar kilit modeli (Ruiz, 2019)

Serbest (bağlanmamış) enzim (E) ve substrat (S) konsantrasyonları, enzimin ve substratın nispi başlangıç konsantrasyonlarına bağlıdır. İlk $[E]_0 / [S]_0$ oranına dayanarak üç farklı durum tespit edilebilir.

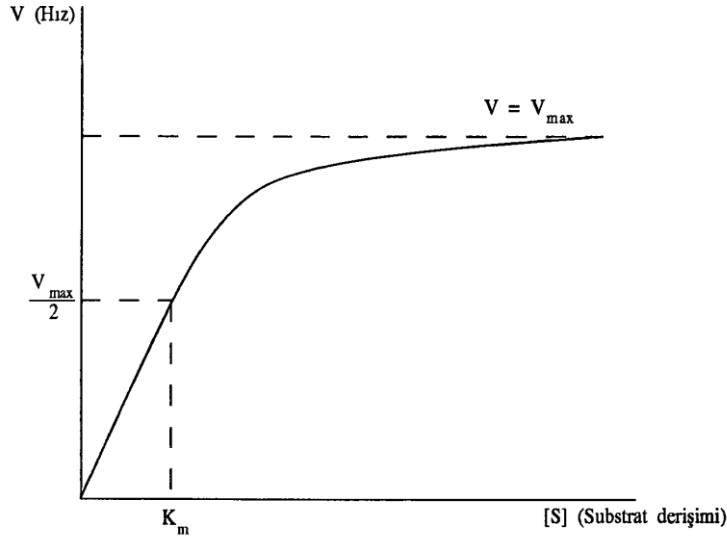
(a) İlk enzim konsantrasyonu, başlangıçtaki substrat konsantrasyonundan fazladır. Yani $[E]_0 / [S]_0 \gg 1$. Bu durumda, enzimin sadece bir kısmı substrata bağlanır veya enzimin bir kısmı serbesttir. Hız, substratın mevcudiyeti ile sınırlıdır ve artan substrat konsantrasyonu veya reaksiyon ortamına ilave substrat ilavesiyle artar. Bu durumda,

reaksiyon hızı hiperbolik olarak substrat konsantrasyonuna göre değişir, çünkü serbest substrat konsantrasyonu çok düşüktür ve hız sınırlayıcıdır. K_M , reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına eşit olduğu aynı zamanda hız sabitinin yarısı olarak bilinen substrat konsantrasyonudur.

(b) İlk substrat konsantrasyonu, başlangıç enzim konsantrasyonunun dan fazladır. Yani $[E]_0 / [S]_0 \ll 1$: Bu durumda, substratın sadece bir kısmı enzime bağlanır ve substratın bir kısmı serbest haldedir. Bununla birlikte, tüm enzim molekülleri substrata bağlıdır ve serbest enzimin konsantrasyonu çok düşük veya ihmal edilebilir seviyededir. Hız, enzimin mevcudiyeti ile sınırlıdır ve artan enzim konsantrasyonu veya reaksiyon ortamına ekstra enzim eklenmesiyle artar. İlk enzim konsantrasyonu düşük olduğundan, neredeyse tüm enzim molekülleri substrat tarafından işgal edilir ve serbest enzim konsantrasyonu düşük olur. Yani, $[E]_0$ yaklaşık olarak $[ES]$ 'e eşittir ve serbest enzim konsantrasyonu reaksiyon hızını sınırlar.

(c) İlk enzim ve substrat konsantrasyonları eşittir. Yani, $[E]_0 / [S]_0 = 1$. Bu durumda ne enzim ne de substrat, hız sınırlayıcı parametre değildir. Tüm substrat molekülleri enzime bağlanır ve tüm enzim molekülleri substrat tarafından işgal edilir. Çünkü serbest enzim ve substrat konsantrasyonları neredeyse sıfırdır. Bu nedenle, enzim substrat katalizli reaksiyonlar için hız ifadesi, enzimin ve substratın nispi başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir.

Enzim konsantrasyonu fazla olduğunda, ($[E] \gg K_M$), K_M , $[E]$ ile karşılaştırıldığında ihmal edilebilir (Kargi, 2009).



Şekil 1.2. Michaelis-Menten grafiği

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

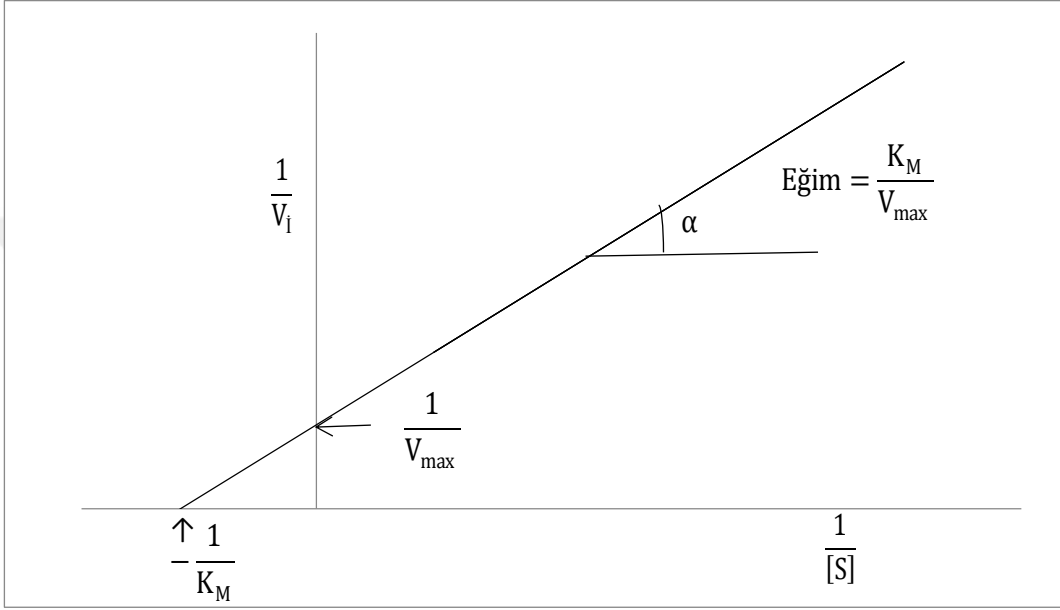
V_{max} : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_M (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_M bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

K_M substratın enzime ilgisinin bir ölçüsüdür. Bundan dolayı K_M değeri ne kadar küçük olursa, substrat enzime o kadar sıkı bağ kurar, K_M değeri ne kadar büyükse substrat enzime o kadar zayıf bağ kurar. K_M değerleri aynı zamanda aynı özelliğe sahip enzimleri birbirlerinden ayırt etmek için de kullanılmaktadır (Eisenthal and Danson, 1992).

Bir hiperbol Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak meydana getirildiğinde, hesaplamaların daha pratik yapılması için hiperbolün bir doğru denklemine dönüştürülmesi gerekmektedir. Bunun için eksenlerin ölçeklerinin uyumlu bir biçimde değişikliğe uğratarak, farklı biçimlerle doğru denklemine dönüşümü sağlanabilir. Bunlar arasında sıklıkla başvurulana Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver and Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.2)$$

Bu denkleme göre Y ekseninde $1/V$, X ekseninde $1/[S]$ değerleri olacak şekilde bir doğru oluşturulur. Bu doğrunun eğimi ise K_M/V_{max} ' tır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Lineweaver-Burk grafiği

Enzimatik reaksiyonların hızlarını; enzim konsantrasyonu, sıcaklığı, ortamın pH'sı, zaman, kofaktör konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, aktivatör ve İnhibitör konsantrasyonu, tepkimelerin ürünleri, bazı iyon konsantrasyonları, diğer fiziksel etkenler ve ışık etkilemektedir.

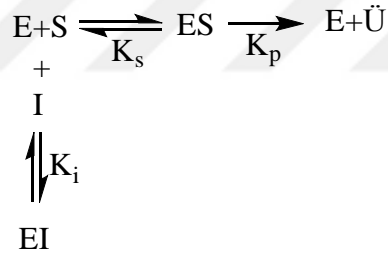
Bazı enzimler ortadaki hidrojen iyonlarının konsantrasyona bağlı olarak, düşük pH'lı (asidik) ortamlarda bazılarıysa yüksek pH düzeylerinde aktivite göstermektedirler. Buna karşın ekseriyetle pH'nın nötral olduğu durumlarda enzim aktivitesi en yüksek seviyelerdedir.

Enzim inhibitörleri, bir enzim reaksiyonuna eklendiğinde aktiviteyi azaltan H^+ iyonları dışında herhangi bir bileşik olarak tanımlanır. Birçok enzim inhibitörü bilinmektedir. Pestisitler böcekleri, istenmeyen bitkileri veya hayvanları öldürmek için ayrıca enzimleri inhibe etmek için kullanılırlar. Meyvelerin ve sebzelerin esmerleşmesini önlemek veya "tazelikliğini" korumak için kullanılırlar. Pek çok farmasötik bileşik, enzim

sistemlerini seçici olarak inhibe ederek mikroorganizmaları öldürmek için tasarlanmıştır. Mekanik olarak iki ana enzim inhibitör grubu vardır. Bir grup, kovalent bağ oluşumunu içeren reaksiyonlarla enzimleri inhibe eden (geri dönüşü olmayan inhibitörler); diğer grup, dönüşümlü kovalent olmayan bağ oluşumu ile enzimleri inhibe edenlerdir. Her iki tip de enzim aktivitesini azalttığı veya ortadan kaldırdığı için önemlidir (Whitaker, 2002a).

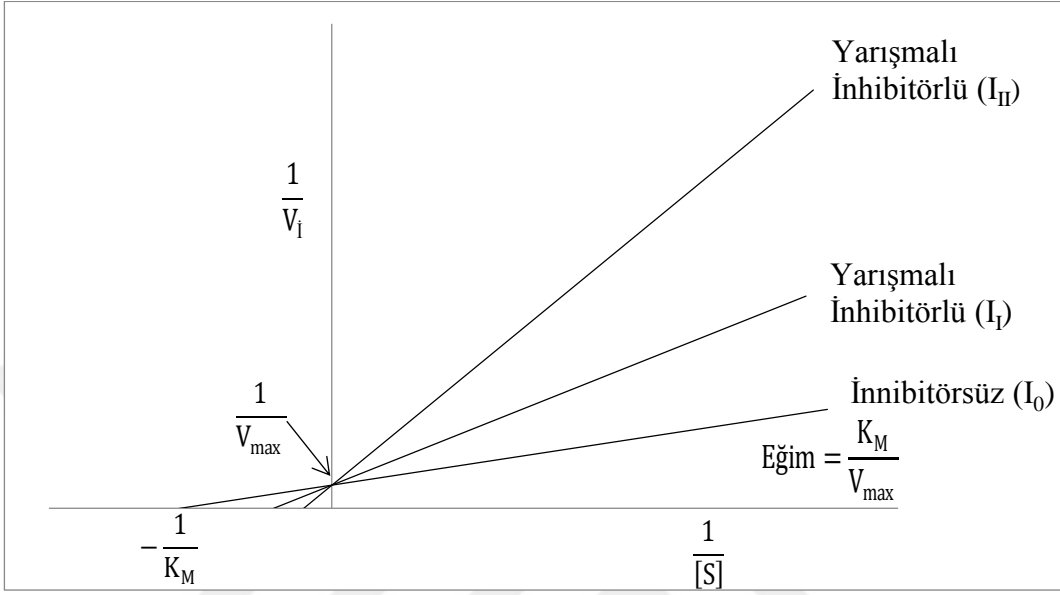
Dönüşümlü inhibisyonun; yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon, Yarışmalı (competitive) inhibisyon yarı yarışmalı (uncompetitive) ve Karışık Yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon şeklinde 4 türü vardır; (Ziyan, 1998).

Yarışmalı inhibitör (I), molekül yapısından dolayı substrata (S) benzer ve substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını izin vermeyecek şekilde bağlanarak enzimin aktivite göstermesine engel olur (Ziyan, 1998).



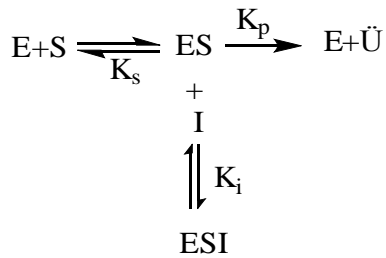
Şekil 1.4. Yarışmalı (competitive) inhibisyon şeması

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (1.3)$$



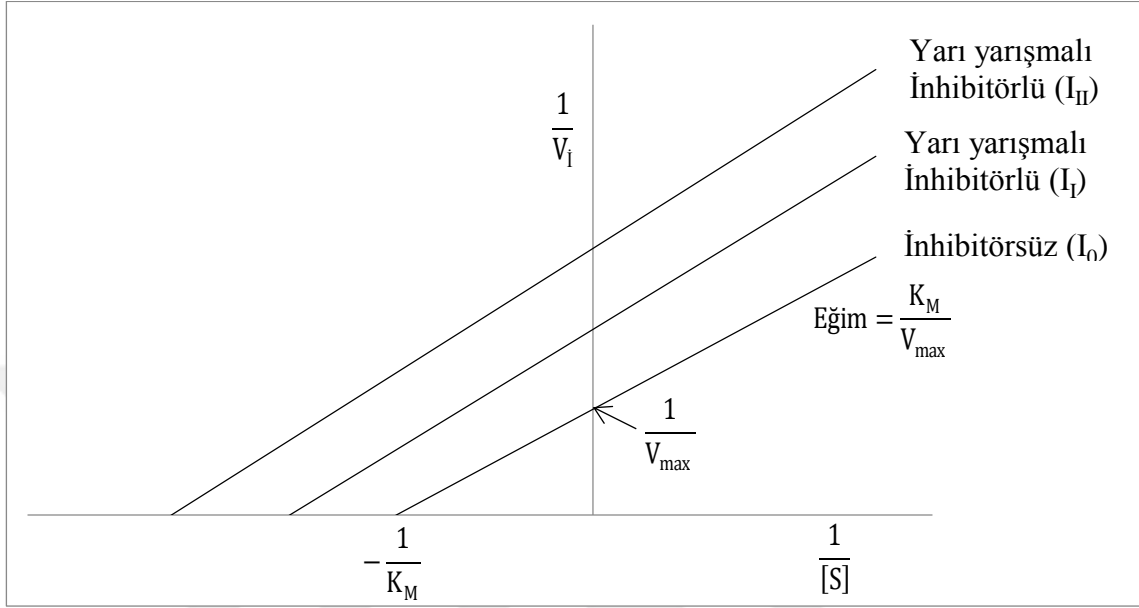
Şekil 1.5. Yarışmalı (competitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği

Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon; tek substratlı sistemlerde inhibitör, serbest enzime bağlanamayacağından bu tür inhibisyonla çok nadir karşılaşılmaktadır. Bu tür inhibisyonda inhibitör, enzimle birleşip EI kompleksi meydana getiremediğinden dolayı enzim ilk substratla ES kompleksi oluşturur, ardından bu kompleks inhibitörle etkileşir (Ziyan, 1998). Reaksiyon şeması;



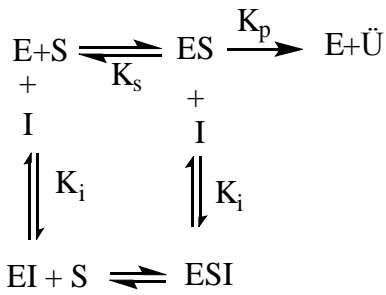
Şekil 1.6. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (1.4)$$



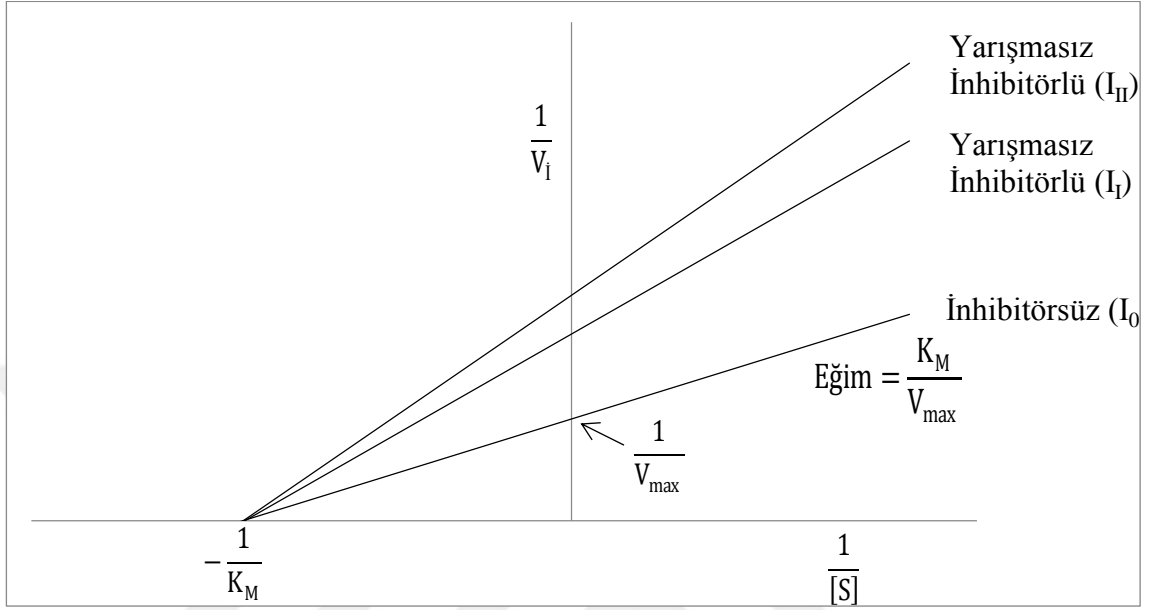
Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği

Yarı yarışmalı (noncompetitive) inhibisyon; bu tür inhibisyonlarda substrat ve inhibitör rastgele bir şekilde birbirinden bağımsız ve tersinir olacak şekilde ayrı merkezlere bağlanırlar. Bundan dolayı ES ve EI komplekslerini oluşturabilirler. Ayrıca ES, I ile ve EI, S ile bir araya gelerek ESI üçlü kompleksini oluştururlar, meydana gelen ESI üçlü kompleksi katalitik olarak inaktiftir (Ziyan, 1998).



Şekil 1.8. Yarı yarışmalı (noncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması

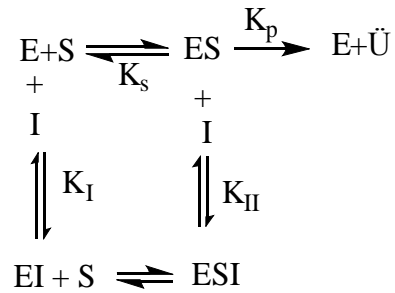
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (1.5)$$



Şekil 1.9. Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği

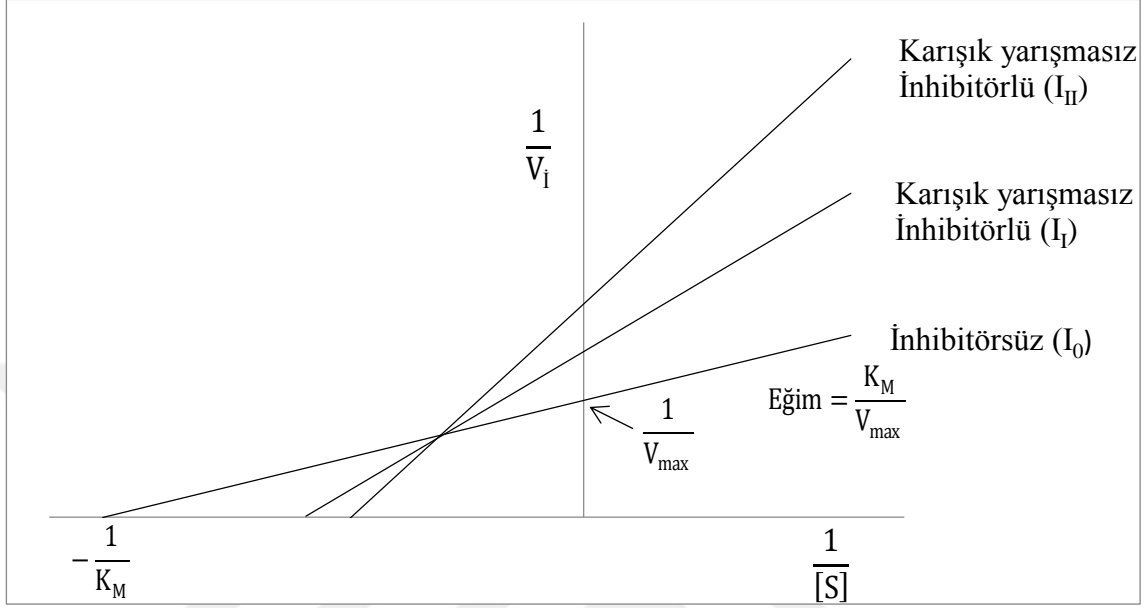
Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon; E, S ve I' nın bağlanma denge sabitlerinin değiştiği ayrı bir noncompetitive inhibisyon çeşididir (Ziyan, 1998;).

Reaksiyon şeması



Şekil 1.10. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyon reaksiyon şeması

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{II}}\right) \quad (1.6)$$



Şekil 1.11. Karışık yarışmasız (mixed noncompetitive) inhibisyonun Lineweaver-Burk grafiği

Enzimler, birçok biyolojik ham maddede doğal olarak bulunur ve işlenmesi ile birlikte gıdaların işlevsel özelliklerini birçok şekilde etkileyebilir. Endojen enzimlerin gıdalar üzerinde faydalı veya zararlı etkileri olabilir. Bazı enzimler, yan ürünlerin geri kazanılmasında, yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesinde, daha yüksek oranlarda ve ekstraksiyon oranlarının elde edilmesinde veya örneğin tat, doku açısından gıda kalitesinin artırılmasında gıda işlemlerinde olumlu biçimde kullanılır. Öte yandan, enzimlerin de zararlı etkileri olabilir. Gıda bozulmasına, gıdada doğal olarak bulunan enzimler veya bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler neden olabilir. Örneğin; meyve ve sebzelerde polifenoloksidazlarla enzimatik esmerleşme reaksiyonları, veya endojen lipazların ve lipoksijenazların varlığından kaynaklanan ekşime bu durumlara örnektir (Loey *et al.*, 2002).

Enzimlerin faydalı ve zararlı etkilerinin bir sonucu olarak, çoğu gıda işleme adımında enzimatik aktivitenin kontrolü gereklidir. İkisinden biri, işlem sırasında enzimatik aktiviteyi artırarak enzimin faydalı etkilerini arttırmak istemektedir; bu durumda, ilgili işlem koşulları altında enzim stabilitesi hakkında bilgi, proses tasarımı için gereklidir

(örneğin termostabilitesi, asit ortamlarına karşı direnci). Diğer taraftan, zararlı enzimatik etki söz konusu olduğunda, enzimatik tepkimeyi ortadan kaldırmak veya geciktirmek istendiğinde, genellikle fiziksel yöntemlerle etkisizleştirilerek veya katkı maddeleri kullanılarak enzimatik tepkimenin engellenmesiyle gerçekleştirilen kimyasal bir yöntemdir (Loey *et al.*, 2002).

Polifenol oksidaz (PPO) içeren hasat sonrası esmerleşme reaksiyonlarının bir sonucu olarak, dünyadaki meyve ve sebzelerin yarısının kaybolduğu tahmin edilmektedir (Whitaker, 1995). Meyve ve sebze dokuları dağıtım, ambalajlama veya işleme sırasında zarar görür ve renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişikliği kimyasal bir kusur değildir, fakat renk değişimi tüketicilere hitap etmez, ürün piyasa değerini düşürür ve meyvenin besin kalitesini de etkiler. Buna enzimatik esmerleşme denmektedir. Bu istenmeyen enzimatik esmerleşme birçok meyve ve sebzede meydana gelmektedir (Doğan and Doğan., 2003; Pruidze *et al.*, 2003).

PPO'nun bitkilerde enfeksiyonlara karşı meydana getirdiği direnç şöyledir; enzimatik reaksiyon neticesinde meydana gelen kinon bileşikler, farklı bir polimerleşme reaksiyonuna girerek su içerisinde çözünemeyen, koyu renkli polimer birleşikler meydana getirir. Meydana gelen bu polimer bileşikler dokulara dolarak enfeksiyonların yayılmasını engellemektedir. Enzim ayrıca bitkide o-difenollerin biyosentezi, hücrelerde var olan redox reaksiyonlarının bazılarını düzenlediği, tohum katlarının sertleşmesine, fotosentezde ETS (elektron transport zinciri)'inde görev yaptığı, bitkilerin hastalanmasını engellediği ve kimyasal bileşiklerin etkilerinden koruduğu tahmin edilmektedir (Mayer and Harrel, 1979).

Tüketicinin her geçen gün giderek daha da bilinçlenmesiyle tüketilen gıdaların insan ve çevre sağlığına uygun olmasının yanında, aynı zamanda damağa da hitap etmesi beklenmektedir. Canlılarda, esmerleşme veya kararma şeklinde tanımlanan en sık görülen oksidasyon reaksiyonlarından bir tanesi, sarıdan kahverengi ve siyaha kadar farklılaşan renk dönüşümleriyle neticelenen, fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonudur (Marshall *et al.*, 2000).

Polifenol oksidaz, çoğunlukla tirozinaz, polifenolaz, fenolaz, katekol oksidaz, krozola veya katekolaz olarak adlandırılır. Tirozinaz adı, ilk önce substrat olarak kullanılan tirozinden gelmektedir. Daha yüksek bitkilerden ve mantarlardan elde edilen enzimler çok çeşitli mono fenolik ve o-difenolik bileşikleri okside etmektedir (Ramirez *et al.*, 2003).

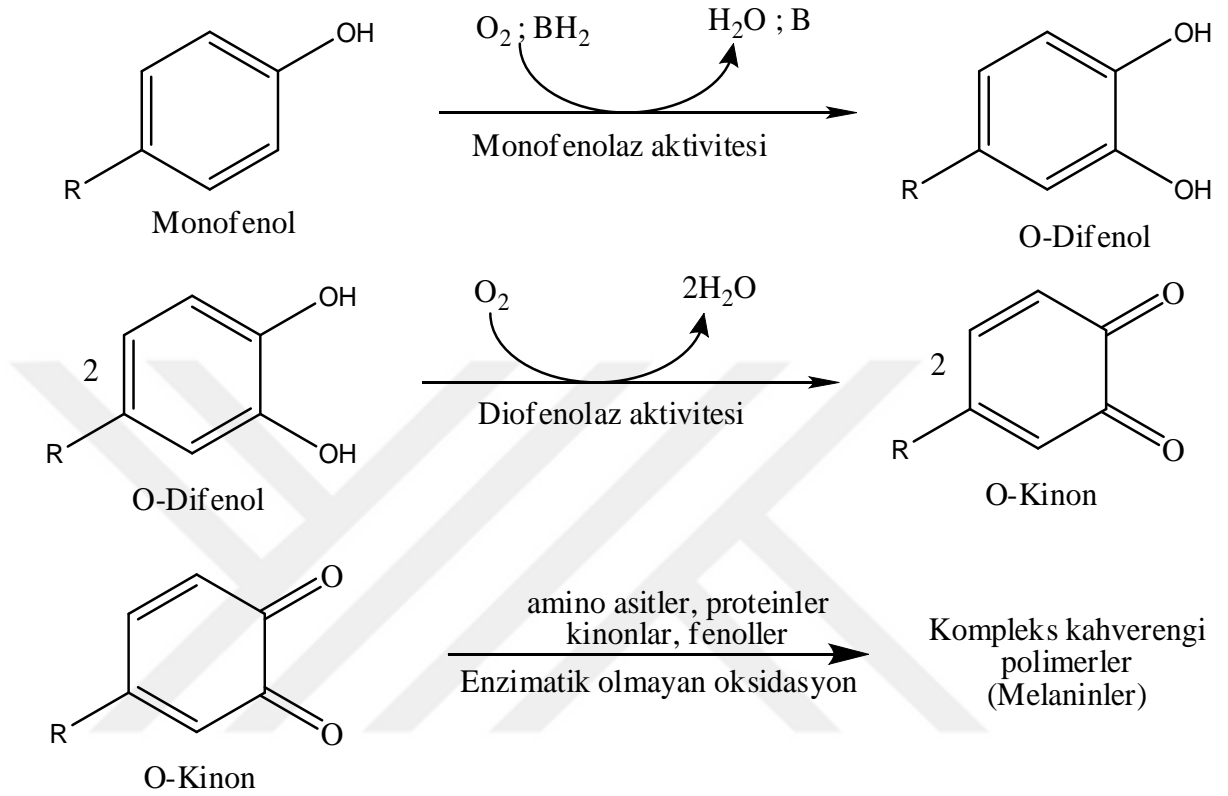
Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının tamamı bitkinin çeşidine, geliştiği bölgeye ve bitkinin ne kadar olgun olduğuna göre farklılık gösterir. Esmerleşmenin rengi ise ortamdaki var olan fenolik substratların çeşidine bağlıdır. Bitkilerde ki enzimatik esmerleşme, aktif bulunan PPO konsantrasyonuna, sıcaklığa, pH'ya ve dokularda var olan oksijen seviyesine bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörlerden birinin ortamda olmaması veya olması gereken optimum değerinden düşük olması reaksiyonu durdurabilir veya yavaşlatabilir (Pekyardımcı, 1992).

Sağlıklı bitkisel dokularda, Polifenol oksidaz (PPO) enzimlerinin substrat olarak rol alan fenolik bileşiklerle teması, neredeyse bulunmamaktadır. Bunun temel sebebi, substratlarla enzimlerin bitki hücresinin ayrı bölgelerinde bulunmasıdır. Polifenol oksidaz enzimlerinin bazısı sitoplazmada serbest halde iken, çoğunluğuysa hücrenin kloroplast ve tilakoit kısımlarında, membran ile yapışık halde yer almaktadır. Bunun aksine, fenolik bileşiklerin büyük bir çoğunluğu vakuollerde yoğunlaşmış bir şekilde yer almaktadır. Fakat hücredeki pektinazların çalışmalarıyla doku olgunlaşmasının ileriki safhalarında, dokunun kontrollü bir biçimde kendiliğinden farklılaşır. Bununla birlikte, işleme, hasat ve taşıma esnasındaki etki ve yahut yapılan farklı işlemler yoluyla dokunun bütünlüğünde ve hücrenin yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Bunun neticesinde, polifenol oksidaz enzimi havadaki oksijen yoluyla kendi substratlarından olan fenolik bileşiklerle etkileşime girmektedir (Muchuweti *et al.*, 2006).

Meyve ve sebzelerin depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri esnasında oluşan zedelenmeler neticesinde meydana gelen esmerleşme reaksiyonları ürünün sadece görünüş ve tadını bozmakla kalmayıp onun besleyici değerinin de düşmesine yol açmaktadır (Zemel *et al.*, 1990).

Esmerleşme reaksiyonuna neden olan sebepler; enzimlerin yol açtığı esmerleşme reaksiyonları, enzimatik olmayan oksidatif esmerleşmeler, maillard reaksiyonu neticesinde oluşan esmerleşmeler olarak üç grup altında toplanmaktadır (Pekyardımcı, 1992).

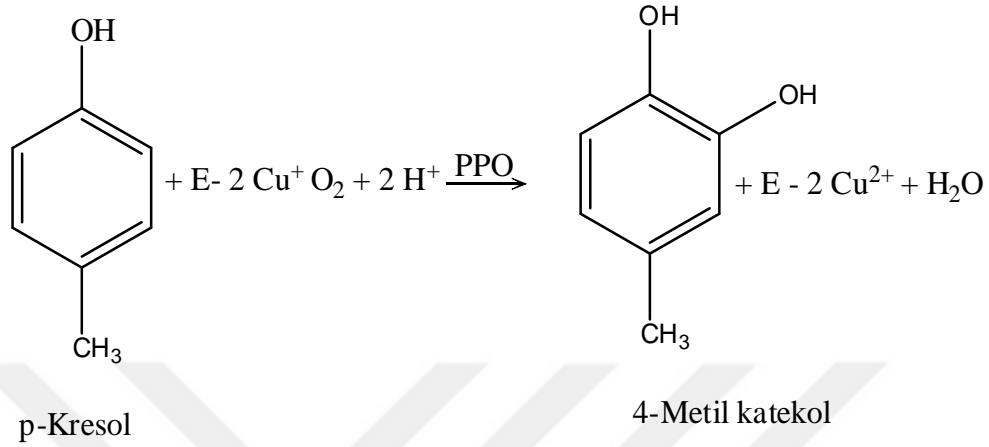
Enzimatik esmerleşme reaksiyonları iki safhada meydana gelmektedir. Birinci safhada, PPO'nun katalizlediği reaksiyonla mono fenollerin ya da difenollerin o-kinonlara enzimatik oksidasyonu, ikinci safhada ise enzimatik oksidasyon neticesinde meydana gelen o-kinonların, enzimatik olmayan polimerizasyon reaksiyonları neticesinde melanin bileşiklerine dönüşmesidir. Bu esmerleşme reaksiyonları baskı koşulları altında meydana gelir. Bunun sebebi ise bu koşullar altında iken hücre içi parçalanmaların oluşması ve polifenol oksidaz substratları (fenolikler ve oksijen) ile temas kurulmasıdır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları basit yürüyen reaksiyonlar değildirler. Birçok mono fenolik ya da difenolik bileşik, polifenol oksidazla reaksiyona girerek oldukça farklı çeşit kinonik ürünlere ya da polimerizasyon ürünlerine dönüştürülürler. Fenolik substratlardan, polifenol oksidaz aktivitesi neticesinde meydana gelen o-kinonlar renkli türler olmasına karşın, enzimatik esmerleşmenin tipik kırmızı kahverengimsi rengi, o-kinonların enzimatik olmayan ikinci safha reaksiyonları neticesinde meydana gelen melaninlerden kaynaklanmaktadır (Yoruk and Marshall, 2003).



Şekil 1.12. Esmerleşme için enzimatik ve müteakip enzimatik olmayan kümelenme işlemlerinin şematik gösterimi (Yoruk and Marshall, 2003)

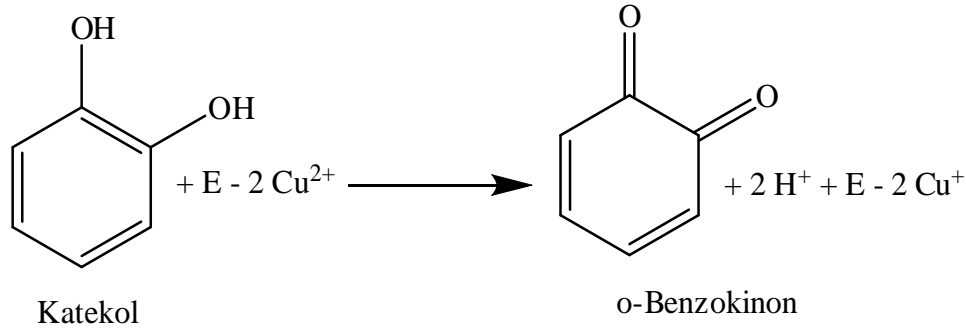
Yapısında bakır bulunduran polifenol oksidaz enzimi moleküler O_2 varlığında birbirinden bütünüyle farklı kresolaz aktivitesi olarak bilinen mono fenollerin hidroksilasyonu yoluyla o-dihidroksi fenollerin meydana gelmesi ve katekolaz aktivitesi olarak adlandırılan o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu şeklinde iki farklı reaksiyonu katalizlemektedir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Birinci kategorideki reaksiyonlar fenilhidroksilaz veya kresolaz enzimleri yoluyla katalizlenen ve mono fenoller, o-dihidroksifenollere dönüşüyle sonuçlanan reaksiyon şekil 1.13.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.13. o-dihidroksifenol oluşumu

İkinci kategorideyse O-dihidroksifenol, E---2Cu²⁺'yi E---2Cu⁺ haline indirgemektedir (Whitaker, 1972). Difenollerin O-kinonlara oksitlenmesi reaksiyonu ise katekolaz veya fenoloksidaz enzimleri tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. o – benzokinon oluşumu

Enzimatik olmayan oksidatif esmerleşme reaksiyonları da enzimatik reaksiyonlar gibi yürür ve fenolik gruplar arttıkça oksitlenmeye karşı hassaslık artar (Harbone, 1964).

PPO'nun bitkisel kaynaklardan izolasyonu aşamasında 3 farklı sorun gözlenir; PPO'nun pasif halde bulunması, hücrenin organelleriyle kompleks yapmış PPO'nun çözünür hale getirilmesi, bitkin yapısında yer alan fenolik bileşiklerin polifenol oksidazla okside olması neticesinde polimerize olup PPO'nun üstüne çökmenin engellenmesidir (Tozak, 2013).

PPO'nun herhangi bir numuneden eldesinde üzerinden gelinmesi gereken en ciddi sorun; bitkisel kaynaktan izolasyonu ile taşınma esnasında enzimatik fenol oksidasyonunun ve pigment oluşumuna izin verilmemesidir. PPO proteinin üzerine pigmentlerin çökmesiyle enzimin sadece çözünmemesine değil aynı zamanda PPO'nun dönüşümsüz inaktivasyonuna da yol açabilir. Bunun gibi riskleri minimum seviyeye indirmek amacıyla enzim izolasyonu ve saflaştırılması adımlarının tamamı +4°C'de yürütülmelidir. Taşıma ve homojenizasyon çoğunlukla sıvı azot veya azot atmosferi içerisinde yapılmaktadır (Tozak, 2013). Ekstraksiyon aşamasında çok farklı tamponlardan faydalanılmaktadır ve hangi pH değerinin kullanılacağı PPO'nun kaynağına göre farklılık göstermektedir. Ancak pH'nın değeri genellikle ya nötr yada asidik ortam olacak biçimde ayarlanması yapılır. Kullanılacak tampon çözeltinin pH değeri saflaştırılmaya çalışılan PPO'nun yapısını etkileyebilmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Ekstraksiyon sistemini enzimatik PPO'dan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler ya da kinon bağlayıcıları da katılabilir. Sodyum metabisülfid, L-sistein, DIECA, askorbik asit veya bazen de bu bileşiklerin karışımı kullanılabilir. PPO'nun izolasyonu esnasında fenolik oksidasyonunun ve polimerizasyonunun engellenmesinin en etkili yöntemlerinden biri de ortamda var olan substratların çözünmeyen bir polimere birleşerek ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Fenollerin bağlanmasında çoğunlukla polietilen glikol (PEG) tercih edilmektedir. Bu tercihin sebebinde, PEG'in asetondaki çözünürlüğünün belirli avantajlar sağlamasından kaynaklandığının düşünülmektedir (Loomis, 1968).

Meyve, sebze, meyve suları ve şaraplardaki enzimatik esmerleşmenin kontrolü, belirli bir bitkide bulunan fenolik substrat tipleri, askorbik asit ve sülfhidril bileşikler, O₂ erişilebilirlik seviyesi, mevcut co-okside edilebilir bileşiklerin doğası ve o-benzokinonların polimerizasyon ve bozunma yolları gibi indirgeyici bileşiklerin seviyesi hakkında kimyasal bilgi gerektirmektedir. Ayrıca bitki gelişiminin farklı aşamalarında mevcut olan PPO seviyesini ve substratları bilmekte önemlidir. Hepsinden önemlisi, gıdalardaki enzim kaynaklı esmerleşme ile enzim kaynaklı olmayan esmerleşmeyi (Maillard reaksiyonu) ayırt etmektir (Whitaker and Lee, 1995).

Teoride meyve ve sebzelerin PPO katalizörlü esmerleşmesi, enzimin ısı inaktivasyonu, substratlardan birinin veya her ikisinin (O_2 ve fenoller) dışarıda bırakılması veya uzaklaştırılması, pH'yı 2 veya daha fazla birim optimum pH'nın altına düşürerek, enzimin yeniden aktifleştirilmesiyle veya PPO'yu inhibe eden veya melanin oluşumunu önleyen bileşikler ilave edilerek engellenebilir (Vamos-Vigyazo, 1995; Walker, 1995).

Oksijen ve fenollerin dokudan uzaklaştırılması ve / veya ayrılmasıyla, sağlam dokuların esmerleşmesi önlenir; Bu yöntemlerin ticari faydaları sayısız araştırmacı tarafından incelenmektedir (Sapers *et al.*, 1994). Meyve ve sebzelerde, kabuklara zarar vermediği sürece O_2 'nin girişini engelleyen "kabukları" (mumlar ve diğer yüzey tabakaları) vardır. Ticari olarak O_2 ; kontrollü atmosferik depolama, paketleme teknikleri vb. ile meyve ve sebzelerdeki konsantrasyonunun düşürülmesi veya ortama girişinin engellenmesiyle önlenir (Whitaker and Lee, 1995).

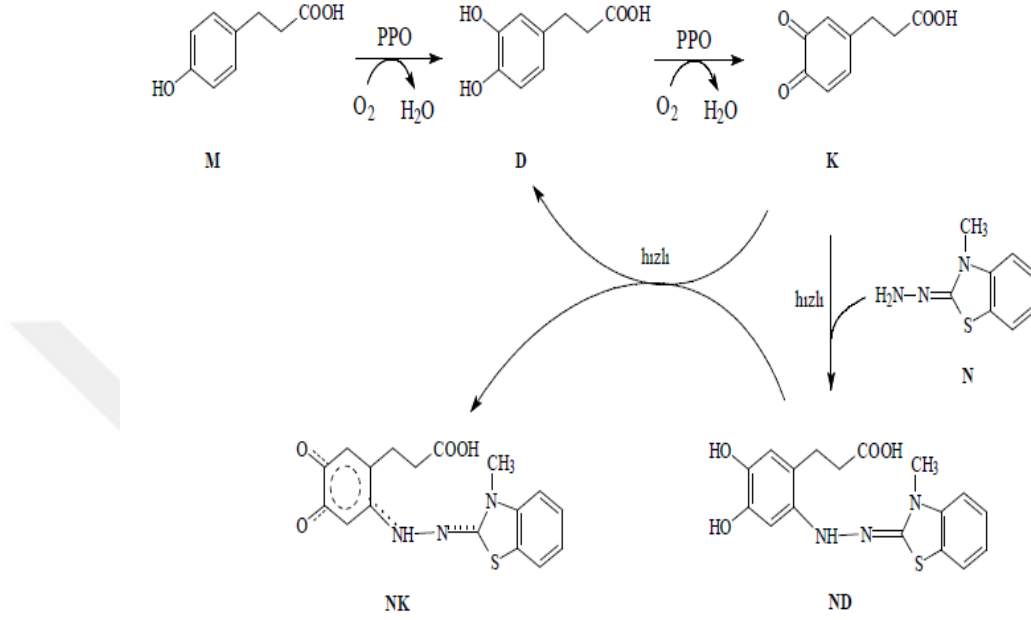
Literatüre göre farklı etkileyiciler enzimatik esmerleşmeyi kontrol edebilir ve bu bileşikler, indirgeyici ajanlar, şelatlama ajanları, asitleştiriciler, enzim inhibitörleri, enzim muameleleri ve kompleks yapan ajanlar inhibisyon mekanizmasına göre sınıflandırılmaktadırlar (Özoğlu and Bayındırlı, 2002).

Esmerleşmenin kontrolü için en yaygın kullanılan ajanlar sülfid ajanlarıdır. Bu bileşiklerin yol açtığı olumsuz sağlık etkileri nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), SO_2 'nin gıda maddelerinin tatbikinde mümkün olduğunca en düşük oranlarda kullanılmasını tavsiye etmiştir. Yapısında sülfür bulunan maddeler içerisinde L-sistein esmerleşme reaksiyonunu engellemek amacıyla kullanılabilir önemli bir kimyasaldır. Sistein stabil ve renksiz ürünler üretmek için o-kinon ara ürünleriyle reaksiyona girer (Rapeanu *et al.*, 2005).

Askorbik asit (AA), gıda ürünlerinde esmerleşme kontrolü için sıklıkla kullanılmaktadır ve onun izomer izoaskorbik asidinden daha etkili olduğu belirtilmiştir (Özoğlu ve Bayındırlı., 2002). Bu vitamin bir antioksidan görevi görür, çünkü esmerleşmeye yol açan ikincil reaksiyonlara girmeden önce üretilen kinonu azaltır ve pH'nın düşürülmesine de katkıda bulunur (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005). Optimum pH-

PPO reaksiyonları 5 ila 7,5 arasında değiştiğinden, düşük değerler enzimatik aktiviteyi inhibe etmektedir.

Spektrofotometrik analizler, PPO'nun aktivitesini belirlemek için daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı kinetik deneylerde, melanin gibi enzimatik reaksiyonda üretilen kinonların varlığı ölçülürken diğer yöntemlerdeyse, o-kinonların birleştirme reaktifleri ile reaksiyonunun hızını ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Aktivite ölçüm yönteminde kullanılan metotların hassaslık sorununu giderme adına PPO tarafından katalize edilen çeşitli difenollerin oksidasyonunda oluşan o-kinonu yakalamak için MBTH'nin kullanıldığı farklı bir yöntem geliştirilmiştir. Burada o-kinonlar, renk yoğunluğunun (optik yoğunluk) kullanılan fenol konsantrasyonu ile ilişkili olduğu, yoğun renkli ürünler üretmek için 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH) ile reaksiyona girmektedir. Bu metod PPO'nun varlığında p-hidroksifenil propiyonik asit (PHPPA) ve 3,4-dihidroksifenil propiyonik asitin (DHPPA) oksidasyonunun kinon ürünleri ve MBTH arasındaki birleşme reaksiyonlarına dayanmaktadır. pH küvet karışımındaki maddelerin çözünürlüğünü ve stabilitesini etkilediği için ortama % 2 (v/v) oranında DMF eklendiğinde artık küvetteki karışım her pH değerinde çözünebilir hale gelmektedir. MBTH, pH'ya bağlı olarak farklı protonlama-proton giderme derecesinin olduğu amino grubu içerisinde üçlü bir nükleofildir. Küvet içerisindeki reaksiyonların mekanizma basamakları detaylı bir biçimde sunulmuştur (Espin *et al.*, 1996).



Şekil 1.15. PPO'nun 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH) içerisinde mono ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: o-kinon, N: MBTH, ND: MBTH -difenol renksiz katılma ürünü, NK: MBTH -kinon katılma ürünü) (Espin *et al.*, 1996).

Elma *Roseceae* ailesinin *Malus* türünden olup Çin'de, Kore'de, Anadolu'da, Avrupa'da, Japonya'da, Kuzey Amerika'da ve Himalaya'daki çeşitli gen merkezlerinde 48 çeşidinin olduğu düşünülmektedir (Dziubiak, 2004). Türkiye ise dünyada üretilen alan yönüyle beşinci, üretilen miktar (neredeyse % 4) yönüyle üçüncü sırada yerini almaktadır. Bu miktarda yapılan elma üretimi, elma meyvesi elde edilen yaklaşık 45 milyon ağaçtan elde edilmektedir (Anonim 2013a). Genel olarak elma; lezzeti, aroması, rengi, ekonomik değeri ve besin içeriğinden ötürü insanların çoğunlukla seçtiği ve karbonhidratlar, diyet lifi, esansiyel mineraller ve bol miktarda antioksidanlı bileşenleri bünyesinde barındıran meyve çeşitleri arasında en önemlilerinden birisi olarak görülmektedir (Sadik *et al.*, 2003).

Tüketicilerin satın almasını hem ürünün rengi hem de aroması etkilemektedir. Kırmızı kabuklu elmalar oldukça yaygın olmasına rağmen kırmızı etli elmalar hala fazla ilgi görmemektedir. Dikkat çekici antosiyanin içerikleri nedeniyle, "Purpurroter Cousin",

"Pink Pearl" ve "Son zamanlarda" Weirouge "gibi kırmızı etli elmaları giderek daha fazla ilgi çektikleri belirtilmiştir. Cezp edici kırmızı renklerine ek olarak, yüksek asitliklerinden dolayı pigment bozulmasının ve oksidasyonun az olduğu varsayılmaktadır (Buchter-Weisbrodt, 2003). Neredeyse tüm kırmızı etli elma çeşitleri yabani *Malus niedzwetzkyana*'ya kadar uzanmaktadır (Nocker *et al.*, 2012).

Son zamanlarda, gül elma şarabı ve pembe meyve suları gibi yeni ve orijinal elma kökenli ürünler piyasaya sunuldu. Bu inovatif içecekler, meyve etinde mevcut olan dikkate değer miktarda antosiyanin pigmenti ile klasik çeşitlerden farklılık gösteren kırmızı meyve etli çeşitler kullanılarak üretilmektedir (Sadilova *et al.*, 2012). Genel olarak polifenoller antioksidan kapasiteye sahiptir ve kısmen oksidatif strese karşı koruyucu etkilere katkıda bulunabilirler (Ferrari *et al.*, 2016). Ayrıca, elmalar, günlük tüketilen meyveler arasında en yüksek fenolik alımlardan birini temsil etmektedir (Chun *et al.*, 2005). Kırmızı etli elma suları, müşterileri günlük fenolik tüketimini artırmaya teşvik edebilecek doğal ve sağlıklı bir yeni ürün olarak görünmektedir (Février *et al.*, 2017).

Soğuk iklim etki gösterdiği Ardahan'ın merkez kesimlerinde meyvecilik yapılmazken, mikroklimal iklimin etkili olduğu Posof ve Çıldırım ilçesinin Kurtkale havzasında değişik türlerin çeşitleri başarılı bir şekilde yetiştirilmektedir. Bu coğrafyada meyvecilikte suni gübreler ile tarım ilaçları kullanılmamaktadır. Bununla birlikte meyveciliğin olduğu bölgelerde ulaşım sıkıntılarının bulunması ve arabuluculuk yapanların meyveyi değerinden daha az fiyatlardan üreticilerden satın alması nedeniyle, pazarlama problemleri olduğu ifade edilmiştir. Yılda yaklaşık 510 tonluk elma yetişmesine rağmen halk genel olarak bölgedeki meyve yetiştiriciliğinin bilincinde olmadığı bildirilmiştir (Anonim 2013b). Bölgedeki bazı Mahara ve Uruset grubu elmaların Gürcistan ile Rusya'dan getirilip bölgeye adapte edildiği bildirilmiştir (Abacı ve Sevindik, 2014). 17 Aralık 2018 tarihinde Posof Belediyesi ile Ardahan Ticaret ve Sanayi Odasınınca yürütülen çalışmalar neticesinde Posof ilçesinde yetiştirilen ve içinin de dışı gibi kırmızı olması nedeniyle ilgi gören elma, Türk Patent ve Marka Kurumunca coğrafi işaretli alınarak Posof Badele elması olarak tescillenmiştir (ATSO, 2018).

Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) (PBPPO) saflaştırılması, karakterize edilmesi ve bazı inhibitörlerin ve iyonların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla önce Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) ham ekstrakt hazırlanmış; daha sonra soğuk aseton ile çöktürülen proteinlerden afinite kromatografisi yöntemiyle PBPPO enzimi saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan PBPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile saflığı kontrol edilerek kinetik özellikleri, optimum pH ve sıcaklık şartları, sıcaklığa dayanıklılığı ve bazı kimyasalların ve metal iyonlarının etkileri araştırılmıştır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

PPO'nun katalitik reaksiyonları birçok meyve ve sebze ürününün kalitesi üzerine büyük bir etkisi vardır ve ürününü renk, tat, tekstür ve besinsel değerlerinin kaybı gibi birçok olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Bu tip sonuçlar ürünün satış ve pazarlaması sırasında ürünün taşınması, depolanması ve işlenmesinden kaynaklanan esmerleşmelerden dolayı ürüne büyük zararlar verebilmektedir. Buna karşın siyah çay, kahve ve kakao gibi bazı ürünlerde ise PPO'nun sebep olduğu esmerleşmeler ürünün kalitesini yükselttiği ve lezzetli ürünler meydana getirdiği için aranan bir özelliktir. PPO'nun sahip olduğu bu önemli özelliklerinden dolayı birçok araştırmacı tarafından, çok farklı ürün çeşidinde ve değişik organizmalarda çalışılmıştır.

Farklı bir çalışmada polifenol oksidaz enzimi Ankara armudundan (*pyrus communis*) ekstrakte edilmiş akabinde amonyum sülfatla çöktürmesi yapıldıktan sonra diyalizlenmiş, jel filitasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Jel filitasyon aşamasından önce diyalizlenen numuneden, polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Polifenol oksidaz enziminin en etkili substratının 4-MK olduğu optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 35°C ve 7,2 olarak tespit edilmiştir. 4-metil katekol ile yapılan kinetik çalışmada V_{max} ile K_M 'leri sırası ile 344,5 U/mg protein ve 5,55 mM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada altı adet inhibitör kullanılmış ve en etkili olanlarının yarışmalı (competitive) inhibitörler olarak L-sistein ve L-askorbik asit olduğu saptanmıştır. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile PPO enziminin üç izoenziminin olduğu saptanmıştır. Baskın olan bantlardaki molekül ağırlıkları sırasıyla 28 kDa, 40 kDa ve 60 kDa olarak tespit edilmiştir (Ziyan, 1998).

Rocha and Morais (2001) yaptıkları çalışmada Jonagored elmadan polifenoloksidaz (PPO) enzimini, fenolik adsorbanlar içeren ekstraksiyona % 2 PVP ve % 0,25 Triton X100 ilavesiyle ekstrakte etmişlerdir. Deneyle enzim bir çok substrata karşı olan ilgi ve spesifiğini değerlendirmek için yapılmıştır. 'Jonagored' elma PPO'sunun, L-dopa, 4-metilkatekol ve (+) katekine karşı spesifikliği (düşük K_M), test edilen diğer fenollerinkinden daha yüksek olduğu tespit edilmiş, ancak en yüksek aktivite seviyesi p-cresol ile elde

edilmiştir. V_{max}/K_M oranı, p-kresolün ardından L-dopa ve 4-metilkatekolün, "Jonagored" elma PPO'su için en iyi substrat olduklarını göstermiştir.

Arslan *et al.*, (2004) çalışmalarında, PPO'yu afinite kolonu yardımıyla dut (*Morus alba* L.) meyvesinden izole etmişlerdir. Saflaştırılmış enzim, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde moleküler ağırlığı 65 kDa olan tek bir bant şeklinde çıkarılmıştır. Optimum PPO'su, substrat olarak, 4-MK, katekol ve pyrogallol kullanılarak belirlenmiştir. Dut PPO'sunun optimum pH ve sıcaklık değerleri kullanılan üç substratta pH 4,5-8,0 ve 20-45°C arasında değişmiştir. Optimum pH ve sıcaklıkta dut PPO'sunun katekol, 4-metil katekol ve pyrogallol'e karşı V_{max} ile K_M 'leri Lineweaver-Burk grafiğinin kullanılmasıyla belirlenmiştir. $K_M = V_{max}$ değerleri, dutun kullanılan substratlar arasında pyrogallol'e karşı en yüksek reaktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan dut PPO'sunun mono fenoller, p-kresol ve L-tirozin için hiçbir aktivite göstermemesi, monofenolaz (kresolaz) aktivitesinin olmadığını ortaya koymuştur. Klasik PPO inhibitörlerinin yanı sıra, ilk kez bazı sülfonamid bileşiklerinin dut PPO aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkisi test edilmiş ve önemli bir inhibisyon sergiledikleri ortaya konulmuştur.

Muchuweti *et al.*, (2006) yaptıkları çalışmada, Polifenol oksidaz enzimini Uapaca kirkiana meyvesi ve kabuğundan, amonyum sülfat çöktürme ve diyalizle izole etmişlerdir. Kabuğun PPO enzimi ileriye saflaştırılması, jel filtrasyon kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir. Optimum pH değerleri, kabuk ve meyve PPO için sırası ile 7 ve 8 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklıklarıysa meyve ve kabuk PPO için sırasıyla 45 ve 35°C olduğu bildirilmiştir. PPO enziminin inhibisyon çalışmaları sitrik asit, sodyum azid, sodyum metabisülfid ve tiyüre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmasında en etkili inhibitörler hem kabuk hem de öz PPO'su için sodyum azit ve sitrik asit olduğu rapor edilmiştir. V_{max} ile K_M 'leri sırası ile kabuk PPO için 13,63 U/mg protein ve 4,92 mM meyve PPO için ise sırasıyla 14,03 U/mg protein ve 5,43 mM olarak bulunmuştur. Poliakrilamid jel elektroforez ile üç Uapaca kirkiana PPO izoenzimi tespit edilmiştir. İzoenzimlerinden birinin, 26,625 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, muşmula (*mespilus germanica* L.) bitkisinden birinci, ikinci ve üçüncü safha olmak üzere 3 farklı olgunluk safhası hazırlanarak ekstraktlarda PPO aktivitesi çeşitli biyokimyasal ve kinetik veriler yönünden irdelenmiştir. Çalışmalar neticesinde enzimin katalitik aktivite sahip olduğu optimum sıcaklık ve pH değerleri sırası ile, Birinci safhada 30-40°C-7,0, ikinci safhada 10-20°C-4,0, üçüncü safhada ise 10-30°C-5,0 olduğu ve optimum protein konsantrasyonunun bütün olgunluk safhalarında 0,1mg/mL olduğu tespit edilmiştir. En iyi aktivite 4-MK substratı kullanıldığında elde edilmiş ve bununla V_{max} ile K_M 'leri saptanmıştır. Askorbik asit, sodyum metabisülfid, tiyoüre ve sodyum azid inhibitörleri enzim aktivitesini inhibe ederek aktiviteyi düşürmüştür. Bununla birlikte Al^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ metal iyonlarınızı da enzimin aktivitesini inhibe ettiği Al^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ve Ni^{2+} iyonlarının ise farklı olgunluk safhalarında aktivasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (Demir, 2006).

Yapılan farklı bir çalışmada PPO enzimi İzmir üzümü'nden ekstrakte edilmiş akabinde amonyum sülfatla çöktürmesi yapıldıktan sonra diyalizlenmiş, jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Jel filtrasyon aşamasından önce diyalizlenen numuneden, PPO enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. Bunun için, optimum pH ve sıcaklık değerleri değişik substratlar kullanmak suretiyle tespit edilmiştir. PPO enziminin en iyi substratının katekol ve optimum sıcaklık ile pH değerlerinin sırası ile 25°C, 7,2 olduğu belirtilmiştir. Katekol substratıyla yapılan kinetik çalışmalarda V_{max} ile K_M değerleri sırası ile 507,2 U/mg protein 3,65 mM olduğu tespit edilmiştir. PPO enzimini en iyi sodyum azid, sodyum dietilditiyokarbamat ve tiyoüre inhibitörlerinin inhibe ettiği tespit edilmiştir (Önez, 2006).

Yerlitürk *et al.*, (2007) çalışmalarında, PPO'yu yabani armuttan (PePPO) afinite kromatografisiyle yardımıyla saflaştırmışlardır. Sıcaklık, pH ve ısı inaktivasyonu için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklıkta, katekol ve pyrogallol ile PePPO için V_{max} ile K_M değerleri tespit edilmiştir. V_{max} / K_M , PePPO'nun katekol için en büyük aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. PePPO için optimum pH, katekol substrat olarak kullanıldığında pH 6,0 olarak tespit edilmiştir. Pyragallol ve katekol için optimum PePPO sıcaklıkları sırasıyla 65 ve 35°C olduğu bildirilmiştir. Enzim aktivitesinin artan

sıcaklık ile ısı denatürasyonu nedeniyle azalmıştır. PePPO'nun inhibisyonu, p-aminobenzoik asit, etilenglikol, L-sistein, L-tirozin, sodyum azid, p-aminobenzensülfonamid, b-merkaptotanol ve ditiyotreitol kullanılarak araştırılmıştır. Enzim etilenglikol, L sistein, L-tirozin, p-aminobenzensülfonamid ve ditiyotreitol ile yarışmalı tip inhibisyon B-merkaptotanol, sodyum azit ve p-aminobenzoik asit ile ise yarışmasız inhibisyon göstermiştir. Bu sonuçlar PePPO için en etkili inhibitörün ditiyotreitol olduğunu ve inhibisyon tipinin PPO'nun kaynağına bağlı olduğunu göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada polifenol oksidaz (PPO), Polonya'da yetişen maruldan (*Lactuca sativa var. Capitata* L.) izole edilmiş ve biyokimyasal özelliği incelenmiştir. Bu maruldan elde edilen PPO, 4-metilkatekol'e katekolden daha yüksek afinite göstermiştir. Yapılan kinetik çalışmalarda K_M ile V_{max} 'leri katekol için $3,20 \pm 0,01$ mM ve 4081 ± 8 EÜ/mg protein 4-metilkatekol için ise $1,00 \pm 0,09$ mM ile 5405 ± 3 EÜ /mg protein olarak tespit edilmiştir. Enzimlerin optimum pH'larının sırasıyla katekol substrat olarak kullanıldığında 5,5 ve 4-metilkatekol kullanıldığında ise 6,8 olduğu bulunmuştur. Enzimin, 35°C'de optimum sıcaklığa sahip olduğu ve nispeten 30 ila 40°C'lerde daha kararlı olduğu bildirilmiştir. 50 °C, 60 °C ve 70°C'lerdeki aktivitenin % 50'ni inaktive etmek için gereken sürelerin sırasıyla yaklaşık 30, 20 ve 5 dakika olduğu bulunmuştur. Yapılan elektroforetik analizde ise, SDS-PAGE'de 60 kDa'lık molekül ağırlına denk olan tek bir bant ortaya çıkarılmıştır (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008).

PPO enzimi badem çağlasından izole edilip ve amonyum sülfat yardımıyla çöktürüldükten sonra, diyalizlenip jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Jel filtrasyon aşamasından önce diyalizlenen numuneden, PPO'nun karakterizasyon çalışması yapılmış. Bunun için, farklı substratlar kullanılarak optimum sıcaklık ile pH'ları tespit edilmiştir. PPO enziminin en iyi aktivite gösterdiği substratın 4-metil katekol olduğu ve optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırası ile 35°C ve 6,5 olduğu tespit edilmiştir. K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada yedi adet inhibitör kullanılmış ve en etkili olanların yarışmalı inhibitör olarak sodyum azid, tiyoüre, benzoik asit, sitrik asit ve askorbik asit oldukları tespit edilmiştir. Metallerin PPO enzim aktivitesine yaptıkları etki

incelenmiş Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} , Pb^{2+} metallerinin enzimin aktivitesini yükseltirken Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{3+} , Sn^{2+} , K^+ metallerinin ise enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Güngör, 2008).

Yabancı (2008) yaptığı çalışmada çaydan ekstrakte edilip kısmen saflaştırılan PPO enziminin biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Yapılan substrat çalışmasında enzimin ilgisinin en fazla olduğu substratın 4- metil katekol olduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH değerinin 6,02 olduğu ve 4,03 ile 7,00 pH aralığında aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. PPO'nun optimum sıcaklığının $30^{\circ}C$ olduğu ifade edilmiştir. Enzim 20 ila $80^{\circ}C$ gibi bir aralıkta %70'in üzerinde aktivitesini korumuştur. PPO'nun ısıl kararlılığının yüksek olduğu ifade edilmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmalarındaysa L-sistein'in en az inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Dedeoğlu (2009) yaptığı çalışmasında, *Lactarius salmonicolors* ve *Agaricus bisporus* adlı iki mantar türünden PPO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi saflaştırıp Sepharose 4B-L-tirozin paraaminobenzoik asidin bağlı olduğu afinite kolonu ile saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimler SDS-PAGE kullanılarak tek bir bant halinde ortaya konulmuştur. Yaklaşık olarak *Lactarius salmonicolor* PPO (LsPPO) enziminin molekül ağırlığı 36 kDa, *Agaricus bisporus* PPO (AbPPO) enziminin molekül ağırlığı 50 kDa olduğu bulunmuştur. PPO'nun optimum pH ile sıcaklığı iki mantar türü için 4-MK, pirogallol ve katekol substratlarıyla sırasıyla LsPPO enzimi için pH 6,0-7,5 ve $0-25^{\circ}C$ arasında değiştiği, AbPPO'nun pH'sı 7,5-8,0 ve $20-30^{\circ}C$ arasında farklılık göstermiştir. Bu substratlarla yapılan kinetik çalışmalardaysa K_M ve V_{max} değerlerine göre LsPPO'nun en iyi substratı 4-MK, AbPPO'nun pirogallol olduğu tespit edilmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmalarında LsPPO enzimi için p-aminobenzen sülfanamid, siyrincis asit, L-sistein, okzalik asit, glutatyon ve 2-merkaptto etanolün yarışmasız inhibiör, L-tirozin ise yarışmalı inhibitör AbPPO enzimi için ise L-tirozin, 2-merkaptto etanol, siyrincis asit ve L-sistein'nin, yarışmasız inhibitörü, p-aminobenzen sülfanamidin karışık tipli ve okzalik asittin ise yarışmalı inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

Öz (2010) polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisi yöntemiyle *Lactarius piperatus* mantarından saflaştırıp karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan enzimden yapılan SDS ve doğal PAGE'yle PPO enzimi tek bir bant şeklinde bulunmuştur. Katekol substratıyla PPO aktivitesi tespit edilmiş ve optimum sıcaklığıyla pH'sı sırasıyla 20°C, 7,0 olarak bulunmuştur. Katekol substratıyla yapılan kinetik çalışmada V_{max} ile K_M 'leri sırası ile 25000 U/mg protein, 1 mM olduğu bildirilmiştir. *L. piperatus* mantarındaki polifenol oksidaz enziminin I_{50} değerlerine göre, sodyum metabisülfid, benzoik asit askorbik asit ve sodyum azid inhibitör etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bazı metal iyonlarının da PPO aktivitesini farklı şekillerde etkilediği belirlenmiştir.

Tozak (2013) yaptığı çalışmada Nevşehir patatesinden (*solanum tuberosum* L.) PPO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleriyle kısmi olarak saflaştırdıktan sonra afinite kromatografisi tekniğiyle 52,25 kat saflaştırılarak karakterizasyonunu yapmıştır. Saflaştırılan PPO enziminin L-tirozin ve p-kresol substratlarına karşı hiçbir aktivite göstermediği, katekol, gallik asit ve pirogallol substratlarına karşı ise oldukça yüksek bir aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Optimum pH ve sıcaklık deneylerinde en fazla aktiviteyi pH: 7,0 ve 20°C ' de katekol substratı kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalarda ise katekol substratı için V_{max} ve K_M 'leri sırası ile, 5000 U/mg protein ve 5 mM olduğu belirtilmiştir.

Kuyumcu (2014) yaptığı çalışmada, afinite kromatografisi yöntemiyle *Lactarius eucalypti* mantarından PPO enzimini saflaştırıp karakterizasyonu yapmıştır. Saflaştırılan enzimden yapılan SDS ve doğal PAGE'yle PPO enzimi tek bir bant şeklinde bulunmuştur. DHPPA, 4-MK ve L-DOPA substratları kullanılarak PPO'nun optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 30, 20, 20°C pH değerleriyse sırasıyla 7,0 5,0, 7,0 olduğu tespit edilmiştir. Kinetik çalışmalarda, K_M ile V_{max} 'ları sırası ile DHPPA, 4-MK ve L-DOPA substratlarında 2000, 2500,1666 U/mg protein ve 0,4, 0,25, 0,83 mM olduğu belirtilmiştir. Askorbik asitin enzim için bulunan I_{50} değerlerine göre, etkili inhibitör olduğu rapor edilmiştir.

Cheema and Sommerhalter, (2015) yaptıkları çalışmada Ataulfo mangosu'nun ham özütlerinin, pyrogallol, 3-metilkatekol, katekol, gallik asit ve protokatekuik asit ile polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Ataulfo'da yapılan inhibisyon çalışmalarında sodyum askorbat, glutatyon ve kojik asitin enzimatik esmerleşmeyi önlemede etkili oldukları belirtilmiştir. PPO aktivitesinin olgunluk ile arttığı ve kabuğun, posaya kıyasla her zaman daha yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) PPO aktivitesini arttırdığı, posanın ise kabuktan daha güçlü bir artış gösterdiği belirtilmiştir. Katekolaz aktivitesi için boyanmış SDS-PAGE jellerinin, 53, 112 ve 144 kDa'lık molekül ağırlığına sahip belirgin bantlar ortaya çıkardığı rapor edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada *Lamium purpureum* bitkisinden ekstakte edilen polifenol oksidaz enzimine ait bazı kinetik özellikleri araştırılmıştır. 4-MK substratı varlığında V_{max} ve K_M verileri saptanmıştır. PPO'nun optimum sıcaklık ve pH'ları sırasıyla 10°C ve 7,5 olduğu tespit edilmiştir. Polifenol oksidaz enzimi için L-Sistein, 2-merkaptoetanol, sodyum azid, askorbik asit, benzoik asit, tiyoüre ve sitrik asit yardımıyla yürütülen inhibisyon çalışmalarında inhibitörlerin I_{50} 'leri saptanmıştır (Cerrahoğlu ve Arabacı, 2016).

Kırmızı Kışmış üzümünden (*Vitis vinifera* L.)'den yapılan bir çalışmada PPO enzimi aseton çöktürmesi yöntemiyle kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeliyle saflaştırılıp enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir. Saf enzim örneklerinden PPO'nun varlığı, SDS ve doğal PAGE'yle tek bir bant şeklinde bulunmuştur. L-tirozin, 4-metilkatekol ve katekol substratlarından faydalanılarak PPO'nun optimum aktivitesi tespit edilmiştir. Polifenol oksidazın 4-MK substratıyla optimum pH'sı 5,0 olduğu saptanmıştır. Katekol ve 4-MK, substratlarına ilişkin K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. K_M V_{max} katekol substratıyla 24,21 mM ve 2000 EU/mg protein 4-MK substratıyla ise 7,25 mM ve 2500 EU/mg protein olduğu tespit edilmiştir. PPO'nun enzim aktivitesi, optimum sıcaklığı, inhibitörlerin etkisi, pH kararlılığı, termal stabilitesi ve bazı metallerin iyonlarının etkisi 4-metil katekol substratıyla incelenmiştir. Enzimin stabil pH'sının 7,0 optimum sıcaklığının ise 30°C olduğu

saptanmıştır. PPO'nun termal ısı kararlılığı incelendiğindeyse, bir saat arayla yapılan inkübasyonların ardından, 10-20-30-40°C sıcaklıklarında kararlı olduğu rapor edilmiştir. Dört farklı inhibitör varlığında K_i ile I_{50} değerlerinin hesaplanmasının ardından veriler grafiğe aktarılarak hangi inhibisyona ait olduğu saptanmıştır. Üzümün PPO'su üzerine en kuvvetli inhibisyon etkisinin askorbik asit tarafından yapıldığı bulunmuştur. PPO aktivitesine Mg^{2+} , Al^{3+} , K^+ , Cu^{2+} ve Na^+ metal iyonları etkisi incelenmiştir (Bağcı, 2019).

Benaceur *et al.*, (2019a) yaptıkları çalışmada polifenol oksidazı, yer mantarından (*Terfezia arenaria*) ekstrakte edilip saflaştırılmıştır ve molekül ağırlığı 67 kDa olarak tespit edilmişlerdir. Yer mantarı PPO'sunun, monofenolik, o-difenolik ve trifenolik substratları oksitleyebildiği gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, enzim geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kararlı görünmektedir. Substrat olarak en iyi katalitik etkiyi katekol göstermiştir. Ayrıca deterjanların, kaotropik ajanların, metal iyonlarının ve on bir farklı inhibitörün yer mantarı PPO üzerindeki nispi aktivitesi de incelenmiştir. Latent bir enzim formu gözlenmiş ve aktivitesi, 4mM SDS kullanılarak aktiveleştirilmiştir. Benzer şekilde, L-sistein, Sodyum florür, Sodyum metabisülfid ve Kojik asit için inhibisyon tipi, K_I ve I_{50} değerleri rapor edilmiştir. Ayrıca, PPO'nun termal olarak etkisizleştirilmesi üzerine dört konsantrasyondaki kojik asit etkisi (0,05, 0,1, 0,2 ve 0,3 mM) 60-75°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde ortaya konulmuştur. Kojik asit kullanımı inaktivasyon işleminin hızını arttırmakta ve enzimatik aktiviteyi bozmaktadır. Bunun yanında kojik asidin, enzimin ısıya duyarlılığını arttırdığı ve potansiyel antioksidan kaybını azalttığı belirtilmiştir.

Öztürk *et al.*, (2019) yaptıkları çalışmada polifenol oksidazı (PPO) ilk defa afnite kromatografisi ile çay yapraklarından (*Camellia sinensis*) saflaştırmış ve saflaştırılan enzim karakterize edilmiştir. Enzimin saflığı ve moleküler ağırlık, SDS-PAGE ve denatüre olmayan PAGE (doğal PAGE) ile belirlenmiştir. Her iki elektroforetik yöntemde tek bantlar gözlenmiştir. PAGE sonuçları, çay yaprağından PPO'nun moleküler ağırlığının yaklaşık 50 kDa olduğunu göstermiştir. pH, sıcaklık ve kinetik parametreler incelendi. K_M değerleri katekol ve 4 metilkatekol için sırasıyla 3,782 ve 3,881 mM olarak belirlenmiştir. Katekol ve 4-metilkatekol için V_{max} değerleri de sırasıyla 1,676 ve 1,912 $\mu\text{mol/Ldak}$ olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, enzim aktivitesi üzerinde sodyum metabisülfid, sodyum

sülfat, askorbik asit, glutatyon, dithioeritritolün inhibisyon etkileri araştırılmış ve bu maddeler için I_{50} değerleri sırası ile 21,65, 23,90, 69,31, 99,08 ve 99,02 μM olarak bulunmuştur.

Granny Smith (*Malus × domestica Borkh*) elmalarından elde edilen polifenol oksidaz, hem çözülebilir formunda (sPPO) hem de zara bağlı formunda (mPPO) saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Her iki form da sıcaklığa bağlı faz bölümlenmesi, amonyum sülfat ile çökeltme ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. mPPO'nun spesifik aktivitesi, sPPO'nun 19,17 katı olarak belirlenmiştir. Her iki form için optimum sıcaklık ile pH'sı, katekol substrat olduğunda 35°C ve 7,0 olarak bulunmuştur. sPPO için Michaelis sabiti ve maksimum reaksiyon hızı 34,1mM ve 500 U/mg protein iken, mPPO için ise sırasıyla 53mM ve 10,000 U/mg protein şeklinde tespit edilmiştir. Enzimlerin difenolaz aktivitesi sergilediği ve afiniteleri katekol (sPPO) ve 4-metilkatekol (mPPO) için en yüksek değerde olmuştur. sPPO ve mPPO inhibitörleri arasında askorbik asit, glutatyon ve L-sistein bulunur. Ancak, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), mPPO'nun aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Saflaştırılmış sPPO'nun, 31 kDa'lık bir moleküler ağırlığıyla dimerik yapıda iken, mPPO, 65 kDa'lık bir tahmini moleküler ağırlık ile monomerik yapıda olduğu bildirilmiştir (Han *et al.*, 2019).

Benaceur *et al.*, (2019b) yaptıkları çalışmada, katekol oksidaz (PPO), tadelâ (*Phoenix dactylifera* L.) hurma meyvesinden ekstrakte edilip $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çökeltmesinin, ardından diyaliz, Q-Sepharose bb iyon değişimi kromatografisi ve HPLC jel filtrasyon kromatografisini içeren bir prosedürle saflaştırılmıştır. Biyokimyasal özelliklerinden bazıları incelenmiştir. Saflaştırma oranı ve verim sırasıyla % 80 ve % 20 olarak bulunmuştur. Tadelâ hurma meyvesinin katekol oksidazı, SDS-PAGE kullanarak 90kDa'lık bir moleküler ağırlık sergilemiştir. Katekol oksidaz, sadece o-difenolaz ve trifenolaz aktivitelerini gösterirken, monofenolaz aktivitesi saptanmamıştır. Substrat olarak katekol kullanıldığında ($K_M = 35\text{mM}$) daha iyi bir afinite gözlemlendiği ve $30-60^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında termostabil olduğu bildirildi. Enzimatik esmerleşmenin kontrolü için dört inhibitör kullanılmış, en etkilisinin sodyum metabisülfid ($I_{50}=0,11\text{mM}$) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca

K_i değerleri ve inhibisyon mekanizması da belirlenmiştir. Metal iyon ve deterjanların varlığında enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmamızda, Ardahan ilinin Posof ilçesinde yetişen Posof Badele elması (*Malus domestica* L.) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

Çalışmada kullanılan aletler ve markaları Çizelge 3.1. de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma
Güç kaynağı	Thermo Scientific
UV-VIS Spektrofotometre	Agilent Technologies Cary 60
Su banyosu	WiseClean
Vortex	WiseMix
Peristaltik pompa	Pharmacia Fine Chemicals
Saf Su cihazı	Gesellschaft Für Labortechnik
Otomatik pipetler	Brand
Magnetik karıştırıcı	Joanlab
pH metre	OHAUS
Elektroforez cihazı	BIO-RAO
Buzdolabı	Arçelik
Hassas terazi	Radwag Wingi Elektroniczne
Soğutmalı santrifüj	Heal Force
Derin dondurucu	Vestel
UV-Spektrofotometre küveti	ISOLAB

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve markaları, **Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılanlar**; Askorbik asit, PEG, Triton X-114, Na-Asetat MP Biomedicals'dan, Sigma'dan **Afinite jelinin sentezide kullanılanlar**; CNBr yardımıyla aktifleştirilmiş Sepharose-4B, NaNO₃, L-Tirosin, NaHCO₃, NaOH ve *p*-aminobenzoik asit

Sigma'dan Aldrich'den **Tampon Çözeltilerinde Kullanılanlar**; Glisin, KH_2PO_4 , , Tris, K_2HPO_4 , Sodyum Asetat, Sodyum Tiyosülfat, Gulutaraldehit, Formaldehit, Sodyum Karbonat Sigma'dan, Merck'den **Metal iyonlarının Klorürlerinde kullanılanlar**; NaCl, MgCl_2 , KCl, CuCl_2 , AlCl_3 Merck'den, Fluka'dan **Protein Elektroforezinde Kullanılanlar**; Coomassie Brilliant Blue R-250, Glisin, Amonyum persülfat (APS), Akrilamid, β -merkaptoetanol, N,N'-metilen bisakrilamid, Gliserol, SDS, Bromofenol Mavisi, TEMED Sigma'dan, Fluka'dan, Carlo Erbo'dan **Kullanılan Çözücüler**; Etanol, Aseton, Asetik Asit, HCl, Metanol Merk ve Iso lab firmalarından temin edilmiştir. **Kullanılan inhibitörler**; Sodyum metabisülfat, Benzoik Asit, L-sistein, Askorbik asit, Sigma'dan

3.1.3. Kullanılan çözelti ve tamponlar

3.1.3.a. Protein tayini (Bradford Metodu) için kullanılan çözeltiler

1. Standart serum albumin çözeltisi (BSA): 2mg standart serum albumin (BSA) 2 ml saf suda iyice çözüldü.
2. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 12,5 mL %95'lik etanol içerisinde, 25 mg coomassie brilliant blue G-250 manyetik balık kullanılarak çözüldü içerisinde %95'lik 25 mL'lik fosforik asitten ilave edilerek hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Protein elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

1. Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 12,11 g Tris tartılarak 80 mL saf su çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı ve son hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
2. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS 9 mL saf su içerisinde çözüldü.
3. Ayırma Jeli Tamponu (1M Tris-HCl): 12,11 g Tris tartılarak 80 mL saf su içinde çözümlü, pH 8,8'e getirildi ve son hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
4. SDS Çözeltisi (%10): 1 g SDS 9 mL saf suyla çözüldü.
5. % 30 Akrilamid- % 0,8 Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 0,4 g N,N'-metilen bisakrilamid ve 15 g akrilamid 34,6ml saf suda çözüldü.
6. N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

7. Numune Tamponu: 1 M Tris-HCl pH'sı 6,8'den 0,5 mL, % 10'lük SDS'den 1 mL, % 100'lük Gliserolden 1 mL ve % 0,1'lik bromfenol mavisinden 1 mL alınarak saf suyla 10 mL'ye getirildi. Bu tampondan kullanılmadan önce 950 µL numune tamponundan 50 µL olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edilmiştir.
8. SDS Jel Yürütme Tamponu: 6,04 g Tris ve 30,04 g glisin tartıldı 1500 mL saf suda çözüldü % 10'lük SDS'den 20 mL ilave edilerek pH'sı 8,3'e ayarlanıp son hacmi saf suyla 2 L'ye getirildi.

3.1.3.c. Gümüş boyamada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

1. Redüksiyon çözeltisi: 9,6 g sodyum asetat 160 mL saf suda çözüldü, üzerine 90 mL etanol ilave edilip pH'sı 6,8'e asetik asit ile ayarlandıktan sonra 300 mg sodyum tiyosülfat ve 6 mL glutaraldehit ilave edilerek son hacim saf su yardımıyla 300 ml'ye ayarlandı.
2. Yıkama 2 çözeltisi: 1 M gliserin % 5'lik asetik asit olan 250 ml saf suda çözüldü.
3. Boyama çözeltisi: 300 mg gümüş nitrat 300 mL saf suda çözüldü ve üzerine 60 µL formaldehit ilave edildi.
4. Yıkama 1 çözeltisi: 7,5 g sodyum karbonat 540 mL saf suda çözüldü ve üzerine 240 µL formaldehit ilave edilmiştir.
5. Tespit çözeltisi: 120 mL saf su, 60 mL % 96'lık etanol ve 20 mL asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3.ç. Afinite jelinin sentezinde kullanılan kimyasallar ve tamponlar

1. 0,01 M pH 6,0 Na₂HPO₄ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 0,71 g NaHPO₄ çözümlenerek 1 M NaOH ile pH'sı 6,0'a ayarlanıp son hacmi 500 ml'ye tamamlandı.
2. 0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 4,2 g NaHCO₃ çözümlenerek 1 M NaOH ile pH'sı 10,0'a ayarlanıp son hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
3. 0,2 M pH 8,8 NaHCO₃ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 8,4 g NaHCO₃ çözümlenerek 1 M NaOH ile pH'sı 8,8'e ayarlanıp son hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

4. Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8,0 Fosfat Tamponu içinde 1M NaCl): 14,625 g NaCl ve 2,175 g K_2HPO_4 200 mL saf su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile pH'sı 8,0'a ayarlanıp son hacimi 250 mL'ye tamamlandı.
5. Afinite Jelini Yıkama ve Dengeleme Tamponu (50 mM pH 5,0 Asetat Tamponu): 450 mL saf su içerisinde 3,4 g sodyum asetat çözülerek 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0'a ayarlanıp son hacimi 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Substrat çözeltileri

1. 100 mM 4-metil katekol: 0,124 g 4-metil katekol bir miktar saf su içerisinde çözülerek hacim 10 mL'ye tamamlandı.
2. 2,5 mM L-Tirosin: 0,181 g L-tirosin bir miktar saf su içerisinde çözülerek hacim 10 mL'ye tamamlandı.
3. 100 mM Katekol: 0,11 g katekol bir miktar saf su içerisinde çözülerek hacim 10 mL'ye tamamlandı..

3.1.3.e. İnhibitör çözeltileri

1. 20,5 mM Benzoik Asit: 10 mg benzoik asit 4 mL saf suda çözüldü.
2. 5,68 mM Askorbik Asit: 2 mg askorbik asit 2 mL saf suda çözüldü.
3. 5,26 mM Sodyum metabisüfit: 3,8 mg $Na_2SO_2O_5$ 3,8 mL saf suda çözüldü.
4. 8,25 mM L-sistein: 2 mg L-sistein 1 mL saf suda çözüldü

3.1.3.f. Metal iyonları stok çözeltileri

Kullanılacak metal iyonunun CI tuzunun 1 mg'ı 1ml saf suda çözüldü ardından seyreltmeler yapılarak deneylerde kullanıldı.

3.1.3.g. Diğer çözelti ve tamponlar

1. 10 M MBTH (3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon): Az saf suda 0,022 g MBTH çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. 50 mM, pH 3,0 Glisin-HCl Tamponu: 0,375 g glisin 90 mL saf suda çözüldükten sonra 1 M asetik asit ile pH'sı 3,0'a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3. Ekstraksiyon Hazırlama Çözeltisi: 70 mL saf su içerisinde 0,68 g sodyum asetat (50 mM), 0,176 g Askorbik asit(10mM), %1 (w/v) TX-114 deterjanı, % 0,5 PEG 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0'a ayarlanarak hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
4. 50 mM pH 6,0-7,0 Fosfat Tamponu: 3,10 g K_2HPO_4 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
5. 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl Tamponu: Yaklaşık 45 mL saf su içerisinde 0,3028 g Tris çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra hacim 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
6. 50 mM pH 4,0-5,0 Asetat Tamponu: 3,40 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1.PBPPO enziminin aktivite ölçüm yöntemi

Enzim aktivitesinin ölçümü, fenolik substratın kinonlara dönüşümü sırasında 500 nm'de absorbanstaki artışa dayanmaktadır (Flurkey, 1986). PPO'nun bir enzim ünitesi, 0,001 absorbanslık bir artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. PPO enziminin aktivite ölçüm için 1 mL'lik kuartz tüp içerisine 0,05 M Na-Asetat tampon çözeltisinden 680 μ L 100 mM 4-Metil katekol substratından 100 μ L 10 mM MBTH çözeltisinden 100 μ L ve %2'lik DMF içeren çözeltiden 20 μ L alınarak spektrofotometrede 500 nm de sıfırlama yapıldı ardından 100 μ L saf enzim ilave edilerek tekrar spektrofotometreye bırakılıp 1 dakika boyunca absorbansında meydana gelen artış ölçülmüştür (Espin *et al.*, 1996). Enzimlerin miktarı, içlerinde var olan aktiviteleri dikkate alınarak enzim ünitesi (E.Ü) biçiminde ifade edilir. Yaygın bir E.Ü tanımı olmamakla beraber, normal şartlarda 1 mL'lik reaksiyon karışımı içerisinde dakikada 0,001 absorbans yükselişiyle sonuçlanan enzimin miktarı biçimde tanımlanmıştır (Özen, 2004).

3.2.2. Ekstraksiyon hazırlama ve asetonla çöktürme

Posof Badele elması (*Malus domestica* L.) kabuk ve çekirdeğinde ayrıldıktan sonra 50 g alınarak porselen havanda iyice öğütüldü. -80 de yarım saat bekletilip iki tekerrür halinde elma toz haline gelinceye kadar öğütüldü. Üzerine 100 ml ekstraksiyon hazırlama

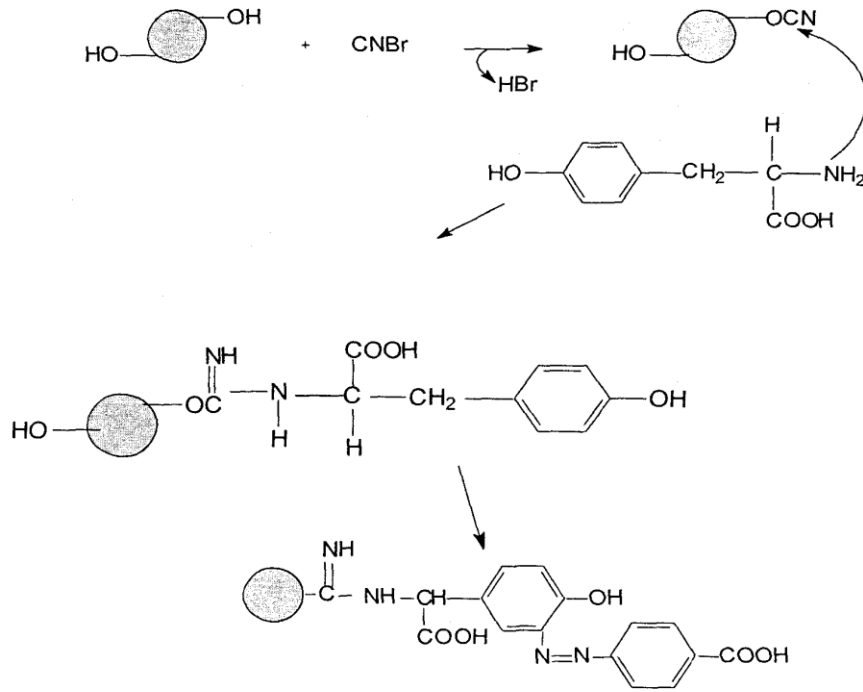
çözeltisi ilave edilip manyetik balık yardımıyla düşük devirde karıştırıldı. İki katlı bir bez tülbentle süzülerek PBPPO özütü +4°C’de 6,000 rpm de bir saat süreyle santrifüj yapıldı. Ardından süpernatantlara, hacmi kadar soğuk asetonla, buzlu bir su banyosu içerisinde çok hızlı olamayacak şekilde ilave edildi. Bir gece + 4 °C’de bekletilen ham enzim özü aseton karışımı, +4 °C’de 10,000 rpm’de bir saat santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım atılıp, elde edilen çökelekler çözünmediği en az hacimde 50 mM pH 5,0 asetat tamponuyla çözüldü (Öz, 2010).

3.2.3. Afinite jelinin sentezi

Bu çalışmada faydalanan afinite jeli Arslan *et al.*, (2004) yılında yaptıkları çalışmadaki gibi sentezlenmiştir. CNBr yardımıyla aktif hale getirilmiş sepharose-4B matriksi, uzantı kolu elde etmek için tirozinle kovalent olacak şekilde modifiye edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu sentezlemede PPO’nun inhibitörü olduğu bilinen p-aminobenzoik asit ligan olarak tercih edilmiştir.

5 g CNBr yardımıyla aktif hale getirilmiş Sepharose-4B karışımı içerisinde 10 mL saf su bulunan bir behere bırakılıp iyice çözdürüldü. 2 M NaOH yardımıyla karışımın pH’sı 11,0’e çıkarıldı ve pH sabitlenene kadar 2 M NaOH bazından ilave yapılmaya devam edildi. Süspansiyona küçük buz parçaları bırakıldı ve karışım buchner hunisi kullanılarak mavi banttardan süzüldü. 0,1 M pH’sı 10,0 olan bikarbonat tamponundan 250 mL alınıp süzgeç kağıdında ve üzerinde kalan kısım iyice yıkandı ardından süzülerek bir beher içerisine bırakıldı. 0,1 M’lık soğuk bikarbonat tamponuna 20 mL içerisinde 10 mg L-tirozin olacak şekilde süspansiyonun üzerine eklendi, ardından 90 dakika boyunca karıştırıldı. Bu aşamadan sonra süspansiyon, 4°C’de 16 saat boyunca dolapta bekletildi. 16 saatlik sürenin sonunda süspansiyon mavi banttardan bir daha süzülerek bol saf suyla iyice yıkandı. 0,2 M’lık bikarbonat tamponununun 100 mL’siyle ilk olarak mavi bandın üzerinde artı kalan kısım iyice yıkandı ardından bikarbonat tamponunun 40 mL’si içine bırakıldı. 10 mL 1 M’lık soğuk HCl’nin içerisinde çözdürülen 25 mg p-aminobenzoik asit çözeltisinin üzerine, daha önceden soğutulan 5 mL’lik saf su içerisinde çözdürülen 75 mg NaNO₂ damla damla damlatıldı. Buz banyosunda 10 dakika boyunca bekletilen reaksiyon ardından 40 mL’lik sepharose-4B-L-tirozin karışımına diazolanmış şekilde bulunan p-aminobenzoik asit

eklendi ve süspansiyonun pH'sı 2 M NaOH yardımıyla 9,5'e çıkartılarak 3 saat boyunca 25°C'de karıştırıldı. Mavi bant üzerine alınan karışım ilk olarak 1 L saf suyla, ardından 200 mL 0,01 M'lık pH 6,0 Na₂HPO₄ tamponu yardımıyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Arslan *et al.*, 2004). Reaksiyon aşamaları aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Siyonojen bromürle aktifleştirilmiş Sepharose-4B'den afinite jelinin sentez basamakları

3.2.4. Ekstrakt çözeltilisinin afinite kolona yüklenmesi ve enzimin elüsyonu

1×10 cm ebatlarındaki afinite kolonuna, sentezlediğimiz afinite jeline, hava kabarcığı oluşmayacak biçimde dikkatlice dolduruldu ve kolonun dengelenmesi için 0,05 M pH'sı 5,0 asetat tamponuyla dengelenmeye bırakıldı. Dengeleme işlemini sonlandırabilmek için kolonun altında toplanan tampondan 280 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Yapılan ölçümler eşit olunca dengeleme işlemi sona erdirildi. İyice

yıkayıp dengeye ulaşmış kolona, saf enzimden yüklenerek kolon bidaha 0,05 M pH'sı 5,0 asetat tamponuyla yıkamaya bırakıldı. Yıkama işleminin sonlandırabilmek için tekrar kolonun altında toplanan tampondan 280 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Yapılan ölçümler eşit olunca yıkama işleminin sona erdirildi. Yapılan yıkama işlemiyle jele affinite göstermeyen diğer proteinlerin tamamının ve protein dışındaki maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Jele iyice tutunmuş olan enzimler içerisinde 1 M'lık NaCl bulunan 0,05 M pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu yüklenmesiyle 2 mL'lik tüplere elüe edildi. Enzim elüatlarının alındığı her bir tüpte 280 nm'de proteinlerine 500 nm'de ise 4-MK substratıyla aktivite ölçümleri yapılmıştır.

3.2.5. Protein tayini

3.2.5.a. Kalitatif protein tayini

Proteinlerin yapısında aromatik halkaları olan farklı protein zincirleri arasında güçlü hidrofobik etkileşim gösteren amino asitlerin (tirozin, triptofan ve fenilalanin) 280 nm'de ışınları absorblaması prensibine göredir (Jaenicke, 1984). Protein tayini afinite kolonundan alınan bütün tüplerdeki fraksiyonlara uygulandı. Spektrofotometreyle 280 nm dalga boyunda 2 mL'lik kuvarz küvetlerle okumalar yapıldı.

3.2.5.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisiyle saf hale getirilen enzim ile homojenatta bulunan protein miktarı tayini, bu metoda göre yapıldı. Yöntemin esası fosforik asitli ortamdaki proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifiyle kompleks meydana getirmesi ve 595 nm'de en yüksek absorbanı göstermesi ilkesine dayanmaktadır (Bradford, 1976) . Bu yöntem protein boya karışımının çözeltide fazla kalması, bozucu faktörlerin düşük olması, yüksek oranda tekrarlanabilir olması ve çok az zamanda uygulanması diğer yöntemlere göre avantajlı taraflarındandır. Yöntem 1-100 µg/mL arasında hassasiyet göstermektedir.

Deneyde takip edilen adımlar: 1 mL'sinde 1 mg protein olacak şekilde standart sığır albumin çözeltisinden tüplere sırasıyla 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 ve 0,1 mL bırakıldı. Tüplere daha sonra sırasıyla 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0 µL saf su bırakılarak tüplerin hacmi 0,1 mL'ye getirildi akabinde tüplere Coomassie brilliant blue G-

250 reaktifi ile 4,9 ml eklenerek son hacim 5 mL'ye getirilip vortex ile çok yüksek olmayan hızda karışım sağlandı. 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler daha sonra 595 nm'de 2 mL'lik küvetlerde absorbans değerleri köre karşı ölçüldü. 4,9 mL'lik G-250 reaktifiyle 0,1 mL'lik saf su içeren karışım kör olarak alınmıştır. Yapılan okumalarla standart bir grafik oluşturuldu. Üç farklı tüpe saflaştırılmış olan enzimlerden sırası ile 0,1 mL bırakılarak hacimleri 4,9 mL renklendirme reaktifiyle 5 mL'ye tamamlandı. Vorteksle yapılan karıştırma işleminden sonra on dakika inkübasyona bırakılıp 595 nm'deki absorbans değerlerine bakıldı. Ne kadar protein olduğunu belirlemek maksadıyla işlemler üç sefer tekrerrüt ettirilip bu üç farklı sonucun da ortalamaları alındıktan sonra standart grafikte ne kadar proteinnin olduğu hesaplandı.

3.2.6. SDS Jel Elektroforezi

Laemelli, (1970) tarafından geliştirilen enzimlerin saflık derecesi kontrol etmek maksadıyla sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli %8'lik ve yükleme jeli %3'lük olacak biçimde tabloda belirtildiği gibi hazırlandı. Elektroforez malzemeleri çalışmaya başlamadan önce özellikle cam plakaların alkolle temizliği yapıp iyice kurutuldu. Elektroforez tankına cam plakalar yerleştirilip içine SDS yükleme tamponu bırakıldı. Numunelerle standart proteinler, kuyucuklarda protein miktarı yaklaşık 20-25 µg olacak biçimde SDS yürütme boyasıyla hazırlandı. Hazırlanan numuneler, 96 °C'de beş dakika boyunca ısıtılıp proteinler denatüre edildikten sonra, mikropipet yardımıyla kuyucuklara taşmayacak şekilde dikkatli bir biçimde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak ilk olarak 70 voltta 20 dakika yürütülüp örneğin ayırma jeline kadar gelip yığılması sağlandı. Sonra akım 120 voltta çıkarılarak jelde oluşan mavi renkli boyanın jeli tamamen terk etmesi beklendi. Yürütme işlemi bittikten sonra jeller dikkatlice elektroforez tankından çıkarılıp gümüş boyama aşamasına geçildi.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	Ayırma jelli (%8)	Yükleme jelli (%3)
Didestile Su	6,9 mL	2,1 mL
% 30 Akrilamid- % 0,8 Bisakrilamid	4 mL	0,5 mL
1 M Tris HCl	3,8 mL (pH:8,8)	0,38 mL(pH:6,8)
% 10 SDS	0,15 mL	0,03 mL
% 10 APS	0,15 mL	0,03 mL
TEMED	0,009 mL	0,003 mL
Toplam	15 mL	3 mL

3.2.7. Gümüş Boyama

Yaptığımız çalışmanın ne kadar hassas olduğunu görmemiz açısından gümüş boyama uygulandı. Çalışma 4 basamakta yapılmıştır. 1. Basamakta tespit çözeltisi içerisinde yarım saat hafif çalkalanarak yapıldı. 2. basamakta tespit çözeltisinden alınan jel redüksiyon çözeltisi içerisinde yarım saat hafif çalkalanarak yapıldı. 3. basamakta jel redüksiyon çözeltisi içinden çıkarılıp üç sefer 5'er dakika aralıklarla hafif çalkalanma yapılarak bekletildi. Bu arada gümüş nitratlı çözelti taze olarak hazırlandı. 4. basamakta içerisinde gümüş nitrat bulunan jel'de 20 dakika boyunca hafif çalkalanarak yapıldı. En son olarak yıkama 1 ve yıkama 2 çözeltileri içerisine alınarak bantlar görünene kadar hafifçe çalkalanıp içerisinde saf su olan kaba bırakılıp fotoğrafı çekildi (Güller, 2014).

3.2.8. Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar

Polifenol oksidaz enzimiyle yapılan kinetik çalışmalarda 4-MK substrat olarak kullanılıp optimum sıcaklık, optimum pH, pH spesifikliği, ısı spesifikliği, bazı metal iyonları etkisi, V_{max} , K_M , K_i , I_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.8.a. PBPPO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesinin 4-MK substratı kullanarak pH ile değişimini ölçmek amacıyla yapılan çalışmada, 0,05 M sodyum asetat (pH 4,0-4,5-5,0-5,5) ve 0,05 M K-fosfat (pH 6,0-6,5-7,0-7,5) tamponları yardımıyla hesaplandı. PPO'nun en iyi aktivitesinin olduğu pH optimum pH olarak alınıp, veriler grafikte şematize edildi.

3.2.8.b. PBPPO enzimine optimum iyonik şiddetin etkisi

0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1 M'lık optimum pH'sı 5,5 olan Na-Asetat tamponundan yararlanarak PPO enziminin optimum iyonik şiddeti belirlenmiştir.

3.2.8.c. PBPPO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklığının tespit etmek için, 0-90°C sıcaklık aralığında 10°C'lik sıcaklık artışlarıyla 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerlerine enzim ilavesiyle aktivite ölçümleri yapıldı. Reaksiyon karışımına tampon çözeltisi, MBTH, DMF ve saf enzim elüat ilave edilmesinin ardından PPO aktivitesi, 1 dakika gibi kısa sürelerde ölçölüp optimum sıcaklık değeri hesaplandı (Çolak *et al.*, 2005).

3.2.8.ç. PBPPO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Kullanılan substrat konsantrasyonlarının polifenol oksidazın aktivitesine olan etkilerini incelemek maksadıyla yürütölen deneylerde, son konsantrasyonu 2 mM-10 mM arasında değişiklik gösteren 5 farklı konsantrasyondaki katekol ile 4-MK substratlarından faydalanıldı. PPO'nun aktivitelerinin ölçölmesiyle elde edilen analiz verilerinin $1/[S]$ ile $1/V$ 'leri hesaplanıp Lineweaver-Burk grafiğiyle V_{max} ile K_M 'leri bulundu (Lineweaver and Burk, 1934).

3.2.8.d. PBPPO enziminin pH kararlılığının incelenmesi

PPO'nun pH'sının stabilliğini belirlemek maksadıyla tamponu, pH'sı 4,0-4,5-5,0 ve 5,5 olan 50 mM Na-asetat tamponu, 50 mM pH'sı 6,0-6,5-7,0,7,5 olan K-fosfat tamponu hazırlanıp enzim tamponların içerisinde eşit oranda (0,5 mL-0,5 mL) olacak şekilde yapılan karışımlarda spektrometrik okuma yapılmasının ardından +4 °C'de 1 ila 10 gün arasında inkübasyona bırakıldı. Aktivite ölçümleri yapılırken optimum pH ve sıcaklıktaki tamponlardan faydalanıldı ve yapılan ölçümün sonra enzimin % aktivitesi hesaplanıp veriler grafiğe aktarıldı (Bağcı, 2019).

3.2.8.e. PBPPO enziminin ısı kararlılığının incelenmesi

PPO enziminin termal stabilitesini ölçmek için, bimsiz enzim ependorf tüplerinin içerisine alındı, 10°C'lik bir sıcaklık artışıyla 0 ila 60°C arasında 15 dakikada yapılan ölçümlerle, bir saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra saf enzimden, optimum koşullarda aktivite ölçümleri alındı. Yüzde kalan aktiviteyi, inkübasyon işlemine uğramayan enzimin aktivitesi ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.8.f. PBPPO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

PPO'nun aktivitesine olan inhibitör etkisini tespit etmek için 0,1 M 4-MK substratı varlığında, L-Sistein, Benzoik asit, Sodyum metabisülfid ve L-askorbik asitten çalışıldı. İçinde inhibitör bulunmayan enzim aktivitesi %100 olarak alındı. Bu inhibitörlerin değişik konsantrasyonlarına karşı yüzde aktiviteyi veren grafik oluşturuldu ve yüzde 50 aktivitenin kaldığı değer I_{50} olarak kabul edildi.

3.2.8.g. PBPPO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarından bazılarının polifenol oksidaz aktivitesine olan etkisini belirlemek için Al^{3+} , Cu^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ iyonlarının klorür tuzlarından her birinden 1mg/ml olacak şekilde stok çözeltiler yapıldı. Son konsantrasyonları 1 mM olacak biçimde reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının optimum koşullardaki aktiviteyi ölçüldü (Kolcuoğlu, 2007).

3.2.8.ğ. PBPPO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin belirlenmesi

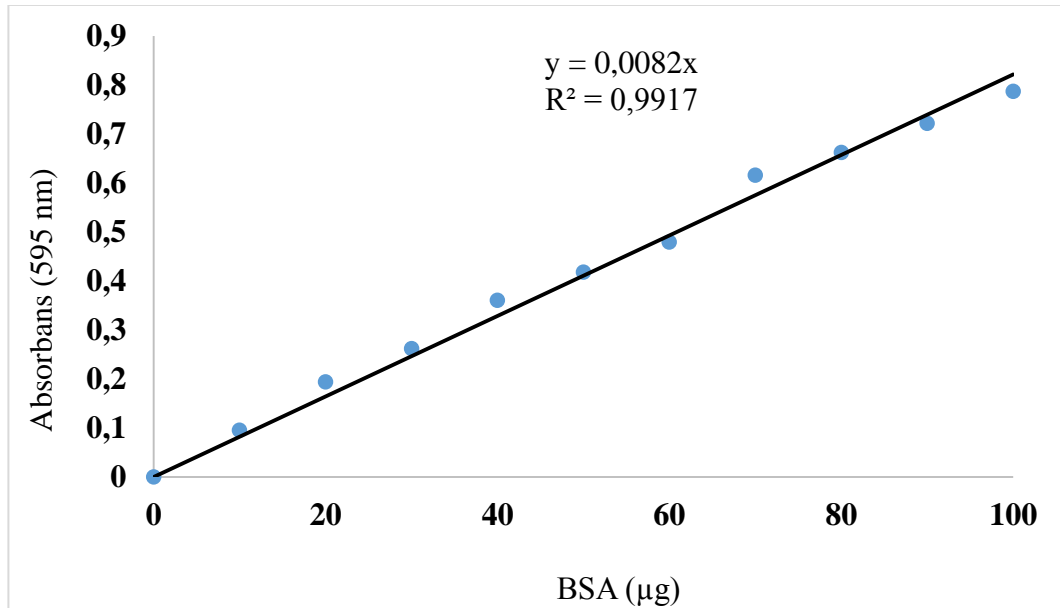
Yapılan inhibisyon çalışmalarında, Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO enzimini inhibe eden sodyum metabisülfid, L-sistein, benzoik asit ve askorbik asit kimyasalları ile Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Al³⁺ Cu²⁺ metal iyonlarından faydalanılmıştır. Çalışmalarda beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu kullanılmıştır. Konsantrasyonlar yapılan I₅₀ çalışmalarıyla belirlenmiştir. Akabinde Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO'nun 3 değişik inhibitör konsantrasyonlarından 1/[S] ile 1/V'leri belirlendi. Lineweaver-Burk grafiğine göre ayrı ayrı K_i'leri hesaplanıp hangi inhibisyon çeşidine ait oldukları belirlendi (Lineweaver and Burk, 1934).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda polifenol oksidaz (PBPPPO) enzimi Ardahan ilinin Posof ilçesinde yetişen içi dışı kırmızı olan Posof Badele elmasından (*Malus domestica L.*) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı inhibitör özellikleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda aktarılmıştır.

4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

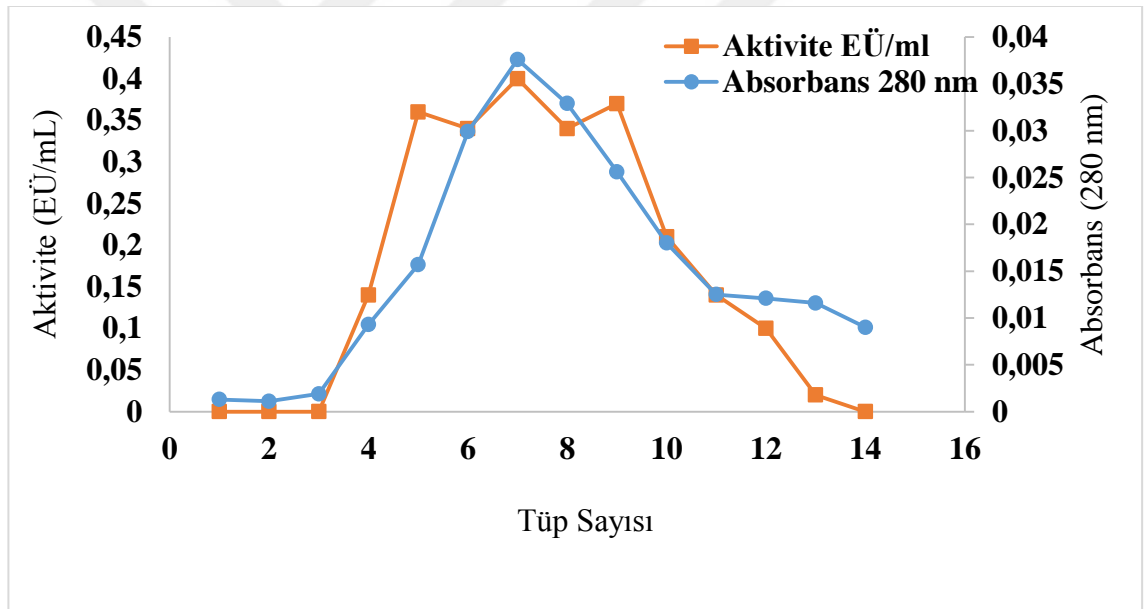
Posof Badele elmasından (*Malus domestica L.*) afinite kromatografisi yardımıyla izole edilen enzimin kantitatif protein miktarının hesaplanması Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bunun için standart grafik bölüm 3.2.5.a.'da açıklandığı gibi yapılmıştır. Çizilen standart grafik yardımıyla ham ekstrakt, aseton çöktürmesi ve saflaştırılan enzimde var olan protein miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif analizinde kullanılan standart grafik

4.2. PBPPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Posof Badele elmasının (*Malus domestica* L.) saflaştırılma yöntemi Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Tüp numarasına karşı absorbanlar ve bulunan aktiviteler grafiğe aktarılarak Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. PBPPO'nun afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmasıyla elde edilen elüsyon grafiği

1'den 14'e kadar numaralandırılan elüsyon tüplerinden 2 mL olacak şekilde elüatlar toplandı. 500 nm'de spektrofotometrik ölçümlerle aktivitelerine bakıldı. En yüksek enzim aktivitesinin olduğu tüpten Bradford metodu yardımıyla kantitatif protein analizi yapıldı. Elde edilen veriler yardımıyla, saflaştırma katsayıları ve % verim hesaplaması yapıldı.

Çizelge 4.1. PBPPO enzimi için saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml.dk)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Enzim Özüdü	24	1,12	1,8	43,2	26,88	0,62	1	100
Aseton çöktürmesi	3	4,23	0,28	0,84	12,69	15,11	24,37	47,2
Afinite kromatografisi	2	1,21	0,08	0,16	2,42	15,16	24,45	9,0

Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) afinite jeli kullanılarak PBPPO enzimi, % 9,0 verimle 24,25 kat saflaştırıldı. Ham enzim ekstraktının, aseton çöktürmesi sonrası ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen PBPPO'nun spesifik aktiviteleri sırası ile 0,62-15,11-15,16 U/mg protein şeklinde olduğu tespit edildi.

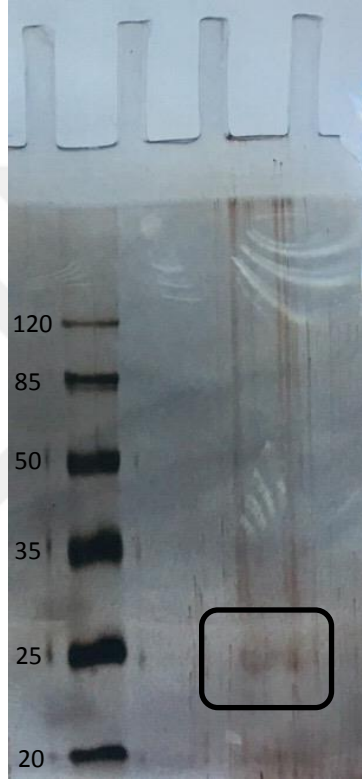
Yapılan benzer çalışmalarda, afinite kromatografisiyle patatesinden PPO enzimi 7,87 kat (Bayrak *et al.*, 2019), Isparta'da yetişen arap kızı yabani elmasından (*Malus domestica*) 13,0 kat (Millioğlu, 2019), enginar (*Cynara scolymus* L.) bitkisinden 43,0 kat (Doğan *et al.*, 2005), çay yaprağı bitkisinden (*Camellia sinensis*) 19,77 kat (Öztürk, 2019) ve *Laccaria laccata* mantarından 26,3 kat (Kolcuoğlu, 2018) saflaştırılmıştır.

Farklı saflaştırmalarla taze yeşil fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) başlığındaki iki PPO enzimi Sephadex G-100 kolonu ile 17 kat ve 9,4 kat saflaştırılmıştır (Guo *et al.*, 2009). PPO, *ferrula* sp. bitkilerinin yapraklarından ve gövdelerinden iyon değişim kromatografisiyle 2,7 ve 2,2 kat saflaştırılmıştır (Erat *et al.*, 2006). Çay bitkisi PPO, DEAE-selüloz kolonu ile %5,11 verim ile 3,32 kat saflaştırıldı. Çay (*Camellia sinensis*) bitkindeki PPO enzimi, DEAE-selüloz kolonuyla %5,11 verim ile 3,32 kat saflaştırılmıştır (Ünal, 2011). *Camellia sinensis* ile yapılan bir başka çalışmada ise, iki PPO izoenzimi, amonyum sülfat çökeltmesi, aseton, diyaliz, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle 5 basamakta 48,94 kat saflaştırılmıştır (Teng *et al.*, 2017).

4.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

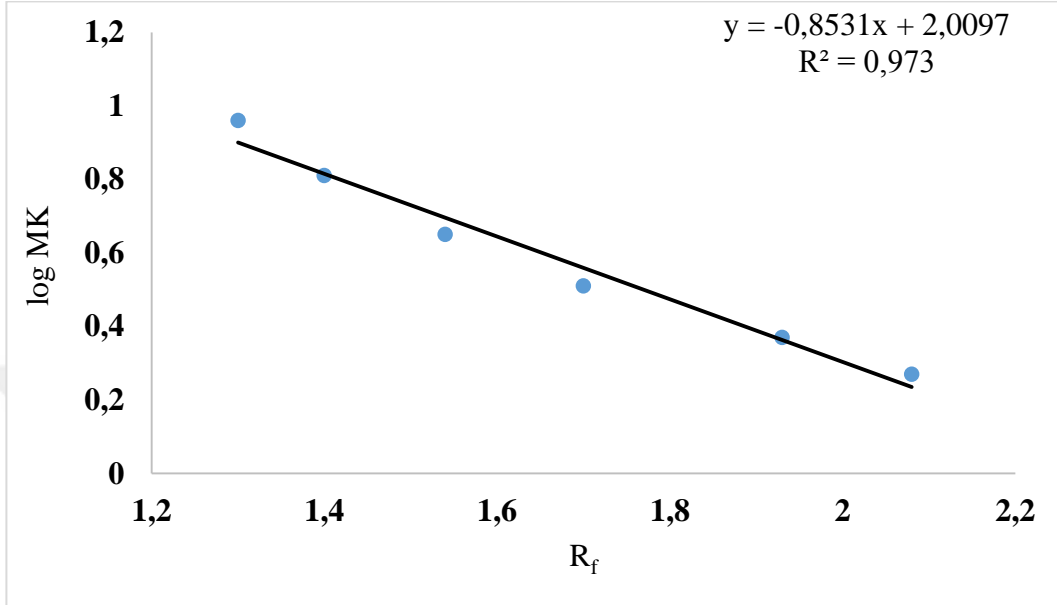
4.3.1. Polifenol oksidazın elektroforetik olarak karakterizasyonu

Afinite kromatografisi yardımıyla elde edilen elüatların içerisindeki PPO enziminin varlığını belirleyebilmek için SDS-PAGE elektroforez yönteminden faydalanılmıştır. Bölüm 3.2.6.a'da ifade edildiği gibi yapılan %8-3'lük SDS-PAGE'ye elüatlar tatbik edilmiş ve gümüş boyama işlemi uygulanarak protein bantları açık bir şekilde görünür biçime getirilmiştir. Saflaştırılan enzime protein bandıyla içerisinde standart protein bantları olan jeller karşılaştırıldığında yaklaşık 19,95 kDa'lık bir değere karşılık gelen protein bandı bulunmuştur. İçerisinde protein bandı olduğu düşünülen jellerin fotoğrafı çekilip kaydedilmiştir.



A **B**

Şekil 4.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi, B: Saf Enzim Elüatı, A: Protein Standartı; (120 kDa *E. Coli* β -galaktozidaz, 85 kDa BSA, 50 kDa tavuk yumurtası ovalbümin, 35 kDa sığır eritrosit CA, 25 kDa inek sütü β -laktoglobulin ve 20 kDa tavuk yumurtası lizozim)



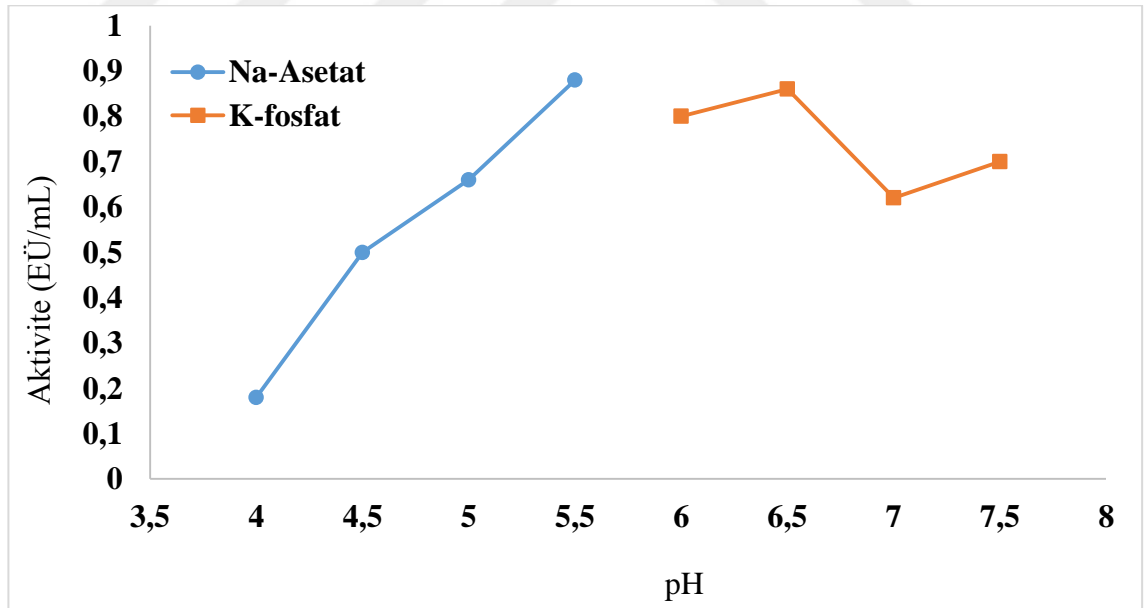
Şekil 4.4. PBPO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde kullanılan standart logM_K-R_f grafiği

Öztürk *et al.*, (2019) saflaştırdıkları enzimin PAGE sonuçları, çay yaprağından PPO'nun moleküler ağırlığının yaklaşık 50 kDa olduğunu göstermiştir. Cheema and Sommerhalter, (2015) yaptıkları çalışmada Ataulfo mangosu'nun boyanmış SDS-PAGE jellerinin, 53, 112 ve 144 kDa'lık molekül ağırlığına sahip belirgin bantlar ortaya çıkardığı rapor edilmiştir. Benaceur *et al.*, (2019b) yaptıkları çalışmada, katekol oksidaz (PPO), Tadela (*Phoenix dactylifera* L.) hurma meyvesinden ekstrakte edilip (NH₄)₂SO₄ çökeltmesinin, ardından diyaliz, Q-Sepharose bb iyon değişimi kromatografisi ve HPLC jel filtrasyon kromatografisini içeren bir prosedürle ve saflaştırmıştır. Tadela hurma meyvesinin katekol oksidazı, SDS-PAGE kullanarak 90kDa'lık bir moleküler ağırlık sergilemiştir. Muchuweti *et al.*, (2006) yaptıkları çalışmada, Polifenol oksidaz enzimini Uapaca kirkiana meyvesi ve kabuğundan, amonyum sülfat çökeltme ve diyalizle izole etmişlerdir. Kabuğun PPO enzimi ileriki saflaştırılması, jel filtrasyon kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi ile üç Uapaca kirkiana PPO izoenzimi tespit edilmiştir. İzoenzimlerden birinin, 26,625 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir. Granny Smith (*Malus × domestica* Borkh) elmalarından elde edilen polifenol

oksidaz, hem çözülebilir formunda (sPPO) hem de zara bağlı formunda (mPPO) saflaştırıldı ve karakterize edildi. Her iki form da sıcaklığa bağlı faz bölünmesi, amonyum sülfat ile çökeltme ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış sPPO'nun, 31kDa'lık bir moleküler ağırlığıyla dimerik iken, mPPO, 65kDa'lık bir tahmini moleküler ağırlık ile monomerik olduğu bildirilmiştir (Han *et al.*, 2019).

4.3.1.a. PBPPO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Elmadan afinite kromatografisi yardımıyla elüe ettiğimiz PPO enziminin aktivitesine pH'nın etkisini tespit etmek için 0,05M sodyum asetat (pH 4,0-4,5-5,0-5,5) ve 0,05M fosfat (pH 6,0-6,5-7,0-7,5) tamponlarıyla aktivite tayinleri 4-metil katekol substratıyla birlikte ölçüldü. Bulunan değerlerden faydalanılarak % aktivite-pH grafiği çizilmiştir (Çizelge 4.3). Elde edilen veriler yorumlandığında optimum pH'nın 5,5 ile Na-asetat tamponundan elde edildiği tespit edilmiştir.



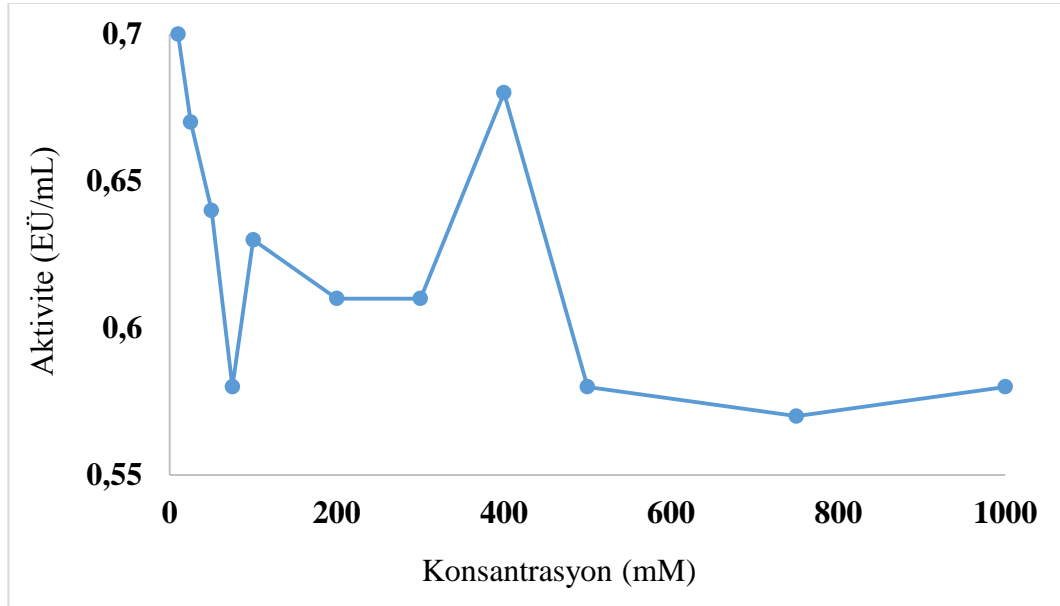
Şekil 4.5. 4-metil katekol substratı varlığında PBPPO aktivitesinin pH ile değişim grafiği

Saflaştırılmış LacPPO (*Laccaria laccata*) 'nın optimum pH'sı 4 - MC, DHPPA ve L - DOPA varlığında tampon çözeltiler Tris - HCl (8,0, 9,0) ve Mcilvaine (pH 3,0-7,0) kullanılarak ölçülmüştür. LacPPO'nun optimum pH değerleri L - DOPA ile DHPPA için 7,0 4 - MC için ise 5,0 olarak bulundu (Kolcuoğlu *et al.*, 2018). pH, enzim aktivitesini

büyük ölçüde etkileyen ana faktörlerden biridir. Yeşil fasulye içindeki PPO aktivitesinin pH profilleri, 0,2 pH aralıklı geniş bir pH aralığında (3,0-8,0) substrat olarak katekol kullanılarak belirlendi. Yeşil fasulye parçaları için, PPOIa ve PPOIb'nin optimum pH'ı sırasıyla 6,8 ve 7,0 olarak tespit edilmiştir(Guo *et al.*, 2009). Enzimler, PPO'nun yüzey yükünü, çözünürlüğünü, konformasyonunu ve farklı substratlar veya inhibitörler ile bağlama kabiliyetini etkileyebilecek olan pH'ya son derece duyarlıdır. pH'nin yam PPO aktivitesi üzerindeki etkisi, 35°C'de 5,0 ila 7,5 arasında değişen farklı pH koşullarında substrat olarak 14 mg / mL katekol kullanılarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda optimum pH'nın 6,0 olduğu saptanmıştır (Peng *et al.*, 2019).

4.3.1.b. PBPPO enzimine optimum iyonik şiddetin etkisi

0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1 M'luk optimum pH'sı 5,5 olan Na-Asetat tamponundan yararlanarak PPO enziminin optimum iyonik şiddeti belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda PPO enziminin optimum iyon şiddetinin pH'sı 5,5 0,01 M Na-Asetat tamponu olduğu tespit edilmiştir.

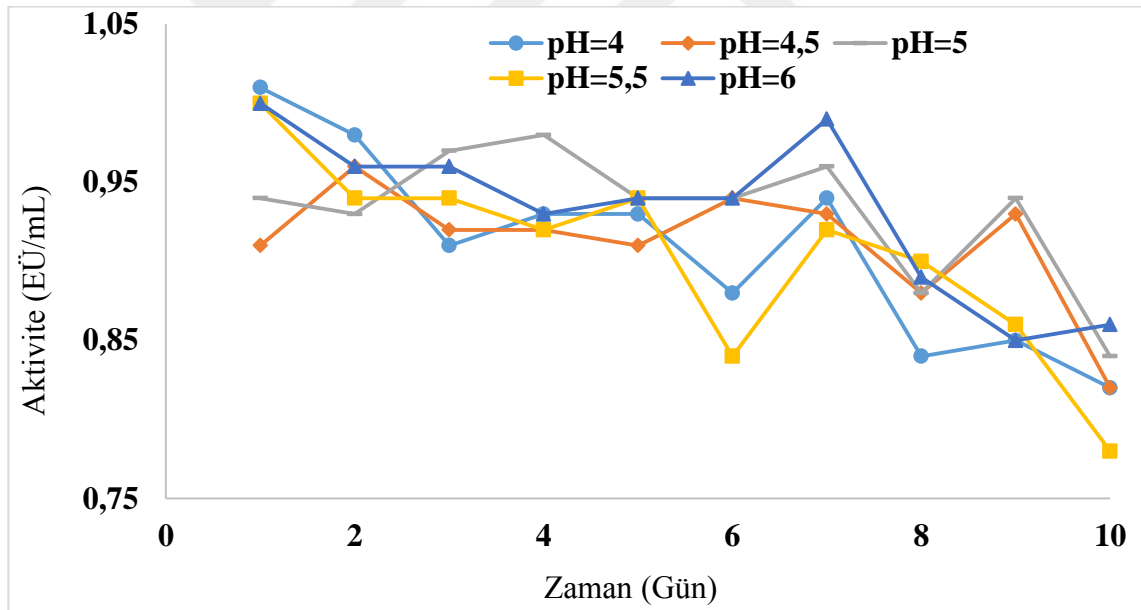


Şekil 4.6. PBPPO enziminin optimum iyonik şiddeti grafiği

Aydın *et al* (2015) katekollü substrat olarak alıp optimum pH'nın 5,5 bulunduğu Hemşin elmasında (*Malus communis* L.) 1-100 mM aralığındaki konsantrasyonlarda fosfat tamponuyla yapmış olduğu çalışmalarında optimum iyonik şiddet 0,1 M olarak bulmuştur.

4.3.1.c. PBPPO enziminin pH kararlılığının incelenmesi

Posof Badele elmasının (*Malus domestica* L.) termal stabilitesini belirlemek amacıyla bölüm 3.2.8.d'de anlatıldığı gibi analizler yapılmış ve yüzde aktivitelere karşılık stabil pH grafikleri yapılmıştır(Şekil 4.6). Grafik incelendiğinde pH 6,0'da enzim en yüksek kararlılığı göstermiştir. Yaklaşık aktivitesinin % 86'sını koruduğu saptanmıştır. Enzimin en az kararlı olduğu pH değeri ise % 22'lik aktivite kaybıyla 5,5 olmuştur.



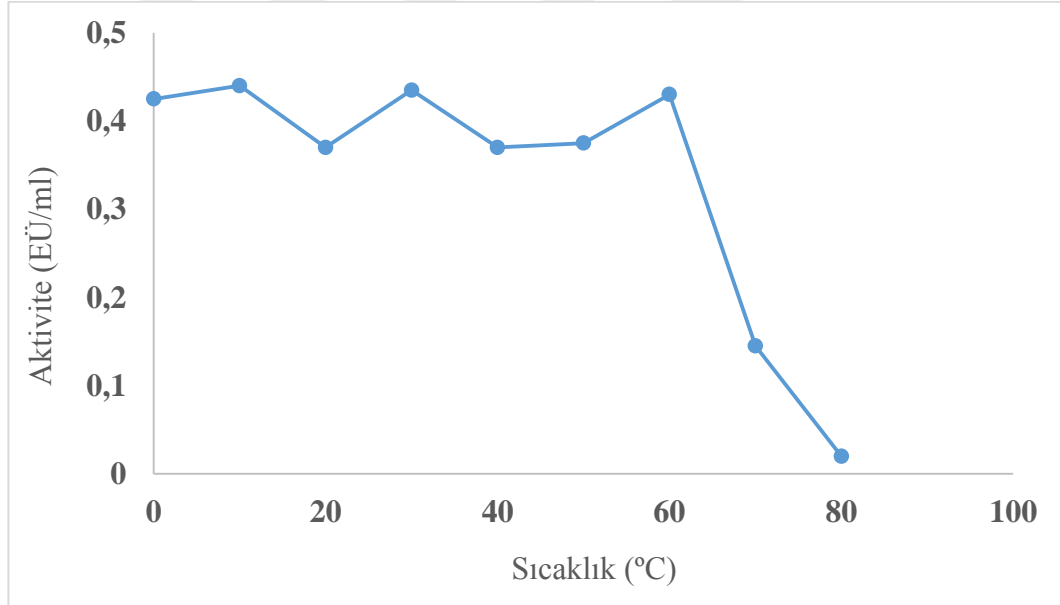
Şekil 4.7.PBPPO'sunun pH kararlılığı

Aydın *et al.*, (2015) yaptıkları bir çalışmada, Hemşin elması (*Malus communis* L.) PPO'nun pH kararlılığı, 0,1 M tampon çözeltileri içerisinde pH 3,0-4,0 aralığında asetat tampon, 4,0-7,0 pH aralığında fosfat tampon, 7,0-9,0 pH aralığında Tris HCl tampon kullanılarak belirlenmiştir. Bir mililitre ham enzim çözeltisi, 3 mL tampon çözeltisi ile karıştırdıktan sonra, numuneler 4°C'de 30 saat süreyle inkübe edilmiş. Her 6 saatte bir

alınan PPO'nun aktivite ölçümleri sonucunda elma (*Malus communis* L.)'nin 8,5'te stabil bir pH'ya sahip olduğu bildirilmiştir.

4.3.1.ç. PBPPO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bu çalışmada Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO'nun optimum sıcaklığını tespit etmek için bölüm 3.2.8.c.'de anlatıldığı gibi 4-metil katekol substratıyla 0-90°C aralığında ölçümler yapıldı. Enzim optimum sıcaklık değeri 10°C olarak bulunmuştur. 50°C üzeri sıcaklık değerlerindeyse aktivitenin azalmaya başladığı ve 70°C üzeri sıcaklıkta ise neredeyse aktivitesinin tamamına yakını kaybettiği tespit edilmiştir.



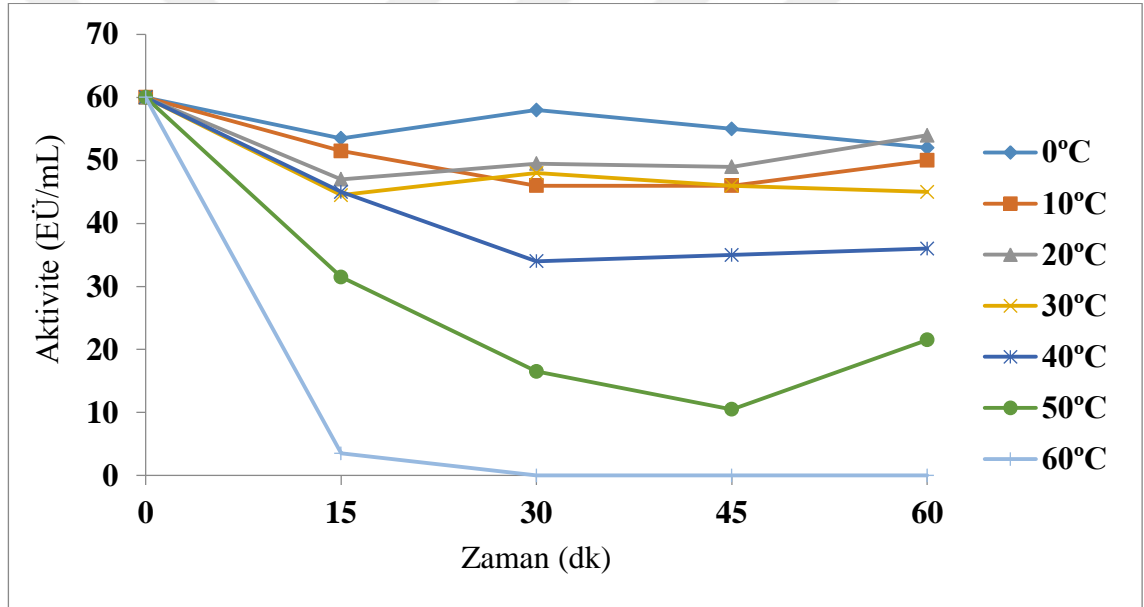
Şekil 4.8. PBPPO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

Aydın *et al.*, (2015) yaptıkları bir çalışmada, elma (*Malus communis* L.) PPO enzim aktivitesi için optimum sıcaklık, fosfat tamponunda (0,1 M; pH 5,5) 420 nm'de olabildiğince çabuk bir şekilde bir substrat (0,1 M) olarak katekol kullanılarak 10-80°C sıcaklık aralığında ölçülmüştür. Elma (*Malus communis*) PPO'su için optimum sıcaklık değerinin 30°C olduğu ve enzim aktivitesinin 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kaybolduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde *ferula sp.*, 'den yapılan çalışmada optimum sıcaklık 12°C (Erat *et al.*, 2006), *L. japonica*'nın (LjPPO) çiçek tohumlarının enzim

aktivitesi, 10 ila 65°C sıcaklık aralığında ölçülmüş ve LjPPO'nun optimum sıcaklığının 25 °C olduğu bildirilmiştir (Liu *et al.*, 2013).

4.3.1.d. PBPPO enziminin ısıl kararlılığının incelenmesi

Afinite kromatografisiyle Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO enzimi için bölüm 3.2.8.e.'de anlatıldığı gibi PBPPO'nun ısıl stabilitesinin tespiti çalışması yapılmış ve Bulunan veriler ışığında ısıl kararlılık grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.9. PBPPO enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık grafiği

Veriler incelendiğinde 0 ile 30°C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesini 1 saatlik inkübasyonun sonunda koruduğu, 40°C'de yarıya indiği 50°C'de % 35'inin kaldığı ve 60 °C'de ise tamamına yakını 1 saatlik inkübasyon sonunda bittiği bulunmuştur.

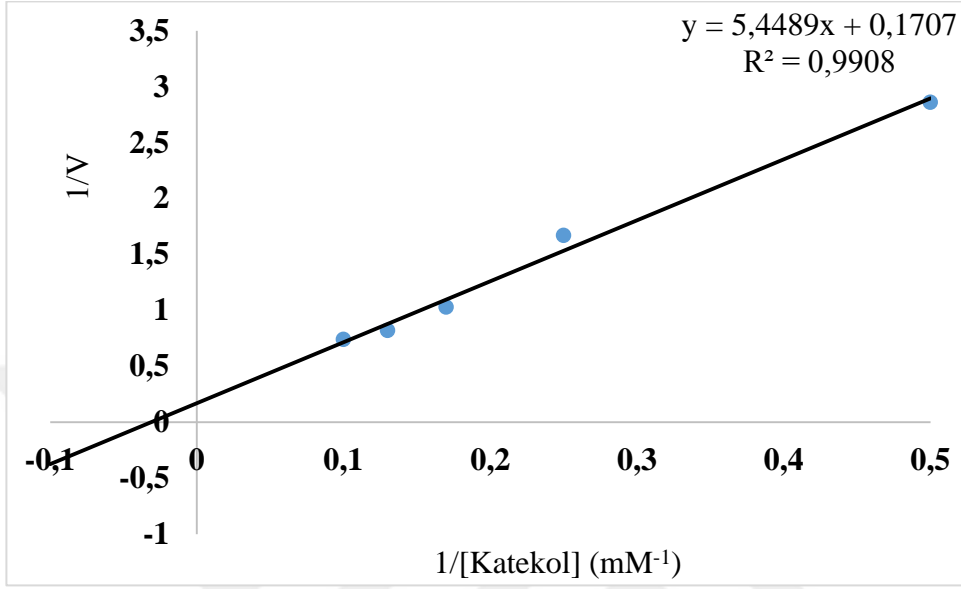
Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) meyvesinden elde edilen PPO enziminin , 40 °C'nin altında kararlı kaldığı bildirilmiştir (Tao *et al.*, 2013). Sıcaklığın L. japonica'nın (LjPPO) çiçek tohumlarının enziminin stabilitesi üzerindeki etkisi sırasıyla 20 ila 70°C sıcaklık aralığında önceden belirlenmiş bir süre boyunca (10-60 dakika) 20 mM Tris-HCl

tamponunda (pH 7,5) inkübe edilerek belirlenmiş ve kalan çözüner enzim aktivitesinin, sıcaklık 40°C'ye ulaştığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Liu *et al.*, 2013).

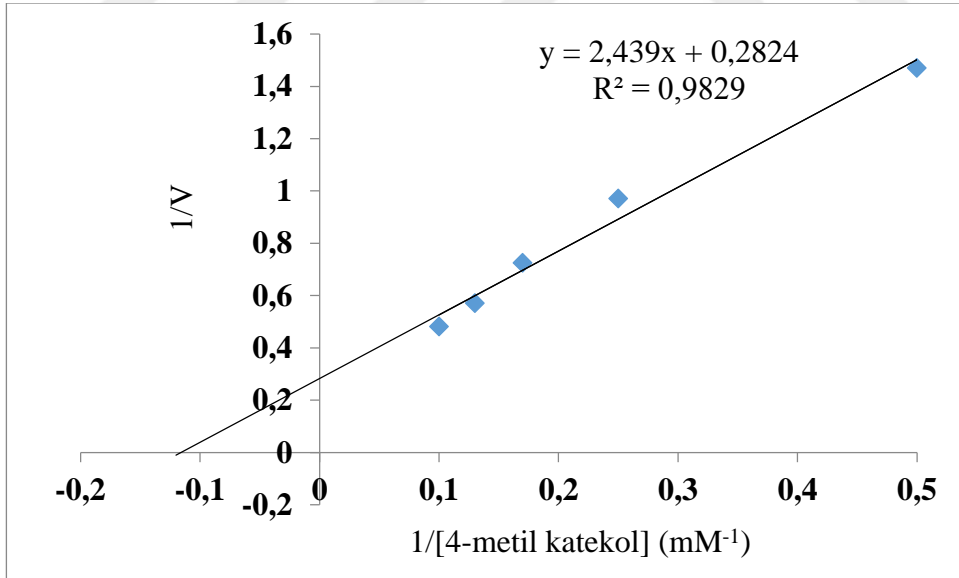
PPO'nun 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,5) içinde önceden belirlenmiş zaman periyotları (20-80 dakika) için 30-80°C'de inkübe edilmiş ve saflaştırılmış CgPPO ve özellikle 30-50°C'de belirgin termal stabilite göstermiş. Enzim, 30, 40 ve 50°C'de 80 dakika inkübasyondan sonra ilk aktivitesinin % 82'sinden fazlasını korudu belirtilmiştir. 80 dakika boyunca 60°C'de inkübasyonda bırakılmış olsa bile, aktivitenin% 70'inden fazlasını koruduğu fakat 70 ve 80°C'de maruz kaldıktan sonra aktivitesi 80 dakikanın sonunda % 57'nin altına düşmüştür (Gao *et al.*, 2011).

4.3.1.e. PBPPO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Posof Badele elmasındaki (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO enzimine olan substrat konsantrasyonlarının etkisi için bölüm 3.2.8.ç'de anlatıldığı gibi incelenmiştir ve veriler grafiklere aktarılmıştır (Şekil 4.10 ve 4.11). Grafikler incelendiğinde, PBPPO enzim aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiği ile uyduğu görülmektedir. PBPPO enziminin difenolik substratlarından olduğu bilinen 4-MK ile katekole ilişkin maksimum hız (V_{max}) Michaelis-Menten sabiti (K_M) değerleri hesaplanmıştır. Katekol için V_{max} ile K_M 'leri sırasıyla 5,86 EÜ/mL dk, 33,3 mM iken, 4-metil katekol için V_{max} ile K_M 'leri sırasıyla 3,54 EÜ/mL dk 8,53 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Katekol varlığında PBPO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği



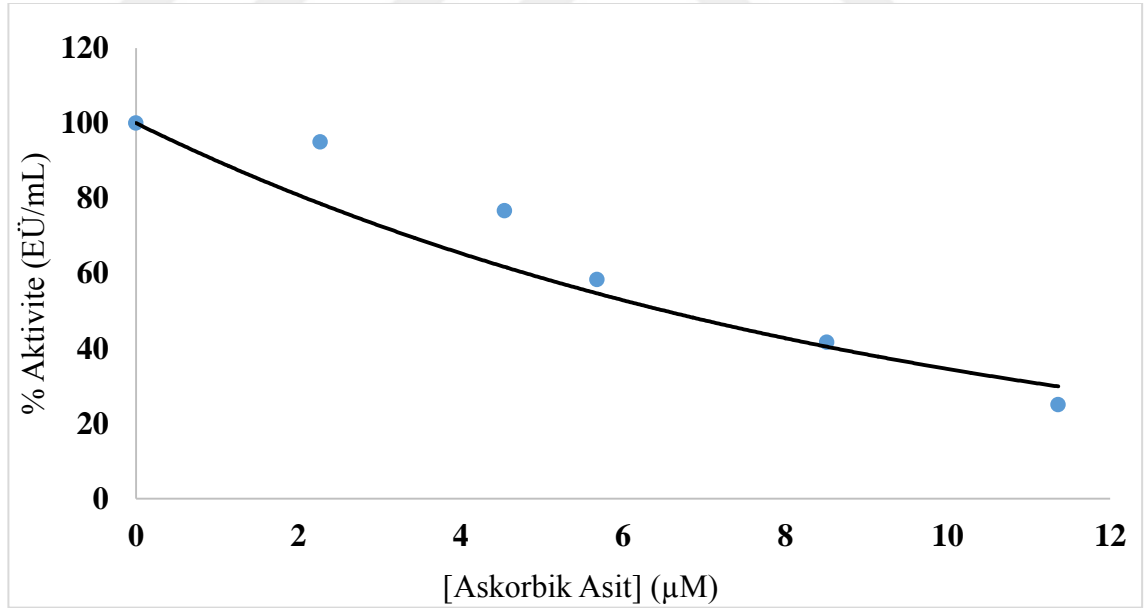
Şekil 4.11. 4-Metil katekol varlığında PBPO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

Yapılan benzer çalışmalarda PPO enzimi katekol ve 4- metil katekol varlığında K_M değerleri sırasıyla Kırmızı Kışmışi üzümünden (*Vitis Vinifera* L.) 24,21 mM ile 7,25 mM (Bağcı, 2019), semizotundan (*Portulaca oleracea*) 4,40 mM ile 6,75 mM (Gül Güven *et al.*, 2017), Amasya elmasında 34mM ile 3,1 mM (Oktay *et al.*, 1995), vanilya fasulyesinden

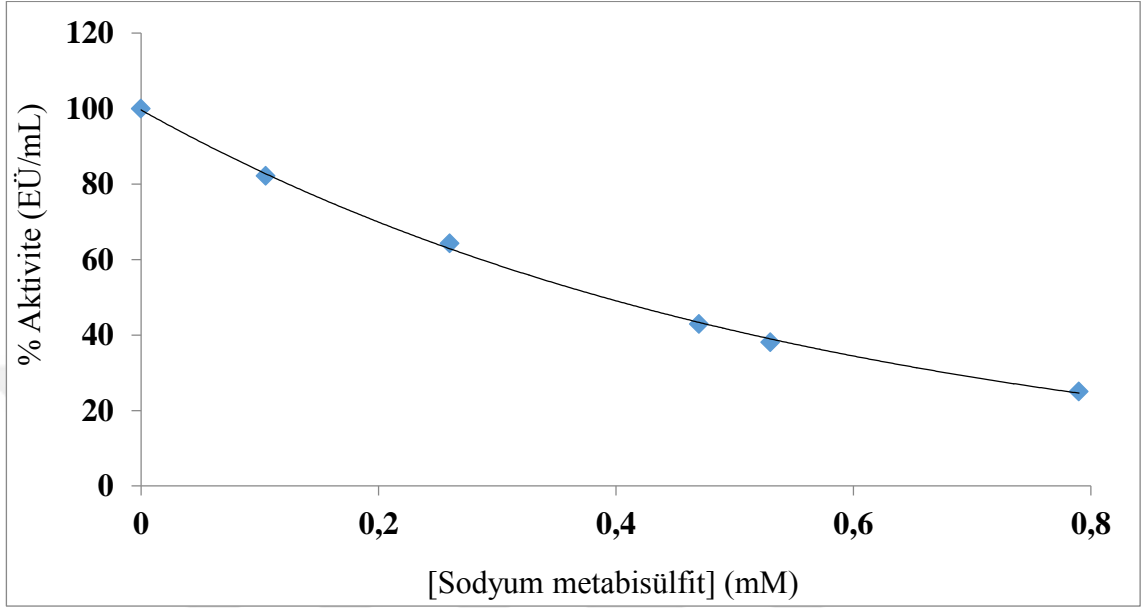
(*Vanilya planifolia*) 85mM ile 10,6 mM (Waliszewski *et al.*, 2009), Cape Bektaşı üzümünden (*Physalis peruviana* L.) $203,80 \pm 30,13$ mM ile $3,88 \pm 0,39$ mM (Bravo and Osorio, 2016), maruldan (*Lactuca sativa var. capitata* L.) $3,20 \pm 0,01$ mM ile $1,00 \pm 0,09$ mM (Dziki *et al.*, 2008), arap kızı elmasından (*Malus domestica*) 50 mM ile 2 mM (Millioğlu, 2019) olduğu bildirilmiştir.

4.3.1.f. PBPPO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

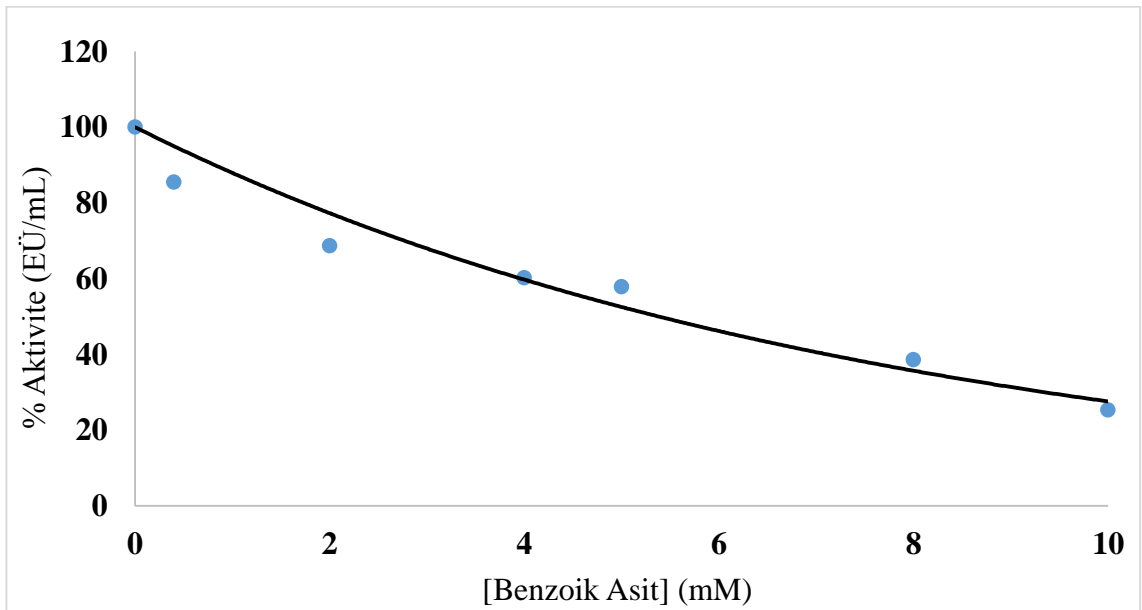
Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO enzimi için bölüm 3.2.8.f'de anlatıldığı gibi inhibitör etkisi incelenmiştir. Ayrı ayrı inhibitörler için % aktiviteye bağlı konsantrasyon grafikleri ve I_{50} değerleri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda I_{50} değerlerine bakılarak en iyi inhibitörün sodyum metabisülfid olduğu tespit edilmiştir.



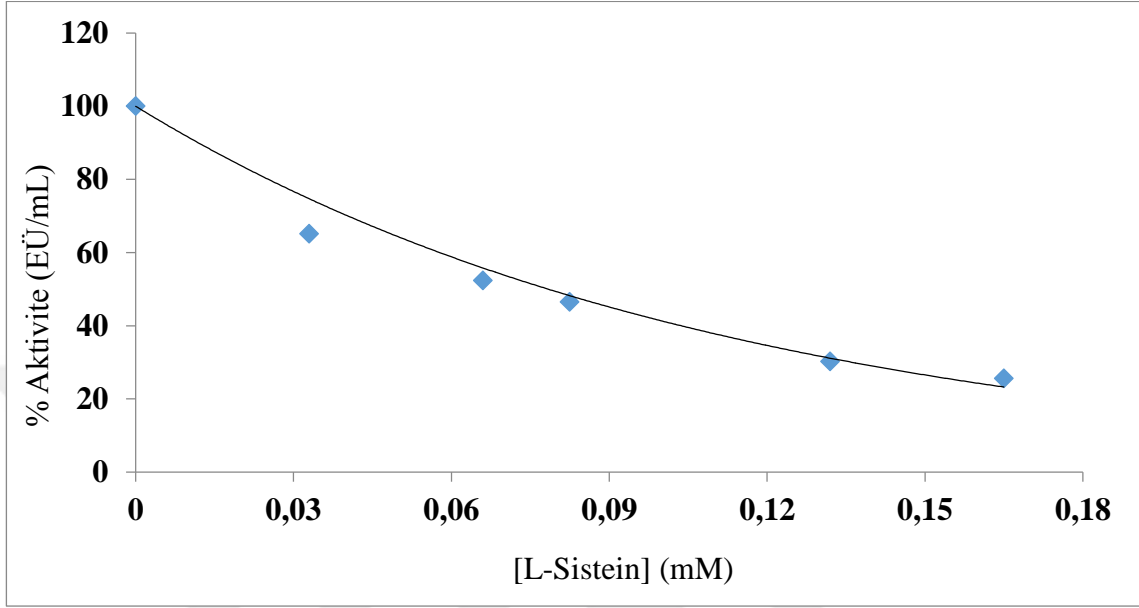
Şekil 4.12. PBPPO enzim aktivitesi üzerine askorbik asitinin etkisini gösteren % aktivite(EÜ/mL) grafiği



Şekil 4.13. PBPPO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfittin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.14. PBPPO enzim aktivitesi üzerine benzoik asittin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.15. PBPPO enzim aktivitesi üzerine L-sistein etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 4.2. PBPPO'sunun aktivitesi üzerine dört farklı inhibitörle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen I_{50} değerleri

İnhibitör	I_{50} (mM)
Askorbik asit	0,0065
Benzoik asit	5,373
L-sistein	0,078
Sodyum metabisülfid	0,390

PBPPO enzimi için bölüm 3.2.8.g'de anlatıldığı gibi farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunmuş ve veriler grafiğe aktarılmıştır. Spesifik bir inhibitör ile enzimatik esmerleşmenin önlenmesi, tek bir mekanizmayı içerebilir veya iki veya daha fazla inhibitör etki mekanizmasının etkileşiminin bir sonucu olabilir.

Dönüşümlü inhibisyonun; Yarışmalı (competitive) inhibisyon, yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon, yarı yarışmalı (noncompetitive) ve karışık yarışmalı (mixed

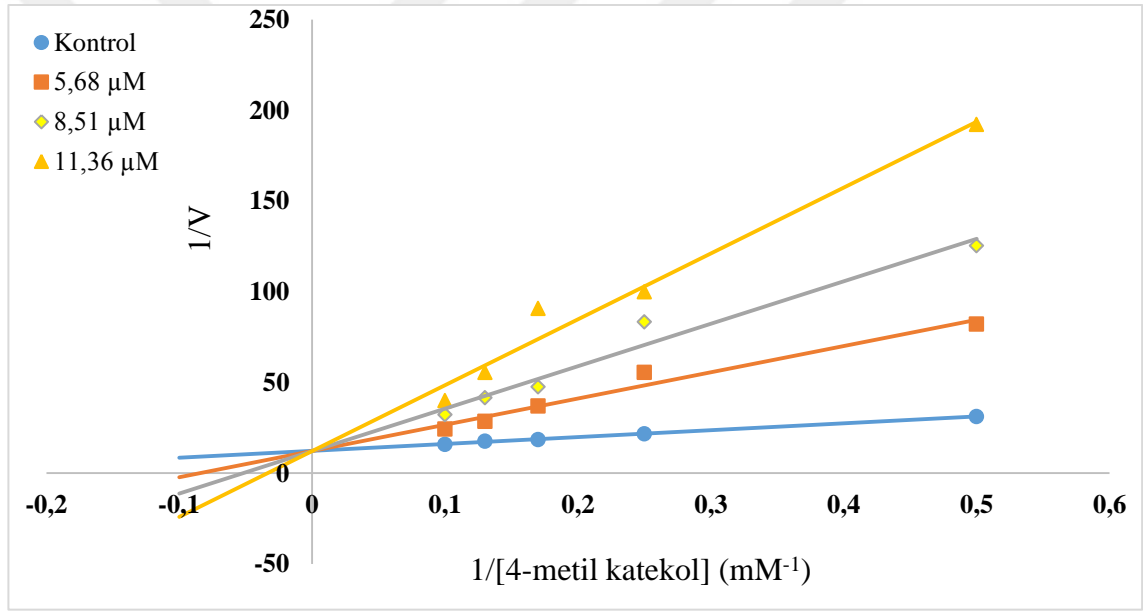
noncompetitive)inhibisyon olmak üzere dört türü inhibisyon türü olduğu bildirilmiştir (Ziyan, 1998).

Yarışmalı inhibisyon için

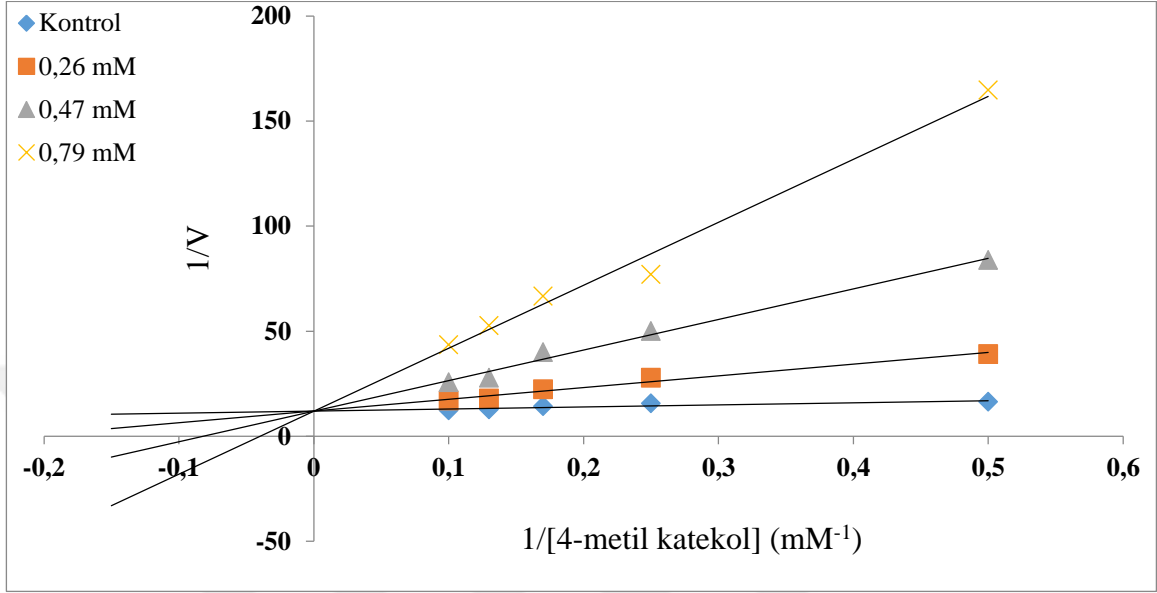
Yarışmasız inhibisyon için

$$K^I_M = K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

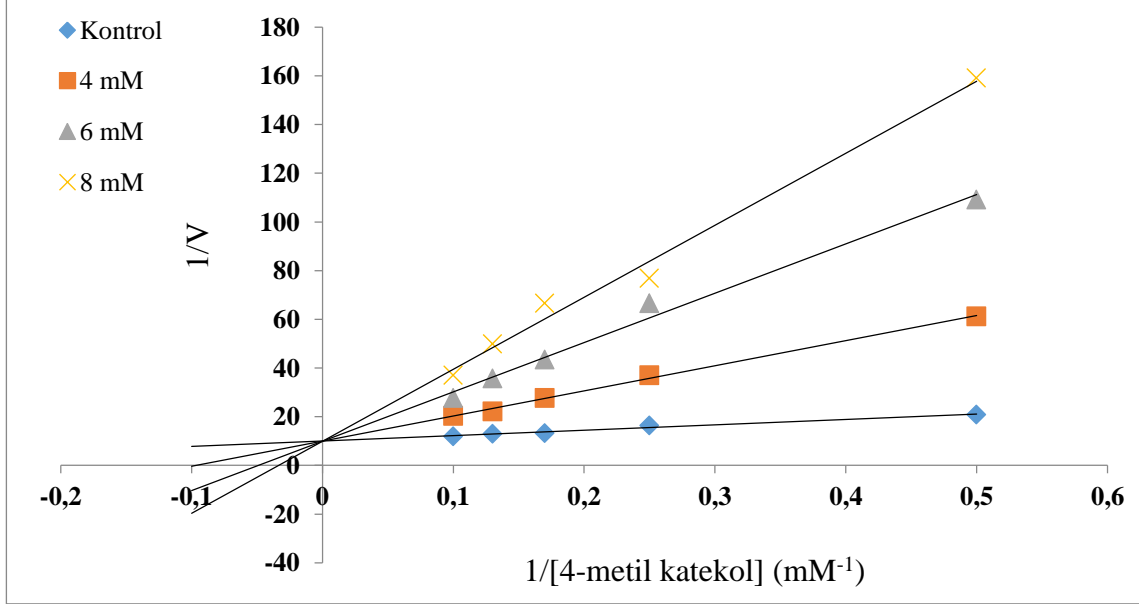
$$V^I_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (4.1)$$



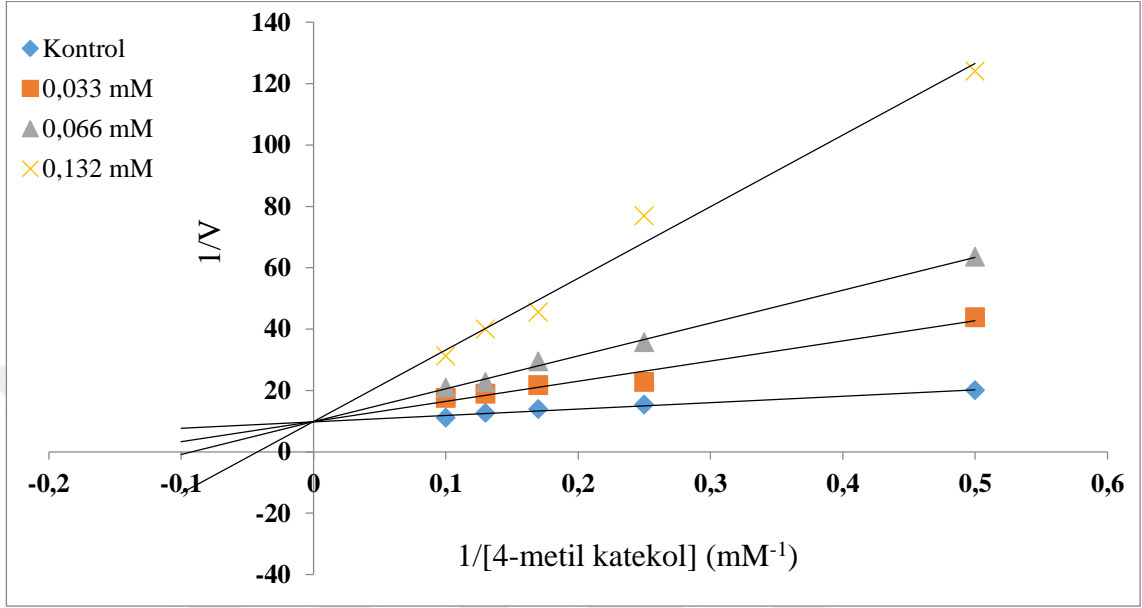
Şekil 4.16. PBPO enzim aktivitesi üzerine askorbik asittin inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.17. PBPPO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfittin inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.18. PBPPO enzim aktivitesi üzerine benzoik asittin inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.19. PBPPO enzim aktivitesi üzerine L-sisteinnin inhibisyon türünü gösteren grafik

Birçok madde, enzimin substrat ve / veya turnover sayısına bağlanmasını etkileyecek şekilde enzim ile birleştirilerek bir enzimin aktivitesini değiştirebilir. Bir enzimin aktivitesini bu şekilde azaltan maddeler, inhibitör olarak bilinir. Birçok inhibitör, enzimlerinin substratını yapısal olarak andıran ancak substrat ile karşılaştırıldığında çok yavaş reaksiyona giren veya reaksiyona girmeyen maddelerdir. Bu tür inhibitörler, enzim katalitik mekanizmasını açıklamaya yönelik bir çabanın bir parçası olarak bir substrat bağlama bölgesinin kimyasal ve konformasyonel doğasını araştırmak için yaygın olarak kullanılır (Doğan *et al.*, 2005).

Sebzelerin enzimatik esmerleşmesi, oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktiflerin uzaklaştırılması veya PPO inhibitörleri kullanılarak eritilebilir veya elimine edilebilir. İşlem sırasında oksijenin sebzelerden tamamen uzaklaştırılması zordur çünkü oksijen her yerde bulunmaktadır (Rudsari *et al.*, 1981). Yaptığımız bu çalışmada, askorbik asit, benzoik asit, l-sistein ve sodyum metabisüfit inhibisyon çalışmasında kullanılmış ve I_{50} değerleri sırasıyla Çizelge 4.2.'de gösterildiği gibi 0,0065 mM, 5,373 mM, 0,078 mM ve 0,390 mM bulunmuştur. Substrat olarak 4-metil katekol'den faydalanılmıştır.

Esmerleşmenin önlenmesi; PPO'nun inaktivasyonu, reaksiyon için substratlardan birinin (O_2 , polifenoller) ortadan kaldırılması ve ikincil reaksiyonlarda renkli ürünlerin oluşumunu engellemek için enzim faaliyetinin reaksiyon ürünleri üzerindeki inhibitör etkisinin sonucu olabilmektedir (Augustin *et al.*, 1985).

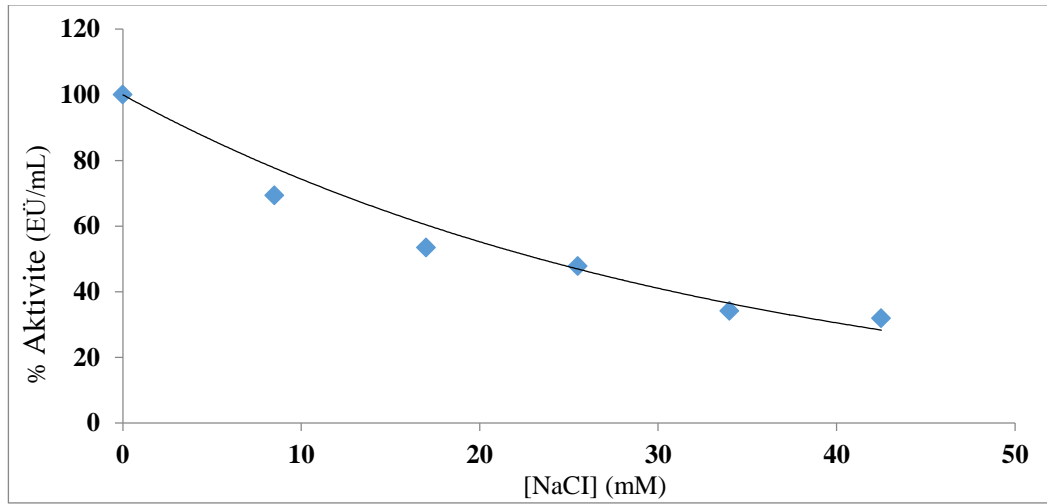
Yapılan inhibisyon çalışmalarında benzoik asit enginar'da (*Cynara scolymus* L.) inhibe edici etki göstermezken l-sistein ile yarışmalı ve askorbik asit ile yarışmasız tip inhibisyon K_i ve I_{50} değerleri l-sistein ve askorbik asit için sırasıyla K_i ; 1.1×10^{-4} M, $8,6 \times 10^{-4}$ M I_{50} ; $1,25 \times 10^{-4}$, $3,57 \times 10^{-4}$ M şeklinde gözlemlenmiştir (Doğan *et al.*, 2005). Duttan (*Morus alba* L.) yapılan çalışmada l-sistein yarışmalı tip inhibisyon ve K_i 'sinin 0,035 M I_{50} ' si ise $6,25 \times 10^{-5}$ M olduğu bildirildi (Arslan *et al.*, 2004), tortum elmasından (*Malus sylvestris.*) yapılan çalışmada askorbik asit yarışmalı tip inhibisyon ve K_i 'si $0,042 \pm 0,002$ mM I_{50} 'sinin 0,494 mM inhibitör etki gösterdiği (Karabulut, 2017), bir yabancı yenilebilir mantardan (*Macrolepiota mastoidea*) yapılan çalışmalarda askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit için I_{50} ' sis sırasıyla 0,04 mM, 0,47 mM ve 0,84 mM olarak hesaplandığı (Kolcuoğlu *et al.*, 2007), Trabzon hurmasından (*Diospyros kaki* L., *Ebenaceae*), yapılan çalışmalarda askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit için sırasıyla K_i ; 0,01 mM, 0,04 mM, 2 mM I_{50} ; 0,031 mM, 0,038 mM , 5 mM olduğu (Özen *et al.*, 2004), Iğdır'ın kırmızı kişmiş üzümünden (*Vitis vinifera* L.) yapılan çalışmalarda askorbik asit ve benzoik asit in yarışmalı sodyum metabisülfidin ise yarışmasız tip inhibisyon gösterdiği askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit için sırasıyla K_i ; 0,0021 mM, 0,525 mM, 0,847 mM I_{50} ; 0,0086 mM, 0,286 mM, 7,75 mM oldukları (Bağcı, 2019), çay yaprağından (*Camellia sinensis*) yapılan bir çalışmada Askorbik asitin yarışmalı Sodyum metabisülfidin ise yarışmasız tip inhibisyona sahip olduğu ve bunların K_i ve I_{50} değerleri sırasıyla K_i ; $32,67 \pm 0,016$ μ M, $19,30 \pm 0,005$ μ M, ve I_{50} ; 69,31 μ M, 21,65 μ M oldukları (Öztürk *et al.*, 2019) bildirilmiştir.

Çizelge 4.3. PBPPO'su üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal maddelerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

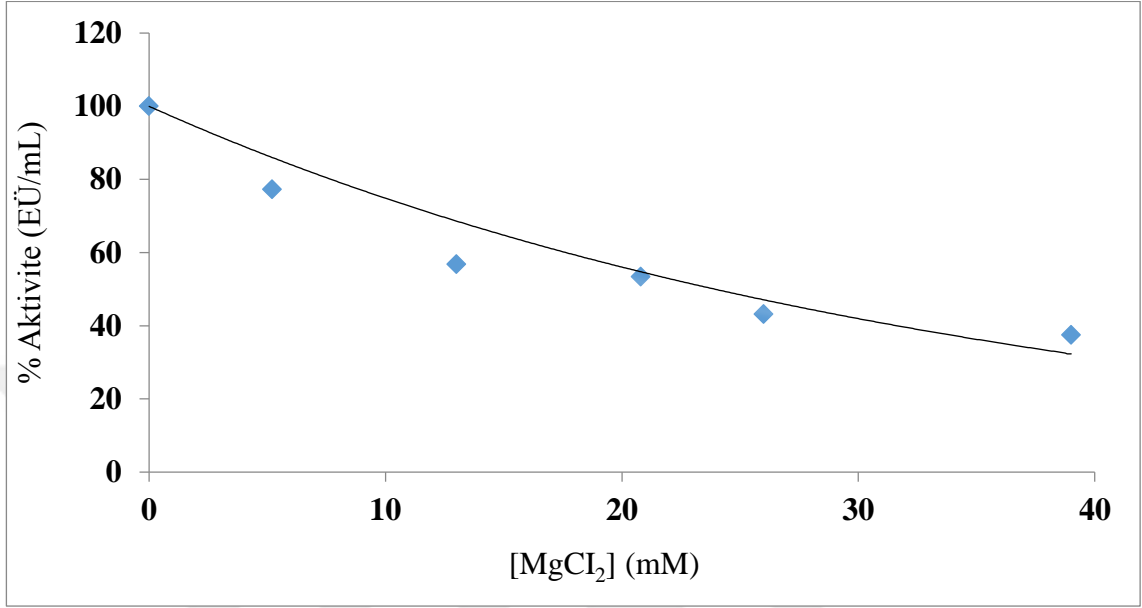
İnhibitör	I_{50} (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Türü
Askorbik Asit	0,00654	$0,00167 \pm 0,00035$	Yarışmalı
Benzoik asit	5,37	$0,82 \pm 0,29$	Yarışmalı
Sodyum Metabisülfıt	0,39	$0,04 \pm 0,014$	Yarışmalı
L-sistein	0,078	$0,014 \pm 0,002$	Yarışmalı

4.3.1.g. PBPPO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar

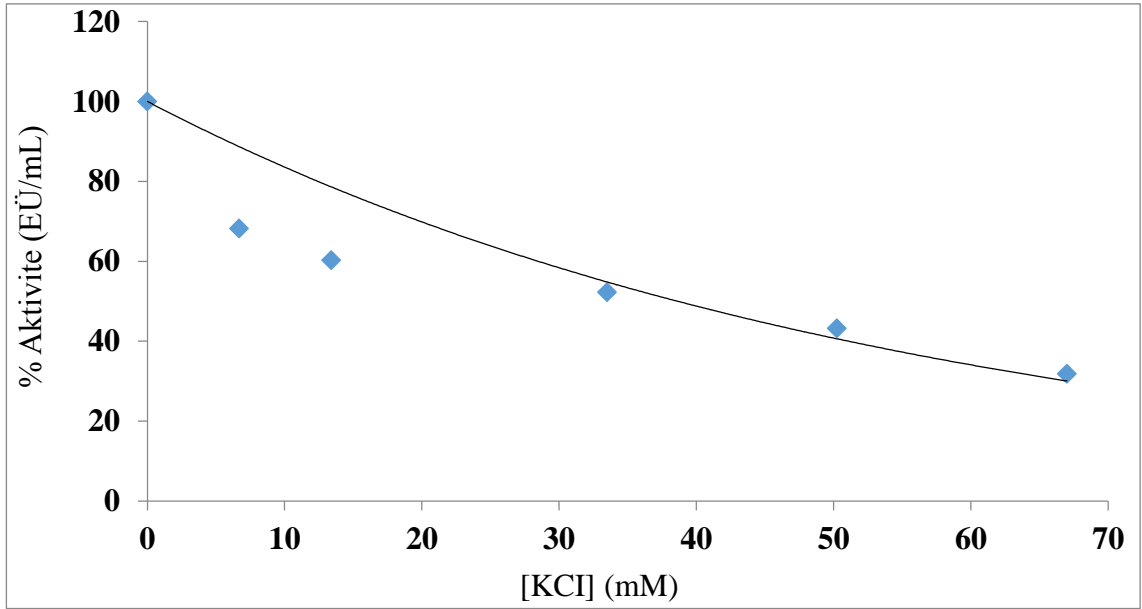
Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan PBPPO enzimi için bölüm 3.2.8.g.'de anlatıldığı gibi aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelenmiş ve elde edilen veriler çizelgeye aktarılarak sonuçlar verilmiştir. K_i sabiti ve inhibisyon çeşidini tespit etmek için Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanıldı. Bu grafikler ve denklemler yardımıyla K_i sabitleri ve inhibisyon türü hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).



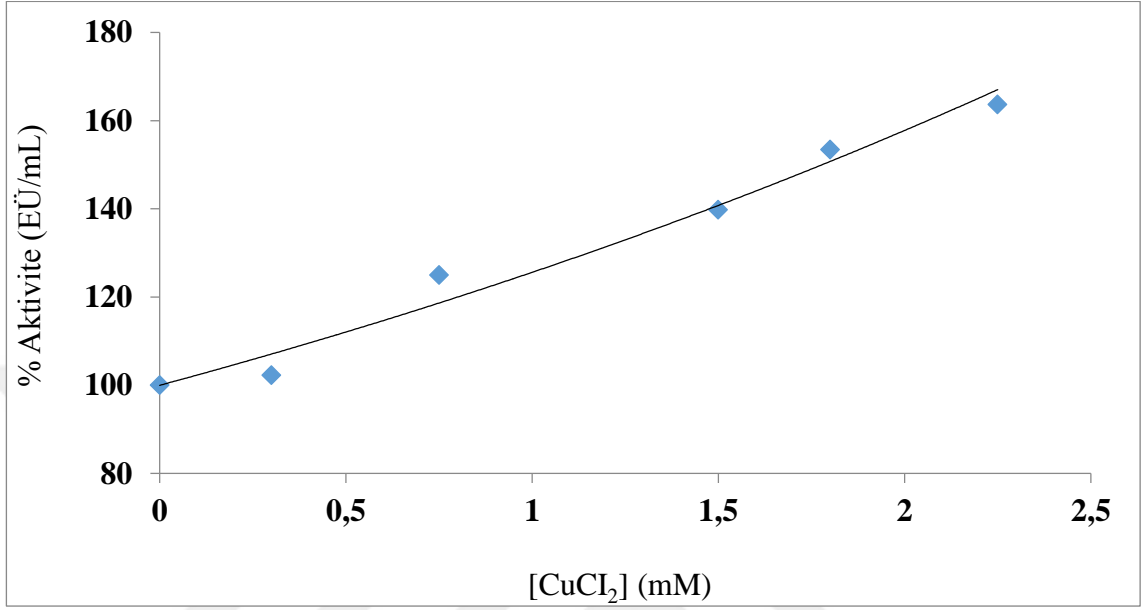
Şekil 4.20. PBPPO enzim aktivitesi üzerine NaCl etkisini gösteren % aktivite(EÜ/ml) grafiği



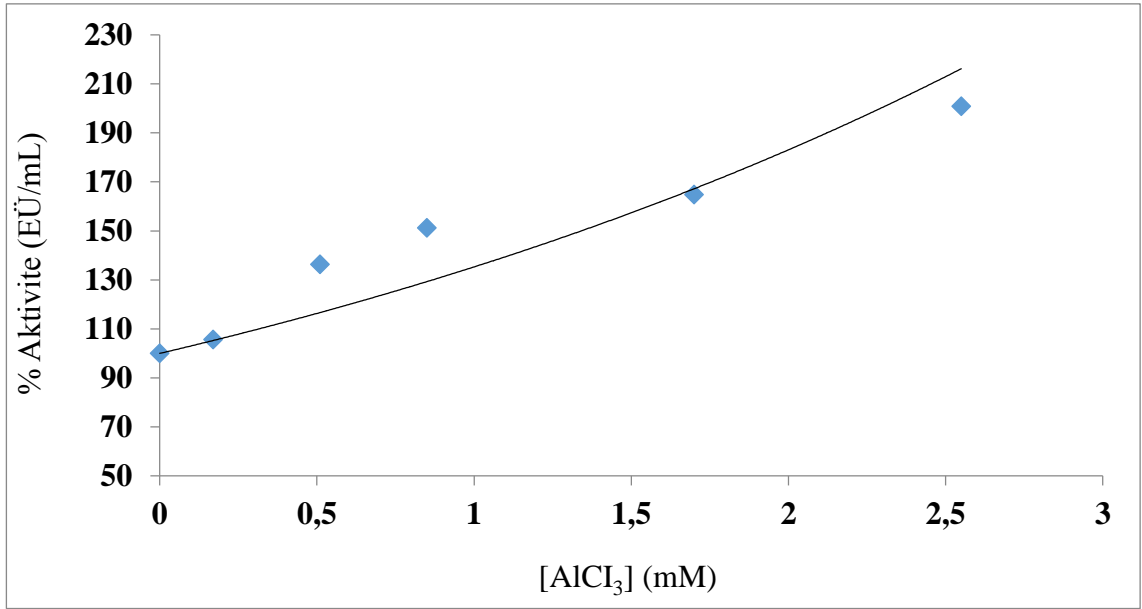
Şekil 4.21. PBPPO enzim aktivitesi üzerine MgCl₂ etkisini gösteren % aktivite(EÜ/ml) grafiği



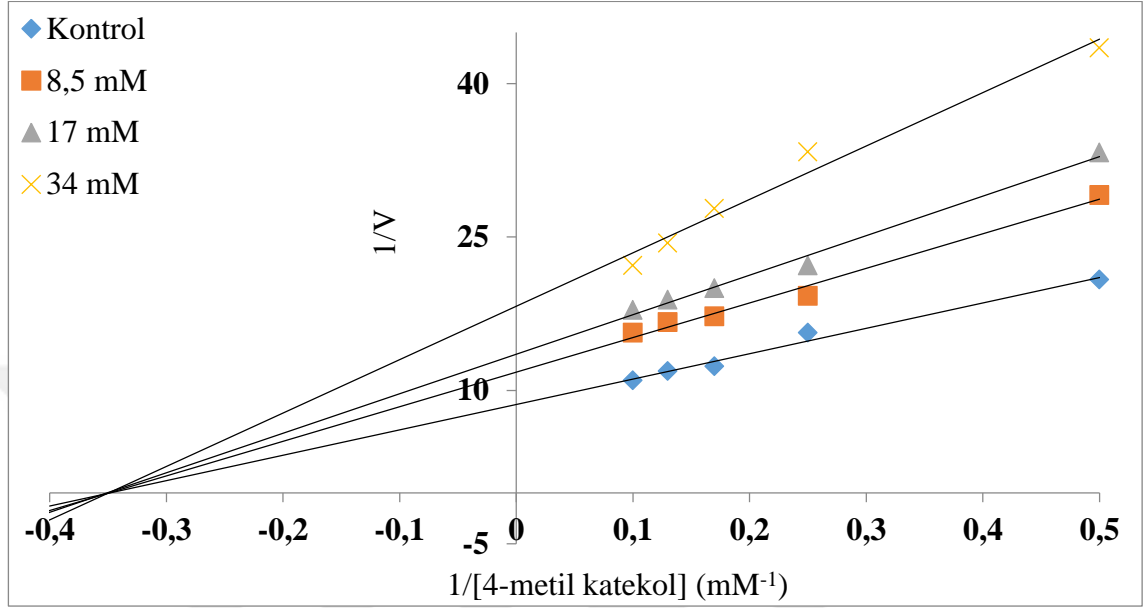
Şekil 4.22. PBPPO enzim aktivitesi üzerine KCl etkisini gösteren % aktivite(EÜ/ml) grafiği



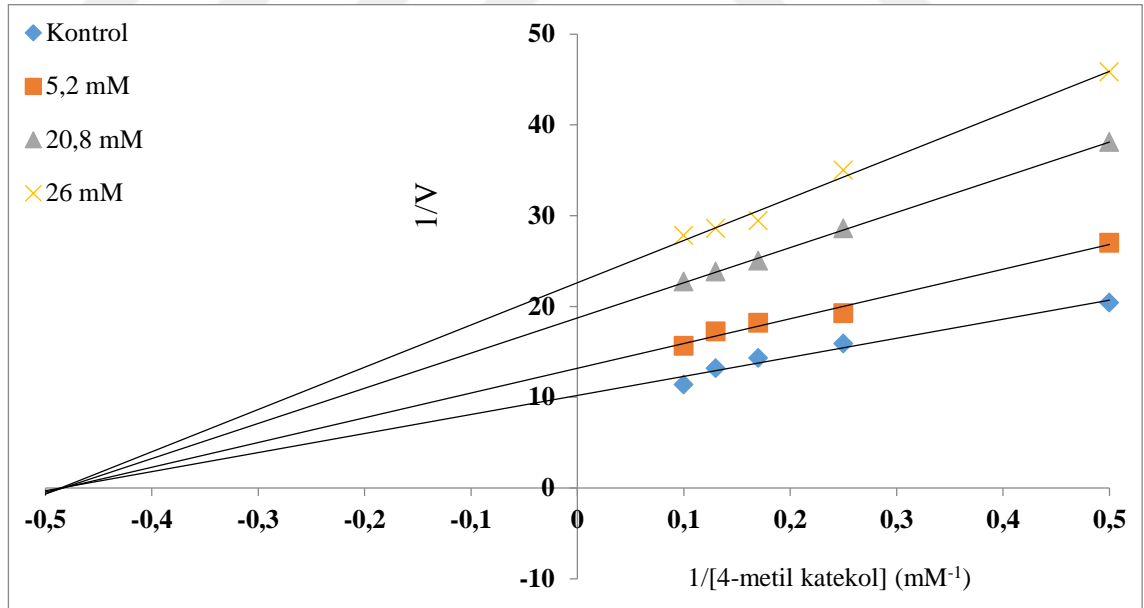
Şekil 4.23. PBPPO enzim aktivitesi üzerine CuCl₂ etkisini gösteren % aktivite(EÜ/ml) grafiği



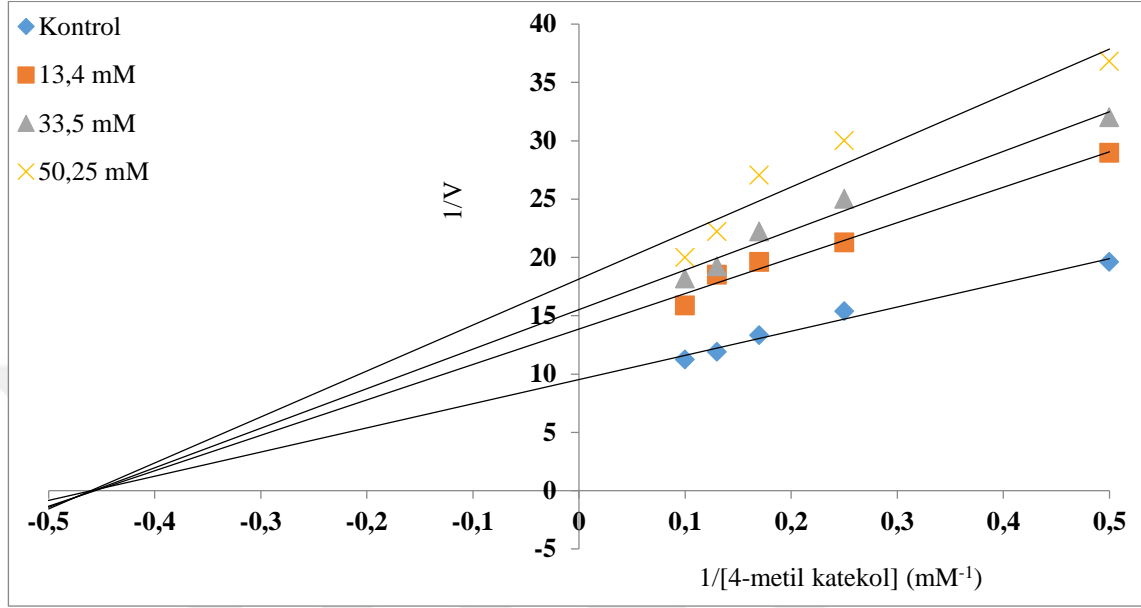
Şekil 4.24. PBPPO enzim aktivitesi üzerine AlCl₃ etkisini gösteren % aktivite(EÜ/ml) grafiği



Şekil 4.25. PBPPO enzim aktivitesi üzerine NaCl'nin inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.26. PBPPO enzim aktivitesi üzerine MgCl₂'ün inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.27. PBPPO enzim aktivitesi üzerine KCl'nin inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.4. PBPPO enzimi için bulunan I_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Metal iyon	I_{50}	Ortalama K_i	İnhibisyon türü
Na^+	23,10 mM	0,071±0,15 mM	Yarışmasız
Mg^{2+}	23,90 mM	21,18±3,27 mM	Yarışmasız
K^+	38,50 mM	45,56±14,30 mM	Yarışmasız
Cu^{2+}	Aktivasyon	-	-
Al^{3+}	Aktivasyon	-	-

Yapılan metal iyonları çalışmasında, yenilebilir yabani bir mantarda (*Macrolepiota mastoidea*) Cu^{2+} 'nin neredeyse PPO enzimini tamamen inhibe ettiği bunun yanında Al^{3+} ile K^+ 'nin da inhibisyona etki ettiği bildirilmiştir (Kolcuoğlu *et al.*, 2007). Metal iyonları, Lewis asitleri gibi koordinasyon bileşiklerinde ve potansiyellerindeki farklı koordinasyon sayılarına ve geometrilere sahip olabileceğinden metal iyonları ligandlar olarak proteinlere karşı farklı davranabilir. Bu farklılıklar ayrıca farklı bölgelere metal bağlanmasına neden olabilir ve bu nedenle enzim yapısını farklı şekillerde bozarlar. (Bock *et al.*, 1999; Di Tusa *et al.*, 2001; Kolcuoğlu *et al.*, 2007).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tüketicilerin taleplerini karşılamak amacıyla birçok farklı ürün değiştirilmiş içerikleriyle piyasaya sürülmektedir. Bu inovatif ürünler özellikle içeriklerindeki fenolikleriyle, antosiyaninleriyle ve yüksek besleyici değerleriyle tüketicileri cezptmektedir. Tüketicilerin günümüzdeki satın alma eğilimlerini öncelikle ürünün popülaritesi ardından rengi ve kokusu takip edilmektedir. İçi dışı kırmızı olan Posof Badele elmasının (*Malus domestica* L.) yurt içindeki ekonomik önemi henüz yeteri kadar bilinmemektedir. Fakat yurt dışında Posof Badele elmasına (*Malus domestica* L.) benzer farklı elma çeşitlerinin ekonomik ve besinsel değerlerinin önemi kavranmış olmalı ki bu elmalara yönelik farklı ürünler piyasaya sunulmuştur.

İnsanların beklentilerini karşılayabilmek için üretimi ve pazarlaması yapılacak ürünlerin özelliklerinin bilinmesi çok büyük önem arz etmektedir. Yaptığımız bu çalışmada esmerleşmeden kaynaklanan ürünün duyuusal ve besinsel kalite özelliklerinde kayba yol açan Posof Badele elmasındaki (*Malus domestica* L.) polifenol oksidaz enziminin özellikleri belirlenmiştir.

Ardahan'ın Posof ilçesinin kurtkale havzasından temin edilen içi dışı kırmızı olan elmadan PBPPPO enzimini saflaştırmak için, elmanın kabuğu soyulup ve çekirdekleri çıkartıldıktan sonra ham enzim özütü çözültüsüyle ekstrakte edilip sonra soğuk asetonla çöktürölüp afinite kromotografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırdığımız enzimin saflık derecesini kontrol etmek için SDS-PAGE yapılmış proteinin moleküler ağırlığı 19,95 kDa olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimden önce substratlarının V_{max} ve K_M 'lerini tespit etmek için katekol ve 4-MK substratlarından 5 farklı konsantrasyonda ölçümler yapıldı. Substratların V_{max} ve K_M 'leri kıyaslandığında sırası ile 500 nm'de 4-MK'nın 3,54 EU/mLdk, 8,53 mM katekolün ise 5,86 EU/mLdk, 33,3 mM değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra 4-MK substrat olarak alınıp yapılan çalışmalarda saflaştırılan PPO'nun optimum pH'sı 5,5; optimum iyonik şiddet Na-asetat tamponuyla 10 mM, stabil pH 5,5 ve optimum sıcaklığının 10°C olduğu belirlenmiştir. Bradford metotlarıyla protein tayinleri yapılmıştır. Meyve suyu teknolojisinde en çok kullanılan

inhibitörlerin ve bitkilerde sık karşılaşılan bazı metal iyonlarıyla enzim aktivitesine olan etkisi, inhibisyon türleri, I_{50} ve K_i değerleri her bir değişken için ayrı ayrı incelenmiştir. Al^{3+} ve Cu^{2+} metal iyonlarının enzimi aktive ettikleri tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar Çizelge 5.1.'de toplu bir biçimde gösterilmektedir.

Çizelge 5.1. PBPPO enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, I_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Karakterizasyon sonuçları	Molekül ağırlığı	19,95 kDa		
	Optimum sıcaklık	10°C		
	Optimum pH	5,5		
	Optimum iyonik şiddet	0,01 M		
	Stabil pH	5,5		
	Stabil sıcaklık	0-30°C arası		
K_m- V_{max}	4-Metil katekol	K_M(mM) 8,53	V_{max}(EÜ/mLdk) 3,54	
	Katekol	33,3	5,86	
İnhibisyon sonuçları		I_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon türü
	Askorbik asit	0,00654	0,00167 ± 0,00035	Yarışmalı
	Benzoik asit	5,37	0,82 ± 0,29	Yarışmalı
	L-sistein	0,39	0,04 ± 0,014	Yarışmalı
	Sodyum metabisülfid	0,078	0,014 ± 0,002	Yarışmalı
	Na^+	23,10	0,071±0,15	Yarışmasız
	Mg^{2+}	23,90	21,18±3,27	Yarışmasız
	K^+	38,50	45,56±14,30	Yarışmasız
Cu^{2+}	Aktivasyon	-	-	
Al^{3+}	Aktivasyon	-	-	

Yaptığımız bu çalışma sonucunda Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) PBPPO enzimi saflaştırılmış karakterize edilmiş ve inhibitörü olabileceği düşünülen bazı inhibitörler tarafından inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan literatür taraması neticesinde Posof Badele elması (*Malus domestica* L.) hakkında daha fazla bilgi sahibi olabilme adına bu çalışma yapılmış ancak bu elma türünün yurtdışında benzer türleri göze

alındığında daha çok bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. HPLC veya LC-MS tekniği gibi tekniklerle elmanın içerik analizi yapılması veya daha fazla özelliklerinin tespit edilmesi adına antioksidan yöntemler ile özelliklerinin belirlenmesi bu elmanın daha iyi anlaşılması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Özellikle ticari değeri göz önünde bulundurulduğunda Ardahan ilinin ekonomisine de katkı yapabileme potansiyeline sahip bu elma türünün hem üretimini arttırılması hem de tanınılırlığının arttırılması son derece önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abacı, Z.T., Sevindik, E., 2014. Ardahan Bölgesinde Yetiştirilen Elma Çeşitlerinin Biyoaktif Bileşiklerinin ve Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2), 175- 184.
- Anonim (2013a). <http://www.tuik.gov.tr/> (Erişim Tarihi: 15.07.2013).
- Anonim (2013b). Ardahan Tarım İl Müdürlüğü. <http://www.ardahantarim.gov.tr/> (Erişim Tarihi:16. 06. 2013).
- Arslan, O., Erzen, M., Sinan, S., Ozensoy, O., 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88, 479-484.
- ATSO, 2018. Ardahan Ticaret ve Sanayi Odası. <http://www.ardahantso.org.tr/Odam%C4%B1zdanHaberler/tabid/3218/articleType/ArticleView/articleId/26459/ATSODAN-POSOF-BADELE-ELMASI-COGRAFI-ISARETI-TANITIMI.aspx>. Erişim Tarihi (20.12.2018).
- Augustin, M. A., Ghazali, H. M., Hashim, H., 1985. Polyphenoloxidase from guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(12), 1259-1265.
- Aydın, B., Gulcin, I., Alwasel, S. H., 2015. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Hemşin apple (*Malus communis* L.). *International journal of food properties*, 18(12), 2735-2745.
- Bağcı, O., 2019. *Polifenol Oksidaz Enziminin Iğdır Kırmızı Kışmış Üzümünden (vitis vinifera L.) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve İnhibisyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Iğdır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Iğdır.103.

- Bayrak, S., Öztürk, C., Demir, Y., Alım, Z., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2019. Purification of Polyphenol Oxidase from Potato and Investigation of the Inhibitory Effects of Phenolic Acids on Enzyme Activity. *Protein and peptide letters*.
- Benaceur, F., Chaibi, R., Berrabah, F., Neifar, A., Gouzi, H., Benaceur, K., Gargouri, A., 2019a. Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from Truffles (*Terfezia arenaria*). *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Benaceur, F., Gouzi, H., Meddah, B., Neifar, A., Guergouri, A., 2019b. Purification and characterization of catechol oxidase from Tadelá (*Phoenix dactylifera* L.) date fruit. *International journal of biological macromolecules*, 125, 1248-1256.
- Bock, W.C., Katz, A.G., Markham, G.D., Glusker, J.P., 1999. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions. *Journal of the American Chemistry Society*, 121, 7360-7372.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-250.
- Bravo, K., Osorio, E., 2016. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food chemistry*, 197, 185-190.
- Buchter-Weisbrodt, H., 2003. Roter Apfelsaft ohne Fruchtbeimischung. *Rot im Trend: Sichtbar gesund*, Flüss, Obst, 70, 78-79.
- Cerrahoğlu, E. ve Arabacı, G., 2016. Eflatun çiçekli ballıbabası (*lamium purpureum*) polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve inhibisyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 20(2). 245-250.
- Cheema, S., Sommerhalter, M., 2015. Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food chemistry*, 171, 382-387.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., Lee, C. Y., 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables

- in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(10), 1715-1724.
- Çolak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis Roem.*) fruits at early stage of maturation, *Food Chemistry*, 90, 801-807.
- Dedeoğlu, N., 2009. *Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 164.
- Demir, Ö., 2006. *Musmula (mespilus germanica L.) Meyvelerinin Olgunlaşması Sirasındaki Polifenol Oksidazın Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 46.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., Mc Call, K.A., Fierke, C.A., Toone, E. J., 2001. Thermodynamics of metal ion binding: 1. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 40, 5338-5344.
- Dogan, M., Dogan, S., 2003. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii*). *Journal food chemistry*, 39, 1-9.
- Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O., 2005. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 776-785.
- Dziubiak, M., 2004. Collection of the genus Malus Mill. In the botanical garden of the polish Academy of sciences in Warsaw. *Journal of fruit and ornamental plant research*. 12: 121-128.
- Eisenthal, R., Danson, M.J., 1992. *Enzyme Assays*. Oxford University Press, New York, USA, 351.

- Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O. I., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp.* **Food Chemistry**, 95(3), 503-508.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1996. Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. **Journal of food science**, 61(6), 1177-1182.
- Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Garcia-Ruiz, P.A., Varon, R., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., 2001. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1548, 1-22.
- Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, P.A., Varon, R., Garcia-Canovas, F., 2000. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. **European Journal of Biochemistry**, 267, 5865-5878.
- Ferrari, C.K.B., Percário, S., Silva, J.C.C.B., Torres, E.A.F.S., 2016. An apple plus a brazil nut a day keeps the doctors away: antioxidant capacity of foods and their health benefits. **Current pharmaceutical design**, 22(2), 189-195.
- Février, H., Le Quéré, J. M., Le Bail, G., Guyot, S., 2017. Polyphenol profile, PPO activity and pH variation in relation to colour changes in a series of red-fleshed apple juices. **LWT-Food Science and Technology**, 85, 353-362.
- Flurkey, W. H., 1986. Polyphenoloxidase in higher plants: immunological detection and analysis of in vitro translation products. **Plant physiology**, 81(2), 614-618.
- Gao, Z. J., Liu, J. B., Xiao, X. G. 2011. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from leaves of *Cleome gynandra* L. **Food chemistry**, 129(3), 1012-1018.
- Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., Świeca, M. 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). **Food Chemistry**, 107(1), 129-135.

- Guerrero-Beltrán, J. A., Swanson, B. G., Barbosa-Cánovas, G. V., 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *Food Science and Technology*, 38(6), 625-630.
- Gul Guven, R., Guven, K., Matpan Bekler, F., Acer, O., Alkan, H., Dogru, M., 2017. Purification and characterization of polyphenol oxidase from purslane. *Food Science and Technology*, 37(3), 356-362.
- Güller, U., 2014. *Mitokondrial Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 81.
- Güngör, K., 2008. *Çağla badem (prunus dulcis) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 91.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J., Xue, S., 2009. The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 117(1), 143-151.
- Han, Q. Y., Liu, F., Li, M., Wang, K. L., Ni, Y. Y., 2019. Comparison of biochemical properties of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Food chemistry*, 289, 657-663.
- Harborne, J.B., 1964. Biochemistry of phenolic compounds. *Academic Press*, N.Y, 15-22.
- Jaenicke, L., 1984. Protein Bestimmung. *Einführung in the Praxis des Biochemikers*, Köln, 27.
- Karabulut, Ş., 2017. *Tortum Elmasından (Malus sylvestris.) Polifenol Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 71.

- Kargi, F., 2009. Generalized rate equation for single-substrate enzyme catalyzed reactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 157-159.
- Kolcuoğlu, Y., 2012. Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentata*). *Process Biochemistry*, 47, 2449-2454.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), *Food Chemistry*, 101, 778-785.
- Kolcuoğlu, Y., Kuyumcu, I., Colak, A., 2018. A catecholase from *Laccaria laccata* a wild edible mushroom and its catalytic efficiency in organic media. *Journal of food biochemistry*, 42(5), e12605.
- Kuyumcu, İ., 2014. *Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan lactarius eucalypti o. K. Mill & r. N. Hilton' dan Polifenol Oksidazin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 72.
- Laemelli, D. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227-680.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of American Chemical Society*. 56, 658-661.
- Liu, N. N., Liu, W., Wang, D. J., Zhou, Y. B., Lin, X. J., Wang, X., Li, S. B., 2013. Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Food chemistry*, 138(1), 478-483.
- Loey, A.V., Indrawati, Smout, C., Hendrickx, M., 2002. Inactivation of enzymes: From experimental design to kinetic modeling. *In Handbook of food enzymology*, CRC Press, 64-73.

- Loomis, W. D., 1968. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. *Methods Enzymology*, 13, 555.
- Marshall, M. R., Kim, J., Wei, C. I. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. *FAO*, Rome, 49.
- Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*, 18, 193-214.
- Millioğlu, Ö., 2019. *Arap Kızı yerel elma (Malus domestica) çeşidinde polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı killerle immobilizasyonu ve inhibisyon etkilerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Isparta, 94.
- Muchuweti, M., Mupure, C. H., Ndhala, A. R. ve Kasiyamhuru, A., 2006. Characterization of Polyphenoloxidase from *Uapaca kirkiana* Fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 328-332.
- Nocker, S.V., Berry, G., Najdowski, J., Michelutti, R., Luffman, M., Forsline, P., Ordidge, M. 2012. Genetic diversity of red-fleshed apples (Malus). *Euphytica*, 185(2), 281-293.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., Şakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60(3), 494-496.
- Önez, Z., 2006. *Üzümden (vitis vinifera L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87.
- Öz, F., 2010. *Lactarius Piperatus Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 54.

- Özen, A., Colak, A., Dincer, B., Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., *Ebenaceae*). *Food Chemistry*, 85(3), 431-437.
- Özoğlu, H., Bayındırlı, A., 2002. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 13(4-5), 213-221.
- Öztürk, C., Aksoy, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2019. Purification of tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-8.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları, *Gıda*, 17, 181.
- Peng, X., Du, C., Yu, H., Zhao, X., Zhang, X., Wang, X., 2019. Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from water yam (*Dioscorea alata*). *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 676-684.
- Pruidze, G. N., Mchedlishvili, N. I., Omiadze, N. T., Gulua, L. K., Pruidze, N. G., 2003. Multiple forms of phenol oxidase from Kolkhida tea leaves (*Camelia Sinensis* L.) and Mycelia Sterilia IBR 35219/2 and their role in tea production. *Food research international*, 36(6), 587-595.
- Ramirez, E. C., Whitaker, J. R., Virador, V. M., 2003. Polyphenol oxidase. *Food Science and Technology*, New York, Marcel Dekker, 509-524.
- Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M., 2005. Thermal and high-pressure inactivation kinetics of polyphenol oxidase in Victoria grape must. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 2988-2994.
- Rocha, A. M. C. N., Morais, A. M., 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, 12(2), 85-90.
- Roudsari, M. H., Signoret, A., Crouzet, J., 1981. Eggplant polyphenol oxidase: Purification, characterisation and properties. *Food Chemistry*, 7(3), 227-235.

- Ruiz, M. J. F., 2019. **“All cats are gray in the dark” Parity between genetic and non-genetic factors in development.** Doctoral dissertation in Philosophy, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Filosofía y Letras, Buenos Aires, 194.
- Sadik, C. D., Sies, H., Schewe, T. 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. **Biochemical pharmacology**, 65(5), 773-781.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Carle, R., 2012. Chemical quality parameters and anthocyanin pattern of red-fleshed Weirouge apples. **Journal of applied botany and food quality**, 80(1), 82-87.
- Sapers, G. M., Miller, R. L., Miller, F. C., Cooke, P. H., Choi, S. W., 1994. Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. **Journal of Food Science**, 59(5), 1042-1047.
- Tao, Y. M., Yao, L. Y., Qin, Q. Y., Shen, W., 2013. Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61(51), 12662-12669.
- Teng, J., Gong, Z., Deng, Y., Chen, L., Li, Q., Shao, Y., Xiao, W., 2017. Purification, characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*). **LWT- Food Science and Technology**, 84, 263-270.
- Topal, Ş. 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri. **GIDA**, 10(1).
- Tozak, K.Ö., 2013. **Nevşehir Patatesinden (*solanum tuberosum* L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılarak Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi.** Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray, 72.

- Ünal, M. Ü., Yabancı, S. N., Şener, A., 2011. Extraction, partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from tea leaf (*Camellia sinensis*). *GIDA*, 36(3).
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14; 49-129.
- Vámos-Vigyázó, L., 1995. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables: a review of principles and practice. *American Chemical Society*, Washington, DC, 49-62.
- Waliszewski, K. N., Márquez, O., Pardio, V. T., 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry*, 117(2), 196-203.
- Walker, J. R. 1995. Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. *American Chemical Society*. Washington, DC, 8-22.
- Whitaker, J. R. 2002b. Enzyme-catalyzed reactions: experimental factors that affect rates. *In Handbook of Food Enzymology*, CRC Press, 46-63.
- Whitaker, J. R., 2002a. What Enzymes Do and Why They Are Highly Specific and Efficient Catalysts. *In Handbook of Food Enzymology*, CRC Press, 36-45.
- Whitaker, J.R., 1972. Polyphenol oxidase. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, O.R. Fennema. Marcel Dekker, New York, 571-582.
- Whitaker, J.R., Lee, J.Y., 1995. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. *American Chemical Society*, Washington, DC, 2-7.
- Yabancı, S.N., 2008. *Çay Bitkisi Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 35.

- Yerlitürk, F. Ü., Arslan, O., Sinan, S., Gencer, N., Özensoy, G. Ö., 2008. Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Pyrus elaeagnifolia*). *Journal of Food Biochemistry*, 32(3), 368-383.
- Yoruk, R., Marshall, M. R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1. *Journal of food biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Zemel, G. P., Sims, C. A., Marshall, M. R., Balaban, M., 1990. Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. *Journal of food science*, 55(2), 562-563.
- Ziyan, E., 1998. *Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (pyrus communis)' ndan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflastirilmesi ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,85.

ÖZGEÇMİŞ

17.12.1990 tarihinde Iğdır'ın merkeze bağlı tacirli köyünde doğdu. 8. Sınıfa kadar olan eğitimini tacirli orta öğretim okullunda, 80. Yıl cumhuriyet Anadolu lisesinde lise eğitimini tamamladı. 2008'de başladığı Çanakkale 18 Mart üniversitesi mühendislik mimarlık fakültesi gıda mühendisliği bölümündeki yükseköğrenimini 2012 yılında tamamladı. 2015 yılında master eğitimine Iğdır üniversitesi fen bilimleri enstitüsünde başladı.

