



**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN İĞDIR KIRMIZI
KİŞMİŞ ÜZÜMÜNDEN (*Vitis Vinifera* L.) AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE İNHİBİSYONU**

Ogün BAĞCI

Yüksek Lisans Tezi

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
IĞDIR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN IĞDIR KIRMIZI KIŞMIŞ ÜZÜMÜNDEN
(*Vitis Vinifera* L.) AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE İNHİBİSYONU

Oğün BAĞCI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

IĞDIR

2019

Her hakkı saklıdır

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.



Ogün BAĞCI

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 İĞDIR KIRMIZI KİŞMİŞ ÜZÜMÜNDEN (*Vitis Vinifera* L.) AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE İNHİBİSYONU

BAĞCI, Ogün

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA

Temmuz 2019, 103 sayfa

Bu çalışmada tarihi bir üzüm çeşidi olan Kırmızı Kişmiş üzümünden (*Vitis vinifera* L.) PFO enzimi aseton çöktürmesi ve takiben Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak, afinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve enzimin kinetik özellikleri incelendi. Saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant halinde ortaya konuldu. Optimum PFO aktivitesi, 4-metilkatekol, katekol, L-Tirozin substratları kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı, 4-metilkatekol, substratı varlığında 5,0 olarak bulundu. 4-metilkatekol, katekol substratları için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) hesaplandı. Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri 4-metil katekol için 7,25 mM ve 2500 U/mL.dak protein olarak ve katekol için ise 24,21 mM ve 2000 U/mL.dak protein olarak belirlendi. PFO enziminin pH kararlılığı, optimum sıcaklık ve termal stabilitesi, enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin ve inhibitörlerin etkisi gibi özellikleri 4-metil katekol substratı varlığında incelendi. Optimum sıcaklığı 30 °C, stabil pH'sı 7,0 olarak belirlendi. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 1 saatlik inkübasyondan sonra, 10-40 °C aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Dört farklı gıda katkı maddesi için I_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. Askorbik asitin *Vitis vinifera* L. PFO'su üzerinde en güçlü inhibitör etkisi gösterdiği gözlemlendi. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1 mM ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda PFO aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, Saflaştırma, Afinite kromatografisi, Karakterizasyon, İnhibisyon

ABSTRACT

PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM IGDİR CITY'S GRAPE KIRMIZI KISMIS (*Vitis Vinifera L.*) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY, CHARACTERIZATION AND INHIBITION

BAĞCI, Oğün

Master Thesis, Food Engineering Main Discipline

Thesis Adviser: Assist. Prof. Elif Duygu KAYA

July 2019, 103 pages

In this study, the PPO enzyme from the Kirmizi Kismis (*Vitis vinifera L.*), a historical grape variety, was purified by affinity chromatography using the cold acetone precipitation followed by Sepharose-4B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity column and the kinetic properties of the enzyme were investigated. The purified enzyme was appeared as a single band on native- and SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum PPO activity was determined using 4-methyl catechol, catechol, L-Tyrosine substrates. The optimum pH of the enzyme was found to be 5,0 in the presence of 4-methyl catechol substrate. The Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated for 4-methylcatechol, catechol substrates. Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) values were determined as 7,25 mM and 2500 U/mL.dak protein for 4-methyl catechol and 24,21 mM and 2000 U/mL.dak protein for catechol. PFO enzyme pH stability, optimum temperature and thermal stability, enzyme activity on the properties of some metals and inhibitors such as the effect of 4-methylcatechol substrate was examined in the presence. The optimum temperature was found as 30 °C and the stable pH value was found as 7,0. When the thermal stability profile of the enzyme was analyzed, it was very stable in the range of 10-40 °C, it was observed that after 1 hour incubation. I_{50} and K_i values and inhibition types were determined for four different food additive and ascorbic acid showed the strongest inhibitory effect on the *Vitis vinifera L.* PPO activity. The effect of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} and Al^{3+} ions on PFO activity at final concentrations of 1 and 10 mM was investigated.

Key words: Polyphenol oxidase, Purification Affinity chromatography, Characterization, Inhibition

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının açığa kavuşması, hem beslenme hem de sağlık açısından esmerleşmenin sonuçlarını kavramak ve çözümler geliştirmek açısından oldukça önemlidir. Buna göre, Iğdır ve çevresinde yetişen ve tüketilebilen bu üzüm türü, tüketilmenin yanında endüstriyel öneme de sahip olabilecektir. Bu kaynaklardan sağlanan özütten PFO enziminin saflaştırılması ve kapsamlı incelenmesi ile bunun sonucunda elde edilen PFO aktivitesinin inhibisyon verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel PFO kaynaklarına aktarılmasıyla, hem istenmeyen esmerleşmeden kaynaklanan ekonomik kayıplar azaltılmış veya giderilmiş hem de besin değerlerinde kayıp olmaksızın ürünlerin raf ömürleri uzatılmış olacaktır.

Tez çalışmam süresince destek, ilgi ve bilgisini esirgemeyen, deneyim ve bilgisinden faydalandığım tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Elif Duygu KAYA'ya teşekkür ederim. Ayrıca yardımları için Öğr. Gör. Ayşe TÜRKHAN'a teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca alanımda bilgi birikiminin oluşmasını sağlayan değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan beni destekleyen anneme, babama, abime ve ablama teşekkür eder sevgilerimi sunarım.

Ogün BAĞCI

Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|--|----------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | v |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 41 |
| 3. MATERYAL ve METOT | 47 |
| 3.1. Materyal | 47 |
| 3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar..... | 47 |
| 3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler..... | 47 |
| 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar..... | 49 |
| 3.1.3.a. Protein tayini (Bradford Yöntemi) için kullanılan çözeltiler | 49 |
| 3.1.3.b. Protein elektroforezinde kullanılan çözeltiler | 49 |
| 3.1.3.c. Afinite jelinin sentezinde kullanılan tamponlar | 50 |
| 3.1.3.ç. Substrat çözeltileri | 51 |
| 3.1.3.d. İnhibitör çözeltileri | 51 |
| 3.1.3.e. Metal iyonları stok çözeltileri | 51 |
| 3.1.3.f. Diğer çözelti ve tamponlar | 51 |
| 3.2. Metod..... | 52 |
| 3.2.1. Ekstraksiyon hazırlama ve asetonla çöktürme | 52 |
| 3.2.2. Afinite Jelinin Sentezi | 53 |
| 3.2.3. Ekstrakt çözeltilisinin afinite kolona yüklenmesi ve enzimin elüsyonu | 54 |
| 3.2.4. PFO aktivitesi ve substrat karakteristiğinin belirlenmesi..... | 55 |
| 3.2.5. Protein tayini | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.5.a. Kalitatif protein tayini | 55 |
| 3.2.5.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini | 55 |
| 3.2.6. SDS jel elektroforezi | 56 |
| 3.2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) | 57 |
| 3.2.8. Polifenol oksidaz ile ilgili kinetik çalışmalar | 57 |
| 3.2.8.a. Substrat özgünlüğü | 57 |
| 3.2.8.b. PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi | 57 |
| 3.2.8.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi | 58 |
| 3.2.8.ç. PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi..... | 58 |
| 3.2.8.d. PFO enziminin pH kararlılığının incelenmesi | 58 |
| 3.2.8.e. PFO enziminin ısıl kararlılığının incelenmesi | 58 |
| 3.2.8.f. PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi | 59 |
| 3.2.8.g. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi | 59 |
| 3.2.8.ğ. PFO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin bulunması | 59 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA | 60 |
| 4.1.Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik | 60 |
| 4.2. PFO Enziminin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılması..... | 61 |
| 4.3.Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu..... | 63 |
| 4.3.1. Polifenol oksidazın elektroforetik olarak karakterizasyonu..... | 63 |
| 4.3.2. Polifenol Oksidaz aktivitesinin spektroskopik olarak karakterizasyonu.... | 65 |
| 4.3.2.a. PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi..... | 66 |
| 4.3.2.b. PFO enziminin pH kararlılığının incelenmesi | 68 |
| 4.3.2.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi | 69 |
| 4.3.2.ç. PFO enziminin ısıl kararlılığının incelenmesi | 70 |
| 4.3.2.d. PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi | 71 |
| 4.3.2.e. PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi..... | 74 |
| 4.3.2.f. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi..... | 78 |
| 4.3.2.g. PFO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin bulunması | 79 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 87 |
| KAYNAKLAR | 84 |

ÖZGEÇMİŞ 104



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|------------------------|---|
| %..... | Yüzde |
| dk..... | Dakika |
| 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 |
| M..... | Molar |
| mM..... | Milimolar |
| U..... | Ünite aktivite |
| UV..... | Ultraviyole |
| U/mg..... | Spesifik aktivite |
| V _{max} | Enzimatik reaksiyonun ulaştığı maksimum hız |
| µL..... | Mikrolitre |

Kısaltmalar

| | |
|-----------|---------------------------------|
| APS..... | Amonyum persülfat |
| BSA..... | Bovine Serum Albumin |
| DNA..... | Deoksiribonükleik asit |
| DMF..... | Dimethyl formamide |
| DOPA..... | Dihidroksi fenilalanin |
| EDTA..... | Etilen diamin tetra asetik asit |

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| FDA | Food and Drug Administration |
| PAGE | Poliakrilamid jel elektroforezi |
| PFO | Polifenol Oksidaz |
| PMSF | Fenilmetilsülfonoflorid |
| PVP | Polivinil piroolidon |
| 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.Enzimatik reaksiyon..... | 3 |
| Şekil 1.2.Herhangi bir enzimin katalitik etkisi..... | 3 |
| Şekil 1.3.Michaelis-Menten grafiği..... | 4 |
| Şekil 1.4.Lineweaver-Burk Grafiği..... | 6 |
| Şekil 1.5.Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon reaksiyon şeması..... | 9 |
| Şekil 1.6.Yarışmalı inhibisyonun Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği | 9 |
| Şekil 1.7.Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon reaksiyon şeması | 10 |
| Şekil 1.8.Yarışmasız inhibisyonun Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği..... | 10 |
| Şekil 1.9.Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon reaksiyon şeması..... | 11 |
| Şekil 1.10.Yarı yarışmalı inhibisyonun Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği.. | 12 |
| Şekil 1.11.Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)..... | 15 |
| Şekil 1.12. <i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi) | 16 |
| Şekil 1.13.PFO'nun bakır atomu merkezleri | 17 |
| Şekil 1.14.PFO için tavsiye edilen monofenolaz çevrimi | 18 |
| Şekil 1.15.PFO için tavsiye edilen difenolaz çevrimi | 19 |
| Şekil 1.16.Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri | 21 |
| Şekil 1.17.Flavonoidlerin kimyasal yapısı | 22 |
| Şekil 1.18.Katekinlerin kimyasal yapısı | 23 |
| Şekil 1.19.Klorogenik asidin kimyasal yapısı | 23 |
| Şekil 1.20.Kafeik asidin ve Kumarik asidin kimyasal yapısı | 24 |
| Şekil 1.21.4-metil katekolün kimyasal yapısı | 24 |
| Şekil 1.22.Katekolün kimyasal yapısı | 24 |
| Şekil 1.23.Basit fenolik substratların kimyasal yapısı | 25 |
| Şekil 1.24.Üzüm tanesinin kesiti | 34 |
| Şekil 1.25.İğdir Kırmızı Kışmış üzümü | 38 |
| Şekil 3.1.Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları | 54 |
| Şekil 4.1.Proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA:Bovine | 60 |

| | |
|--|----|
| Serum Albumin)..... | |
| Şekil 4.2. PFO'nun afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği..... | 61 |
| Şekil 4.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi, A:Saf Enzim Elüatı, B:Protein Standartı..... | 63 |
| Şekil 4.4. Kırmızı Kışmış Üzümünden saflaştırılan PFO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik | 64 |
| Şekil 4.5. Doğal-poliakrilamid Jel Elektroforezi (C:Susbrat boyama 24 mM L-DOPA)..... | 64 |
| Şekil 4.6. 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişim grafiği..... | 67 |
| Şekil 4.7. Kırmızı Kışmış üzümü PFO'sunun pH kararlılığı | 68 |
| Şekil 4.8. Kırmızı Kışmış üzümü PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi | 69 |
| Şekil 4.9. PFO enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık grafiği | 70 |
| Şekil 4.10. 4-metil katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi | 72 |
| Şekil 4.11. Katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi | 72 |
| Şekil 4.12. 4-metil katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği..... | 73 |
| Şekil 4.13. Katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği | 73 |
| Şekil 4.14. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği | 75 |
| Şekil 4.15. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfite etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği | 75 |
| Şekil 4.16. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine sitrik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği | 76 |
| Şekil 4.17. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine benzoik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği | 76 |
| Şekil 4.18. Kırmızı Kışmış üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine benzoik asitin inhibisyon etkisi | 80 |
| Şekil 4.19. Kırmızı Kışmış üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine sitrik asitin inhibisyon etkisi | 80 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.20. Kırmızı Kışmiş üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine askorbik asitin inhibisyon etkisi | 81 |
| Şekil 4.21. Kırmızı Kışmiş üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine sodyum metabisülfitin inhibisyon etkisi | 81 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| Çizelge 1.1. Bazı PFO substratları | 25 |
| Çizelge 1.2. Bazı PFO'ların aktivite türleri | 26 |
| Çizelge 3.1. Kullanılan aletler | 47 |
| Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar | 48 |
| Çizelge 3.3. Metal iyonları konsantrasyonları | 51 |
| Çizelge 4.1. İğdır Kırmızı Kışmış Üzümünden (<i>Vitis Vinifera</i> L.) PFO Enziminin Saflaştırma Tablosu | 62 |
| Çizelge 4.2. Serbest enzimin substrat özgünlüğü | 66 |
| Çizelge 4.3. 4-metil katekol substratının farklı pH'larda gösterdikleri aktivite değerleri (Aktivite değerleri birim U/mL.dak'dır.) | 66 |
| Çizelge 4.4. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su aktivitesi üzerine dört farklı inhibitörle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen I_{50} değerleri | 77 |
| Çizelge 4.5. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi | 79 |
| Çizelge 4.6. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal maddelerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri | 82 |

1. GİRİŞ

Canlı hücrelerdeki bütün hayati olaylar genellikle birbiri içine girmiş, kompleks biyokimyasal reaksiyonlar göstermektedir. Bu olaylar canlıya özgü organik maddelerle katalize edilirler. Yani bu maddeler reaksiyonları harekete geçirmekte, kontrol etmekte ve durdurabilmektedir. Bu görevi çoğunlukla protein yapılı molekül olan enzimler yapmaktadır. Her organizma sadece kendisinin sentez edebildiği, kendisine has enzimlere sahiptir. Enzimler her türlü hayvan ve bitkisel organizmada mevcuttur ve türlerine özgü karaktere sahiptirler. Bu bakımdan enzimler, bütün hayvansal ve bitkisel kaynaklı gıdaların bileşenleri olarak da bulunurlar. Enzimler, kimyasal reaksiyonlara biyokatalizör olarak katılırlar. Çeşitli maddeler arasındaki böyle bir reaksiyon gerçekleşmeden önce bu maddelerden birinin aktif olması gerekir. Aktif hale gelen enerji, enzimlerin katılmasıyla düşürülür. Enzimler böylece biyokimyasal olayların reaksiyon hızını, katalizör olmayan reaksiyonlara kıyasla 10^3 ile 10^7 kat yükseltirler (Berg *et al.*, 2002). Başka bir ifade ile enzimler, hücreler tarafından sentezlenen, canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşumuna neden olmadan %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Kimyasal yapılarına göre enzimler proteinlerdir. Bazı enzimler bağlı metal iyonu formunda, kompleks, protein olmayan komponentlerine (bakır, magnezyum, demir gibi) veya vitaminden oluşan organik bileşiğe de sahiptirler. Tüm enzimler kendi üçüncül yapısına ve katalitik aktivitesi için çok önemli olan spesifik konformasyona sahiptir. Enzimlerdeki protein ve protein olmayan grup arasındaki bağın sağlam veya daha az sağlam oluşuna göre protein olmayan grubuna koenzim veya prostetik grup denir. Enzimin bir koenzimi bulunması halinde toplam veya kompleks enzime haloenzim, protein kısmı ise apoenzim olarak adlandırılır. Apoenzim ve prostetik grup kendi başlarına katalitik etki gösteremezler.

DNA'dan bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin aktarılmasının en önemli araçları enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimler hücre içinde sentezlendiği için genellikle hücre içinde katalitik etki gösterirler. Fakat bazı enzimler hücre içinde sentezlenip hücre dışına salıverilir. Bunlara örnek olarak: sindirim sisteminde görevli olan enzimlerden pepsin ve tripsin gibi enzimler, hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salıverilir (Berg *et al.*, 2002).

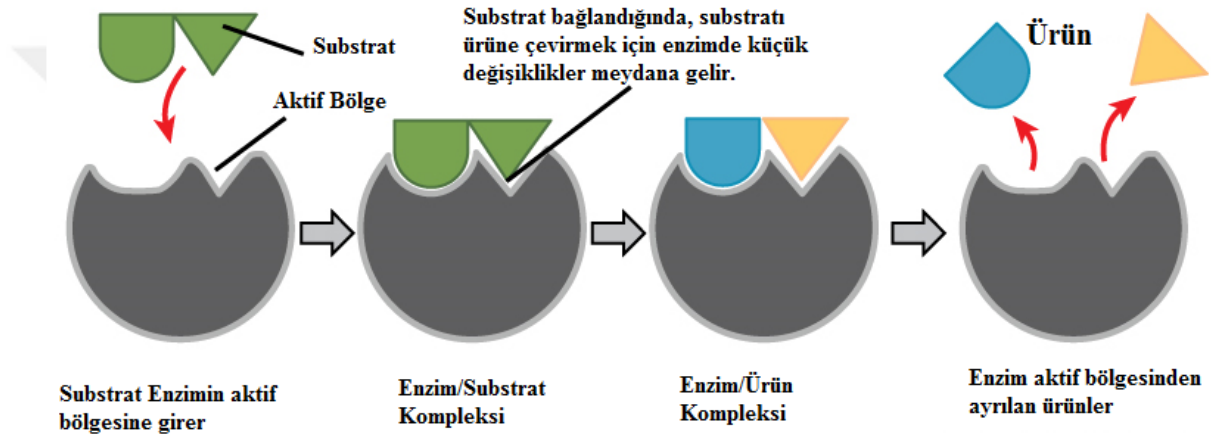
Enzimlerin etkisi altında işlenen ve ürüne dönüştürülen maddelere substrat denir. Enzimlerin adlandırılmasında, enzim tarafından katalize edilen reaksiyon belirleyici rol oynar. Enzimin etki ettiği substrat adının sonuna veya reaksiyon isminin kelime köküne veya -az eki getirilerek veya genel adlarıyla isimlendirilmiştir. Giderek daha fazla enzimin ortaya çıkması sonucu sistematik bir adlandırmaya gerek duyulmuştur ve bu sebeple Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) Biyokimya Cemiyeti tarafından kurulmuştur. Bu komisyonda her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu kod numarası, önce E.C. (Enzyme Commission) harfleri, daha sonra dört rakamdan oluşur. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu ifade ederken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu gösterir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını belirtir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Bu güne kadar yaklaşık 1500-2000 enzim tanınmıştır. Etkilenen reaksiyon tipine göre enzimler altı ana gruba ayrılmıştır.

1. Oksidoredükdazlar: Substratların oksidasyonu veya redüksiyonunu katalize eder.
2. Transferazlar: Bir atom grubunun, örneğin bir metil veya fosfat grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Substratın hidrolitik olarak parçalanmasını sağlarlar.
4. Liyazlar: Bir molekülün parçalanmasını veya bir grubun molekülden uzaklaştırılmasını katalize ederler.
5. İzomerazlar: Bir molekülde atomların tekrar düzenlenmesini sağlayan enzimlerdir.
6. Ligazlar: Bağ oluşumunun gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Enzimlerin reaksiyon hızları ve mekanizmaları enzim kinetiğine dayanılarak incelenir. Enzim kinetiğinin esas amacı enzimatik kimyasal reaksiyonun nasıl ve ne gibi bir hızla oluştuğunu tespit etmektir. Substratların işlenmesi, ürüne dönüşümü esnasında

reaksiyon mekanizmasının ve hızın bilinmesi bu alan açısından önemlidir. Emil Fischer 1894 yılında en basit enzim substrat ilişkisini betimlemiş ve anahtar-kilit modelini ileri sürmüştür. 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten enzimlerin kinetik özelliklerini açıklayan basit bir teori sunmuşlardır. Bu sayede birçok enzimin en basit bir şekilde kinetik özelliklerini açıklamayı başarmışlardır. Bu teori hala geçerliliğini korumaktadır.



Şekil 1.1. Enzimatik reaksiyon (Çesko, 2018)

Enzim (E), substrat (S) ile bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturulur. Bu ES kompleksi ürün (P) ve enzime (E) dönüşür. Michaelis-Menten modeli aşağıdaki reaksiyon ile gösterilmektedir (Horton *et al.*, 1996 ; Berg *et al.*, 2002).

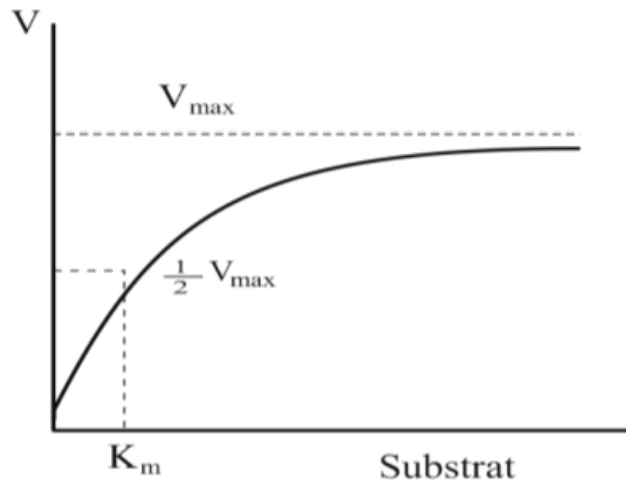


Şekil 1.2. Herhangi bir enzimin katalitik etkisi (Horton *et al.*, 1996)

Burada E ve S'dan k_1 hızı ile ES kompleksi oluşur ve k_{-1} hızındaki geri reaksiyonla ve k_2 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile ES'nin ayrışması gerçekleşir. Enzimin katalizlediği bir reaksiyonun hızı, enzimin etkisi altında zaman birimi başına ürüne dönüşen substratın veya oluşan ürünün miktarına göre belirlenir. Aktif enzimin miktarı ile ölçülebilen hız doğru orantılıdır. Buna rağmen birçok enzimin miktarını belirlemek zor olduğundan veya saf numuneleri bulunmadığından bu enzimlerin miktarları ifadesi yerine

enzim aktivite ünitesi olarak ifade edilir. Bir doku özütü veya biyolojik bir sıvı içindeki enzimin miktarını belirlemek için örnekte bulunan enzimin katalize ettiği tepkimenin ölçülen hızı, aktif enzimin miktarı ile doğru orantılıdır. Enzim aktivitesi birimi ise belirli koşullarda 1 dakikada, 1 mikromol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır. Enzimlerin reaksiyon hızlarının farklı olması, ilgili enzimlerin etkinliklerinin veya aktivitelerinin farklı olmasından kaynaklanır (Horton *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2002).

Substrat konsantrasyonunun düşük olması enzimatik reaksiyonun yavaş olmasına neden olan en önemli etkenlerden biridir. Substratı düşük olan reaksiyonlarda enzim-substrat (ES) kompleksi çok az oluşur. Böylece ortamda bulunan bir sürü enzim molekülü serbest halde kalır. Bunun sonucunda ürüne dönüşen miktar çok azdır, bu da reaksiyon hızının az olmasına sebep olur. Substrat konsantrasyonunun belirli miktarlarda artışları ile enzim moleküllerinin yarısı serbest kalırken diğer yarısı ES kompleksini oluşturur. Bu noktada oluşan ES kompleksi maksimum hızın yarısına ($1/2 V_{max}$) ulaşmış olur. Kontrollü bir şekilde substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla enzimlerin tümünün ES kompleksi oluşturduğu bir seviyede reaksiyon hızı artık maksimum düzeyde olur (V_{max}). Bundan sonra substrat konsantrasyonunun artırılması durumunda dahi reaksiyon hızı artmaz, çünkü enzim doygunluk noktasına ulaşmıştır.



Şekil 1.3. Michaelis-Menten grafiği (Gözükara, 2011)

Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar hız denklemleri ile tanımlanabilir. En fazla kullanılan yöntem Michaelis-Menten denklemi olup, başlangıç reaksiyon ilk hızını substrat konsantrasyonuyla ilişkilendiren bağıntıyla hesaplanır. Michaelis-Menten bağıntısı şu şekilde tanımlanır:

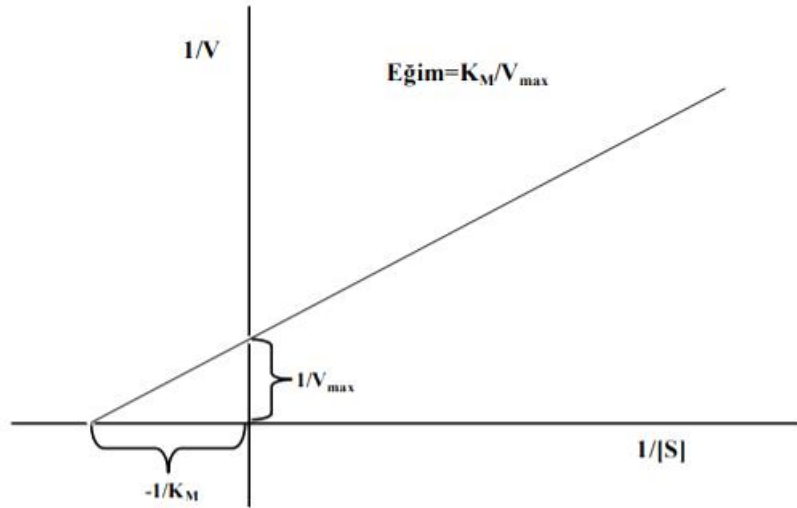
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + [S])} \quad K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (1.1)$$

K_m bir Michaelis-Menten sabitidir. $1/2 V_{\max}$ 'daki substrat konsantrasyonunu belirtir ve substrat için enzimin ilgisinin bir ölçüsüdür. Bu yüzden K_m değeri ne kadar düşükse, substrat enzime o kadar sıkı bağlanır, K_m değeri ne kadar büyükse substrat enzime o kadar zayıf bağlanır. K_m değerleri aynı fonksiyona sahip enzimleri ayırt etmek için de kullanılır (Eisenthal and Danson, 1992).

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, hesaplamaların daha kolay yapılabilmesi amacıyla bu hiperbolün bir doğru denklemi haline dönüştürülmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, farklı yollardan doğru denklemi haline getirilebilir. Bunlardan en fazla kullanılanı Lineweaver-Burk denklemidir. Michaelis-Menten denkleminin her iki tarafının tersinin alınmasıyla Lineweaver-Burk denklemi elde edilmiş olur ve şu şekilde tanımlanır:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.2)$$

Verilen denklemde ordinatta $1/V_{\max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi K_m/V_{\max} 'dır. Lineweaver-Burk grafiği V_{\max} 'ın değerini daha doğru bulmak için avantaj sağlar. Michaelis-Menten eşitliği ise V_{\max} ve K_m 'nin belirlenmesinde ve inhibitör etkinliğinin analizinde kullanılır (Nelson and Cox, 2005).



Şekil 1.4. Lineweaver-Burk Grafiği (Keha ve Küfrevioğlu, 2009)

Enzim tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen etmenler; ortamın pH'ı, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, zaman, substrat konsantrasyonu, tepkimenin ürünü, çeşitli iyonların konsantrasyonu ile ışık ve diğer fiziksel etmenlerdir.

Ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak, enzimler katalitik etki gösterirken aktiviteleri ve etkinlikleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH'lı (asidik) ortamlarda daha aktif olmakla birlikte, bazıları ise yüksek pH seviyelerinde (bazik ortamda) aktivite gösterirler. Ancak genellikle enzim aktivitesi nötral ortamlarda en yüksek seviyededir.

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri, o enzimin optimum pH'ı olarak adlandırılır. Bu değer, enzim molekülünün yapısına katılan aminoasitlerin asit veya bazik reaksiyonuna dayanmaktadır. pH değerinin değişmesi, reaksiyon hızının yavaşlamasına neden olur. Asitli ortamlarda enzimler, kısmen denatüre olurlar (Demirci, 2009).

Enzimler protein yapıda olduklarından dolayı tipik protein özelliklerine sahiptirler. Enzim etkisi en fazla sıcaklığa bağlıdır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık değeri vardır. Yani bu sıcaklıkta ve aynı sürede en fazla substrat miktarını parçalar veya burada reaksiyonun hızı en yüksektir (Demirci, 2009).

Enzimin substrata doymun olduğu koşullarda, enzim konsantrasyonuna bağlı olarak enzimatik reaksiyonunun hızı doğrusal olarak artar. Ortamda yeterli miktarda substrat ve kofaktör var ise; enzim konsantrasyonu arttıkça, enzimatik reaksiyonun hızı da artacaktır.

Ortamda bulunan enzim konsantrasyonun sabit tutularak substrat konsantrasyonuna bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktasına V_{max} denir ve enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. Substrat konsantrasyonu arttıkça enzim reaksiyonunun hızı da artar. Fakat substrat ilavesine devam edildikçe bu hızlı artış gittikçe yavaşlayarak sonuçta belirli bir düzeyde sabit kalır. Yani bazı durumlarda ortamda aşırı miktarda substrat bulunması, substrat moleküllerinin enzime bağlanmasını zorlaştırarak enzimi inhibe etmektedir. Bu olay 'substrat inhibisyonu' olarak isimlendirilir.

Enzimlerin çoğu işlevlerini su içerisinde gösterdiğinden, suyun miktarda enzim aktivitesinde önemli bir koşuldur. Enzimler, genellikle su derişimi %15'in altında olan ortamlarda faaliyet göstermezler.

Enzim-substrat kompleksinin oluşmasını farklı yollarla etkileyen, enzim işlevinin azalmasına sebep olan doğal veya yapay kimyasal maddelere 'enzim inhibitörleri' denir. Bu maddeler enzim aktivitesinin durdurulması veya azaltılması istendiği durumlarda aracı olarak kullanılır. Böylece enzim faaliyeti ortamda bulunan inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır.

Bazı enzimler aktivitelerini artırmak için aktivatör olarak adlandırılan iyonlar veya küçük moleküllere ihtiyaç duymaktadır. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır. Bir kısım aktivatörler sadece substratla, diğer bir kısmı ise enzimle birleşerek reaksiyonun hızlanması ve enzimin aktivitesinin artışına yardımcı olurlar.

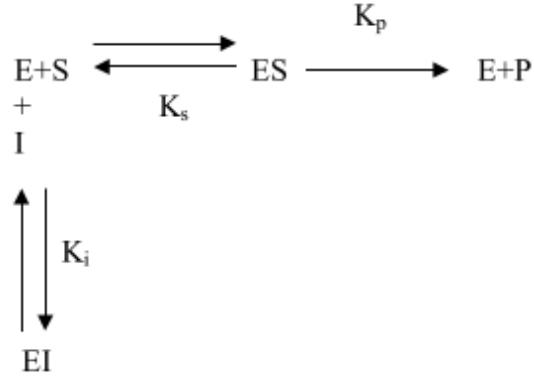
Işığın enzim aktivitesi üzerine artırıcı veya azaltıcı etkisi vardır. Kırmızı ve mavi ışık, tükürük amilazı ve diğer bazı enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olur. Ultraviyole ışık ise azaltıcı etki eder.

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro aktivitelerinin bazı bileşiklerin etkisiyle azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon denir. Buna neden olan bileşiklere ise

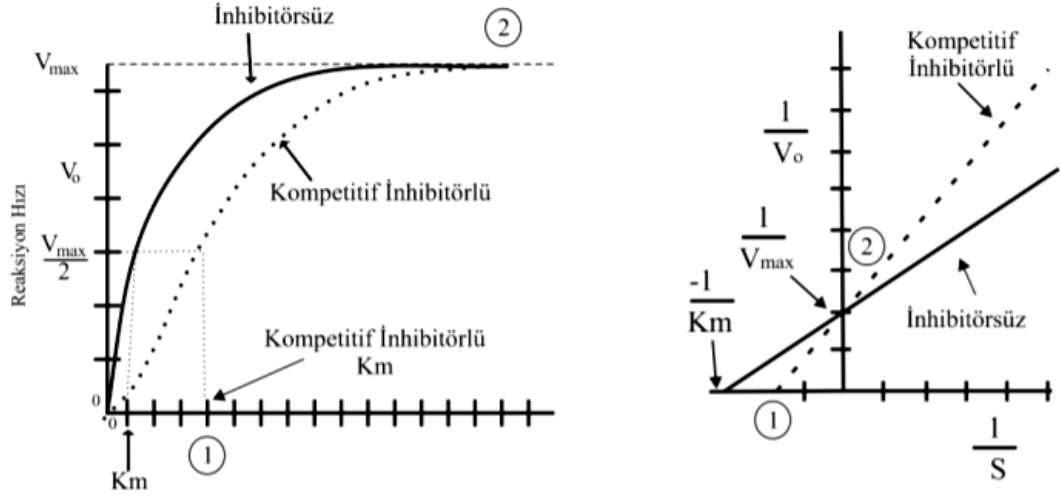
inhibitör adı verilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). İnhibitörler çoğunlukla düşük molekül ağırlıklı bileşik veya iyonlardır. Enzim aktivitesinin inhibe edilmesi biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan oldukça önem teşkil etmektedir. İnhibisyon araştırmaları sonucunda enzimatik reaksiyonların mekanizmaları, enzimin substrat spesifikliği, aktif merkezin yapısı ve aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar açıklanabilir. Ayrıca bir enzimin işlevini yerine getirmemesi bazı hastalıkların sebebi olabilir; herhangi bir faktör bir enzimi inhibe ederek enzimin katalizlediği kimyasal reaksiyonu durdurabilir veya bir hastalığı, bir farmakolojik ajan enzim inhibisyonu üzerinden tedavi edebilir.

Geri dönüşümlü (tersinir) inhibisyon ve geri dönüşümsüz (tersinmez) olmak üzere iki tip inhibisyon vardır. Geri dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör aktif merkeze kovalent olarak bağlanmasıyla enzim inaktive olur. Geri dönüşümlü inhibisyonda ise inhibitör, enzimle veya enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır. Dönüşümlü inhibisyonun; Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, Yarı Yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon olmak üzere üç türü vardır.

Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yapı bakımından substrata benzeyen inhibitörler tarafından gerçekleştirilir. Aktif merkeze bağlanan inhibitör, enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. Bu sayede substratın enzime bağlanması engellenmiş olur. Ancak substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü enzim-substrat ve enzim inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması dengeyi ES kompleksi yönüne kaydırır. Yarışmalı inhibitör kataliz hızını ES kompleksi oranını düşürerek azaltır. Bir başka deyişle enzimin K_m değeri artar. (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon reaksiyon şeması



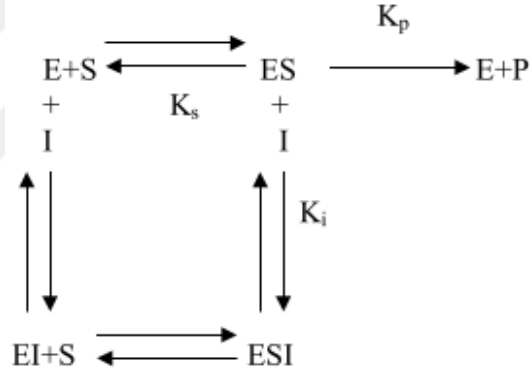
Şekil 1.6. Yarışmalı inhibisyonun Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği (Aksoy, 2008)

Kinetik sabitler (V_{max} ve K_i) Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanabilir.

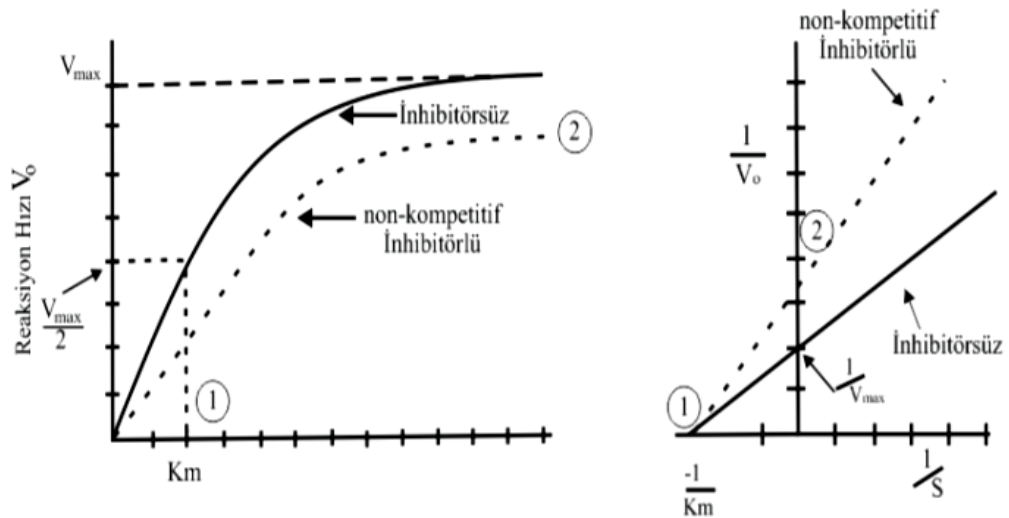
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (1.3)$$

K_i değeri serbest enzimin ve enzim-inhibitör kompleksinin substrata karşı olan tavrından etkilenmektedir.

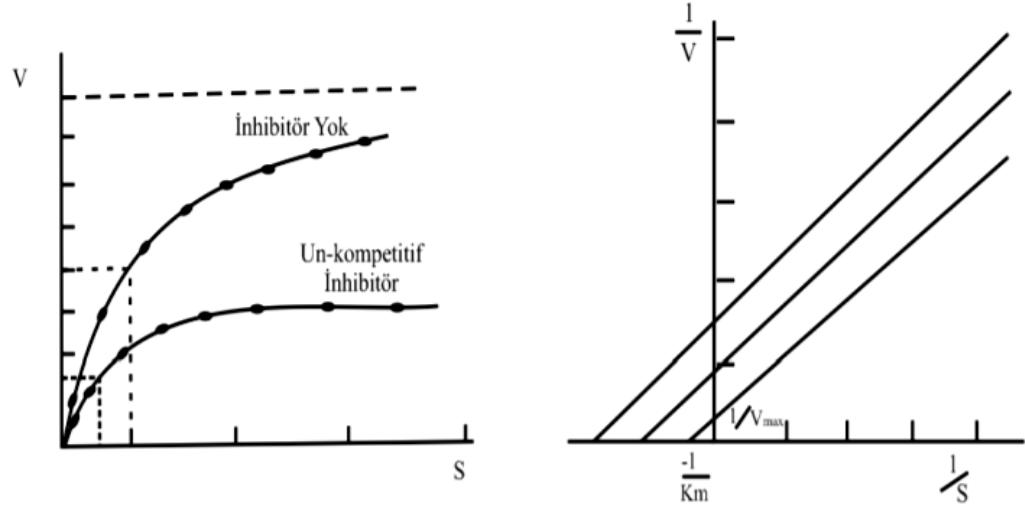
Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine aktif merkez dışındaki bir bölgeden bağlanır. Bu bağlanma substratın bağlanmasını etkilemez. Aynı şekilde substrat bağlanması da yarışmasız inhibitörün bağlanmasını etkilemez. Şekil 1.7’de verilen reaksiyon mekanizmasına göre inhibitör, E ve ES kompleksine bağlanarak EI ve ESI kompleksini oluşturur. ESI kompleksinden inhibitör dönüşümlü olarak ayrıldığından ürün oluşur. ESI kompleksinden inhibitör daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamaktadır. Bu tür inhibisyonda, tepkimenin V_{max} değeri azaldığı halde K_m değeri değişmez. V_{max} ’ın azalması bu faktöre bağlıdır ve reaksiyonda maksimum hıza ulaşamaz.



Şekil 1.7. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon reaksiyon şeması



Şekil 1.8. Yarışmasız inhibisyonun Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği (Aksoy, 2008)



Şekil 1.10. Yarı yarışmalı inhibisyonun Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği (Gözükara, 2008).

Kinetik sabitler (V_{\max} ve K_i) Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanabilir.

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

Geri dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitörler enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkararak veya onunla irreversibl (geri dönüşümsüz) olarak birleşerek enzimi inhibe ederler. Bu tip inhibitörler enzimin spesifik gruplarıyla kovalent bağlar oluşturarak etki gösterir ve enzim yapısını bozduğu için geri dönüşüm olmamaktadır. Enzim-inhibitör kompleksinin seyreltilmesine rağmen enzim aktivitesini kazanamaz. Örneğin; proteindeki sisteinin sülfidril yan zinciri ile kurşun kovalent bağlar oluşturur. Amoksisilin ve penisilin antibiyotikleri bakteri sentezine ait bir veya daha fazla enzimi inhibe eder.

Canlı hücrelerde görülen tüm biyokimyasal reaksiyonlar genetik kontrol altında hücre içinde sentezlenen enzimlerin kontrolü ve düzeni altında meydana gelir. Buna göre enzimler canlılık için gerekli temel maddelerdir. Gıda endüstrisinin temel ham maddeleri

genellikle hayvansal veya bitkisel kaynaklı ürünlerdir. Bu sayede işlem görmemiş hayvansal ve bitkisel gıda maddelerinin yapılarında doğal olarak pek çok enzim bulunmaktadır. Gıdalarda bulunan enzimler, gıdanın karşılaşılabileceği çevre koşullarından veya gıdaya uygulanan işlemlerden büyük oranda etkilenirler. Buna göre enzimler işlem görmüş gıdanın mevcut kalitesini ve durumunu yansıtır. Doğal enzimlerden bir kısmı gıdanın kalitesini olumlu yönde etkilerken, bazıları ise istenmeyen reaksiyonlara ve bunlara bağlı değişimlere neden olurlar.

Enzimatik esmerleşme, oksijen ve fenolik bileşikler ve polifenol oksidazların etkileşimini içeren meyve ve sebzelerde meydana gelen yaygın bir renk reaksiyonudur. Esmerleşme, genellikle monofenollerin *o*-difenollere ve *o*-difenollerin kinonlara enzimatik oksidasyonu ile başlar ve reaktif kinon bileşikleri meydana gelir. Bu kinonoid maddeler daha sonra enzimatik olmayan polimerizasyon reaksiyonları ile kırmızı-kahverengi melanin pigmentinin oluşumuna yol açar. Enzimatik esmerleşme, taze kesilmiş meyve ve sebze endüstrisinde kalitesinin korunmasına zarar verir, ancak çay, kahve ve kakao gibi bazı gıda maddelerinde renk ve lezzet gelişimine fayda sağlamaktadır. Elma, armut, muz, şeftali, marul ve patates gibi çeşitli meyve ve sebzeler, işleme ve depolama sırasında enzimatik esmerleşmeye karşı özellikle hassastır. Esmerleşme sadece görünüşleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda tat, koku ve doku gibi diğer duyuşal özellikleri ve ayrıca besin değerini de bozabilir (Jiang, 2004; Komthong *et al.*, 2006). Geleneksel olarak işlenmiş gıdaların aksine, taze ürünler canlı dokulardan oluşur ve işleme sırasında önemli doku hasarları devam eder (Luo and Tao, 2003). Hücre vakuollerinde fenolik bileşikler sitoplazmada PPO enziminden ayrıldığından bozulmamış bitki hücrelerinde enzimatik esmerleşme meydana gelmez. Bununla birlikte, dokular dilimleme, kesme veya soyularak zarar gördüklerinde, PFO ve fenolik bileşiklerin bir araya gelmesi ile hızlı bir esmerleşme reaksiyonu başlar. Ayrıca esmerleşme, fenolik substratlar, PFO enzimi ve oksijen, sıcaklık, pH ve su aktivitesi açısından optimum koşullar altında bir araya geldiklerinde oluşur (Alıcı, 2012).

Enzimatik esmerleşme, minimal işlenmiş meyve ve sebzelerin hasat sonrası ömrü için en önemli sınırlayıcı faktörlerden biridir. Esmerleşme yoğunluğu temel olarak oksidatif

aktivite ve substrat konsantrasyonundan etkilenir. Fenolik bileşiklerin oksidatif reaksiyonlarında rol oynayan ana enzimler polifenol oksidaz (PFO) ve peroksidazdır (POD) (Clemente and Pastore, 1998). POD, bitki alemindeki PFO'dan başka bir önemli oksidatif enzimdir. Hidrojen peroksit varlığında fenolik bileşiklerin tek elektron oksidasyonunu gerçekleştiren ve bir demir-porfirin bileşiği olan hem içeren bir enzimdir. PFO tarafından katalize edilen bazı fenoliklerin oksidasyonundan hidrojen peroksit üretimi, PFO ile POD arasında sinerjistik etki yaratabilir ve bu, POD'nun esmerleşme işlemlerine dahil edildiğinin izlenimini uyandırır (Subramanian *et al.*, 1999).

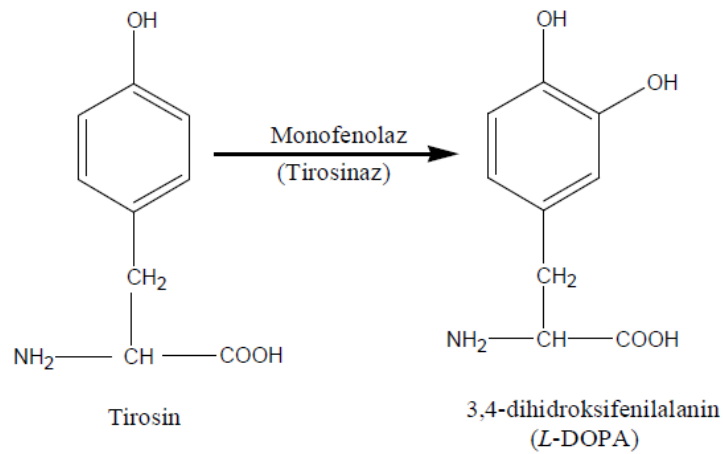
Taze kesilmiş ürünlerin dokuda kızarmasına fenilalanin amonyum liyazının (PAL) da dahil olduğunu gösteren birçok kanıt vardır. PAL, fenilpropanoid yolundaki ilk enzimdir ve PAL aktivitesindeki bir artış, PFO ve POD için substrat olan fenolik bileşiklerin konsantrasyonunda bir artışa neden olur. Hisaminato *et al.* (2001), depolama sırasında kesilmiş marulun enzimatik esmerleşmesi ile PAL aktivitesi arasında bariz bir ilişki gözlemlemiş ve PAL aktivitesini inhibe ederek esmerleşmenin önlenebileceğini rapor etmiştir. Cantos *et al.* (2002), minimal işlenmiş patateslerde bir fenolik bileşik olan klorojenik asit içeriğinin artmasıyla birlikte PFO, POD ve PAL aktivitelerinde genel bir artış bildirmiştir.

Saltveit (2000)'e göre, fenilalanin amonyum liyazın (PAL), PFO ve POD'un enzimatik aktivitesindeki artış, kesim sırasında dokular tarafından yapılan strese bir cevaptır, bu da raf ömrünün azalmasına neden olur. Ayrıca Jin *et al.* (2009), şeftali meyvesinin esmerleşmesinin PFO, POD ve PAL enzimlerinin kombinasyonundan kaynaklandığını tespit etmişlerdir.

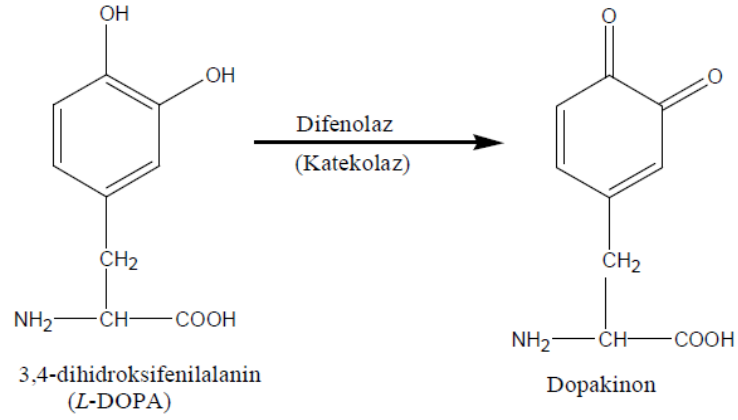
Kahverengileşmenin ekonomik önemi nedeniyle, PFO'lar fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgili olarak geniş bir şekilde incelenmiştir. Ancak, bitki fizyolojisinde bu enzimlerin rolü hakkında bilgi hala sınırlıdır. Günümüze kadar polifenol oksidazların bitkilerdeki fizyolojik rolleri hakkında birçok teori ortaya atılmış ve tartışılmıştır. PFO'nun tabiattaki en önemli görevi bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır. Bitkilerin enfeksiyona karşı

olan dirençlerinde PFO'nun basitçe görevi şudur; enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek suda çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi üstlenirler. Ayrıca enzimin bitkide *o*-difenollerin biyosentezi, tohum katlarının sertleşmesi, genel bir oksidoredüktaz olarak hücrelerdeki redox reaksiyonlarının bir kısmını düzenlediği, fotosentezde elektron transport zincirinde rol aldığı, bitki hastalıklarına ve kimyasallara karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (Mayer and Harrel 1979).

Polifenol oksidazlar, fenolik bileşiklerin *o*-kinonlara oksidasyonunu katalize eden bakır elementi içeren oksidoredüktaz enzimlerin bir grubudur (Van Gelder *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2011). Fenolik substratların *o*-kinonlara PFO enzimi ile dönüştürülmesi iki oksidasyon aşaması vasıtasıyla gerçekleşir. Birincisi, varolan bir hidroksil grubuna bitişik orto konumunun hidroksillenmesidir: monofenol oksidaz veya monofenolaz aktivitesi, ayrıca hidroksilaz veya kresolaz aktivitesi olarak da ifade edilir (Şekil 1.11). İkinci olarak *o*-dihidroksibenzenlerin *o*-benzokinonlara oksidasyonu: diphenol oksidaz veya diphenolaz etkinliği, aynı zamanda katekolaz veya oksidaz aktivitesi olarak da bilinir (Vamos-Vigyazo, 1981; Yoruk and Marshall, 2003). Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri etkisiyle oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, siyah veya kırmızı pigmentler oluşturur (Whitaker, 1972; Kuyumcu, 2014) (Şekil 1.12).



Şekil 1.11. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)

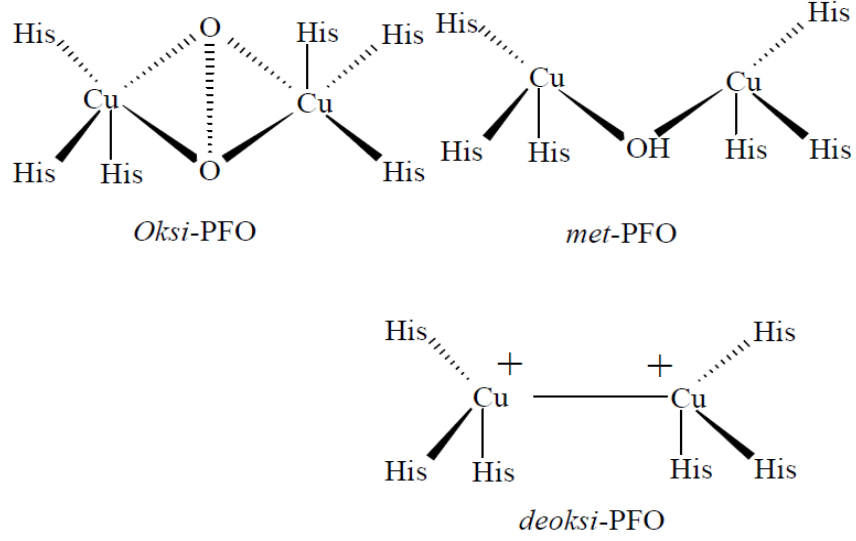


Şekil 1.12. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)

PFO isimlendirmesi spesifik substrat ve etki mekanizmalarına dayanarak yapılmıştır. Bu isimlerden bazıları, katekol oksidaz, katekolaz, krezolaz, tirozinaz, polifenol oksidaz, dopa oksidaz ve difenol oksidaz ve *o*-oksidoredüktazdır. Tirozinazlar monohidroksi fenollerin O₂ varlığında *p*-kinonlara dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir (Espin *et al.*, 1995). *o*-diphenol oksidazlar olarak da bilinen katekol oksidazlar *o*-dihidroksi fenollerin O₂ varlığında *o*-kinonlara yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Sistematik adları 1,2-benzendiol: oksijen oksido redüktazdır (Partington and Bolwell, 1996). Lakkazlar, difenolik substratların oksijenin varlığında oksidasyonunu katalize eder, ancak sadece *o*-difenollerle reaksiyona girebilen katekol oksidazlardan farklı olarak, lakkazlar hem *o*- hem de *p*-difenolleri oksitleyebilir (Pourcel *et al.*, 2006). Lakkazlar esas olarak mantarlarda ve şeftali (*Prunus persica*) ve kayısı (*Prunus armeniaca*) gibi bazı bitkilerde bulunur, ancak çoğu diğer meyve ve sebzelerde bulunmaz (Nicolas *et al.*, 1994). 1981 yılından itibaren bunların tümü 'Fenolazlar' veya 'Polifenol oksidazlar' adı altında toplanmıştır (Çimen, 2007).

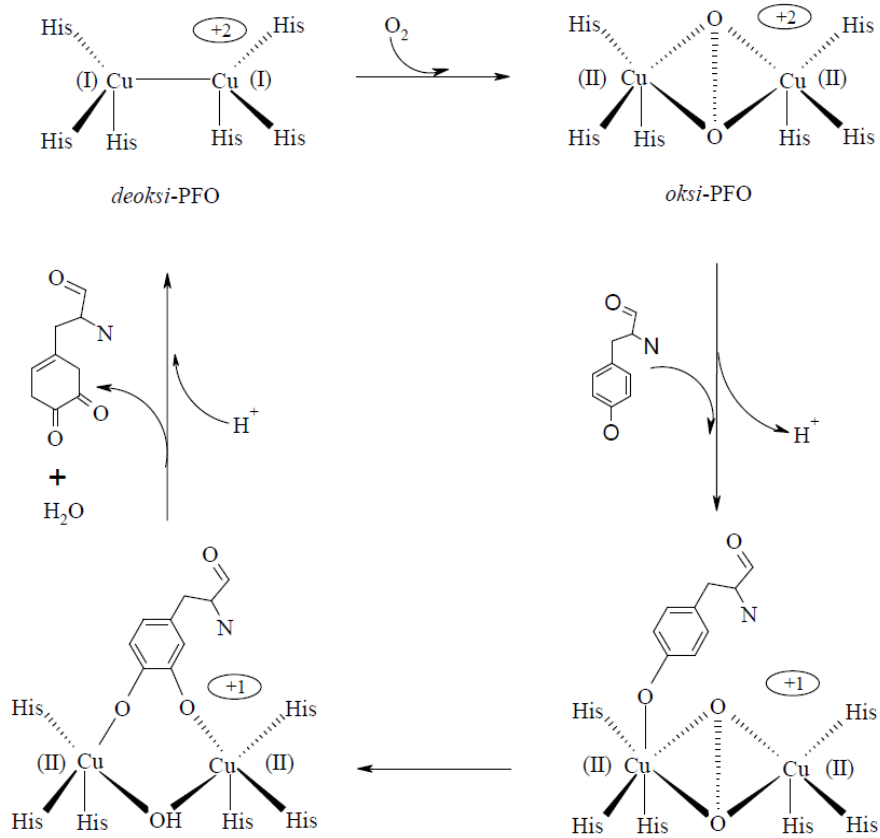
Elde edilen kimyasal ve spektroskopik bulgular neticesinde PFO aktif bölgesinin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğu ve Tip 3 bakır merkez özelliği bulundurduğu belirtilmiştir (Fenton, 1995). Bakır atomunu merkezde bulunuşları 'met' (Em), 'deoksi' (Ed), 'oksi' (Eo) halleridir. Em; Cu⁺²-Cu⁺² aktif bölgesi metpolifenol oksidazdır. Ed; Cu⁺¹-

Cu^{+1} aktif bölgesi PFO'nun indirgenmiş halidir. Eo; $\text{Cu}^{+2}-\text{O}_2^{-2}-\text{Cu}^{+2}$ aktif bölgesi oksipolifenol oksidazdır.



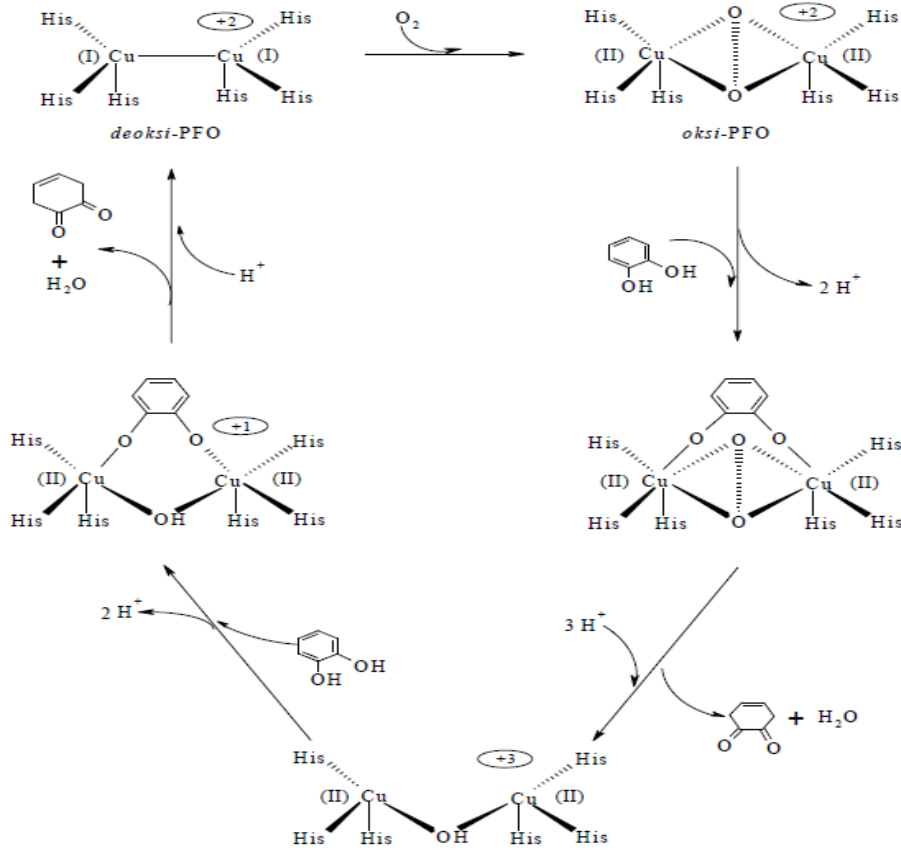
Şekil 1.13. PFO'nun bakır atomu merkezleri

Polifenol oksidazın difenolaz ve monofenolaz çevrimlerinin, genelde birbirlerine ilişkin oldukları belirtilir. Çünkü önce monofenolaz çevriminde bir difenol (kresolaz reaksiyonu) bundan sonra difenolaz çevriminde (katekolaz reaksiyonu) kullanılmak üzere üretilir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. PFO için tavsiye edilen monofenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003)

Monofenolaz çevriminde, oksijenle temas eden deoksi-formundaki enzim oksiforma dönüşür. Bununla beraber fenolün hidroksi grubu, oksiformundaki $[\text{Cu(I)-O}_2\text{-Cu(I)}]$ PFO'nun bir bakır atomuna aksiyal pozisyonda bağlanır. Orto-pozisyonda bir oksijenlenme bu bağlanmayı takip eder. PFO'nun oksiformu bir monofenölü dönüştürebilecek tek aktif merkez formudur. Bu form, $\text{Cu(I)-O}_2\text{-Cu(I)}$ ifadesiyle yazılabilir, lakin en uygun olarak peroksid $[\text{Cu(II)-O}_2^{2-}\text{-Cu(II)}]$ şeklinde ifade edilir. Substratın bağlanmasının ardından oluşan bu beş koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesinin ardından, fenolik substratın orto-hidroksilasyonu, difenolik ürünün koordinasyonu ve su kaybı gerçekleşir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. PFO için tavsiye edilen difenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003)

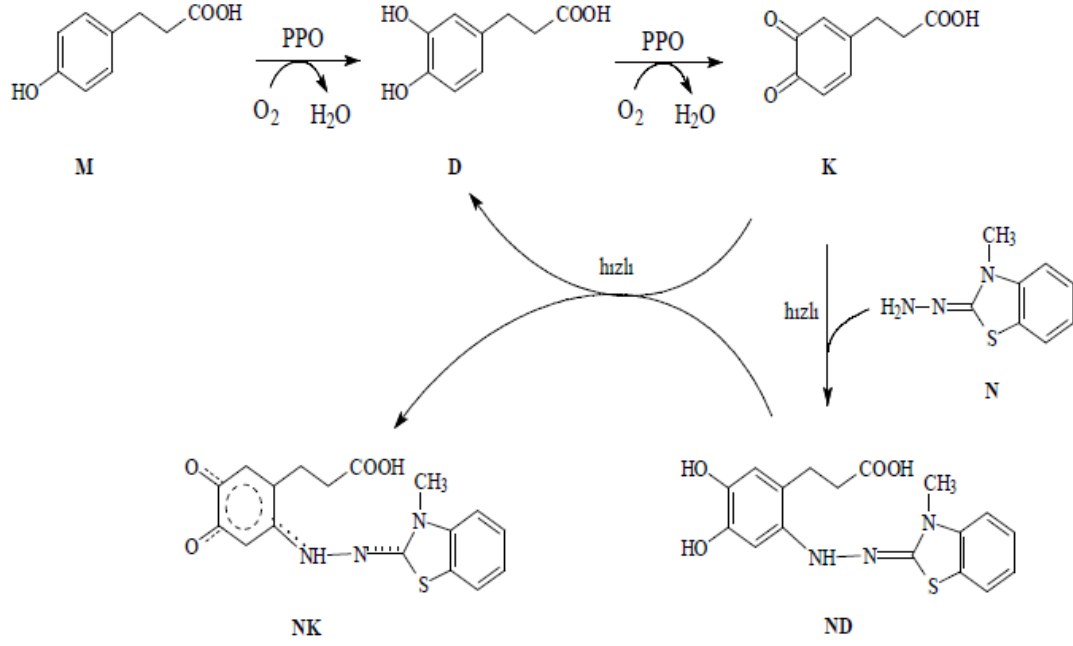
Oksi-formdaki PFO'ya bir difenol, difenolaz çevriminde bağlanır. Orto-benzokinin ürünü molekül içi elektron transferi sonucunda oluşur ve bu anda enzimin deksiformu, yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir.

Oluşturulan *o*-kinon bileşikleri, enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı bir şekilde kolayca polimerleşerek, koyu kahverengi suda az çözünen polimerik yapılara dönüşürler ve canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir. Oluşturulan bu pigmentler esmerleşme reaksiyonunun karakteristiğini yansıtır. Hem monofenolaz ve hem de difenolaz çevrimlerinde görüldüğü gibi, katalitik çevrimlerin ilginç bir yönü, net reaksiyonda dışarıdan her hangi bir protona gerek duyulmamasına rağmen, bayağı yoğun bir proton akışımının var olmasıdır. Örneğin, difenolaz çevriminde (Şekil 1.8) O-O bağının parçalandığı anda üç protona ihtiyaç vardır.

Enzim aktivitesini izlemek için çeşitli PFO testleri geliştirilmiştir. PFO enzimi aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli polarografik, manometrik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak, ürünün oluşum veya substratın tükenme hızının ölçülmesiyle belirlenebilmektedir.

Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O₂, bir respirometre ile sistemin oksijen kullanması ilkesine göre manometrik olarak veya bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçüm yapılabilir (Mayer *et al.*, 1966). Kronometrik yöntem ise askorbik asit varlığında ilk rengin gözlemlendiği zamanın belirlenmesi ilkesine göre yapılır (Mayer *et al.*, 1966).

Spektrofotometrik yöntemde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızının ölçümü yapılarak enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha kolay ve çabuk olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972). Monofenolik substratlara yönelik PFO aktivitesi, *o*-kinonun oluşum hızını ölçerek 400-500 nm'de karşılık gelen değerin spektrofotometrik olarak belirlenebilir. *o*-difenollerin güçlü emilim gösterdiği 280 nm'ye yakın absorbans kullanımı, monofenolik substratlardan *o*-difenol oluşumunu değerlendirmenin başka bir yoludur. En yaygın uygulanan yöntem ultraviyole/görünür (UV/Vis) spektrofotometredir (Garcia-Molina *et al.*, 2007). Tipik olarak, bu, PFO ile katalize edilmiş reaksiyonların ürünü olan *o*-kinonların UV/Vis emiliminin izlenmesini içerir. Bununla birlikte, *o*-kinonlar kararsızdır ve zaman içinde polimerize olabilirler (Fenoll *et al.*, 2000; Fenoll *et al.*, 2001). Sonuç olarak, UV/Vis emilimi değişebilir ve doğru olmayan kinetik ölçümlere neden olabilir. *o*-kinonlar ve 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi nükleofilik reaktifler arasındaki birleşmiş reaksiyon ürünü oluşumunun izlenmesini içeren alternatif bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu nükleofilik reaktif, kararsız *o*-kinon ürünlerini kararlı bir reaksiyon ürünü haline çevirir ve böylece istenmeyen *o*-kinon polimer birikimini önler ve kinetik ölçümlerin hatalılığını azaltır (Espin *et al.*, 1995). Bu reaksiyonun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuştur (Rodriguez Lopez *et al.*, 1994).



Şekil 1.16. Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: *o*-kinon, N: kromojenik nükleofil, ND: nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü) (Özel, 2008)

Polifenol oksidaz enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Bitkilerde yaygın olmasının yanı sıra mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hayvansal organizmalarda da bulunmaktadır. Ayrıca bazı toprak türlerinde glukoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO enziminin de varlığı ve aktivitesi rapor edilmiştir (Sarkar *et al.*, 1989; Gulko and Khaziyev, 1993).

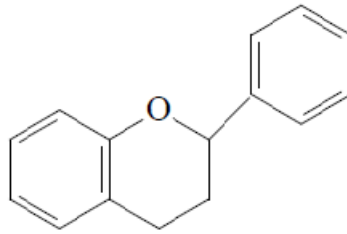
Bitkilerin içerdikleri PFO miktarı, türe ve bitkinin yetistiriliş şartlarına göre değişkenlik göstermektedir. Hatta aynı organizmanın farklı organlarında bulunan PFO, farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Birçok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PFO aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. PFO'nun bitki hücrelerindeki lokalizasyonu bitkinin yaşına, türüne; meyve

ve sebzelerde ise olgunluğa bağılı bir durumdur (Stephens and Wood, 1974; Padron *et al.*, 1975; Mayer, 1987).

Meyve ve sebzeler çok çeşitli fenolik bileşikler bulundururlar. Fakat bu bileşiklerin çok az bir miktarı PFO enzimi için substrat olabilmektedir. Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyonlar sonucu meyve ve sebzelerde renk bozulmalarına neden olmalarının dışında, meyvelerin tatlarına da etkide bulunurlar.

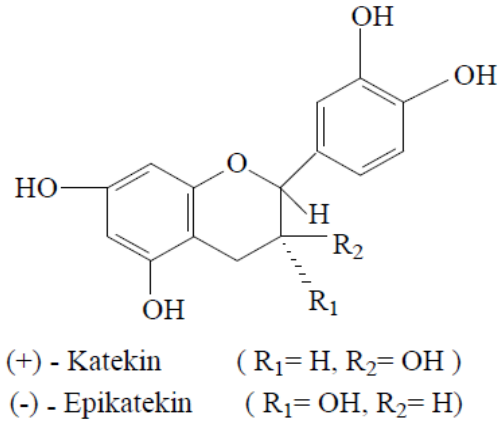
Flavonoid tipi fenollerle, basit fenoller, PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratlarıdır. Bunlardan bazıları sinamik asit esterleri, katekinler, 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin), 3,4 - dihidroksifenil alenin (DOPA) ve tirozindir. Katekol (*o*-dihidroksi fenol); enzimatik oksidasyon çalışmalarında model substrat olarak kullanılmaktadır.

Flavonoidler bitkisel gıdalarda yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında yaygın ve bol miktarda bulunan bileşiklerdir. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C₆-C₃-C₆) gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Frudenberg and Weinges, 1962).



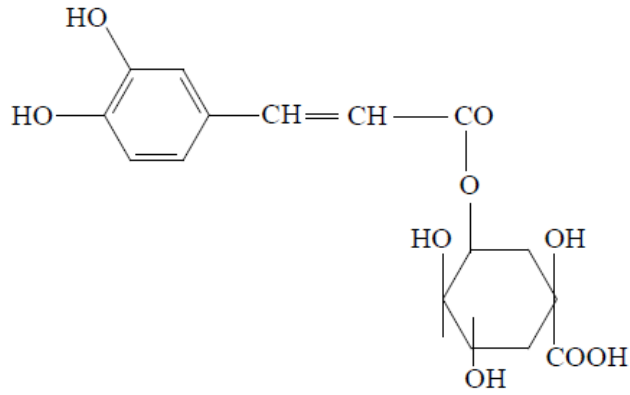
Şekil 1.17. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olan katekinler C₃ atomunda bir -OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak isimlendirilirler (Aron and Kennedy, 2008). Katekinler, doğada (+)- katekin ve onun stereoizomeri şeklinde olan (-)- epikatekin olarak mevcuttur. Katekinlerin sıcak sodyum karbonatla muamelesinden diğer formları meydana gelir.



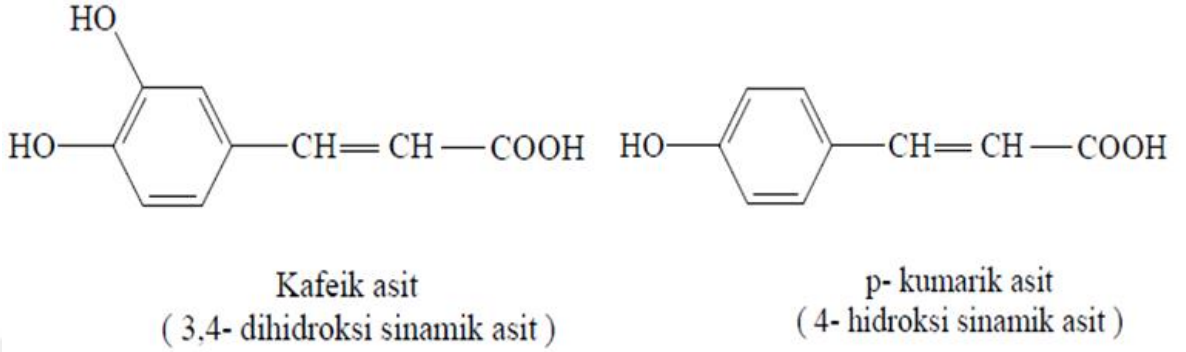
Şekil 1.18. Katekinlerin kimyasal yapısı (Frudenberg and Weinges, 1962).

Klorogenik asit, PFO'nun en yaygın doğal substratı olan sinamik asitin esterlerindedir. Klorogenik asidin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.

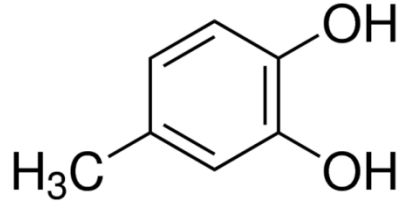


Şekil 1.19. Klorogenik asidin kimyasal yapısı

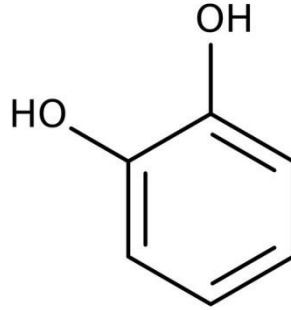
Klorogenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının *p*-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PFO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu rapor edilmiştir (Sato, 1962).



Şekil 1.20. Kafeik asit ve Kumarik asitin kimyasal yapısı



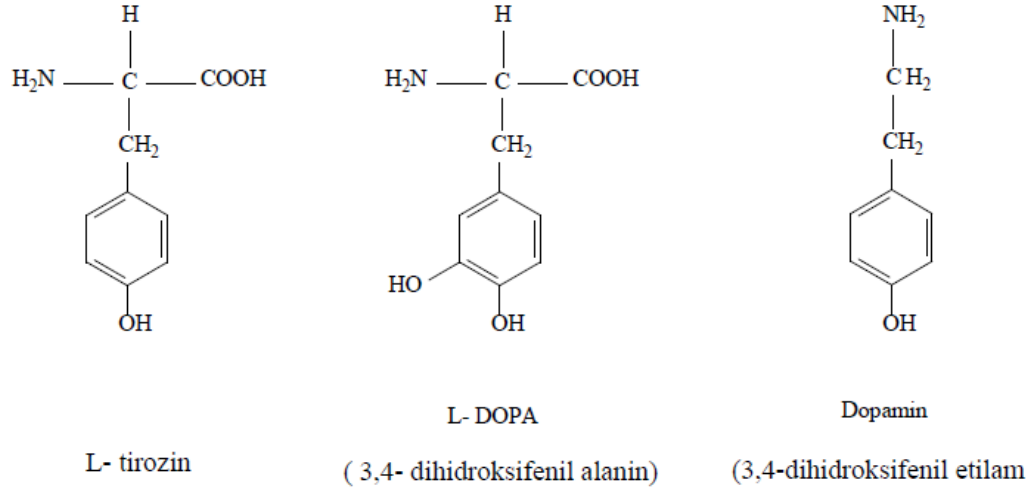
Şekil 1.21. 4-metil katekolün kimyasal yapısı



Şekil 1.22. Katekolün kimyasal yapısı

PFO'nun yaygın olarak kullanılan basit fenolik substratlarından biri olan tirozin neredeyse her bitkide bulunur ve proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Tirozin ve Dopaminin (3,4-dihidroksifenil etil amin) PFO ile hidroksilasyonu sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenil alenin) bitki dokularında bulunur. Ayrıca birçok besin maddesinde bulunabilen tirozin, enzimatik oksidasyon sonucu 3,4 dihidroksifenil alanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda etkili bir rol oynayan substratlardandır.

Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PFO, L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmasına karşın, tirozine karşı aktivite göstermez, ancak *p*-kresolu hidroksillediği görülmüştür (Stelzig *et al.*, 1972).



Şekil 1.23. Basit fenolik substratların kimyasal yapısı

Yukarıdakilerin dışında, aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi literatürde PFO'nun substratları olarak kullanılan birkaç substrat vardır.

Çizelge 1.1. Bazı PFO substratları (Doğan *et al.*, 2009).

| Monofenol | Difenol | Trifenol |
|------------------------|----------------------------|-----------------|
| <i>p</i> -kresol | Katekol | Pirogallol |
| Tirozin | Klorojenik asit | Gallik asit |
| 4-hidroksibenzoik asit | L-Dopa | Floroglüsinolün |
| 2-hidroksibenzoik asit | Kafeik asit | |
| 4-hidroksisünamik asit | Hidrokinon | |
| 3-hidroksisünamik asit | 3,4-dihidroksibenzoik asit | |
| Ferulik asit | Dihidroksümarik asit | |
| Syringic asit | Dopamin | |
| Vanilik asit | Rezorsinol | |

Bazı bitki PFO'ları, örn. mantar, patates, bakla, hem monofenollerin hidroksilasyonunu hem de difenollerin oksidasyonunu katalize eder. Ancak bazı PFO'lar, tirozine (monofenoller) yönelik hiçbir aktivite göstermez, bu da monofenolaz (krozolas) aktivitesinin olmadığını gösterir. Çizelge 1.2, bazı bitki PFO'larının aktivite türlerini göstermiştir.

Çizelge 1.2. Bazı PFO'ların aktivite türleri (Doğan *et al.*, 2009).

| PFO Kaynağı | Monofenol Aktivitesi | Difenol Aktivitesi |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Ay çekirdeği | - | + |
| Starking elması | + | + |
| Muz | - | + |
| Çilek | - | + |
| Çerimoya | + | + |
| Kayısı | - | + |
| Ananas | - | + |
| Arap sakızı | - | + |
| Muşmula meyvesi | - | + |
| Cennet meyvesi | - | + |
| Enginar | - | + |
| Dut | - | + |
| Pancar | + | + |
| Marul | - | + |

Substrat özgülüğü sadece meyve ve sebzenin türüne bağlı değildir, bununla birlikte bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiği kısma ve yetiştiriliş koşullarına bağlıdır. Aktivitenin gözlemlendiği pH aralığı da substratın kullanılabilirliğini etkilemektedir (Lavollay *et al.*, 1963; Vamos-Vigyazo and Gejzago, 1978).

PFO'lar hakkında, esmerleşmenin ticari önemi sebebiyle büyük ölçüde araştırmalar yapılmıştır. Enzimatik esmerleşme elma, armut, muz, şeftali gibi meyvelerde, patates gibi sebzelerde ve yemeklik mantarlarda daha çok meydana gelir. Fakat yeterli

miktarda PFO enzimi ve fenolik madde içermeyen limon, domates, turunçgillerde yüksek asit sebebiyle enzimatik esmerleşme problem oluşturmamaktadır (Ponting, 1960; Vamos-Vigyazo, 1981). Diğer yandan bazı tahıllardan elde edilen unlardaki yüksek PFO enzim aktivitesinden ötürü, ekme ve makarna ürünlerinin esmerleşme gösterdiği ve oluşan kinonların proteinlerle birleşerek gıdaların sindirimini zorlaştırdığı ve bu arada lizin amino asidinin etkisini azalttığı rapor edilmiştir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Birçok çalışma, PFO ifadesi ile biyotik strese direnç/tolerans arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Örneğin, arttırılmış PFO aktivitesi sergileyen patates çeşitleri, bakteri çeşitlerinden *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* and *Dickeya spp.*'in neden olduğu yumuşak çürüme hastalığına daha fazla tolerans göstermişlerdir (Ngazee *et al.*, 2012).

Gıda endüstrisinde, polifenol oksidazlar esmerleşme etkileri için istenmese de, çeşitli faydalı amaçlar için uygulanabilirler. Birkaç durumda, karakteristik lezzetler veren bileşiklerin oluşumuna yol açtığından enzimatik esmerleşme faydalı olabilir (Hurrell and Finot, 1984). Makarnada sarı renk karotenoid içeriği ve irmiğin lipoksijenaz aktivitesi ile ilişkilidir. Kırmızı bileşen bunun yerine kurutma sırasında Maillard reaksiyonunun sonucudur ve son olarak, esmerlik fenolikler ve PFO'lara bağlıdır. Ayrıca PFO'ların, kepekli un (Sing and Sheoran, 1972), hamur (Baik *et al.*, 1995) ve Çin buğulanmış ekmeği (Dexter *et al.*, 1984) ve erişte gibi çeşitli son ürün çeşitlerinin esmerleşmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Yine çay, kakao, kahve, siyah incir ve siyah üzüm gibi gıda ürünlerinde PFO aktivitesi arzulanan bir durumdur (Casado-Vela *et al.*, 2005). Bu sayede bu ürünler istenen son ürün tekstürüne kavuşurlar.

Ayrıca PFO'lar bira, şarap ve meyve suyunda esmerleşme, pus oluşumu ve bulanıklık gelişiminden sorumlu olan fenoliklerin giderilmesinde içecek işlemede kullanılabilirler. Polifenol oksidazlar, özellikle lakkazlar, biyopolimerleri çapraz bağlayabildiklerinden, şimdilerde fırınlama işlemi için ilgi uyandırmaktadır (Rodriguez Couto and Toca Herrera, 2006). PFO, bir *o*-difenolik antioksidan olan hidroksitirozolün biyosentezi ve kırmızı-mor betalainler ve altın renkli auronlar gibi gıda renklendiricilerinin

biyosentezi gibi durumlarda teknolojik uygulamaları için gerekli olan yeterli monofenolaz aktivitesini gösterir (Şimsek and Yemenicioğlu, 2007). Ayrıca gıda endüstrisinin farklı yönlerinde polifenol oksidazlar, askorbik asit tayininde, şeker pancarı pektin jelleşmesinde kullanılırlar.

Gelişmiş ülkelerde toksik bileşiklerin atık sulardan çevreye atılmadan önce uzaklaştırılmaları için hükümet mevzuatı daha sıkı bir hal almaktadır. Son ilgi, fenoliklerin endüstriyel atıklardan çıkarılması için enzimatik bir yaklaşım olarak peroksidazların ve polifenol oksidazların kullanımına odaklanmıştır. Peroksidazlar, fenolik bileşikleri geniş pH ve sıcaklık aralığında etki etme yeteneğine sahiptir, ancak stokiyometrik miktarlarda hidrojen peroksit gerektirir. Bu açıdan, çalışmak için sadece oksidan olarak moleküler oksijene ihtiyaç duyan polifenol oksidazlar daha avantajlı görünmektedir (Edwards *et al.*, 1999).

Tıbbi alanda, yakın tarihli bir araştırmaya göre, polifenol oksidazların dış çürümesinden sorumlu olan bir bakteri olan *Streptococcus sobrinus*'un dış yüzeyine yapışmasını önlediği bulunmuştur (Cowan, *et al.*, 2000). Ayrıca, polifenol oksidazlar Parkinson hastalığının tedavisi için kullanılabilir. Polifenol oksidazın etkisiyle L-tirozin, Parkinson hastalığında yetersiz olan dopamin takviyesi yapmak için kullanılan L-DOPA'ya dönüştürülür (Xu *et al.*, 1998; Asanuma *et al.*, 2003).

PFO enziminin aktivasyonu çoğunlukla istenmeyen bir olay olduğundan bu durum PFO'nun inhibisyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi üzerine çok fazla çalışma yapılmışken, aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar çok az olmasına sebep olmuştur.

Üzüm PFO'su kısa bir süre için asidik pH'ya ya da üreye maruz bırakıldığında 4-10 kat arasında dönüşümlü olarak aktive olmaktadır. Yüksek iyonik şiddetlerde, asitlerle olan aktivasyon daha yüksektir. Bu durum, kloroplastlarda olduğu gibi kısmen saflaştırılmış enzim ekstraktlarında da rastlanır. Ürenin inaktif bakla PFO'sunu aktive ettiği ve aynı zamanda enzimin monofenoller üzerine olan etkisinde artmaya sebep olduğu rapor edilmiştir (Lerner *et al.*, 1972).

Ispanakta inaktif şekilde bulunan PFO enzimi, hem doğal hem de denatüre tripsin ile aktive edilebildiği belirtilmiştir (Tolbert, 1973).

Anyonik deterjan, SDS, birçok bitki kaynağından gizli PFO aktivatörü olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Çoğu enzim, proteinlerin üçüncül ve kuaterner yapısının sert bir şekilde değişmesi nedeniyle SDS ile muamele üzerine biyolojik aktivitelerini kaybeder. PFO'nun SDS'ye direnci, belki de PFO yapısını güçlendiren disülfit bağlarının varlığından kaynaklanmaktadır. SDS aktivasyon derecesi bitki materyallerine göre büyük ölçüde değişir. Örneğin, tanımlanmış deneysel koşullar altında PFO aktivitesi baklada yaklaşık 65 ila 119 kat (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1990; Jimenez and Garcia-Cannona, 1996), üzümde 19 kat (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989), şeftalide 25 kat (Laveda *et al.*, 2000), muzda 10 kat (Sojo *et al.*, 1998), patates yaprağında 4 kat (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1993) ve mangoda SDS ile 7 kat (Robinson *et al.*, 1993) arttığı rapor edilmiştir. SDS ile PFO aktivasyonu, bir dizi parametreye bağlıdır: deterjan konsantrasyonu ve pH, literatürde tipik olarak vurgulanan parametrelerdir.

Ortama Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi turp PFO'sunda aktivite artışına sebep olurken, Cu^{+2} iyonlarının patates PFO'suna etkisi olmadığı belirlenmiştir (Weaver *et al.*, 1968; Ishigoro and Aoyaina, 1970).

PFO tarafından katalizlenen adrenalinin oksidatif döngüsünü ve renkli ara bileşiklerin oluşumunu L-DOPA aktive eder. Tatlı patates dokularında substratların uyardığı aktivasyona da rastlanmıştır (Schaller, 1972).

Enzimatik kahverengileşme patates, mantar ve marul, meyveler ve kabuklu deniz hayvanlarında rastlanan önemli bir sorundur (Sapers, 1993). Renk değişikliği, gıda ürünlerinin görünümünde ve duyuusal özelliklerinde zararlı değişikliklere neden olabilir, bu da raf ömrünün kısılmasına, piyasa değerinin düşmesine ve ürünün pazardan tamamen çıkarılmasına neden olur.

Yılda milyonlarca dolarlık ürün kaybı, enzimatik esmerleşmeden kaynaklanmaktadır (Martinez and Whitaker 1995; Whitaker 1996; Kim *et al.*, 2000). Meyve ve sebzelerde ve ayrıca karides ve ıstakoz gibi deniz ürünlerinde PFO kaynaklı

zararlı esmerleşme reaksiyonlarının sebep olduğu ekonomik kayıptan dolayı, kaliteyi korumak ve ürün raf ömrünü uzatmak için kontrolünü gerektirir. Şimdiye kadar, taze kesilmiş meyvelerin ve sebzelerin enzimatik esmerleşmesini kontrol etmek için çeşitli teknikler ve mekanizmalar araştırılmış ve teorik olarak, tüm teknikler bir veya daha fazla temel bileşenin (oksijen, enzim, bakır veya substrat gibi) esmerleşme reaksiyonundan elimine edilmesine çalışıldı. Sonuç olarak, kararma önleyici kimyasal kullanımı, modifiye atmosfer ambalajları, ısıtma işlem ve soğutma depoları, taze kesilmiş meyve ve sebzelerin başlangıç rengini korumaya yardımcı olmak için kullanılan en yaygın yöntemlerdir.

Oksijenin PFO'dan uzaklaştırılması enzimatik esmerleşmeyi de kontrol edebilir, fakat oksijen tekrar mevcut olduğunda esmerleşme yeniden başlayabilir (Langdon, 1987). Bu nedenle, enzimatik esmerleşmeyi önlemenin en iyi yolu, esmerleşme önleyici maddelerin kullanımınıdır.

Esmerleşmeyi önleyici inhibitörler enzim üzerinde etki gösterir veya enzimatik katalizin substratı veya ürünleri ile reaksiyona girerek esmerleşme pigmentinin oluşumunu engeller (Arslan and Doğan, 2005). Daha geniş bir ifade ile bu bileşikler, reaksiyondan bir aktif reaksiyon elementini, yani enzim, substrat, bakır veya bir reaksiyon ara ürününü (o-kinonlar) ortadan kaldırarak esmerleşme reaksiyon hızını azaltır veya inhibe eder (Vamos-Vigyazo, 1981; Richardson and Hyslop 1985).

Esmerleşmeyi engelleyen maddeler; indirgeyici ajanlar, şelatlayıcı ajanlar, enzim inhibitörleri, asitleştirici bileşikler, enzimler ve kompleksleştirici bileşikler olarak etki mekanizmaları bakımından birkaç gruba ayrılabilir. İnhibisyon mekanizması, bireysel enzimatik esmerleşme önleyici kategorileri için değişkenlik gösterir. Etki mekanizmalarındaki farklılıklar, aynı anda birkaç ajanın kullanılmasını mümkün kılar ve bu sayede inhibisyon etkisi, bireysel olarak kullanılan inhibitörlere kıyasla daha fazladır (McEvelly and Iyengar 1992).

Yaygın kullanılan bileşenlerden biri askorbik asittir. Enzimatik esmerleşmeye neden olan polifenol oksidaz enziminin doğal inhibitörlerinden biri olan askorbik asit (Aguilar *et al.*, 2005), *o*-kinonları *o*-fenolik bileşiklere indirgeyip PFO enzimini inaktif ederek renk

bozulmasını engellemekte ve bu sırada kendi de parçalanmaktadır ve PFO aktif bölgesinde Cu^{2+} 'nin mononükleer bakır Cu^+ 'ya indirgeyerek inhibitör etkisini gösterir. Ayrıca ortamdaki oksijeni de indirgeyerek esmerleşme reaksiyonlarını diğer bir yolla inhibe etmektedir (Fortuny and Beloso, 2003). Bunların haricinde askorbik asitin şelatlayıcı özelliği bulunmaktadır. Askorbik asit enzimin prostetik grubunu şelatlayarak enzime direkt olarak etki etmektedir.

Askorbik asit, iyi bir antioksidandır ve günümüzde yaygın olarak kullanılan en çok esmerleşme önleyici maddedir (Rupasinghe *et al.*, 2005). Askorbik asit ayrıca, güçlü antioksidan aktivitesine ek olarak, esmerleşme süreci gerçekleşmeden önce oluşan kinonları başlangıç katekollerine geri döndürerek depolama sırasında polifenol oksidazı inhibe edebilir (Abo-Shady *et al.*, 2007, Ali *et al.*, 2013).

Doğayla özdeş esmerleşme önleyici ajanları, genellikle güvenli durum olarak kabul edildikleri ve toksik olmadıkları için favori gruptur. Esmerleşmeyi kontrol altına almak için yaygın olarak kullanılan çeşitli doğal inhibitör ajanları arasında askorbik asit, sitrik asit ve taze meyve ve sebzelerde bulunan zayıf organik asitler olan oksalik asit bulunur (Son *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Askorbik asit, sitrik asit ve oksalik asit bitki dokularında yaygın olarak bulunan zayıf organik asitlerdir.

Sitrik asit gibi asitleştiriciler de PFO inhibitörleri olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Sitrik asit, pH'ı düşürerek (optimal PFO aktivitesi için gerekli olanın altında) ve bakır şelatlama yoluyla PFO üzerinde çift inhibe edici bir etki gösterir (İbrahim *et al.*, 2004). Ayrıca PFO proteini üzerindeki histidin kalıntılarına karşı bölgeye özgü özgüllüğü sayesinde askorbik asit görevi de görür (Osuga *et al.*, 1994).

İndirgen maddeler gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, o-kinonların birikmesini önleyerek melanin oluşumunu inhibe ederler veya stabil renksiz ürünler oluşturabilirler (Eskin *et al.*, 1971; Kim *et al.*, 2000). Bu maddelerden, enzimatik esmerleşmenin en güçlü inhibitörlerinden biri kükürt dioksit (SO_2) veya sülfite, özellikle sodyum sülfite, sodyum bisülfite ve sodyum metabisülfittir (Eskin *et al.*, 1971; Kim *et al.*, 2000). Meyve ve sebze endüstrisinde, etkili olmaları ve düşük fiyatlarından ötürü

esmerleşme önleyici inhibitörü olarak sülfitleme yaygın olarak kullanılmıştır (Eskin *et al.*, 1971; Eskin 1990). Sülfitleme sadece bir indirgeyici madde olarak değil aynı zamanda PFO'yu doğrudan inhibe etme kabiliyetine sahip olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca kinonlarla etkileşime girerek onların kahverengi pigmentler oluşturmasını engelleyici etkide bulunurlar (Ashie *et al.*, 1996). Sülfitleme çok kullanılan bir PFO inhibitörü olmasına rağmen, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda kullanımına izin verilmez (FDA, 1996).

Asitleyiciler veya asitleştiriciler (askorbik asit, malik asit, sitrik asit, fosforik asit), meyve ve sebzelerde pH'ı azaltarak veya bakırı şelatlayarak PFO aktivitesini inhibe edebilir (Richardson and Hyslop, 1985).

PFO, aktif bölgesinde bakır içerir ve şelatla bakırın çıkarılması kaçınılmaz olarak PFO'yu pasif hale getirir. Metal enzim kompleksindeki geçiş metallere bağlanarak enzimleri etkisiz hale getirebilen sorbik asit, polikarboksilik asitler (sitrik, malik, tartarik, oksalik ve süksinik asitler), polifosfatlar (ATP ve pirofosfatlar), makromoleküller (porfirin, proteinler) ve etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA) gibi şelatlayıcı ajanlar, çeşitli gıda işleme uygulamalarında karamayı önleyici maddeler olarak kullanılmaktadır.

Doğal olarak oluşan bir anyonik polisakarit olan pektin, %0,5'lik bir konsantrasyonda kullanıldığında elma suyunun esmerleşmesini %5-10 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Tong *et al.*, 1995). Pektin içinde bulunan karboksil gruplarının, PFO'nun bakır kısmını şelatlayabildiğine ve böylece kızarmayı önleyebileceği düşünülmektedir.

Sistein o-kinonlarla reaksiyona girer ve renksiz bir bileşik oluşturur ve böylece renk değişimlerini geciktirerek PFO aktivitesini azaltır (Dudley *et al.*, 1989).

Esmerleşmeyi önleyici başka bir madde olan 4-hidroksiresorinol, aktif olmayan bir kompleks oluşturmak için PFO ile bağlanır ve böylece esmerleşme reaksiyonunu azaltır (Lambrecht, 1995).

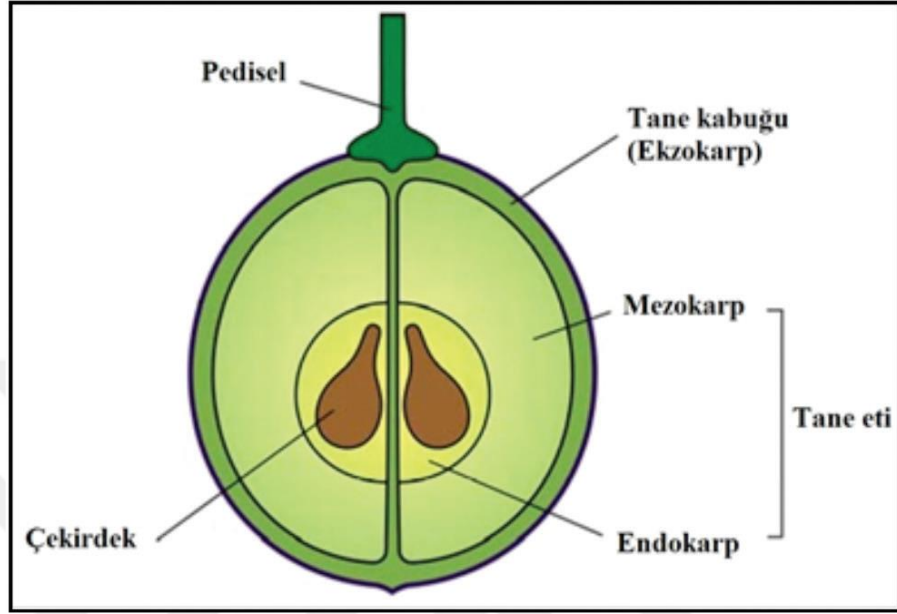
Bunların haricinde PFO enzimini inhibe edici ve enzimatik esmerleşmeyi önleyici olarak termal prosesler, yüksek basınç uygulamaları, vurgulu elektrik alan, UV ışınları, ultrasound, modifiye atmosfer uygulamaları gibi fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde PFO'nun termal yolla inhibisyonu sayesinde enzimatik esmerleşme önlenir fakat geleneksel ısı uygulamaları renk bozulmaları, tat bozukluğu, vitamin ve besin değeri kayıpları gibi kötü etkilere sebep olabilir. Yine bu gibi yöntemlerin uygulama zorluğu ve yüksek maliyetli olmaları gıda sanayinde kullanılmalarını kısıtlı hale getirmiştir.

Asmagiller familyasının Vitis cinsinden sarılgan bir bitki olan üzüm, tarihçesi MÖ 5000 yılına kadar dayanan ve yeryüzünde kültürü yapılan en eski meyve türlerinden biridir. Anavatanı Anadolu'da dahil olan Küçük Asya ve Kafkasya'yı kapsayan bölgedir.

Üzüm, dünyanın en çok üretilen meyve mahsullerinden biridir ve her yıl yaklaşık 75 milyon ton üretilmektedir. Aynı zamanda en bol meyvelerden biridir. Üzüm yetiştiriciliği, 100 farklı ülkede 2014 yılında 7,5 milyon hektarlık bir yüzölçümü ile dünyaya yayılmıştır. Üzüm, şarap, meyve suyu, reçel, jöle, üzüm çekirdeği özü, kuru üzüm, sirke ve üzüm çekirdeği yağı gibi taze ve işlenmiş ürünler olarak tüketilir. Üzüm en yüksek teknoloji (soğutma, kükürtleştirme, ambalajlama, soğuk hava deposu) ve uygulamalara (el emeği) sahip meyvelerden biridir. Üzümün çok yönlülüğü ve küresel üzüm ürününün boyutu göz önüne alındığında, üzüm pazarının küresel gıda tüketiminde önemli bir rol oynadığı açıktır.

Türkiye, uygarlığın beşiğinde uzun bir geçmişe sahip bağcılık için uygun bir alan arasında yer almaktadır. Türkiye, üzümün önde gelen üreticilerinden biridir. 468.792 hektar üzüm bağı ve yaklaşık 4 milyon ton üretime sahiptir. Dünya genelinde 77 milyon tondan fazla üzüm, 7,1 milyon ha'dan fazla üretilmektedir. Ülkemizde 1 milyon 945 bin tonu sofralık, 1 milyon 524 bin tonu kurutmalık ve 463 bin tonu şaraplık olmak üzere 3 milyon 933 bin ton üzüm üretimi yapılmıştır (TÜİK, 2018). Üretimi yapılan üzümlerin yaklaşık %63'ü çekirdekli %27'si ise çekirdeksiz üzümde oluşmaktadır.

Üzüm tanesi, yapısı ve özelliği bakımından üç ana bölümde incelenmektedir. Bu bölümler tane kabuğu (ekzokarp), tane eti (mezokarp ve endokarp) ve çekirdekler şeklinde ayrılmışlardır (Şekil 1.25).



Şekil 1.24. Üzüm tanesinin kesiti (Conde *et al.*, 2007)

Tanenin toplam kuru ağırlığının %5-12'lik kısmı tane kabuğunun ağırlığı oluşturmaktadır. Fiziksel ve iklimsel zararlı etkiler, su kaybı, mantar istilası veya bulaşması ve ultra viyole karşı taneyi koruyan kısımdır. Tanede mevcut olan renk, tat, aroma maddelerinin yaklaşık hepsi tane kabuğundaki hücre tabakalarında ihtiva edilmektedir (Pinelo *et al.*, 2006). Üzüm tanesinin meyve eti, sulu yapıda olan perikarptan oluşmuş olup kabukla çevrelenmiştir. Perikarp ise üç bölümden meydana gelir. Bunlar; üst tabaka olan ekzokarp, ortadaki sulu ve etli tabaka olan mezokarp ve biraz daha sıkı etli iç tabaka olan endokarptır. Tanenin sulu kısmı, tane ağırlığının yaklaşık % 80-90'nını oluşturmaktadır. Tanede çekirdek miktarı 0-4 arasında olmakta ve çok az bir şekilde 6'ya kadar çıkabilmektedir. Üzüm çeşidine bağlı olarak, çekirdek üzüm ağırlığının %1 ile %4'ü arasındadır ve %12-22 oranında bir yağ içeriğine sahiptir. Çekirdek, tohum kabuğu, endosperm ve embriyo olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. Üzüm tanesinin gelişmesi aşamasında ise yumurtalık içerisindeki tohum taslakları gelişerek tohumu, yani çekirdeği oluşturmaktadır.

Üzüm içeriğinde bulunan, beslenmeye yararlı gıda maddeleri sebebiyle çoğu bölgede beğenilerek tüketilen bir meyve olduğunun yanı sıra gıda sanayi sektörüne

hammadde temin etmesi, istihdam imkanı sağlaması ve yüksek ihracat potansiyeline sahip olması gibi sebeplerden ötürü ülke ekonomisinde ve sosyal hayatta önemli bir konuma sahiptir. Genel itibariyle üzümlerin içeriğinde şekerler, su, mineraller, azotlu maddeler, aroma maddeleri, organik asitler, enzimler, fenolik bileşikler ve vitaminler bulunur (Fidan ve Yavaş, 1986). Üzümde mevcut olan şekerler glikoz ve fruktoz olup, difüzyon yolu ile doğrudan kana karışma özelliği sebebiyle özellikle bebek ve çocukların beslenmesinde önemlidir. Asma tarafından topraktan K, Ca, P, Na, Fe ve Mg gibi mineral maddeler alınır ve meyveye taşınır. Özellikle üzüm ve pekmezin içeriğinde bulunan demirin insan bünyesinin çok kolay bir şekilde kullanabildiği (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2006) değerli demir formunda olması, demir emilimi açısından önemlidir.

Üzümler teknolojik olgunlaşmaya ulaştığında, toplam asitlerin %95'inden fazlasını tartarik, malik ve sitrik asit oluşturur (Wen *et al.*, 2014). Üzümdeki amino asitlerin % 85'ini, üzümün yapısında bulunan azotlu maddelerden; arginin, glutamik asit, prolin ve treonin oluşturur. Üzüm içeriğinde başta inositol ve tiamin (B₁) olmak üzere, pridoksin (B₆), pantotenik asit (B₅), biotin, folik asit, niasin ve az miktarda riboflavin (B₂) bulunur (Fidan ve Yavaş, 1986; Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2006).

İltihap, dokuların hücre hasarına, tahrişe, patojen istilasına karşı koruyucu bir cevabıdır ve hasar gören ve nekrotik hücrelerin yok edilmesi için bir mekanizma görevi görür. Birkaç çevresel faktör iltihaba sebep olabilir. Normal fizyolojik koşullar altında kısa süreli akut iltihap yaralı doku üzerindeki olumsuz etkileri aşabilir. Bununla birlikte, iltihap uzun sürerse, kronik inflamasyon gelişebilir ve kanser, Alzheimer, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, artrit ve otoimmün ve pulmoner hastalıklar gibi kronik hastalıkların gelişiminde ana sebep olarak düşünülür. Üzüm polifenolleri, iltihap yollarının düzenlenmesiyle veya dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerini düşürerek kronik iltihaplanmayı azaltır. Üzüm flavonoidleri ve proantosiyeninler, bazı sentetik ilaçlardan daha etkili olan, kronik inflamasyonu yenmek için birden fazla yol hedefleyebilirler. Flavonoidler, antosiyeninler, proantosiyeninler ve hidroksisinnamik asit türevleri içeren, dondurularak kurutulmuş bir şarap özütü, indometasin ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir anti-inflamatuar etki gösterdi. Üzüm

çekirdeğindeki proantosiyanidinler yüksek anti-iltihap etkiye sahiptir çünkü serbest radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu önler ve pro-inflamatuar sitokinlerin oluşumunu engellerler.

Yapılan bir çalışmada üzüm çekirdeği özütlerinden elde edilen fenolik bileşiklerin Gram-pozitif bakterilere karşı önleyici etkisi, gram-negatiften daha etkili olduğu belirlenmiştir (Delgado-Adámez *et al.*, 2012). Yapılan başka bir çalışmada ise kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktlarının bakteri ve plak oluşumunu engelleme özelliği doğrulanmıştır (Smullen *et al.*, 2012).

Üzüm flavonoidleri insan bağırsak mikroflorasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir ve bu nedenle kilo kaybının kontrolünde yararlı etkilere sahip olabilirler. Üzüm ve üzüm ürünlerindeki polifenoller, antioksidan ve anti-inflamatuar etkilere sahip çok hedefli modülatörler gibi davranarak metabolik sendromu azaltabilir ve obezite ve tip 2 diyabet gelişimini önleyebilir. Üzüm tozu, şeker toleransını artırır ve üzüm çekirdeği ekstresi metabolik sendromu, tip 2 diyabet ve obeziteyi metabolik endotoksemiye kontrol ederek ve bağırsak duvarı bütünlüğünü iyileştirerek önler (Georgiev *et al.*, 2014).

Asma türleri arasında en önemlisi olan *Vitis vinifera* L. türü, dünya üzüm üretiminin neredeyse tamamına yakınına yakınına oluşturmaktadır. Fenotipik varyasyonlara dayanarak, Anadolu ve Kafkasya bölgelerinin *Vitis vinifera* L. türünün çeşitlilik merkezi olduğu yapılan araştırmalarda rapor edilmiştir (Arroya-Garcia *et al.*, 2006). Tür arasında tipler, klonlar, çeşitlerden oluşan genetik ve ekolojik anlamda önemli bir açılım söz konusudur. Bu tür içinde, en az 30.000 civarında isimlendirilmiş çeşidin olabileceği ve bu çeşitlerden yaklaşık 15.000'nin genotipik açıdan farklı olabileceği sanılmaktadır (Allewelt, 1997).

Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki mikroklima iklimine sahip Iğdır'da üzüm yetiştiriciliği için optimum şartlar mevcuttur. Iğdır yöresinde 1984 yılında Prof. Dr. Ferhat Odabaş'ın yapmış olduğu ampelografik çalışma sonucunda yörede otuzdan fazla yerel çeşit bulmuştur (Odabaş, 1984). Yapılan toplam meyve yetiştiriciliği alanlarından 100 dekar alanlık kısmını üzüm yetiştiriciliği kapsamaktadır. Bu arazi üzerinde bulunan toplam üzüm (sofralık-çekirdekli) ağacının yüzde yüzü meyve verir yaşıttır. Yaklaşık 74 ton kadar üzüm

(sofralık-çekirdekli) üretimi yapılmaktadır. Ağaç başına ortalama hasat 740 kg'dır. Iğdır ili yaklaşık 1,3 milyon ton üzüm üretim kapasitesine sahiptir (TÜİK, 2016).

Kırmızı Kışmış üzümü (*Vitis vinifera* L.), ekolojiye iyi adapte olması nedeniyle Iğdır'da yoğun olarak yetiştirilen eski ve yerel bir asma çeşididir. Bu nedenle, benzer ekolojilere özgü benzersiz özellikleriyle umut vaat ediyor. Bu çeşit, bölgedeki birçok *V. vinifera* çeşidine kıyasla sağlam ve çok verimli bir üründür. Iğdırdaki kadıkışlak ve necefali köylerinde üretimi yapılan ve tarihi bir üzüm çeşidi olan Kırmızı Kışmış üzümü kırmızı-pembe rengi ve benzersiz lezzeti ile yöre halkı tarafından beğenilerek tüketilmektedir. Kırmızı kışmış üzümü fenolik asitler, C vitamini, organik asitler ve şeker miktarı ile değerli ve sağlığa faydalı çok sayıda bileşik içermektedir (Eyduran *et al.*, 2015).

Eyduran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Iğdır'da yetiştirilen dokuz yerli üzüm çeşitlerinin içerdikleri şekerleri, organik asitleri ve fenolik bileşikleri karşılaştırılmış ve bitkilerde bulunan ve alerjik tepkileri azaltmak veya bağışıklığı artırmak için bir besin takviyesi olarak kullanılan sarı kristalli bir pigment olan kuersetin içeriğinin ve gıda sanayinde çeşitli kullanım alanları bulunan tartarik asit içeriğinin en fazla Kırmızı Kışmış üzümünde bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada antiinflamatuvar, antioksidan, immün uyarıcı, antiviral ve karsinostatik, hasar önleyici reperfüzyon, antikanser özellikleri bulunan bir bileşik olan kafeik asitin (Borelli *et al.*, 2002; Son and Lewis, 2002) en fazla Kırmızı Kışmış üzümünde bulunduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada yapılan renk ölçümlerinde Kırmızı Kışmış üzümünün pembe şarap yapımı için çok elverişli olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 1.25. İğdır Kırmızı Kışmış üzümü

Gelişen teknolojiyle beraber çeşitli alanlarda enzimlere duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Gıda, tekstil, sağlık gibi sektörlerde oluşan talebi karşılamak amacıyla daha hızlı, çevreye daha az zarar veren, az enerji maliyetli uygulamalar seçilmektedir. Klasik kimyasal yöntemlerin spesifik olmaması, çevreye daha çok zarar vermesi ve veriminin düşük olması gibi etmenlerden ötürü artık tercih dışı kalmıştır. Bu nedenle bu klasik yöntemlerin yerine artık enzim katalizli reaksiyonlar tercih edilmektedir. Biyolojik katalizör olan ve canlı sistemler tarafından metabolizma tepkimelerini hızlandıran enzimler, oldukça spesifik reaksiyonları 10^8 - 10^{20} kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünler oluştururlar. Kaliteli özellikler üzerindeki etkilerine rağmen enzimler, büyük molekülleri daha basit moleküllere hidrolize etmek için çeşitli gıda işleme uygulamalarında biyokatalizörler olarak kullanılırlar. Ek olarak, enzimler, gıda ürünlerinin organoleptik kalitesini geliştirmek için moleküller üretmek ve değiştirmek için kullanılmaktadır. Bu yöntemle üretilen ürünler klasik yöntemlere göre daha kısa zamanda sentezlenir.

Günümüzde talebe göre üreticiler göze hitap eden ve raf ömrü uzun meyvelerin üretimini tercih etmektedirler. Bu nitelikleri karşılayan meyvelerin de üretimi genelde hormon takviyesi ve gen translasyonu ile olağanlaşmıştır. Bu tür uygulamalar meyvelerin sağlık açısından sağlayacağı bazı yararlı yanlarını yok etmektedir. Oysaki meyveler sağlık yönünden oldukça değerli besinlerdir ve besinlerin sağlıklı bir şekilde muhafazası ve raf ömrünün uzatılmasına gerek duyulmaktadır. Gıdaların sentetik yolla elde edilmiş kimyasallarla veya çeşitli yöntemlerle korunması sonucuyla gıdalarda besin değeri ve tat kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Oluşan bu maddeler insan sağlığına olumsuz etkilerinden dolayı bu konulara çevre ve sağlık örgütleri tarafından hassasiyet gösterilmekte ve pek çok gelişmiş ülkede enzimlerle elde edilen yeni ürünlerin ya da bilinen ürünlerin yeniden modifiye edilmesi çalışmalarına hız verilmektedir.

Dolayısıyla son yıllarda, PFO'lar, aromatik bileşiklerin oksitlenmesi için yüksek kapasiteleri nedeniyle önemli ilgi görmüştür. Bu özellik PFO'ların gıda endüstrisinde, hamur ve kağıt endüstrisinde, tekstil endüstrisinde, tıpta ve çevre teknolojisinde bazı biyoteknolojik uygulamalar için çok uygun olmasını sağlar. İlgili enzim fenolik bileşiklerin çeşitli amaçlarla saptanması için biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanılabilir; ayrıca, fenolik bileşikler üzerinde PFO'ların etki etme kabiliyeti, endüstriyel atıksulardaki fenollerin bozunması için kullanılabilir.

İğdır yöresinde yetişen üzüm PFO'larının varlığı, bu türden araştırmaların daha kapsamlı bir şekilde ele alınıp, endüstriyel uygulamalar için kullanılabilirliği açısından önem teşkil etmektedir. Bu kaynaklardan PFO'ların saflaştırılması ile çeşitli ve yeni bazı polimerlerin veya diğer kimyasal maddelerin sentezi işlemlerinde kullanılabilirliklerinin araştırılması giderek artacaktır.

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip meyve olan üzümün PFO enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu ile saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen saf PFO enzimlerinin elektroforetik ve kinetik özelliklerinin analizi hedeflenmiştir.

Bu maksatla şunlar amaçlanmıştır;

- Afinite jeli sentezi,

- İğdir yöresine ait olan Kırmızı Kışmış üzümünden afinite jeli ile PFO'nun saflaştırılması,
- Doğal elektroforezle PFO enziminin varlığının ortaya konulması,
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile PFO enziminin yaklaşık molekül ağırlıklarının belirlenmesi,
- Belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan yatkınlığının araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- Çalışılan her bir substrat için optimum sıcaklık ve optimum pH belirlenmesi,
- Enzimin farklı metal iyonları varlığında aktivitesindeki değişimlerin incelenmesi,
- Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin incelenmesi ve bu hedefle inhibisyon türünün tespiti, I_{50} ve K_i değerlerinin bulunması.

Yapılan bu çalışmayla, yeni enzim kaynakları denenerek endüstrinin gerek duyduğu yeni ve potansiyel PFO'ların saflaştırılması ve elde edilen bu enzim için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, bu veriler dahilinde, farklı alanlarda enzimin kullanılması amacıyla, bazı polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi ve endüstriyel veya farmakolojik öneme sahip yüksek saflıkta bazı organik bileşiklerin sentezi, gibi farklı uygulamalar için kaynak teşkil edecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yüksek boylu maviyemiş meyvesinden (*Vaccinium corymbosum L.*) ekstrakte edilen PFO enzimi için karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve PFO, pH 6,1-6,3 ve 35 °C'de optimum aktivite göstermiştir. Enzimin, 25-60 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında önemli bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan substrat spesifikliğı çalışmasında katekolun, en kolay okside olan substrat olduğu ve ardından 4-metil katekol, DL-DOPA ve dopamin geldiğı belirlenmiştir. Maviyemiş PFO'su katekol varlığında, K_m 15 mM ve V_{max} 2,57 $\Delta A_{420nm} / \text{dak} \times 10^{-1}$ değerleri göstermiştir. Yapılan ısıl kararlılık çalışmalarında PFO'nun, 20 dakika boyunca 85 °C'de tamamen inaktive olduğu, ancak 75 °C'de 30 dakika sonra, yaklaşık %10 değerinde aktivitesini koruduğı, 55 ve 65 °C'de 30 dakika boyunca yapılan ısıl işlem, PFO'nun kısmen etkisizleşmesine neden olduğu gözlenmiştir. Enzimin inhibisyon çalışmalarında askorbik asit, sodyum dietilditiokarbamik asit, L-sistein ve sodyum metabisülfat, 1 mM'da etkili PFO inhibitörler olarak belirlenmiş ve benzoik asit ve sinamik asit serisi inhibitörleri, 2 mM konsantrasyonunda bile olsa, PFO'nun (% 21,8-27,6) nispeten zayıf inhibisyonuna sebep olmuştur (Siddiq and Dolan, 2017).

Enginar bitkisinin gövdesinden ve yaprağından yapılan çalışmada, PFO enzimini ekstrakte edilmiş ve jel filtrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılmıştır. Optimum şartlar 50 mM katekol substratı kullanarak belirlenmiştir. 6 farklı inhibitör ile yürütülen çalışmada, bitkinin yaprağı ve gövdesi için en etkili inhibitörün tiyoüre ve sodyum azit olduğu saptanmıştır (Ziyan and Pekyardımcı, 2003).

Arslan *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada PFO enzimi duttan izole edilmiştir, amonyum sülfat ve afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Substrat olarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanılmıştır. Kullanılan bu üç substrat için yapılan analizlerde optimum pH ve sıcaklık değerlerinin 4,5-8,0 ve 20-45 °C arasında değiştiğı belirlenmiştir.

Aydemir *et al.* (2003) tarafından yapılan diğeri bir çalışmada PFO enzimi yer elmasından izole edilmiştir. Enzim katekol ve L-DOPA'ya karşı aktivite verdiği gözlenirken, bir monofenol olan L-tirozine karşı aktivite vermediğı gözlenmiştir. Enzimin

optimum sıcaklık değeri ise 25 °C ve optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur. Nötr pH civarında enzimin kararlı halde olduğu gözlemlenmiştir. K_m değeri 5,88 mM, V_{max} değeri ise 25,402 U/mg olarak bulunmuştur ve katekol substratı kullanılmıştır. İnhibisyon çalışmasında ise potasyum siyanid, tiyoürenin ve β -merkaptoetanol en etkili inhibitörler olduğu belirlenmiştir.

Türkhan *et al.* (2018) tarafından PFO enzimi alıç (*Crataegus Monogyna*) meyvesinden soğuk aseton çöktürmesi yöntemi kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. PFO enzimi 139,5 verimle 3,58 kat kısmi olarak saflaştırılmıştır. Çalışmada enzimin optimum pH değerinin 5,0 ve optimum sıcaklık değerinin ise 30 °C olduğu tespit edilmiştir. Katekol substratı varlığında enzimin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiş ve bu değerler sırasıyla 12,72 mM ve 5507 U/mL.dak olarak bulunmuştur. Askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit ile yapılan inhibisyon çalışmalarında I_{50} değerleri sırasıyla 0,012 mM, 0,099 mM, 2,21 mM olarak hesaplanmıştır. Substrat spesifikliğı çalışmasında enzimin katekol substratına ilgisinin L-tirosin ve 4-metil katekol substratlarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Farklı bir çalışmada Gülçin *et al.* (2005) ısırgan otu kullanmış ve bu bitkiden izole edilen PFO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle saflaştırmış ve optimum şartları saptamışlardır. Bu çalışmada kullanılan altı farklı substrat arasından enzim için en etkili substratın L-tirozin olduğu belirlenmiştir. Optimum pH değeri 4,5 sıcaklık değerleri ise 30 °C olarak tespit edilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak L-tirozin varlığında sırasıyla $7,90 \times 10^{-4}$ mM ve 11290 U/ml olarak tespit edilmiştir. İnhibisyon çalışmasında L-sistein, klorid, sodyum siyanit, sodyum azit, benzoik asit, L-askorbik asit, salisilik asit, glutatyon, tiyoüre, ditiyokarbomat, sodyum dietil, sodyum metabisülfid ve β -merkaptoetanol gibi çeşitli inhibitörler kullanılmış ve ditiyokarbomatın en etkili inhibitör olduğu belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, PFO enzimi kereviz köklerinden 0,1 M fosfat tamponu kullanarak pH 7'de izole edilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri farklı substratlar kullanılarak belirlenmiştir. K_m değerleri 25 °C'de sırasıyla, katekol için 8,3, pirogallol için 4,5 ve L-

DOPA için 6,2 mM olarak belirlenmiştir. Bu substratlar kullanılarak enzimin optimum pH ve sıcaklığı belirlenmiştir. Katekol ve L-DOPA için 7,0, pirogallol için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklıklar sırasıyla 40 °C, 25 °C ve 45 °C olarak bulunmuştur. Yapılan inhibitör çalışmasında ve en etkili inhibitörün L-sistein olduğu bulunmuştur (Yağar, 2004).

Yapılan başka bir çalışmada PFO enzimi Türkiye’de yetiştirilen emir üzümünden izole edilmiş, optimum pH, optimum sıcaklık, termal inaktivasyon, kinetik parametreler incelenmiştir. Enzim üzerindeki bazı inhibitörlerin etkileri çalışılmıştır. PFO enzimi, iyon değişim kromatografisi ile %11,7 verim ve 24,5 kat saflaştırılmıştır. Optimum pH 4,2 ve optimum sıcaklık substrat olarak katekol kullanıldığında 25 °C olarak belirlenmiştir. K_m değeri $25,1 \pm 2,72 \text{ mmol L}^{-1}$, V_{max} değeri ise $0,925 \pm 0,04 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$ bulunmuştur. Yapılan inhibitör çalışmalarında ise en etkili inhibitörlerin askorbik asit ve sodyum metabisüfit olduğu belirlenmiştir (Ünal and Şener, 2006).

Polifenol oksidaz enziminin anamur muzundan saflaştırıldığı bir çalışmada, enzimin karakteristik özellikleri tespit edilmiştir. Optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 7,0 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Termal inaktivasyon verilerine göre, enzimin yarı ömür değerleri 7,3-85,6 dakika arasında değiştiği görülmüştür. Enzimin Z değerinin ise 14,2 °C ve E_a değerinin 155 kJ. mol^{-1} olduğu tespit edilmiştir. Enzimin K_m değeri 8,5 mM, V_{max} değeri $0,754 \text{ OD}_{410} \text{ dk.}^{-1}$ ‘dır. Yapılan inhibitör analizlerinde sodyum metabisüfit ve askorbik asit en etkili inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Ünal, 2007).

Yapılan başka bir çalışmada, polifenol oksidaz enzimi çağla bademinden izole edilmiştir ve amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi, diyaliz yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden elde edilen numune PFO enziminin karakterizasyonunda kullanılmıştır. farklı substrat kullanılarak optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. En iyi substrat 4-metil katekol olduğu saptanmış ve 4-metil katekol için optimum pH değeri 6,5, optimum sıcaklık değeri ise 35 °C olarak bulunmuştur. K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Yapılan inhibitör çalışmalarında ise en etkili olanların benzoik asit, sodyum azit, sitrik asit, tiyoüre ve L-askorbik asit

olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi incelenmiş; Fe⁺³, Cu⁺², Mn⁺⁴, Pb⁺² metalleri enzim aktivitesini artırırken Zn⁺², Mg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Co⁺³, Sn⁺², K⁺¹ metalleri enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür (Güngör, 2008).

Yapılan bir diğer çalışmada altın ilek meyvesinden (*Physalis peruviana L.*) PFO enzimi izole edilmiş ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu amaçla enzim, aseton çöktürme ve %5 polietilen glikol 8000 ve %14 fosfattan oluşan sulu iki fazlı sistemler (ATPS) kullanılarak ekstre edilip saflaştırılmıştır. Yapılan analizler PFO'nun klorojenik asit, 4-metil katekol ve katekol için en yüksek substrat afinitesine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu enzim için en uygun substratın klorojenik asit olduğu ve K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,56 ± 0,07 mM, 53.15 ± 2.03 U/mL.dak olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH değerleri katekol ve 4-metil katekol için 5,5 ve klorojenik asit için 5,0, optimum sıcaklık değerleri ise katekol için 40 °C, 4-metil katekol için 25 °C ve klorojenik asit için 20 °C olduğu gözlenmiştir. Yapılan inhibisyon testlerinde, en güçlü inhibitörün askorbik asit, ardından L-sistein ve kuersetin olduğu belirlenmiştir. Altın ilek meyvesinden saflaştırılan PFO enziminin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla yapılan SDS-PAGE yönteminde tek bir bant gözlenmiş ve enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 31 kDa olarak bulunmuştur (Bravo and Osorio, 2015).

şakiroğlu *et al.*, (2008) yaptıkları bir çalışmada polifenol oksidaz enzimini dereotundan izole ederek çeşitli kinetik parametrelerini incelenmişlerdir. Bu amaçla katekol, dopamin ve klorojenik asit substratları için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. İnhibitör çalışmalarında substrat olarak katekol kullanılmış ve inhibitör olarak da L-sistein klorür, glutatyon ve askorbik asit ile çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre inhibitörlerden en etkili inhibisyon etkisinin L-sistein klorür olduğu belirlenmiştir.

Dedeoğlu (2009) yaptığı çalışmada, PFO enzimini iki farklı mantardan amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromatografisi ve diyaliz yardımıyla saflaştırmıştır. LsPFO enzimi 26,6 saflaştırma derecesi ve %7 verimle, AbPFO enzimi ise 1,93 saflaştırma derecesi ve %39 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimler için SDS-PAGE de tek bir bant elde edilmiştir. Mantar türleri için sırasıyla enzimin molekül ağırlığı 36 kDa ve 50 kDa

civarında belirlenmiştir. PFO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak tespit edilmiştir. *Lactarius salmonicolor* PFO enziminin kullanılan bu substratlar için optimum pH'ları 6,0-7,5 arasında, optimum sıcaklıkları ise 0-25°C arasında bulunmasına rağmen *Agaricus bisporus* PFO enzimi için optimum pH 7,5-8,0 ve sıcaklık ise 20-30 °C arasında değiştiği bulunmuştur. Lineweaver-Burk yöntemi ile LsPFO ve AbPFO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta bu üç substrat için K_m ve V_{max} değerleri bulunmuş ve LsPFO enzimi için en uygun substratın 4-metil katekol, AbPFO enzimi için ise pirogallol olduğu belirlenmiştir. Farklı inhibitörler kullanılarak her iki enzim için analizler yapılmıştır.

Yapılan diğer bir çalışmada Trabzon ili Yomra Elması meyvesinden hazırlanan ekstraktta polifenol oksidaz enziminin monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri ve çeşitli biyokimyasal özellikleri incelenmiş araştırma konusu olmuştur. Monofenolaz aktivitesi 3-(3,4-hidroksifenil) propiyonik asit (MHPPA), L-tirozin monofenolik substratları ve difenolaz aktivitesi de katekol, L-DOPA ve 4-metil katekol substratları kullanılarak tespit edilmiştir. Her bir substrat için PFO'un en iyi çalışacağı pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar neticesinde Yomra elması (*Malus communis* L.) PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve difenolaz aktivitesinin en yüksek derecede katekol substratına ilgi duyduğu ve bu substrat yatkınlığının sırasıyla 4-metil katekol ve L-DOPA'nın izlediği, monofenolaz aktivitesi için ise sırasıyla MHPPA, L-tirozin şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum azit ve benzoik asit gibi PFO inhibitörlerinin enzim aktivitesini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Can *et al.*, 2010).

Yapılan diğer bir çalışmada, yabani ve yenilebilir olan bir mantardan polifenol oksidaz enzimi izole edilmiş ve Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoikasit afinite jeli kullanılarak 13,9 katı artırılmış ve karakterize edilmiştir. Saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant olarak gözlemlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak optimum şartlar belirlenmiş ve enzimin optimum pH'sı 7,0, sıcaklığı 20 °C olarak tespit edilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalarda katekol substratı kullanılmış ve bu çalışmalar sonucunda, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1

mM ve 25000 U/mg protein olarak tespit edilmiştir. İnhibisyon çalışmalarında ise askorbik asit, sodyum azid, sodyum metabisülfid ve benzoik asitin enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (Öz, 2010).

Farklı bir çalışmada, polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimleri yeni bir keçiboynuzu meyve çeşidinden izole edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. PFO enzimi için optimum pH değeri 4,5; optimum sıcaklık değeri ise 30 °C olarak bulunmuştur. POD enzimi için ise optimum pH değeri 5,0; optimum sıcaklık değeri ise 35°C olarak tespit edilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalarda katekol substratı kullanılmış ve K_m değeri PFO enzimi için 47,11 mmolL⁻¹, guaiakol substratı varlığında ise POD enzimi için K_m değeri 153,00 mmolL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. 4-heksilresorsinol (4-HR), oksalik asit ve L-sistein'in çalışılan inhibitörler arasından her iki enzim için etkili inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir (Zhang and Shao, 2015).

Manila mango (*Mangifera indica*) meyvesinin PFO enziminin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada; enzim ekstrakte edilmiş, hidrofobik etkileşim ve iyon değiştirme kromatografisi ile 216 kat saflaştırılmıştır. PFO enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak 31,5 olduğu belirlenmiştir. İzole edilmiş PFO'nun en yüksek afinite gösterdiği substratlar sırasıyla, pyrogallol ($K_m = 2,77$ mM), 4-metil katekol ($K_m = 3,14$ mM) ve katekol ($K_m = 15,14$ mM) olduğu belirlenmiştir. PFO için optimum pH değerinin 6,0 ve kararlı olduğu sıcaklık değerlerinin 20-70 °C sıcaklık aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PFO aktivitesi, 0,1 mM'de tropolon, askorbik asit, sodyum metabisülfid ve kojik asit ile tamamen inhibe edilmiştir (Palma-Orozco *et al.*, 2014).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Iğdır ilinde yetişen ve tarihi bir üzüm türü olan Kırmızı Kışmış üzümü (*Vitis vinifera* L.) meyvesi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Üzüm, Iğdır Necefali köyünden toplanmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan aletler

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

3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar

| Kullanılan Madde ve Malzemeler | Firma |
|---|--------------------------|
| Afinite Jeli Sentezi İçin Kullanılan; CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, NaHCO ₃ , NaOH, <i>p</i> -aminobenzoik asit, NaNO ₃ ve L-Tirosin | Sigma, Aldrich |
| Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisi İçin Kullanılan; Triton X-114, EDTA, PMSF ve MgCl ₂ | MP Biomedicals, Sigma |
| Protein Elektrofrezisi İçin Kullanılan; TEMED, Amonyum persülfat (APS), SDS, N,N'-metilen bisakrilamid, Bromofenol Mavisi, Akrilamid, Gliserol, Glisin, β -merkaptoetanol, Coomassie Brilliant Blue R-250 | Sigma, Fluka, Carlo Erbo |
| Tampon Çözeltileri İçin Kullanılan; Sodyum Asetat, Tris, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Glisin | Sigma, Merck |
| Metal Klorürleri; CuCl ₂ , NaCl, MgCl ₂ , KCl, AlCl ₃ | Merck, Fluka |
| İnhibitörler; Askorbik asit, Sitrik asit, Benzoik Asit, Sodyum metabisülfid | Sigma |
| Çözücüler; HCl, Asetik Asit, Aseton ve Metanol, Etanol | Merck |

3.1.3.Kullanılan çözeltiler ve tamponlar

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

1.Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 50 mL %95'lik etanolde, 100 mg coomassie brilliant blue G-250 çözülerek içerisinde %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Son hacim ise saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.

2. Standart serum albumin çözeltisi (BSA): 5mg standart serum albuminin (BSA) 5 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

3.1.3.b. Protein elektroforezinde kullanılan çözeltiler

1. Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 36,3 g Tris 150 mL saf su içerisinde çözülerek, 8,8'e pH'sı ayarlandı ve hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 24,2 g Tris 150 mL saf su içerisinde çözülerek, 6,8'e pH'sı ayarlandı ve hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS 50 mL saf su içerisinde çözülerek hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
4. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 10 g APS 50 mL saf su içerisinde çözülerek, hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlanıp ve 250 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünüp -20 °C'de muhafaza edildi.
5. N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Asıl şişesinden kullanıldı.
6. Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid ve 29,2 g akrilamid saf su içerisinde çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
7. SDS Jel Yükleme Tamponu: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 400 µL %10 SDS, 60 µL β-merkaptotanol, 250 µL %80 gliserol karıştırılarak hazırlandı (200 µl'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölündükten sonra -20 °C'de muhafaza edildi).

8. SDS Jel Yürütme Tamponu: 1,5 g Glisin ve 7,2 g Tris yaklaşık 450 mL saf suda çözülmesinin ardından üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi eklendi. 8,3'e pH ayarlandı ve hacmi 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
9. Doğal Jel Yükleme Tamponu: 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf su karıştırılarak hazırlandı (200 µl'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünüp -20 °C'de muhafaza edildi).
10. Doğal Jel Yürütme Tamponu: 1,5 g glisin ve 7,2 g Tris yaklaşık 450 mL saf suda çözülmesinin ardından, 8,3'e pH ayarlandı ve hacmi 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
11. Boyama (Staining) Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250, 93,5 mL metanol ve 62,5 mL glasiyal asetik asit içinde çözülerek hazırlandı.
12. Boya Uzaklaştırma (Destaining) Çözeltisi: 400 mL metanol, 100 mL glasiyal asetik asit ve 600 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.
13. Substrat Boyama Çözeltisi (L-DOPA): 24 mM L-DOPA 100 ml saf su içerisinde hafif ısıtılmasıyla hazırlandı.

3.1.3.c. Afinite jelinin sentezinde kullanılan tamponlar

1. 0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 4,2 g NaHCO₃ çözülerek 1 M NaOH ile pH 10,0'a ayarlanıp hacim 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. 0,2 M pH 8,8 NaHCO₃ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 8,4 g NaHCO₃ çözülerek 1 M NaOH ile pH 8,8'e ayarlanıp hacim 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. 0,01 M pH 6,0 Na₂HPO₄ Tamponu: 450 mL saf su içerisinde 0,71 g NaHPO₄ çözülerek 1 M NaOH ile pH 6,0'a ayarlanıp hacim 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
4. 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 5,0'a ayarlanıp hacim 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

5. Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8,0 Fosfat Tamponu içinde 1M NaCl): 29,25 g NaCl ve 3,10 g K_2HPO_4 450 mL saf su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile pH 8,0'a ayarlanıp hacim 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.3.ç. Substrat çözeltileri

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

3.1.3.d. İnhibitör çözeltileri

1. 1 mM Askorbik Asit: 0,0177 g askorbik asit az saf suda çözülüp hacmi saf suyla 10 mL'ye tamamlandı.
2. 20 mM Benzoik Asit: 0,0245 g benzoik asit az saf suda biraz ısıtılarak çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
3. 10 mM Sodyum metabisülfid: 0,019 g $Na_2SO_2O_5$ az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
4. 100 mM Sitrik Asit: 0,210 g sitrik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Metal iyonları stok çözeltileri

Çizelge 3.3. Metal iyonları Konsantrasyonları

| Metal İyonları | Stok Çözelti Konsantrasyonu(mM) | Madde Miktarı(g) | Çözelti Hacmi(ml) |
|-------------------|---------------------------------|------------------|-------------------|
| CuCl ₂ | 1000 | 1,344 | 100 |
| NaCl | 1000 | 0,585 | 100 |
| MgCl ₂ | 1000 | 0,952 | 100 |
| KCl | 1000 | 0,745 | 100 |
| AlCl ₃ | 1000 | 1,333 | 100 |

3.1.3.f. Diğer çözeltiler ve tamponlar

1. Ekstraksiyon Hazırlama Çözeltisi: 80 mL saf su içerisinde 0,84 g sodyum asetat (50 mM), 2 mM EDTA, %6 (w/v) TX-114 deterjanı, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM PMSF çözülerek 1 M asetik asit ile pH 5,0'a ayarlanarak hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. 50 mM, pH 3,0 Glisin-HCl Tamponu: 0,375 g glisin 90 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'sı 3,0'a ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
3. 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.
4. 50 mM pH 6,0-7,0 Fosfat Tamponu: 3,10 g K₂HPO₄ 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. 10 M MBTH (3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon): Az saf suda 0,022 g MBTH çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstraksiyon hazırlama ve asetonla çöktürme

1. Kırmızı Kışmış üzümü Iğdır Necefali Köyünden mevsiminde temin edildi ve çalışmamızda kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.
2. Yaklaşık 50 gram üzüm dondurma çözme yöntemi uygulanarak havanda öğütüldü ve üzerine 1:2 oranında Triton x-114, PMSF, EDTA, MgCl₂ içeren 50 mM Sodyum asetat (pH:5) enzim özütü hazırlama çözeltisi ilave edildi.
3. Karışım 4 °C'de 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar ham enzim özütü olarak kullanıldı.
4. Elde edilen süpernatanta, hacmi kadar -20 °C'de bekletilmiş soğuk aseton, buz banyosunda, yavaş yavaş ilave edildi ve bir gece 4 °C'de bekletildi.

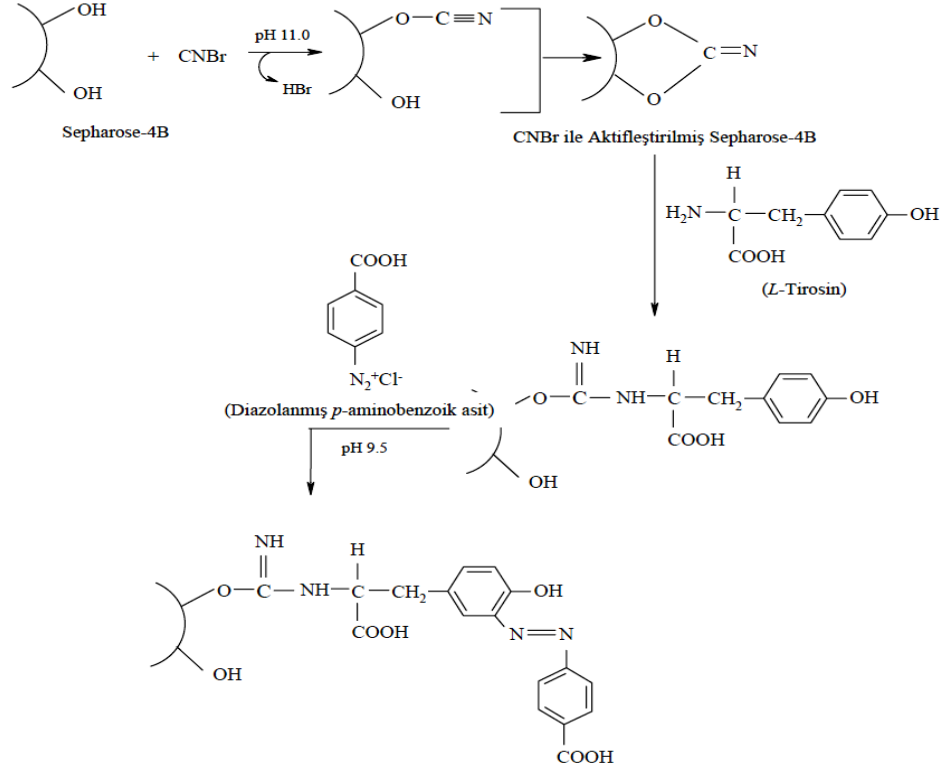
5. Ham enzim özütü, 4 °C'de 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılıp, elde edilen çökelekler çözünmediği en az hacimde 50 mM pH 5,0 asetat tamponuyla çözüldü (Özen vd., 2004).

3.2.2. Afinite jelinin sentezi

Arslan *et al.*, (2004) tarafından sentezlenen yöntemle göre bu çalışmada kullanılan afinite jeli sentezlendi. Bu yöntemle göre CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi, uzantı kolunu oluşturmak amacıyla tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. Polifenol oksidaz enziminin (PFO) spesifik bir inhibitörü olan *p*-aminobenzoik asit ligand olarak seçildi. Bu yöntemle üretilen jel, afinite kromatografisi ile Iğdır Kırmızı Kışmış (*Vitis vinifera* L.) üzümünden PFO enziminin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı.

10 mL saf su, 5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B karışımına bir beher içinde ilave edildi. 2 M NaOH ile süspansiyonun pH'sı hemen 11,0'a yükseltildi ve pH sabit kalana kadar takibi yapıldı. Karışımın içine küçük buz parçaları atıldı ve süzülmesi su trombu yardımıyla mavi banttandır yapıldı. 0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ tamponundan 250 mL alınarak süzgeç kağıdı üzerinde kalan kısım yıkandı ve süzülerek bir beher içerisine alındı. 0,1 M pH'sı 10,0 olan ve 20 mL'sinde 10 mg L-tirozin içeren soğuk NaHCO₃ tamponundan süspansiyonun üzerine ilave edildi ve 90 dakika süresince karıştırıldı. Bu işlemin ardından süspansiyon, 4 °C'de 16 saat beklemeye alındı. Süre bitiminde mavi banttandır tekrar süzülen süspansiyon bol miktarda saf su ile yıkandı. 0,2 M NaHCO₃ tamponunun 100 mL'siyle mavi bant üzerinde kalan kısım yıkanarak aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

10 mL 1 M soğuk HCl içerisinde çözülen 25 mg *p*-aminobenzoik asit üzerine, önceden buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözülen 75 mg NaNO₂ damla damla ilave edildi. 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna 10 dakika buz banyosunda bekletilen karışım ilave edildi ve pH'ı 2 M NaOH ile 9,5'e yükseltirilerek 3 saat süresince oda sıcaklığında karıştırıldı. Mavi bant üzerine alınan süspansiyon önce 1 L saf suyla, sonra 200 mL 0,01 M pH 6,0 Na₂HPO₄ tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan *et al.*, 2004). Reaksiyon basamakları Şekil 3.1 ile gösterildi.



Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları (Özel, 2008)

3.2.3. Ekstrakt çözeltisinin afinite kolona yüklenmesi ve enzimin elüsyonu

1×15 cm boyutlarındaki kolona, sentezlenen afinite jeli, hava kabarcığı oluşmasına izin verilmeyecek şekilde yavaş yavaş yüklendi ve ardından kolonun üstünden eklenen ve kolonun altından toplanan tamponun 280 nm 'de absorbans değerleri eşit oluncaya kadar iyice 50 mM $\text{pH } 5,0$ asetat tamponu ile yıkandı. Böylece dengelenmiş olan kolona, enzim özütü yüklenmesi yapıldı ve jel tekrar 50 mM $\text{pH } 5,0$ asetat tamponu ile yıkandı. Afinite jeline tutunmayan diğer tüm proteinler ve maddeler ortamdan bu sayede uzaklaştırılmış oldu. 1 M NaCl içeren 50 mM $\text{pH } 8,0$ fosfat tamponu ilavesiyle jele tutunan enzimler tüplere 2 mL halinde toplandı. Enzim elüatlarının alındığı her bir tüpte 496 nm 'de 4-metil katekol substratı ile aktivite tayini yapıldı ve 280 nm 'de protein tayini yapıldı.

3.2.4. PFO aktivitesi ve substrat karakteristiğinin belirlenmesi

Afinite kromatografisi ardından elüe edilen her bir tüpte PFO aktivitesi, spektrofotometrik metodla 4-metil katekol varlığında 496 nm'de ve diğer substratlar (katekol, L-DOPA, ve L-tirosin) için 500 nm'de, absorbanstaki yükselişin ölçülmesiyle belirlendi (Espin *et al.*, 1995). Reaksiyon içi karışımı, substratla aynı miktarda 10 mM MBTH ve 20 µL DMF içeren karışıma, saf enzim elüatıyla beraber küvet içi son hacmi 1000 µL olacak şekilde tampon çözelti eklenerek hazırlandı. Kör olarak saf enzim elüatının konulmadığı reaksiyon karışımı kullanıldı.

Bir ünite PFO aktivitesi; 1000 µL reaksiyon karışımında 25 °C'de, optimum şartlarda, 1 dakikada, 1 µm substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplandı. Enzimin saflık derecesini gösteren PFO'nun spesifik aktivitesi ise; 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak U/mg protein şeklinde hesaplandı (Kolcuoğlu, 2012).

3.2.5. Protein tayini

3.2.5.a. Kalitatif protein tayini

Fenilalanin, tirozin ve triptofan, proteinlerin yapısında bulunan ve aromatik gruplar içeren aminoasitlerdir. Bu aminoasitlerdeki aromatik gruplar, farklı protein zincirleri arasında güçlü hidrofobik etkileşim gösterirler. Tirozin ve triptofan, daha az derecede de fenilalanin, ultraviyole ışığı absorbe ederler ve yöntem bu aminoasitlerin 280 nm'de ultraviyole ışığı absorbe etme esasasına dayanır (Segel and Woodin, 1968). Kalitatif protein tayini, kromatografi işlemleri bitiminde eşit hacimde elüe edilen bütün fraksiyonlarda yapıldı. Spektrofotometrede absorbanları 280 nm'de kuvartz küvetler kullanılarak köre karşı okundu.

3.2.5.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford metodu baz alınarak tespit edildi (Bradford, 1976). Bu yöntemde boya olarak negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır. Fosforik asitle hazırlanan bu boya çözeltisi, asidik ortamda pozitif yüklenen protein ile negatif yüklü boya kompleks oluşturur. 595 nm'de, oluşan kompleksin renk

yoğunluğu ölçülür. Yöntemin hassasiyeti 5-100 µg/ml arasındadır. Yüksek oranda tekrarlanabilen bu reaksiyon, hızlı etkileşim gösterir ve kısa sürede tamamlanır (Özen *et al.*, 2004).

Tayin işlemleri gerçekleştirilirken şu prosedür uygulandı: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL dolduruldu. Bütün tüplerin hacmi saf su ile 0,1 mL'ye tamamlanarak ve tüplerin hacmi Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile 5 ml'ye tamamlanıp ve vortex ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 595 nm'de 2 mL'lik küvetlerde absorbans değerleri köre karşı okundu. Kör olarak 0,1 ml saf su ve 4900 ml G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Saf enzim çözeltilerinden üç ayrı tüpe sırasıyla 100 µl alınarak üzerlerine 4900 ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırılarak 10 dakikalık bir inkübasyonun ardından 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Protein miktarlarını belirlemek için bu işlem 3 defa tekrarlanıp 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanarak protein miktarları belirlendi.

3.2.6. SDS Jel Elektrofrez

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE), ayırma jeli %8'lik ve yükleme jeli %5'lik olacak şekilde hazırlanarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Sambrook *et al.*, 1989). Temizlenen cam plakalar arasına dökülen ayırma jelinin donmasının ardından yükleme jeli döküldü. Hazırlanan jel donduktan sonra elektrofrez tankına yerleştirildi ve tank, önceden hazırlanan SDS yürütme tamponuyla dolduruldu. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde protein miktarı 15-20 µg olacak şekilde SDS yürütme boyası ile karıştırıldı. Örnekler, 95 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'da, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika boyunca 25 mA'da yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve hazırlanan boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak yaklaşık 2 saat

boyandı. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise, boya uzaklaştırma çözeltisiyle yaklaşık 2-3 saat yıkandı. Bantları görünür hale getirilen jel fotoğraflanarak kaydedildi.

3.2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyen %5'lik yükleme jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak hazırlandı ve arasına boşluk oluşturmak için plastik aparat yerleştirilen cam plakalar arasına hiçbir hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dolduruldu. İçerisinde protein miktarı 15-20 µg olacak şekilde, doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp mikropipet yardımıyla önceden bir tarak ile oluşturulmuş kuyucuklara yüklendi. Tank, doğal elektrofrez yürütme tamponuyla dolduruldu. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de, sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Jel, elektrofrez tamamlanmasının ardından bandın görülebilmesi için 1 gece boyama çözeltisi içerisine bırakıldı. Ertesi gün boya çıkarıcı çözelti ile boyası çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

3.2.8. Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar

PFO enziminin kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla optimum pH ve sıcaklık katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak belirlendi. Ayrıca PFO enziminin ısı ve pH kararlılığı, bazı metal iyonlarının PFO enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Protein tayini yapıldı. K_m ve V_{max} değerleri tayin edildi ve ayrıca farklı inhibitörler kullanılarak, optimum şartlarda, I_{50} ve K_i değerleri bulundu.

3.2.8.a. Substrat özgünlüğü

Saflaştırılan enzimin substrat özgünlüğünü tespit etmek amacıyla 100 mM olarak hazırlanan katekol, 4-metil katekol ve L-Tirozin substratları varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Bu sayede enzimin çalıştığı en etkin substrat tespit edildi.

3.2.8.b. PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

PFO enzim aktivitesinin pH ile değişimini incelemek için yapılan çalışmada, 50 mM glisin-HCl (pH 3,0), 50 mM sodyum asetat (pH 4,0-5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0-7,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponları ve substrat olarak katekol ve 4-metil katekol kullanılarak reaksiyon hızları belirlendi. PFO enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH

değerleri optimum pH olarak belirlendi, sonuçlar %Bağıl aktivite-pH olarak grafikte gösterildi (Şekil 4.6).

3.2.8.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesinde standart reaksiyon karışımı 0-90 °C aralığında ve 10 °C'lik artışlarla değişen sıcaklık değerlerinde 5 dk bekletildikten sonra üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek bulunmuştur. PFO aktivitesi en hızlı şekilde ölçülüp, en yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık optimum sıcaklık değeri olarak kabul edilmiştir.

3.2.8.ç. PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat konsantrasyonunun PFO aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan analizlerde, son konsantrasyonu 0,0625-20 mM aralığında değişen 4-metil katekol ve katekol substratları kullanıldı. Optimum koşullarda enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan reaksiyon karışımı hazırlanıp enzim aktivitesi tayini gerçekleştirildi. Aktivite tayinini sonuçlarına göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlendi (Lineweaver and Burk, 1934).

3.2.8.d. PFO enziminin pH kararlılığının incelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla 0,05 M'lık pH'sı 3,0 olan glisin-HCl tamponu, pH'sı 5,0 sodyum asetat tamponu, pH'sı 6,0 ve 7,0 olan 0,05 M olan fosfat tamponu ve pH'sı 8,0 olan 0,05 M Tris-HCl tamponu hazırlandı ve saf enzim elüatı bu tamponlarla 1:1 oranında (500 µL: 500 µL) karıştırılıp ilk okuma yapıldıktan sonra 4 °C'de 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat inkübe edildi. Aktivite ölçümlerinde optimum pH ve sıcaklığa sahip tamponlar kullanıldı ve her ölçümün ardından enzimin yüzde kalan aktivitesi belirlendi. Her pH değeri için % kalan aktiviteye karşı zaman grafiği çizildi ve enzimin en stabil olduğu pH değeri belirlendi.

3.2.8.e. PFO enziminin ısıl kararlılığının incelenmesi

PFO'nun ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, yeterli miktarda ependorf tüplerine alınan saf enzim elüatı, 0-60 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla 15 dakikada bir ölçüm alınarak, toplam 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından saf enzim elüatında, optimum

koşullarda aktivite tayini yapıldı. % kalan aktivite aynı şartlarda inkübasyona tabi tutulmayan saf enzim elüatının aktivitesiyle karşılaştırılarak hesaplandı.

3.2.8.f. PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisini incelemek ve I_{50} değerini belirlemek amacıyla, PFO'nun bilinen inhibitörlerinden L-askorbik asit, Sitrik asit, Sodyum metabisülfid ve sorbik asit kullanıldı. Optimum koşullarda yapılan analizlerde 4-metil katekol substratının 100 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. İnhibitörsüz kontrol enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Her bir inhibitör konsantrasyonuna karşı %Kalan aktivite grafiği çizildi ve %50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu, I_{50} değeri olarak belirlendi.

3.2.8.g. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Bazı metal iyonlarının PFO aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ve optimum koşullarda aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.ğ. PFO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin bulunması

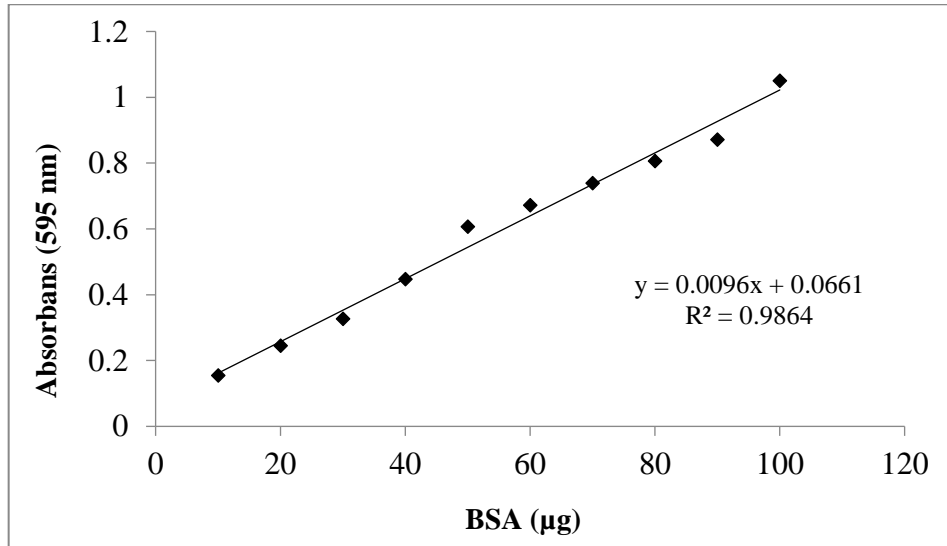
İnhibitör çalışmaları için, Iğdır Kırmızı Kışmış üzümünden elde edilen PFO enzimini inhibe eden Askorbik asit ($C_6H_8O_6$), Sitrik asit ($C_6H_8O_7$), Benzoik asit ($C_7H_6O_2$) ve Sodyum metabisülfid ($Na_2S_2O_5$) maddeleri kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde yapılan ön çalışmayla her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak tespit edildi. Daha sonra üzümünden saflaştırılan PFO enzimleri için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda V-[S] değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Lineweaver and Burk, 1934).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamızda enzimatik esmerleşme reaksiyonlarından büyük ölçüde sorumlu polifenol oksidaz (PFO) enziminin Iğdır ekolojik koşullarında yetişen antik bir üzüm çeşidi olan KIRMIZI KİŞİMİŞ üzümünden (*Vitis Vinifera* L.) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kinetik özelliklerinin tayini yapılmıştır. Enziminin saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmaları sonucu elde edilen bulgular aşağıda başlıklar halinde verilmiştir.

4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

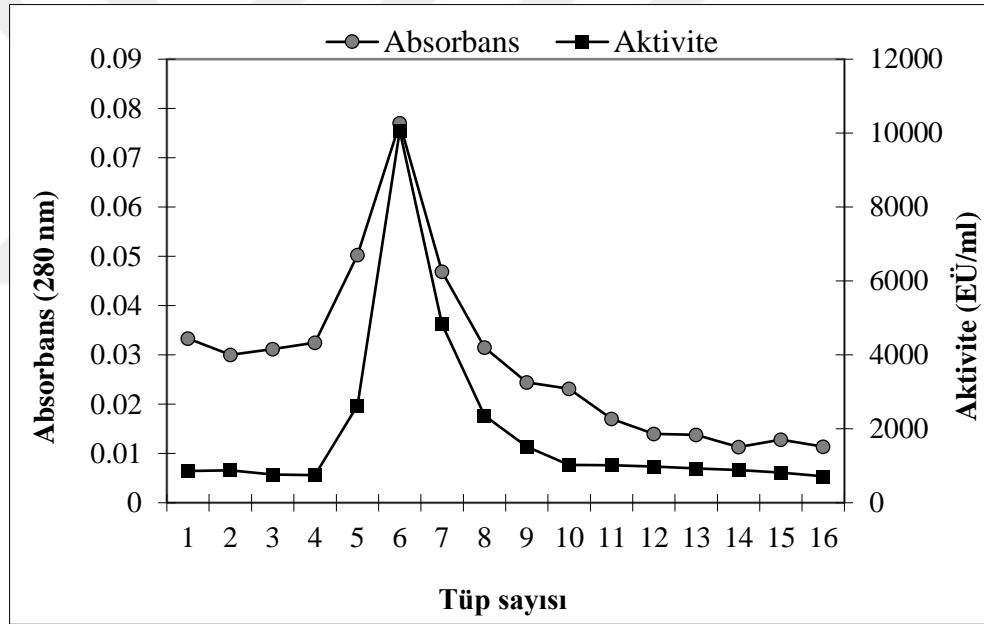
KIRMIZI KİŞİMİŞ üzümünden elde edilen ham ekstrakt, aseton çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile elde edilen saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu amaçla standart grafik bölüm 3.6.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Çizilen standart grafiğe bakılarak ham ekstrakt, aseton çöktürmesi ve saf enzim içerisindeki protein miktarları hesaplandı. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbands değerleri aşağıda gösterildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumin)

4.2. PFO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Kırmızı Kışmış üzümünden Bölüm 3.3’de anlatıldığı şekilde Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit jeli sentezlenerek yapılan afinite kromatografisi sonucu, toplanan elüatlarda spektrofotometrik olarak 280 nm’de Walburg metodu ile kalitatif protein tayini ve 496 nm’de 4-metil katekol substratı ile enzim aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen aktivite ve absorbens değerleri tüp numarasına karşı grafiğe aktarıldı (Şekil 4.2). Grafikte tek bir pik görülmesi, PFO’nun grafikte belirtilen fraksiyon numaralı tüplerde saf olarak toplandığını göstermektedir.



Şekil 4.2. PFO'nun afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği

1'den 16'ya kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine 2 mL halinde elüatlar toplandı. 496 nm’de spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gözlenen tüpte Bradford metoduna göre protein tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları hesaplandı. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi ham enzim özütünde spesifik PFO aktivitesi 15.289 U/mg protein, saf enzim elüatında spesifik aktivite 936.186 U/mg protein olarak hesaplandı. Bu verilere göre PFO’nun 61,23 kat saflaşmış olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.1. Iğdır Kırmızı Kışmış Üzümünden (*Vitis Vinifera* L.) PFO Enziminin Saflaştırma Tablosu

| Saflaştırma Basamağı | Hacim (mL) | Aktivite (U/mL.dak) | Toplam Aktivite | Protein (mg/mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Verim | Saflaştırma Katsayısı |
|----------------------|------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------------|-------|-----------------------|
| Ham Enzim Özütü | 110 | 10.349 | 1.138.445 | 679,6 | 74,46 | 15.289 | 100 | 1 |
| Aseton Çöktürmesi | 12 | 17.078 | 240.936 | 74,77 | 0,8972 | 268.530 | 21,16 | 17,56 |
| Saf Enzim Elüatı | 2 | 6.076 | 12.152 | 10,77 | 0,0215 | 936.186 | 1,76 | 61,23 |

Enzimin saflaştırma işleminde kullanılan Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli Arslan ve çalışma arkadaşları tarafından hazırlanan jel sentezleme yöntemi kullanılarak yapıldı (Arslan *et al.*, 2004). Iğdır Kırmızı Kışmış üzümünden (*Vitis Vinifera* L.) PFO enzimi, sentezlenen afinite jeli kullanılarak %1,76 verimle 61,23 kat saflaştırıldı. Ham enzim ekstraktının spesifik aktivitesi 15,289 U/mg protein, aseton çöktürmesi sonrası özütün spesifik aktivitesi 268,530 U/mg protein ve afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 936,186 U/mg protein olarak hesaplandı.

Benzer çalışmalarda PFO, afinite kromatografisi yöntemi ile Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak, dut meyvesinden (*Morus alba* L.) 74,20 kat (Arslan *et al.*, 2004), *Lactarius piperatus* L. mantarından 13,9 kat (Öz *et al.*, 2013), *Boletus erythropus* mantarından 28,5 kat (Özel *et al.*, 2010), fesleğenden (*Ocimum basilicum* L.) 11,5 kat (Doğan *et al.*, 2005), yaban armudundan (*Pyrus elaeagnifolia*) 31,50 kat (Ülker Yerlitürk *et al.*, 2008) ve *Macrolepiota gracilentia* mantarından 65,3 kat (Kolcuoğlu, 2012) saflaştırılmıştır.

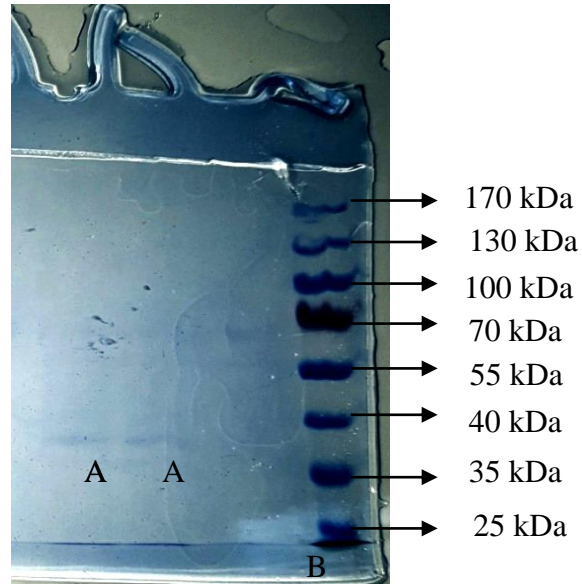
Farklı saflaştırma yöntemleri ile polifenol oksidaz enzimi erikten (*Prunus domestica*) amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile 32,81 kat saflaştırmıştır (Ionita *et al.* 2017). Kumar *et al.* (2008) çalışmalarında polifenol oksidaz enzimini Bardabos kirazından amonyum sülfat çöktürmesi phenyl Sepharose gel filtration kolonu ve Afinite kromatografisi metodu ile %8,3 verimle 60 kat saflaştırmışlardır. Rapeanu *et al.* (2006) çalışmalarında viktorya üzümünden (*Vitis*

vinifera ssp. Sativa) Triton X-100 ve PVP kullanarak %30-90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından diyalizle izole ettikleri polifenol oksidaz enzimini %8,1 verimle 135 kat saflaştırmışlardır. Polifenol oksidaz enzimi Borage bitkisinden (*Trachystemonorientalis* L.) t-butanol ve amonyum sülfat kullanarak üçlü faz ayırma tekniği ile %68,75 kat verimle 3,59 kat saflaştırılmıştır (Alıcı and Arabacı, 2016).

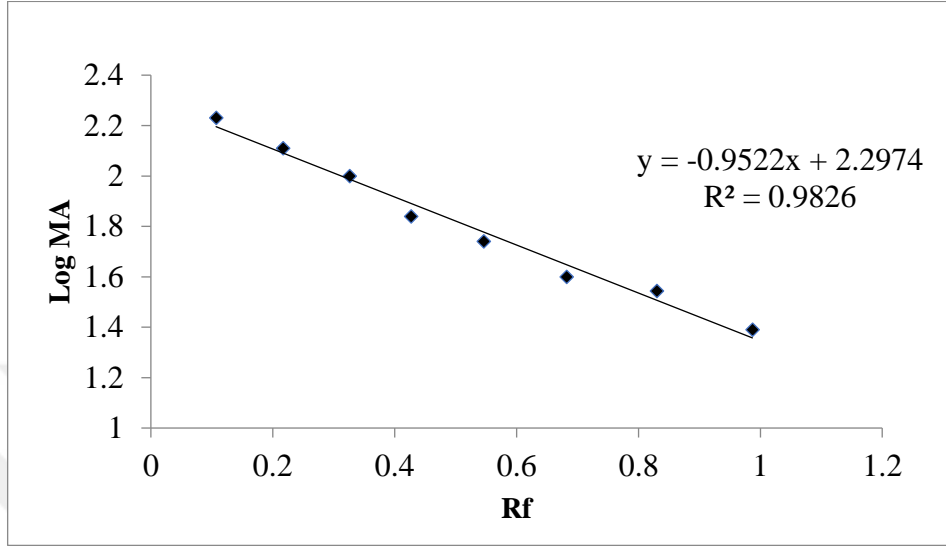
4.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.3.1. Polifenol oksidazın elektroforetik olarak karakterizasyonu

Afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan enzimde PFO varlığının belirlenmesi amacıyla doğal ve SDS-PAGE elektroforez yöntemi uygulandı. Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde hazırlanan %5-8’lik SDS poliakrilamid jel elektroforezine saflaştırılan PFO enzim elüatları tatbik edildi ve coomassie brillant blue R-250 boyama işlemi uygulanarak protein bantları belirgin hale getirildi. Saf enzime ait protein bandı standart protein bantlarıyla karşılaştırıldığında yaklaşık 38,01 kDa’ya karşılık gelen bir protein bandı değeri bulundu. Protein bantları içeren jeller fotoğraflanıp kaydedildi (Şekil 4.3).

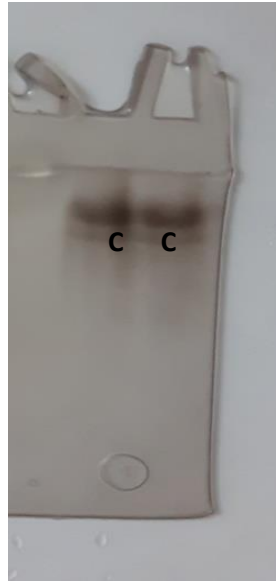


Şekil 4.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi, A: Saf Enzim Elüatı, B: Protein Standartı



Şekil 4.4. Kırmızı Kışmış Üzümünden saflaştırılan PFO için SDS-PAGE yöntemiyle protein molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.

PFO'nun varlığı doğal elektroforezle SDS'siz ve soğuk ortamda tespit edildi. Sentezlenen jele saf enzim elüatı yüklendi ve ardından elektrik alanda yürütülen jel, substrat boyama çözeltisi (L-DOPA) ile boyandı. Oluşan bantlar jel görüntüleme cihazıyla kaydedildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Doğal-poliakrilamid Jel Elektroforezi (C:Substrat boyama 24 mM L-DOPA)

Saflaştırdığımız bu enzimde tek bant bulduğumuzdan dolayı enzimin molekül ağırlığının 38,01 kDa olduğunu kesin olarak söyleyebiliriz. Bu sayede HPLC veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılıp, Kırmızı Kışmısten saflaştırılan PFO'nun alt birimlerinin kontrolüne gerek duyulmamıştır.

Ionita *et al.* (2017) çalışmalarında erikten (*Prunus domestica*) amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemi ile kısmen saflaştırdıkları polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlığını 65 kDa olarak tespit etmişlerdir. Kumar *et al.* (2008) bardabos kirazından saflaştırdıkları polifenol oksidaz enziminin, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak 52 ve 38 kDa molekül ağırlığında iki alt birimi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin saflığını kontrol etmek için yapılan doğal-PAGE ile belirgin tek bir bant gözlemlemişlerdir. Gawlik-Dziki *et al.* (2007) bir marul türünde (*Lactuca sativa var. capitata* L.) uyguladığı kromatografik ayırmalarda elde edilen enzim denatüre edici koşullar altında elektroforetik olarak analiz edilmiş ve SDS-PAGE üzerinde, 60 kDa'lık bir moleküler ağırlığa karşılık gelen tek bir bant görülmüştür. Üçlü faz ayırma metodu kullanılarak Borage bitkisinden saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlığı SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile 80 kDa olarak tespit edilmiştir yine DOĞAL-PAGE ile yapılan 4-metilkatekol substrat boyama sonucu enzimin 2 izoenzimi olduğu tespit edilmiştir (Alicı and Arabacı, 2016).

4.3.2. Polifenol oksidaz aktivitesinin spektroskopik olarak karakterizasyonu

Afinite kromatografisi yöntemiyle Iğdır Kırmızı Kışmı (*Vitis Vinifera* L.) üzümünden saflaştırılan PFO enzimi için en yüksek aktivite gösterdiği substratı bulmak amacıyla katekol, 4-metil katekol, L-tirozin substratları eşliğinde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. En iyi aktiviteyi 4-metil katekol varlığında gösterdiği belirlendi. Katekol ve L-Tirosin substratları varlığında aktivitenin 4-metil katekole göre daha düşük olduğu tespit edildi (Çizelge 4.2). Daha sonra yapılan karakterizasyon çalışmalarında substrat olarak 4-metil katekol kullanıldı.

Çizelge 4.2. Serbest enzimin substrat özgünlüğü.

| Substrat adı | Serbest PFO bağlı aktivite (%) |
|-----------------|--------------------------------|
| 4-metil katekol | 100 |
| Katekol | 41,69 |
| L-Tirozin | 2,95 |

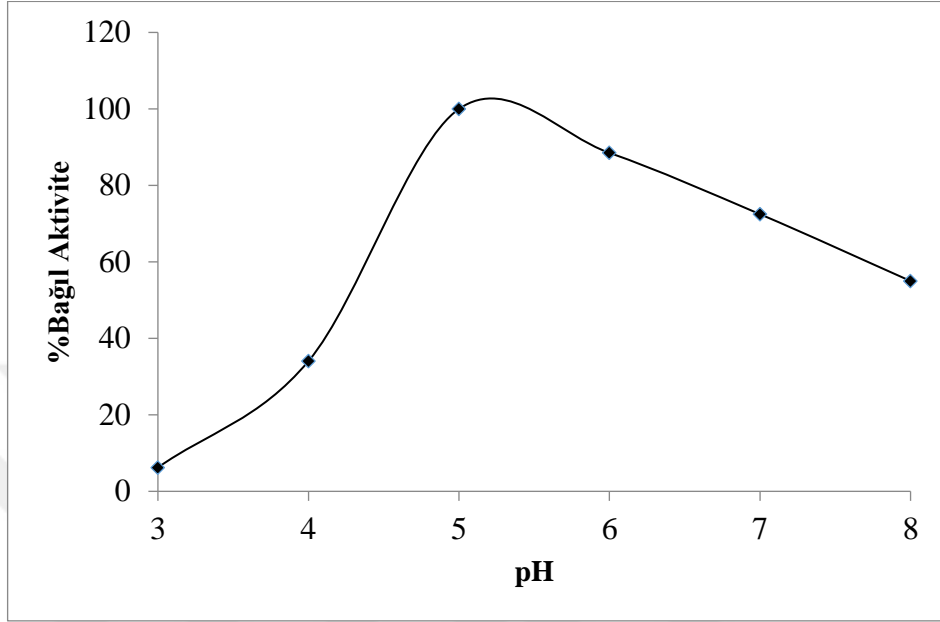
PFO enziminin biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları aşağıdaki başlıklar halinde incelenmiştir.

4.3.2.a. PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Kırmızı Kışmış üzümünden Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırdığımız polifenol oksidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla 50 mM glisin-HCl (pH 2,0 ve 3,0), 50 mM sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0 ve 7,0), ve 50 mM Tris- HCl (pH 8,0) tamponları kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri katekol ve 4-metil katekol substratı varlığında yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak %Bağlı aktivite-pH grafiği çizildi (Çizelge 4.3). Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri, optimum pH olarak tespit edildi. Bundan sonraki çalışmalarda aktivite tayinleri optimum pH değerlerinde gerçekleştirildi.

Çizelge 4.3. 4-metil katekol substratının farklı pH'larda gösterdikleri aktivite değerleri (Aktivite değerleri birim U/mL.dak'dır.)

| pH | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------|----|-----|------|------|-----|-----|
| Substrat | | | | | | |
| 4-metil katekol | 84 | 459 | 1348 | 1193 | 977 | 741 |



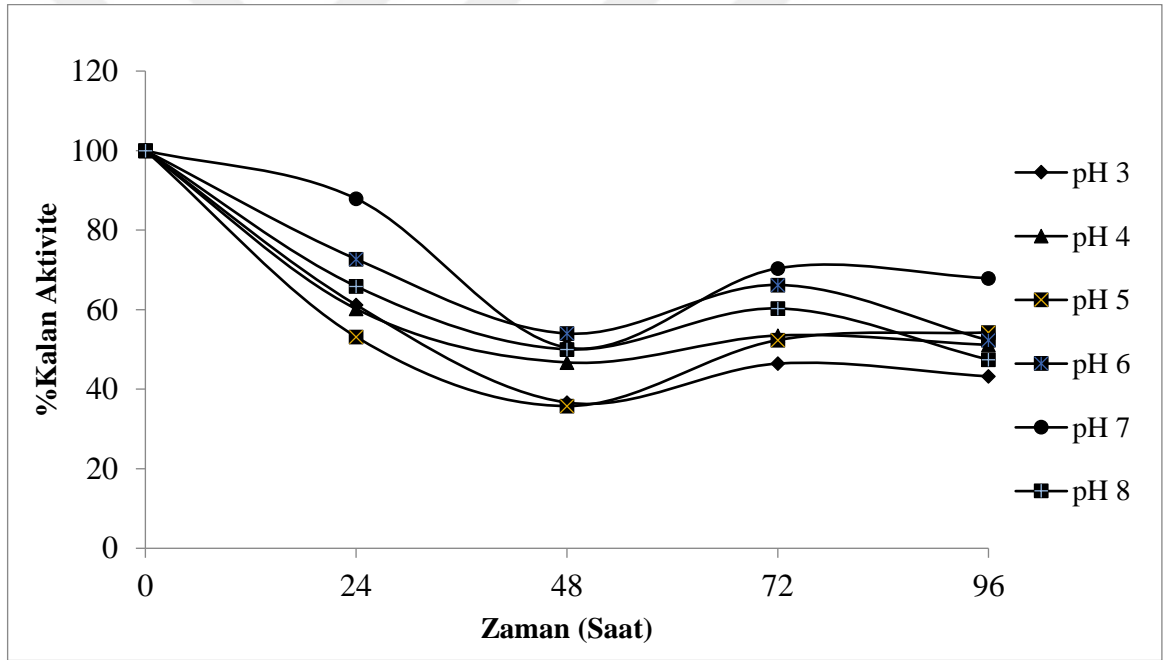
Şekil 4.6. 4-metil katekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişim grafiği

Benzer çalışmalarda; Siddiq and Dolan (2017) blueberry bitikisinden ekstrakte ettikleri polifenol oksidaz enzimi ile yaptıkları optimum pH çalışmasında enzimin optimum pH değerini sodyum fosfat tampon çözeltisi kullanarak 6,1 ve sitrat fosfat tampon çözeltisi kullanarak 6,3 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmalarında optimum pH değerine kadar enzim aktivitesinin kademeli bir şekilde arttığı ancak bu değerden sonra belirgin bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Rapeanu *et al.* (2006) çalışmalarında Viktorya üzümünden (*Vitis vinifera ssp. Sativa*) amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleri ile ekstrakte ettikleri polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerini incelemişler ve 10 mM katekol substratı için optimum pH değerini pH:5,0 olarak tespit etmişlerdir.

Ünal *et al.* (2006) Sultaniye üzümünden (*Vitis vinifera L. cv. Sultana*) kısmi saflaştırdıkları PFO enziminin kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarda, optimum pH belirlemek için 0,2 mM katekol substratı kullanarak 3,0-5,4 pH aralığında aktivite tayinleri yapmışlardır. Elde edilen bulgulara göre pH'nın 3,4 olduğu durumda enzimin en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

4.3.2.b. PFO enziminin pH kararlılığının incelenmesi

İğdır Kırmızı Kışmış üzümü PFO'su, farklı pH değerlerinde 4 °C'de, 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat inkübasyona tabi tutulup % kalan aktiviteye karşı pH kararlılık grafiği çizilmiştir (Şekil 4.7). Enzimin en yüksek kararlılık gösterdiği pH değeri 7,0 olarak tespit edilmiştir. Enzimin pH 7'de 96 saat sonunda aktivitesinin %67,91'lik kısmının korunduğu gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinin en fazla kaybolduğu pH değerleri pH 3 ve pH 8 olup ve bu kayıp değerlerinin sırasıyla %56,77 ve %52,55 oranında olduğu belirlenmiştir.



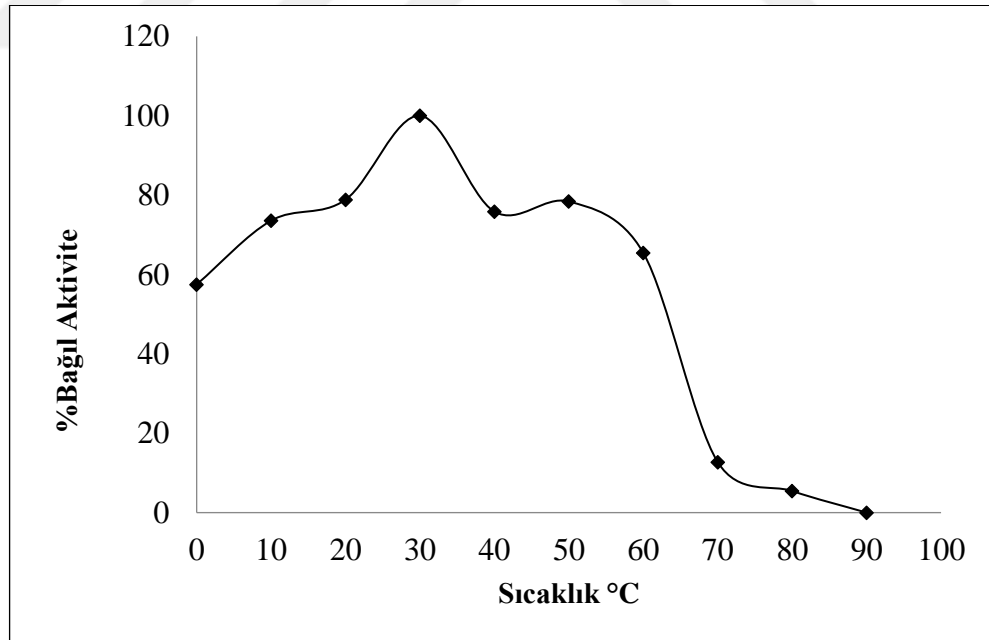
Şekil 4.7. Kırmızı Kışmış üzümü PFO'sunun pH kararlılığı

Kumar *et al.* (2008) Barbados kirazından (*Malpighia glabra* L.) elde ettikleri PFO enzimi için kinetik çalışmalar yürütmüşlerdir. Elde ettikleri PFO'nun pH kararlılığını hesaplamak için enzimi 24 saat uygun tampon çözeltileri içinde 4 °C'de bekletmişlerdir. İnkübasyon sonucu katekol substratı varlığında yapılan ölçümlerde pH'nın 5,5-8,0 değerleri arasında olduğu durumlarda enzim aktivitesinin %72 kadar bir oranla korunduğu gözlemlenmiştir.

4.3.2.c. PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzimler belirli sıcaklarda en verimli çalışır buna optimum sıcaklık denir. Her enzim için farklılık gösterir. Hatta belirli sıcaklığı geçince denatürasyon başlar. Bu çalışmada İğdır Kırmızı Kışmış üzümünden saflaştırılan PFO enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla katekol substratıyla 0-90 °C aralığında enzim aktivitesi ölçüldü. Enzimim maksimum aktivite değeri 30 °C olarak belirlendi. 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesinde giderek azalma, 80 °C üzeri sıcaklıklarda enzimin aktivitesini büyük oranda kaybettiği gözlemlendi.

Yapılan ölçümler sonucu enzim aktivitesini 0-20 °C aralığında %70 civarında koruduğu gözlenmiştir. 60 °C sıcaklıkta enzim aktivitesi %65 civarında koruduğu gözlenmiş ve 70 °C' de ise enzim aktivitesini %12 civarında koruduğu, 80 °C sıcaklıkta enzim aktivitesi yok denecek kadar azaldığı görülmüştür.



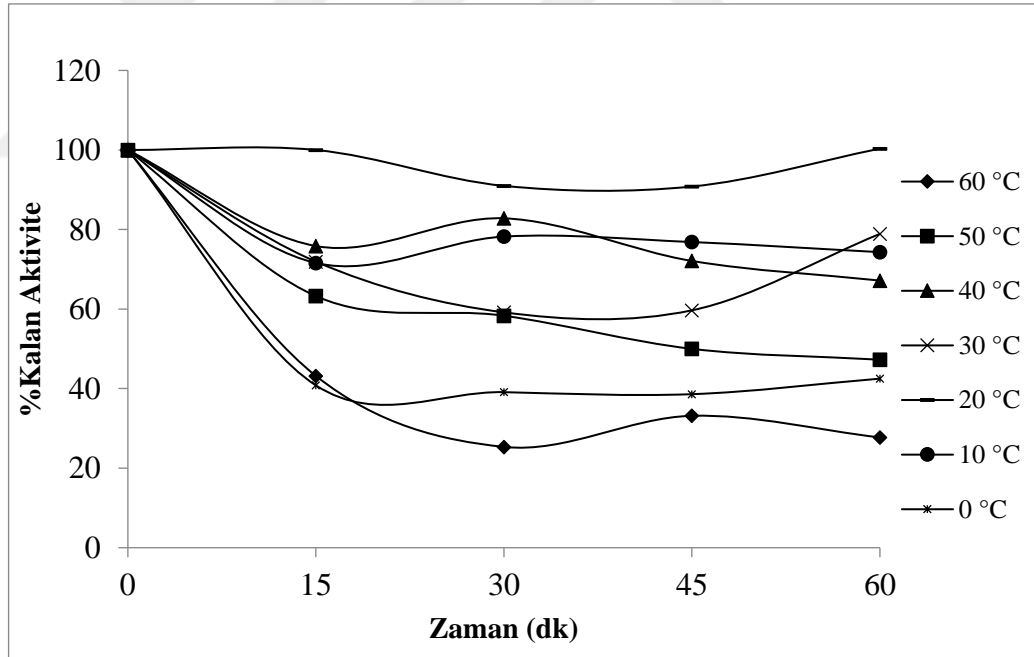
Şekil 4.8.Kırmızı Kışmış üzümü PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

PFO aktivitesi için optimum sıcaklık, enzim kaynağına ve çalışmalarda kullanılan substrata bağlı olarak büyük değişkenlik göstermektedir (Yoruk and Marshall, 2003). Farklı kaynaklardan rapor edilen optimum sıcaklık değerleri muz PFO'su için 30 °C (Ünal, 2007),

Barbados kirazı (*Malpighia glabra* L.) PFO'su için 40 °C (Kumar *et al.*, 2008), üzüm PFO'su için 45 °C (Ünal and Şener, 2014). Elde ettiğimiz sonuçlar bu değerlerin arasındadır.

4.3.2.ç. PFO enziminin ısıl kararlılığının incelenmesi

Afinite kromatografisi yöntemiyle *Vitis Vinifera* L. üzümünden saflaştırılan PFO enzimi üzerinde yapılan sıcaklık çalışmalarında optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla 0-60 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla inkübasyon yapıldı. İnkübasyon 15'er dakika aralıklarla toplam 1 saat sürdü. Her 15 dakika sonunda 4-metil katekol substratı varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Ardından elde edilen sonuçlara göre ısıl kararlılık grafiği çizildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PFO enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık grafiği

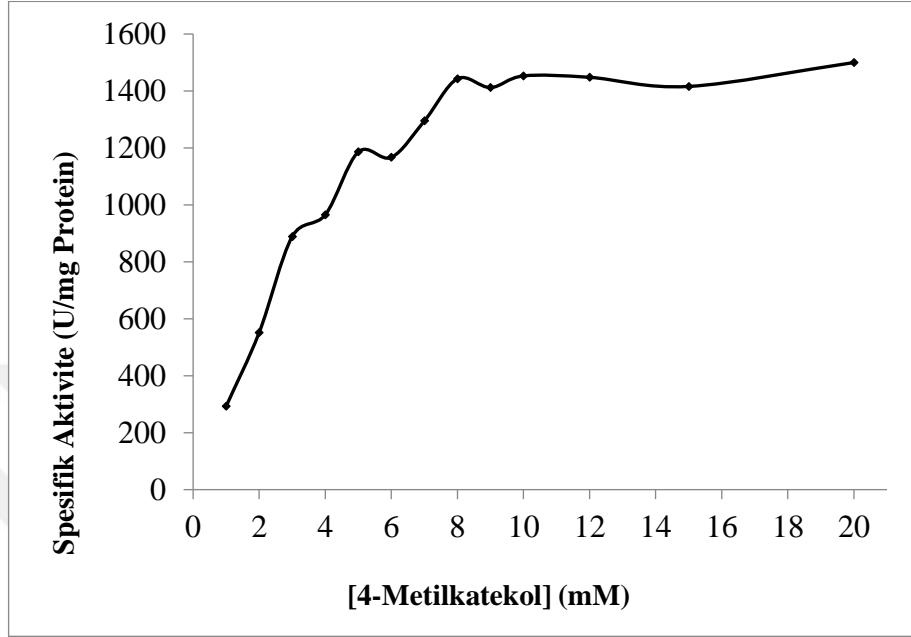
Elde edilen verilere göre 0-40 °C aralığında 1 saat sonunda enzimin aktivitesini koruduğu, 50 °C ve 0 °C'de enzim aktivitesinde 1 saatin ardından %50 seviyelerinde bir azalmanın olduğu ve 60 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda enzimin aktivitesinin %40 seviyesinde azalma gösterdiği gözlenmiştir. 20 °C sıcaklıkta tüm zaman aralıklarında yapılan ölçümlerde ise enzim aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğu tespit edilmiştir.

Yeşil fasulyeden saflaştırılan PFO'nun ısıl kararlılığını belirlemek için yapılan çalışmada, enzimin aktivitesini 0-40 °C aralığında 30 dakikalık inkübasyon sonunda neredeyse tamamen koruduğu tespit edilmiştir. Isıl kararlılığın kullanılan enzim kaynağına göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir (Guo *et al.*, 2009).

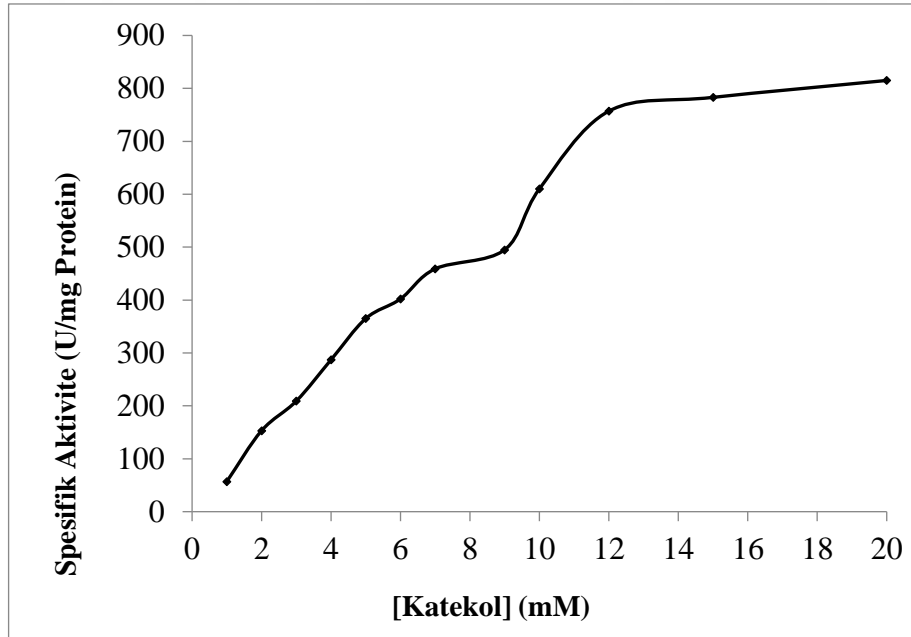
PFO enziminin ısıl kararlılığı incelemek için yapılan çalışmalarda 60 °C ve 70 °C de inkübe edilen enzimin ilk 10 dakikada aktivitesinin neredeyse yarısının kaybolduğunu belirtmişler (Orenes-Pinero *et al.*, 2006; Ünal, 2007). Altın çilekten saflaştırılan PFO için yapılan ısıl kararlılık çalışmasında enzimin 70 °C'de 30 dakika inkübasyonu sonucunda 4-metil katekol substratı eşliğinde aktivite hesaplandığında orijinal aktivitesinin %70 oranında kaybettiği, klorojenik asit substratı eşliğinde aktivite hesaplandığında aktivitesinin %80 oranında kaybettiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada 80 °C'de 30 dakika inkübe edilen enzimin orijinal aktivitesini %10 oranında koruduğu bildirilmiştir (Bravo and Osorio, 2016).

4.3.2.d. PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

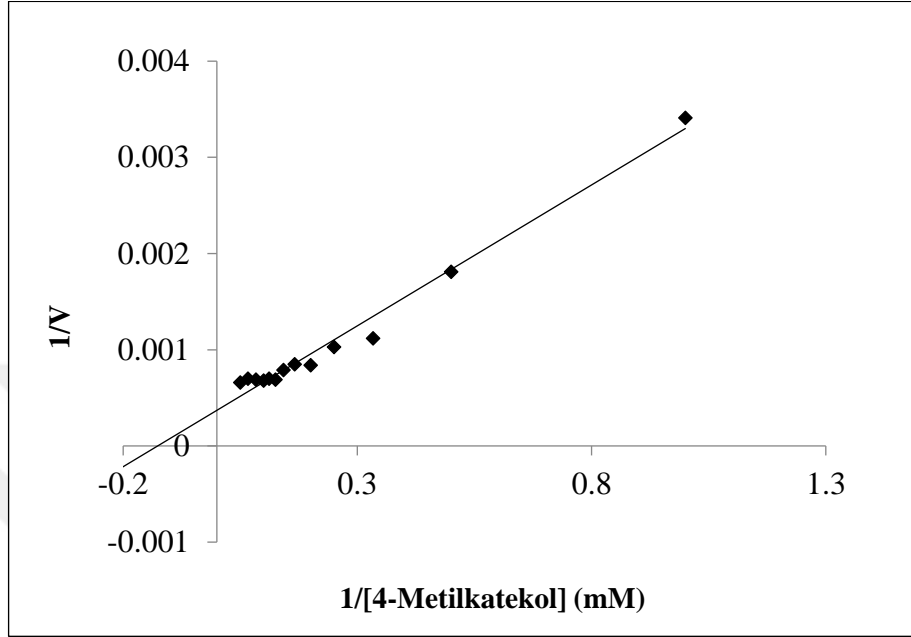
Kırmızı Kişmiş üzümünden saflaştırılan PFO enzimi için bazı kinetik parametrelerin belirlenmesi amacıyla nihai konsantrasyonu 1-20 mM aralığında değişen katekol ve 4-metil katekol substratları varlığında enzim aktivitesi tayini yapıldı. Enzim aktivitesi 4-metikatekol substratı varlığında 496 nm'de, katekol substratı varlığında 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, substrat doygunluğunu belirten Michaelis-Menten eğrileri çizildi (Şekil 4.10 ve 4.11). Çizilen bu grafiklere bakılarak, saflaştırdığımız PFO enzimi aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu görüldü. Etkin bir enzim aktivitesi elde etmek için 4-metil katekol substrat konsantrasyonunun 8 mM, katekol substrat konsantrasyonunun da 12 mM olması gerektiği belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri, kinetik verilerin belirlenmesi amacıyla çizildi ve bu grafikten Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri belirlendi.



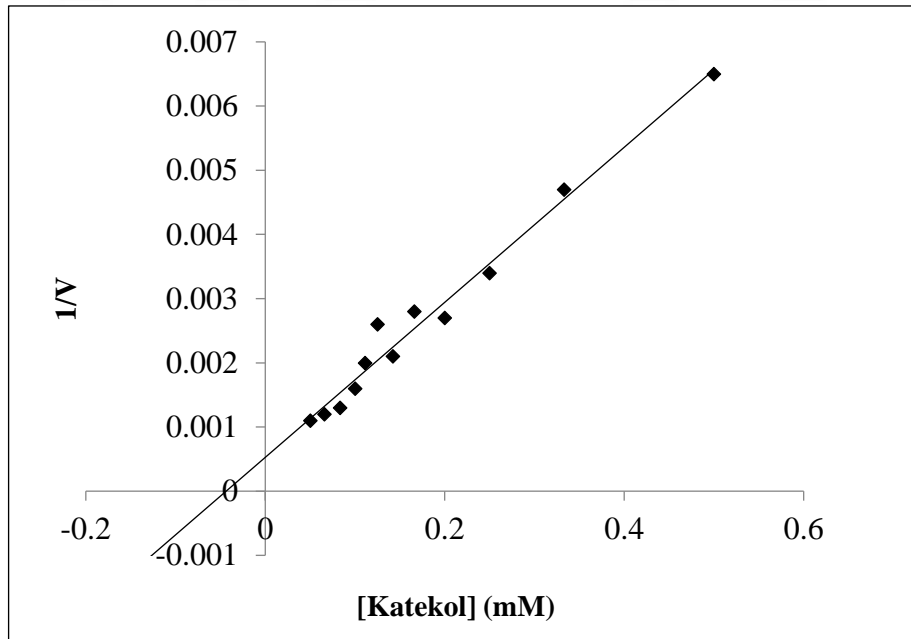
Şekil 4.10. 4-metil katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.11. Katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.12. 4-metil katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği



Şekil 4.13. Katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

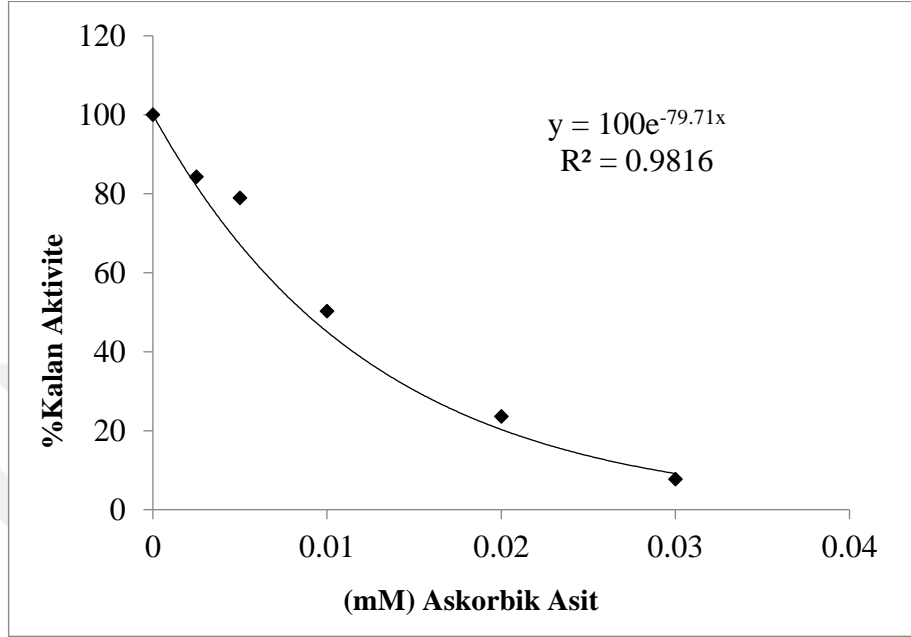
Enzim konsantrasyonu sabit tutulup, farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen substrat-doygunluk grafiğine bakılarak, Kırmızı Kışmışi üzümü PFO'sunun basit

Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu görülmüştür. Grafiklere bakılarak enzimin optimum substrat konsantrasyonunun 4-metil katekol için 8 mM ve katekol için 12 mM olduğu, bu konsantrasyon değerlerinde enzimin substratına doydugu ve bu değerlerin üzerinde enzim aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. PFO enziminin difenolik substratları olan 4-metil katekol ve katekol varlığında kinetik parametreleri Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri 4-metil katekol için 7,25 mM ve 2500 U/mL.dak protein olarak ve katekol için ise 24,21 mM ve 2000 U/mL.dak protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Elde edilen bu verilere bakılarak bu enzimin 4-metil katekole olan spesifikliğinin daha fazla olduğu söylenebilir.

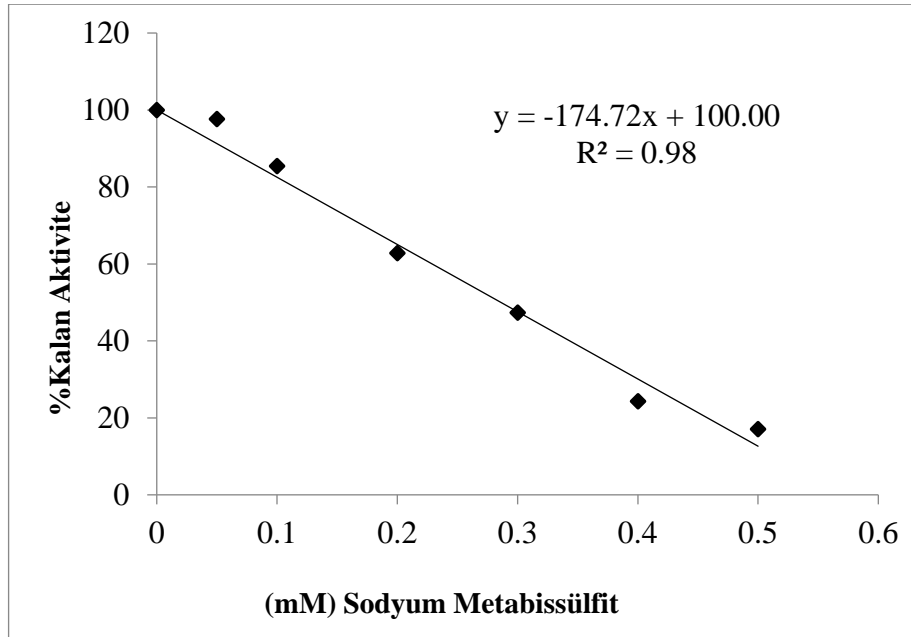
Benzer çalışmalarda PFO enzimi aktivitesinin 4-metil katekol varlığında K_m değerlerinin Amasya elmasında 3,1 mM (Doğan and Doğan, 2004), *Euterpe edulis*'te 2.0 mM (Lourenço *et al.*, 2006), patlıcanda 3.24 mM (Concellon *et al.*, 2004), *Portabella* mantarında 2.1 mM (Xiaodong and Flurkey, 1997), ayvada 4.54 mM (Yağar and Sağıroğlu, 2002), Wolf's elmasında (*Solanum lycocarpum*) 0,15 mM (Batista *et al.*, 2014), Trabzon hurmasında 14,6 mM (Özen *et al.*, 2004) olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2.e. PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

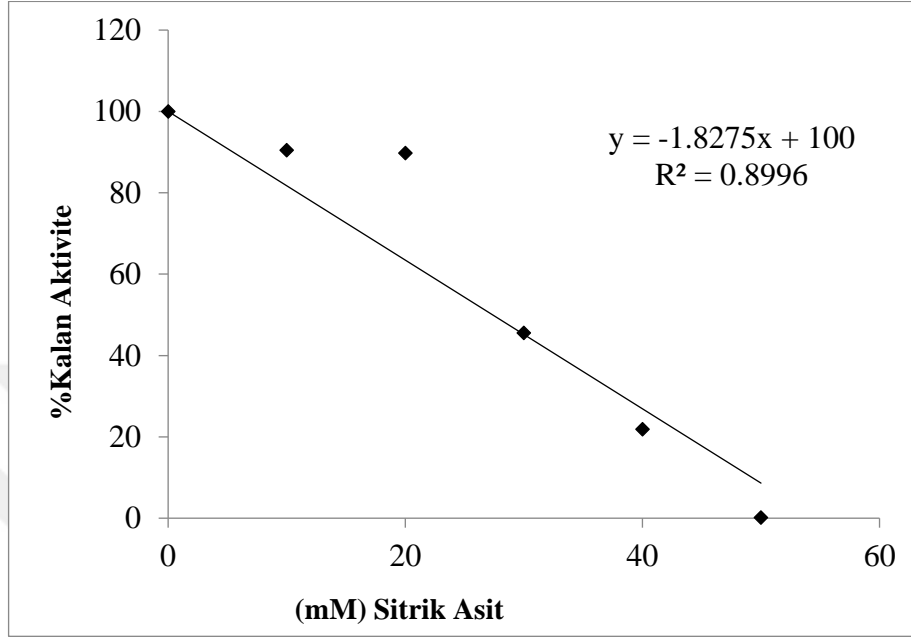
İnhibitör etkisinin *Vitis Vinifera* L.'dan saflaştırılan PFO enzimi üzerine etkisini incelemek üzere, enzimin yaygın inhibitörlerinden olan askorbik asit, sitrik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit kullanıldı. İnhibitor yokluğunda ve ön denemelerle belirlenen inhibitör konsantrasyonlarında 4-metil katekol substratı ile 496 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. Kontrol numunesi olarak inhibitörsüz enzim numunesi alındı ve aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Her bir inhibitör için konsantrasyona karşılık %Kalan aktivite grafikleri çizildi. Enzimin aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu I_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 4.14).



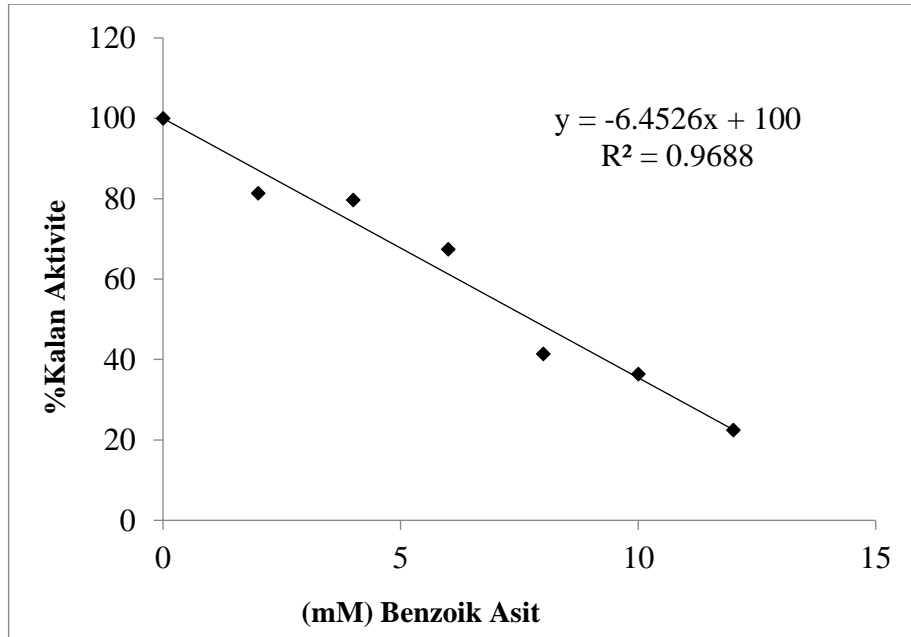
Şekil 4.14. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.15. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfidin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.16. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine sitrik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.17. Kırmızı Kışmış PFO enzim aktivitesi üzerine benzoik asitin etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 4.4. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su aktivitesi üzerine dört farklı inhibitörle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen I₅₀ değerleri

| İnhibitör | I₅₀ |
|----------------------|-----------------------|
| Askorbik asit | 0,0086 mM |
| Sodyum metabisülfite | 0,286 mM |
| Sitrik asit | 27,3 mM |
| Benzoik asit | 7,75 mM |

Elde edilen değerlere bakılarak kullanılan inhibitörler arasından en etkin inhibitörün askorbik asit ve bunun ardından sodyum metabisülfite olduğu belirlenmiştir. Askorbik asitin bu denli etkili olmasının sebebi olarak ortamda bulunan oksijenle daha hızlı reaksiyona girmesi gösterilmiştir (Ros *et al.*, 1993).

Gıda endüstrisinde enzimatik esmerleşme çoğu zaman istenmeyen bir durum olduğu için birçok araştırmaya konu olmuştur. Esmerleşmenin kontrolünde birçok fiziksel ve kimyasal yöntemler bulunsa da günümüzde en çok tercih edilen yöntem ucuz ve kullanımı kolay olduğu için kimyasal anti-browning ajanları kullanımımızdır. Böylece gıdaların işlenmesi veya depolanması ile oluşan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi amaçlanır. Bu nedenle günümüze kadar pek çok araştırmacı polifenol oksidazın inhibisyonu üzerine çalışmıştır. Ancak söz konusu tüketime yönelik gıda maddeleri olduğundan kullanılan inhibitörlerin insan sağlığını tehdit etmeyen, tüketilmesi ile herhangi bir alerjik vb. reaksiyonlara sebep olmayan, gıdanın tekstürünü ve organoleptik özelliklerini etkilemeyen anti-browning ajanları olması önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda gıda maddelerinde kullanılabilen kimyasallar seçilmiştir. Benzer çalışmalarda Rapeanu *et al.* (2006) Viktorya üzümünden elde ettikleri PFO ile yaptıkları inhibisyon çalışmasında inhibitör etkisinin en fazla askorbik asitte olduğunu bunu sırasıyla, L-sistein ve sodyum metabisülfite izlediğini belirtmişlerdir. Gülçin *et al.* (2005) dietil ditiyokarbomat inhibitörünün ısırgan otu PFO'su için en etkili olduğunu belirtmişlerdir. Yine yapılan inhibisyon çalışmasında Anamur muzunu PFO'su için etkili olan inhibitörlerin askorbik asit ve sodyum metabisülfite olduğu belirtilmiştir (Ünal, 2007). Baltas (2016) yaptığı çalışmada metabisülfite, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri için I₅₀ değerlerini sırasıyla 0,0185, 0,0036, 4,0231 ve 0,4653 mM olarak

belirlemiştir. Vanilya fasulyesi PFO'su için en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu ve bunun ardından etkili olan inhibitörün 4-hekzilresorsinol olduğu belirlenmiştir (Walissevski *et al.*, 2009). Mango PFO'su için inhibitör olarak tropolon, sodyum metabisülfid, askorbik asit ve kojik asit kullanılmış ve bu inhibitörlerinin 0,1 mM konsantrasyonunda enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği rapor edilmiştir (Palma-Orozco *et al.*, 2014).

4.3.2.f. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Saf *Vitis Vinifera* L. PFO'su üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek üzere monovalent Na⁺, K⁺, divalent Mg²⁺, Cu²⁺ ve trivalent olarak da Al³⁺ iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. PFO aktivitesindeki değişimler 1 ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda metal iyonları varlığında incelendi. Kontrol olarak metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışımdaki PFO aktivitesi %100 kabul edildi (Çizelge 4.5).

Yapılan çalışmalar sonucunda metal iyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonlarında 4-metil katekol substratı varlığında Kırmızı Kışmış üzümü PFO'sunun aktivitesinde %50'lerde bir kayıp meydana getirdiği gözlenmiştir. Yine 4-metil katekol substratı varlığında 1mM'lık nihai metal iyonları konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerde sırasıyla enzim aktivitelerinde kalan değerler %49,45, %43,95, %34,06, %0,94, %11,61 olarak ölçülmüştür. Buradan da anlaşılacağı üzere sadece Na⁺ metal iyonu varlığında konsantrasyon artırılınca aktivitede bir artış gözlemlenmiştir ve en fazla inhibe edici etki Cu²⁺ metal iyonu varlığında gözlemlenmiştir.

Enzimlerin çoğu, aktivitelerini yerine getirebilmeleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları, farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı geometriye ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu yüzden, proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler (Bock *et al.*, 1999; Di Tusa *et al.*, 2001).

Metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu, enzimin yapısını farklı şekilde etkileyebildiklerinden, aktivasyona veya inhibisyona sebep olma gibi durumlar değişkenlik gösterir (Bock *et al.*, 1999; Di Tusa *et al.*, 2001).

Çizelge 4.5. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

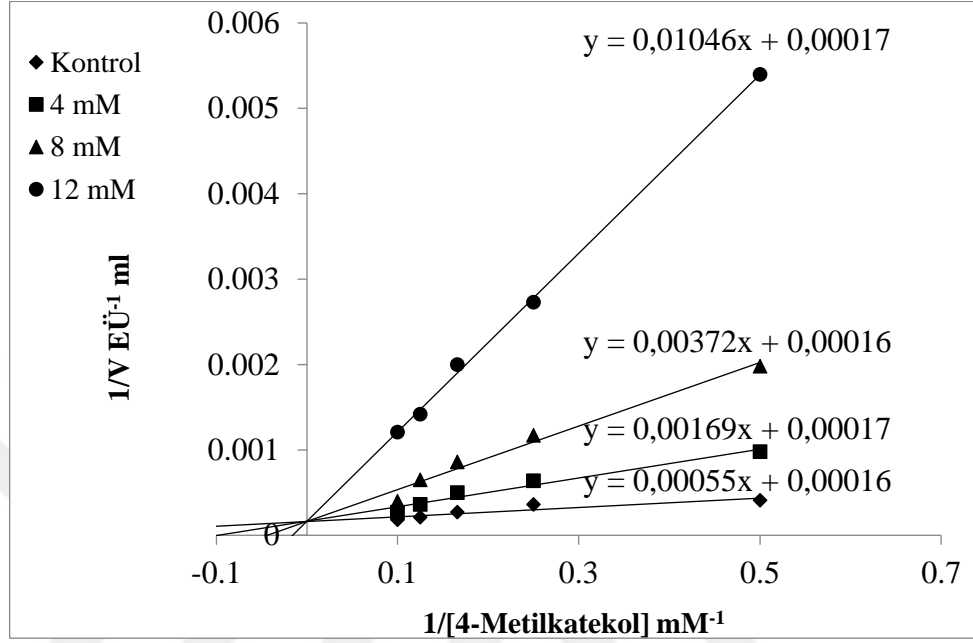
| Metal İyonu | % Kalan Aktivite | |
|------------------|------------------|-------|
| | 1 mM | 10 mM |
| Yok | 100 | 100 |
| Na ⁺ | 44,19 | 49,45 |
| K ⁺ | 50,23 | 43,95 |
| Mg ²⁺ | 53,53 | 34,06 |
| Cu ²⁺ | 49,84 | 0,94 |
| Al ³⁺ | 48,74 | 11,61 |

4.3.2.g. PFO enziminin farklı inhibitörleri için K_i sabitlerinin bulunması

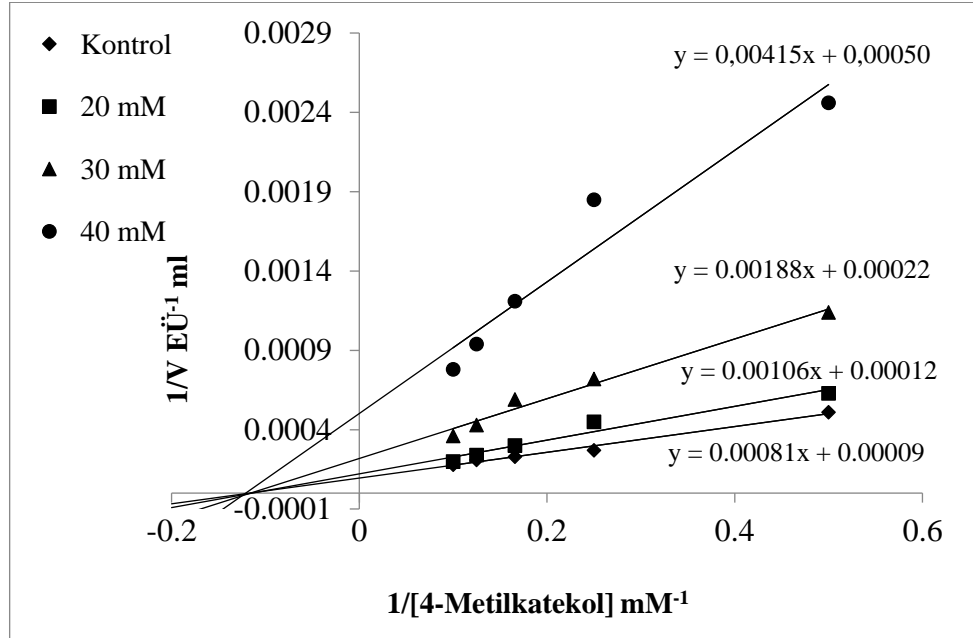
Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin belirlenmesi için, önce optimum şartlarda inhibitörsüz ortamda beş farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapıldı. Ardından yine optimum şartlarda, her bir inhibitör için 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda, 4-metil katekol substratı varlığında enzim aktiviteleri belirlendi. Aktivite değerlerine bakılarak 1/V ve 1/S değerleri hesaplanıp Lineweaver-Burk grafikleri çizimi yapıldı. Çizilen bu grafiklerden yararlanılarak inhibitörlerin K_i sabitleri ve inhibasyon türleri belirlendi (Çizelge 4.6). PFO enzimi için inhibitör olarak kullanılan tüm maddeler için inhibasyon tipleri (yarışmalı inhibitör, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Yarışmalı için Yarışmasız ve Yarı Yarışmalı İçin:

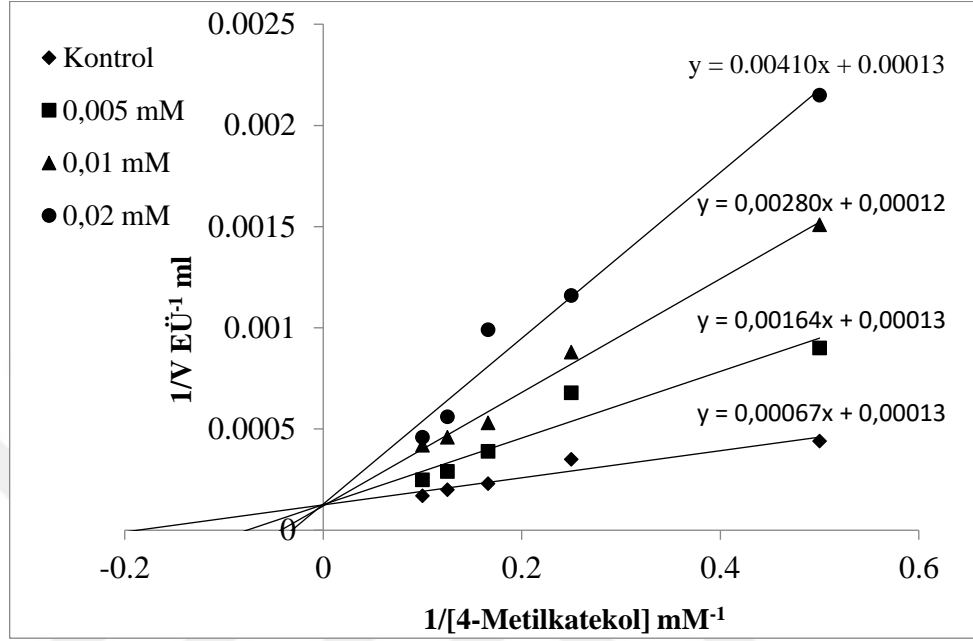
$$K_M^I = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \text{ ve } V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \text{ 'dir.} \quad (4.1)$$



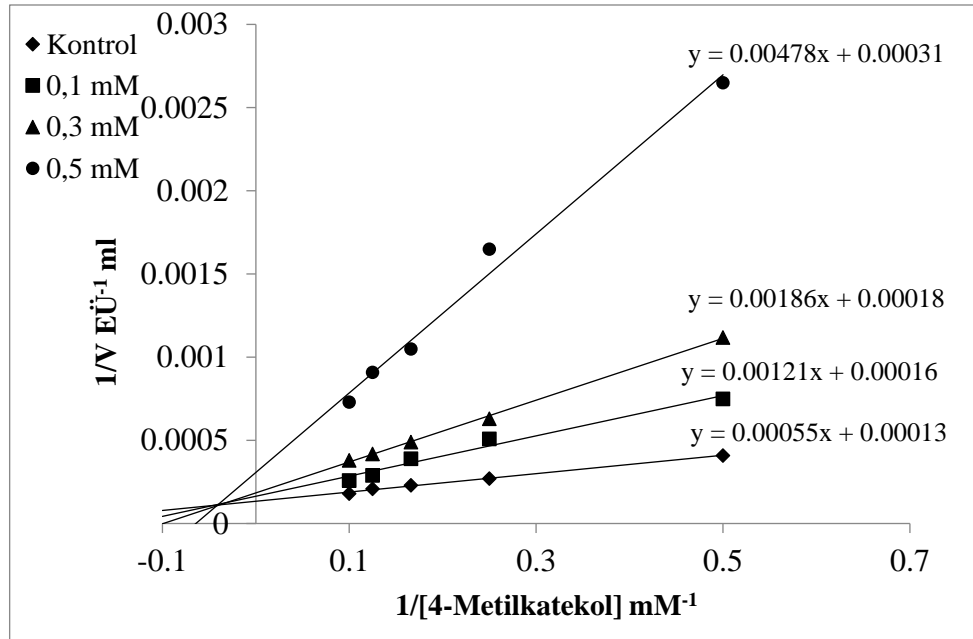
Şekil 4.18. Kırmızı Kışmış üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine benzoik asitin inhibisyon etkisi



Şekil 4.19. Kırmızı Kışmış üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine sitrik asitin inhibisyon etkisi



Şekil 4.20. Kırmızı Kişmiş üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine askorbik asitin inhibisyon etkisi



Şekil 4.21. Kırmızı Kişmiş üzümü PFO enzimi aktivitesi üzerine sodyum metabisülfitin inhibisyon etkisi

Çizelge 4.6. Kırmızı Kışmış üzüm PFO'su üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kimyasal maddelerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

| İnhibitör | Ortalama K_i Değerleri (mM) | İnhibisyon Cinsi |
|----------------------------|---|-------------------------|
| Sitrik asit | 27,573 | Yarışmasız |
| Benzoik asit | 0,847 | Yarışmalı |
| Askorbik Asit | 0,0021 | Yarışmalı |
| Sodyum Metabisülfid | 0,525 | Yarışmasız |

Lineweaver-Burk grafiklerinden çizilen inhibitörlerin K_i değerleri hesaplandığında Çizelge 4.6'da belirtilen sonuçlar bulunmuştur. K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime olan ilgisinin fazla olduğu düşünüldüğünde en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu saptanmıştır. Daha sonra değerlere bakarak sırasıyla etkili olan inhibitörler sodyum metabisülfid, benzoik asit, sitrik asit olduğu tespit edilmiştir. Bulunan bu değerlere bakarak inhibitör etkisinin I_{50} değerleriyle büyük oranda uyduğu saptanmıştır. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafiklerine bakılarak inhibitörlerin inhibisyon cinsleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Yapılan diğer inhibisyon çalışmalarında PFO enzimi farklı kaynaklardan elde edilmiş, inhibitörlerin PFO aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış ve K_i değerleri belirlenmiştir. Yomra elmasında (*Malus communis* L.) PFO'sunda 4-metil katekol varlığında yapılan çalışmada askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitörler olarak bulunmuş ve K_i değerleri 0,05 mM olarak tespit edilmiştir (Can *et al.*, 2013). Semizotu (*Portulaca oleracea*) PFO'sunda sentetik ve doğal inhibitörler kullanılmış, en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu, K_i değerinin 0,36 mM ve inhibisyon tipi ise yarışmasız olarak belirlenmiştir (Gul Guven *et al.*, 2017). *Agaricus bisporus* mantarında (J.E. Lange) prokatekol varlığında en iyi inhibe edici etkiyi benzoik asit vermiş ve K_i değeri 0,046 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca bu inhibisyonun türünün yarışmalı olduğu belirlenmiştir (Gouzi *et al.*, 2010). Armut (*Pyrus communis*) PFO'sunda katekol substratı varlığında altı farklı inhibitör kullanılmış ve en etkili inhibitörün diethyldithiocarbamate

olduğu ve inhibisyon t¼r¼ ise yarışmal¼ olarak belirlenmiştir. Bu inhibit¼r¼n K_i değerinin ise $1,11 \times 10^{-8}$ mM olduğu rapor edilmiştir (Ziyan and Pekyardımcı, 2004). Bir diğer çalışmada PFO, patlıcandan (*Solanum melongena*) izole edilmiş ve sekiz farklı inhibit¼r¼ kullanılmıştır. 4-metil katekol substrat¼ varlığında yapılan çalışmada en etkili inhibit¼r¼ olan sistein hidroklor¼r¼n inhibisyon t¼r¼n¼n yarışmal¼ olduğu ve K_i değerinin ise 0,0018 mM olduğu tespit edilmiştir (Mishra *et al.*, 2013).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Iğdır yöresinde yetişen Kırmızı Kışmış üzümünden (*Vitis vinifera* L.) polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılarak optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH ve ısıl stabilitesi değerleri belirlenmiş, katekol ve 4-metil katekol substratları için K_m ve V_{max} değerleri saptanmış, metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş, çeşitli kimyasalların inhibisyon etkileri incelenerek I_{50} değerleri ve her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalara göre polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları meyve ve sebzelerde hem bitkinin özellikleri ve hem de ekonomik açıdan istenmeyen bazı kayıplara sebep olmaktadır. Esmerleşmenin, meyve ve sebze içeriğindeki fenolik madde miktar ve çeşidine ve polifenol oksidaz aktivitesine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. PFO aktivitesinin kontrol edilmesi, enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde en geçerli yöntemdir. Bu sebeple, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu parametreler doğrultusunda meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan proseslerin en aza indirilmesi ve geliştirilen yeni yöntemlerle birçok ülke için ekonomik yarar ve gıda son ürünlerinde kalite kaybının minimum seviyeye indirilmesi sağlanacaktır.

Esmerleşme reaksiyonlarına sebep olmasının yanı sıra PFO'lar tıpta, atık suların temizlenmesinde, kozmetik sektöründe kullanımına hatta çevrede kirlilik yaratan fenolik bileşiklerin teşhisine kadar çok geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Tüm bu PFO uygulamaları dikkate alındığında bu enzimin saflaştırılıp endüstride kullanılabilir hale getirilmesi oldukça önem kazanmıştır. Böylece PFO enzimi farklı yöntemler kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılan ve PFO'nun saflaştırılması için etkili bir yöntemdir. Bu nedenle, PFO saflaştırılması için afinite kromatografisinde kullanılacak alternatif afinite jelleri sentezi yapılabilir. Ayrıca, daha sonraki çalışmalarda *Vitis vinifera* L. PFO'sunun inhibisyon mekanizmalarının detaylı bir şekilde belirlenmesi, organik çözücü

ortamlarındaki kararlılığının incelenmesi gerekmektedir. *Vitis vinifera* L.'dan saflaştırılan PFO enzimi için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) veya jel flitasyon kromatografisi teknikleri uygulanabilir. Tüm bu uygulanacak teknikler özellikle gıda sektörü için farklı çalışmalara yol gösterici olabilir.

Ayrıca farklı gıda ürünlerine işleme ve farklı gıda sektörlerinde kullanılma potansiyeli olan Kırmızı Kışmış üzüm meyvesinden saflaştırılan PFO enziminin karakterizasyonun belirlenmesi meyvenin gıda endüstri alanında kaliteyi etkileyebilecek sıcaklık ve diğer parametreleri açısından ışık tutacağı düşünülmektedir. Özellikle tarihi bir üzüm çeşidi olması sebebiyle bazı fizikokimyasal özelliklerinin ortaya konması ve değişik değerlendirilme olanaklarının araştırılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Abo-Shady, A., Ali, H.M., Sharaf-Eldeen, H.A., Abdel-Barry, O.A., 2007. DPPH and hydroxyl radical scavenging and antioxidant activities of anilines and related compounds Bull. *Biology, Chemistry and Environmental Science*, 2, 257-266.
- Aguilar, G., Cruz, S., Valdez, H., Ortiz, F., Aguilar, R., Wang, C., 2005. Biochemical Changes of Fresh-Cut Pineapple Slices Treated With Antibrowning Agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 377-383.
- Aksoy, M., 2008. *Beslenme Biyokimyası*. Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 680.
- Alıcı, E.H., 2012. *Kaldırık (trachystemon orientalis) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 89.
- Alıcı, E.H., Arabacı, G., 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemonorientalis L.*) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1051-1056.
- Ali, H.M., Abo-Shady, A., Sharaf Eldeen, H.A., Soror, H.A., Shousha, W.G., Abdel-Barry, O.A., Saleh, A.M., 2013. Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chemistry Central Journal*, 7, 53-61.
- Alleweldt, G., 1997. Genetics of grapevine breeding. *Progress in Botany*, 58, 442-454.
- Aron P.M., Kennedy J.A., 2008. Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79-104.
- Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Boulling, L., Ocete, R., López, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoglu, G., Uzun, H., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Gorislavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F.,

- Primikiri, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F., Martinez-Zapater, J.M., 2006. Genetic evidence for the existence of independent domestication events in grapevine. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707-3714.
- 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.
- Arslan, O., Doğan, S., 2005. Inhibition of Polyphenol Oxidase obtained from Various Sources by 2,3- Diaminopropionic Acid. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85, 1499-1504.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N., 2003. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 5(3), 165-176.
- Ashie, I.N.A., Simpson, B.K., Smith, J.P., 1996. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 1-30.
- Aydemir, T., Kavrayan, D., Çınar, S., 2003. Isolation and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) *Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, Konya, 21, 115-125.
- Baik, B.K., Czuchajowska, Z.U., Pomeranz, Y.E., 1995. Discoloration of dough for oriental noodles. *Cereal Chemistry*, 72, 198-204.
- Baltas, N., 2016. Investigation of a Wild Pear Species (*Pyrus elaeagnifolia subsp. Elaeagnifolia Pallas*) from Antalya, Turkey: Polyphenol Oxidase Properties and Anti-Xanthine Oxidase, Anti-Urease and Antioxidant Activity. *International Journal of Food Chemistry*, 585-595.
- Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., Fernandes, K.F., 2014. Extraction, Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Solanum Lycocarpum* Fruits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 211-217.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. **Biochemistry**. Freeman, W.H. and Company, 5th Ed., New York, 1514.
- 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.
- Borelli, F., Izzo, A.A., Di Carlo, G., Maffia, P., Russo, A., Maiello, F.M., Capasso, F., Mascolo, N., 2002. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. **Fitoterapia**, 73, 38-43.
- 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., 2015. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana L.*) fruit. **Food Chemistry**, 197, 185-190.
- Bravo, K., Osorio, E., 2016. Characterization of Polyphenol Oxidase from Cape Gooseberry (*Physalis peruviana L.*) Fruit. **Food Chemistry**, 197, 185-190.
- Cabaroğlu, T., Yılmaztekin, M., 2006. Üzümün bileşimi ve insan sağlığı açısından önemi. **Buldan Sempozyumu**, Denizli, 24-26 Kasım 2006.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yıldız, O., Kolaylı, S., 2013. Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis L.*) from Turkey. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 29(6), 829-835.
- Can, Z., Dincer, B., Şahin, H., Baltas, N., Yıldız, O., Kolaylı, S., 2010. Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis L.*) from Turkey. **J.O. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23(3), 1-7.

- Cantos, E., Tudela, J.A., Gil, M.I., Espin, J.C., 2002. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3015-3023.
- Casado-Vela, J., Selles, S. ve Bru, R., 2005. Purification and Kinetic Characterization of Polyphenol oxidase from Tomato Fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 381-401.
- Concellon, A., Anon, M.C., Chaves, A.R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena L.*) during storage at low temperature, *Food Chemistry*, 88, 17-24.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H., 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
- Cowan, M.M., Horst, E.A., Luengpailin, S., Doyle, R. J., 2000. Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2578-2580.
- Çesko, C., 2018. *Paulownia Tomentosa'dan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Çeşitli Bitki Özütleri ile İnhibisyonu*. Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 116.
- Çimen, Ç., 2007. *Iğdır Kayısısından (Şalak) Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerinde Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyon Kinetiğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncüyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye, 75.
- Dedeoğlu, N., 2009. *Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 184.

- Delgado-Adámez, J., Gamero-Samino, E., Valdés-Sánchez, E., González-Gómez, D., 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24, 136-141.
- Demirci, M., 2009. *Gıda Kimyası*. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tekirdağ, 245.
- Dexter, J.E., Preston, K.R., Matsuo, R.R., Tipples, K.H., 1984. Development of a high extraction flow for the GRL pilot mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market. *Canadian Institute of Food Science and Technology journal*, 14, 253-259.
- 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.
- Doğan, S., Doğan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69-77.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M., 2005. Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (26), 10224-10230.
- Doğan, S.D., Doğan, M., Aslan, O., 2009. *Enzymatic Browning in Foods and its Prevention. Food Processing Methods*, Techniques and Trends, Valerie C, Belling house, Nova Science Publishess, Inc, New York, 385-415.
- Dudley, E.D, Hotchkiss, J.H., 1989. Cysteine as an Inhibitor of Polyphenol Oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 65-75.
- Edwards, W., Bownes, R., Leukes, W.D., Jacobs, E.P., Sanderson, R., Rose, P.D., Burton, S.G., 1999. A capillary membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols from industrial effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 209-217.

- Eisenthal, R., Danson, M.J., 1992. *Enzyme Assays*. Oxford University Press, New York, USA, 351.
- Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. and Townsend, R.J., 1971. *Browning reactions in foods. Biochemistry of Foods*, Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. and Townsend, R.J., Academic Press, New York, 69-83.
- Eskin, N.A.M., 1990. *Biochemistry of food spoilage: Enzymatic browning. Biochemistry of Foods*, Eskin, N.A.M., Academic Press, New York, 401-432.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231, 237-246.
- Eyduran, S.P., Akin, M., Ercisli, S., Eyduran, E., Maghradze, D., 2015. Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Igdır province of Eastern Turkey. *Biological Research*, 48, 2.
- FDA. 1996. Chemical preservatives. Food and Drug Administration, The Office of Federal Register, Washington DC, 7s.
- 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.
- 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.
- Fenton, D.E., 1995. *Dioxygen management-involvement in enzymes Biocoordination Chemistry*. Oxford Science Publications, Oxford, 52-53.

- Fidan, Y., Yavaş, İ., 1986. Üzümün insan beslenmesindeki değeri. *Gıda Sanayinin Sorunları ve Serbest Bölgenin Gıda Sanayine Etkileri Sempozyumu Bildiriler*, Adana, 225-235.
- Fortuny, R., Belloso, O., 2003. New Advances in Extending The Shelf Life of FreshCut Fruits: A Review. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 341-353.
- Frudenberg, K., Weinges, K., 1962. Catechins and flavonoid compounds in the chemist of flavonoid compounds. *Pergamon Press*, 197.
- Garcia-Molina, F., Munoz, J.L., Varon, R., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., 2007. A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9739-9749.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., Swieca, M., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata L.*). *Food Chemistry*, 107, 129-135.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6, 391-415.
- Gouzi, H., Coradin, T., Delicado, E.N., Ünal, M.Ü., Benmansour, A., 2010. Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. The *Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 1-7.
- Gözükara, E.M., 2011. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 908.
- 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 (Campinas)*, 37(3), 356-362.
- Gulko, A.Y., Khaziyev, F.K., 1993. Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity. *Eurasian Soil Science*, 25(4), 101-113.

- Guo, L., Ma, Y., Shi, J., Xue, S., 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Food Chemistry*, 117, 143-151.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., 2005. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Nettle (*Urtica dioica L.*) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3), 297-302.
- Güngör, K., 2008. *Çağla Badem (Prunus dulcis) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 85.
- Hisaminato, H., Murata, M., Homma, S., 2001. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(5), 1016-1021.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., Scrimgeour, K. G., 1996. *Principles of Biochemistry*. Prentice-Hall Inc., 2nd Ed., New Jersey, USA, 1012.
- Ionita, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stănciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G., Râpeanu, G., 2017. Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56, 177-185.
- Ishiguro, R., Aoyama, Y., 1970. Studies on the relationship between Ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in Radish (*Raphanus sativus L.*). *Eiyo To Shakuryo*. 23, 13.
- Jiang, Y., 2004. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88, 443-446.
- Jimenez, M., Garcia-Carmona, F., 1996. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 42, 1503-1509.

- Jin, P., Zheng, Y.H., Tang, S.S., Rui, H.J., Wang, C.Y., 2009. A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 52(1), 24-29.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, Erzurum, 92-139.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum, 637.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., 2000. *Polyphenoloxidase. In Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, Haard N.F. and Simpson, B.K., Marcel Dekker, New York, 271-315.
- Kolcuoğlu, Y., Çolak, A., Sesli, E., Yıldırım, M., Sağlam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101, 778-785.
- Kolcuoğlu, Y., 2012. Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry*, 47, 2449-2454.
- Komthong, P., Katoh, T., Igura, N., Shimoda, M., 2006. Changes in odours of apple juice during enzymatic browning. *Food Quality and Reference*, 17, 497-504.
- Kumar, A.V.B., Mohan, K.T.C., Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*). *Food Chemistry*. 110, 328-333.
- Kuyumcu, İ., 2014. *Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan Lactarius eucalypt'ı O. K. Mill & R. N. Hilton'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 87.
- Lambrecht, H.S., 1995. *Sulfite Substitutes for the Prevention of Enzymatic Browning in Foods. Enzymatic Browning and its Prevention*, Lee C.Y. and Whitaker J.R., American Chemical Society, USA, 313-323.

- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379, 1-6.
- Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre G., Neumann, J., 1963. *Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase*. Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds, Pridham. J.E. Pergamon Press., Oxford, 33.
- Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y., Choi, W.Y. 2003. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36, 323-9.
- Lerner, H.R., Mayer, A.H., Harel, E., 1972. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, 11, 2415.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-661.
- Lourenço, E.J., Leao, J.S., Neves, V.A., 2006. Heat inactivation and kinetics of polyphenol oxidase from palmito (*Euterpe edulis*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52, 249-259.
- Luo, Y., Tao, Y., 2003. Determining tissue damage of fresh-cut vegetables using imaging technology. *Acta Horticulture Proceedings*, 628, 97-102.
- Marangoni, A.G., 2003. *Enzyme kinetics a modern approach*. Department of Food Science University of Guelph, New York, 244.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195-200.
- Mayer, A.M., 1987. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*, 18, 193-214.

- Mayer, A.M., Harel, E., Ben-Shaul, R., 1966. Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783.
- McEvelly A.J., Iyengar R., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3), 253-273.
- Mishra, B.B., Gautam, S. and Sharma, A., 2013. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): the factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chemistry*, 139(1-4), 105-114.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (çeviri: Kılıç N.)*. Palme Yayınları, Ankara, 1328.
- Ngazee, E., Icishahayo, D., Coutinho, T.A., Van der Waals, J.E., 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease*, 96, 186-192.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert, S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 109-157.
- Odabaş, F., 1984. Iğdır ovası bağcılığı ve burada yetiştirilen üzüm çeşitlerinin ampelografik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, 8(1), 57-65.
- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., de Freitas, V., Silva, A.M., 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Orenes-Pinero, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 2006. Latent Polyphenoloxidase from Quince Fruit Pulp (*Cydonia oblonga*): purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2172-2178.
- Osuga, D., Van Der Schaaf, A., Whitaker, J.R. 1994. *Control of polyphenol oxidase activity using a catalytic mechanism. Protein Structure-Function Relationships*

- in Foods*, Yada, R.Y., Jackman, R.L. and Smith, J.L., Chapman and Hall, New York, 62-88.
- 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, 60.
- Öz, F., Çolak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N., Sesli, E., 2013. Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 36-44.
- Özel, A., 2008. *Boletus Erythropus Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi*. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 110.
- Özel, A., Çolak, A., Arslan, O., Yıldırım, M., 2010. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chemistry*, 119, 1044-1049.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B., Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki L., Ebenaceae*). *Food Chemistry*, 85, 431-437.
- Padron, M.P., Lorano, J.A., Gonsales, A. G., 1975. Properties of o-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendish*. *Phytochemistry*, 14, 1959.
- Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N.A., Sampedro, J.G., Nájera, H., 2014. Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mango (*Mangifera indica cv. Manila*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (40), 9832-9840.
- Partington, J.C., Bolwell, G.P., 1996, Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein from potato tuber, *Phytochemistry* 42(6), 1499-1502.

- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 579-90.
- Ponting, J.D., 1960. *The control of enzymatic browning of fruits, food enzymes*. Schultz H.W., Avi Publ. Co., Inc, Westport, c.t.
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29-36.
- Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, H., 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*). *Food Chemistry*, 94, 253-261.
- Richardson, T., Hyslop, D.B., 1985. *Enzymic browning*. *Food Chemistry*, O.R. Fennema. Marcel Dekker, New York, 445-448.
- Robinson, S.P., Loveys, B.R. and Chacko, E.K., 1993. Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20, 99-107.
- Rodriguez-Couto, S., Toca-Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-13.
- Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J., Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 216, 205-212.
- Ros, J.R., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., 1993. Effect of ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochemical Journal*, 295, 309-312.
- Rupasinghe, H.P.V., Murr, D.P., DeEll, J.R., Odumeru, J., 2005. Influence of 1-methylcyclopropene and NatureSeal on the quality of fresh-cut "Empire" and "Crispin" apples. *Journal of Food Quality*, 28, 289-307.

- Saltveit, M.E., 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 61-69.
- Sambrook, J, Fritsch E.F., Maniatis, T., 1989. *MolecularCloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, 1626.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F.,1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiology*, 91, 1481-1487.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F., 1990. Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Analytical Biochemistry*, 184, 279-282.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., Garcia-Carmona, F., 1993. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1583-1586.
- Sapers, G.M., 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technology*, 47, 75-84.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog, J. M. 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 223.
- Sato, M., 1962. The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. *Phytochemistry*, 8, 353.
- Schaller, K., 1972. Zur Bestimmung der Polyphenoloxidaseaktivitat in Kartoffelknollen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 150, 211.
- Segel, I.H., Woodin, T.S., 1968. Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine-S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 167(1), 78-88.
- Siddiq, M., Dolan, K.D., 2017. Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*). *Food Chemistry*, 218, 216-220.

- Siegbahn, P.E.M., 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 567-576.
- Singh, R., Sheoran, I.S. 1972. Enzymic browning of whole wheat meal flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23, 121-125.
- Smullen, J., Finney, M., Storey, D.M., Foster, H.A., 2012. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 964-973.
- Sojo, M.M., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4924-4930.
- Son, S., Lewis, B.A., 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 468-472.
- Son, S.M., Moon K.D., Lee, C.Y., 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 73, 23-30.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S., Riberio, S., 1972. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel. *Phytochemistry*, 11, 535.
- Stephens, G.J., Wood, R.K.S., 1974. Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase. *Nature*, 251, 358.
- Subramanian, N., Venkatesh, P., Ganguli, S., Sinkar, V.P., 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2571-2578.
- Şakiroğlu, H., Öztürk, A.E., Pepe, A.E. Erat, M., 2008. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from dill (*Anethum Graveolens*). *J.O. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(3), 380-385.

- Şimsek, S., Yemencioğlu, A., 2007. Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*, 42(6), 943-950.
- Tolbert, N.E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiology*, 51, 234-244.
- Tong, C.B.S., Hicks, K.B., Osman, S.F., Hotchkiss, A.T., Haines R.M., 1995. Oxalic acid in commercial pectins inhibits browning of raw apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 592-597.
- Türkhan, A., Kaya, E.D., Yılmaz, İ., 2018. Alıç (*Crataegus Monogyna*) meyvesinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1048-1054.
- TÜİK, 2016. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, Türkiye İstatistik Kurumu. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> Erişim Tarihi (09.10.2018).
- TÜİK, 2018. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, Türkiye İstatistik Kurumu. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 Erişim Tarihi (23.02.2019).
- Ülker Yerlitürk, F., Arslan, O., Sinan, S., Gencer, N., Özensoy Ö., 2008. Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Pyrus elaeagnifolia*). *Journal of Food Biochemistry* 32, 368-383.
- Ünal, M.Ü., 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100, 909-913.
- Ünal, M.Ü., Şener, A., 2006. Determination of Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2374-2379.
- Ünal, M.Ü., Şener, A., Şen, K., 2006. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) polyphenol oxidase. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1123-1127.

- Ünal, M.Ü., Şener, A., 2014. Effect of harvest year on biochemical properties of Narince grape (*Vitis vinifera* L. cv. *Narince*) polyphenol oxidase. ***European Food Research and Technology***, 238, 613-619.
- Vamos-Vigvazo, L., Gejzago, L., 1978. Substrate specificity of the enzymatic browning of apples. ***Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.***, 7, 79.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 15, 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. ***Phytochemistry***, 45, 1309-1323.
- Waliszewski, K.N., Marquez, O., Pardio, V.T., 2009. Quantification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Vanilla Bean. ***Food Chemistry***, 117, 196-203.
- Weaver, M.L., Bron, R.C., Steen, H.A., 1968. The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes. ***American Journal of Potato Research***, 45,132.
- Wen, Y., Cui, J., Zhang, Y., Duan, C., Pan, Q., 2014. Comparison of organic acids levels and L-IdnDH expression in Chinese-type and European-type grapes. ***Euphytica***, 196: 63-76.
- 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., 1996. ***Polyphenol oxidase. Food Chemistry***, O.R. Fennema. Marcel Dekker, New York, 492-494.
- Xiaodong, Z., Flurkey, W.H., 1997. Phenoloxidases in *Portabella* Mushrooms, ***Journal of Food Science***, 62, 97-100.
- Xu, Y.M., Stokes, A.H., Roskoski, R., Vrana, K.E., 1998. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. ***Journal of Neuroscience Research***, 54(5), 691-697.

- Yağar, H., Sağıroğlu, A., 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince, *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 97-103.
- Yağar, H., 2004. Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 34(4), 378-397.
- Yoruk, R., Marshall, M.R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.
- Zhang, X., Shao, X., 2015. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 33, 109-117.
- Ziyan, E., Pekyardımcı, Ş., 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 217-225
- Ziyan, E., Pekyardımcı Ş., 2004. Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol Oxidase. *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 547-557.

ÖZGEÇMİŞ

20.11.1991 tarihinde Iğdır'da doğdu, ilk ve orta öğrenimini Iğdır'da, lise öğrenimini Giresun'da tamamladı. 2010 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yükseköğrenimine başladı ve 2015 yılında mezun oldu. Aynı yıl Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

