

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DOĞAL VE SENTETİK SUBSTRATLARIN
ENZİMATİK OKSİDASYON REAKSİYONLARI**

SEZER SAVCI GÖYCİNCİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

152670

ANTAKYA

AĞUSTOS 2004

Mustafa Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN danışmanlığında, Sezer SAVCI GÖYCINCİK tarafından hazırlanan bu çalışma 17/08/2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Organik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Keriman GÜNAYDIN

İmza

Üye : Prof.Dr.Nureddin ÇOLAK

İmza

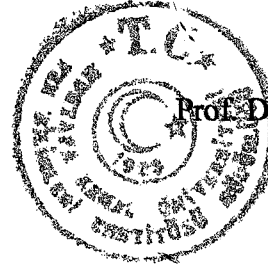
Üye : Yrd.Doç.Dr.M.Kemal SANGÜN

İmza

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Kod No: 204

İmza



17.08.2004

Prof. Dr. Abdurrahman YİĞİT

Enstitü Müdürü

Bu çalışma M.K.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 03M0504

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.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.1.1. Tarihçe.....	1
1.1.2. Proteinler.....	3
1.1.3. Proteinlerin İyonik Özellikleri.....	4
1.1.4. Proteinlerin Ayrıştırılması ve Saflaştırılması.....	4
1.1.4.1. Molekül Büyüklüğüne Bağlı Yöntemler.....	4
1.1.4.2. Elektriksel Yüke Dayanan Yöntemler.....	5
1.1.5. Enzimlerin Özellikleri.....	6
1.1.5.1. Etkinlik.....	6
1.1.5.2. Spesifiklik.....	7
1.1.6. Kofaktörler.....	7
1.1.7. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	8
1.1.8. Enzim Katalizli Reaksiyonlara Etki Eden Faktörler.....	9
1.1.8.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	9
1.1.8.2. Sıcaklığın Etkisi.....	9
1.1.8.3. pH'm Etkisi.....	10
1.1.8.4. Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi.....	10
1.1.9. Önemli Enzimler.....	10
1.1.10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	12
1.1.11. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	15
1.1.11.1. Ekstraksiyonu.....	16
1.1.11.2. Aktivitesini Belirleme Yöntemleri.....	16

1.1.11.3. Katalizlediği Reaksiyonlar.....	16
1.1.11.4. Moleküler Yapısı.....	20
1.1.11.5. Substrat Spesifikliği.....	21
1.1.11.6. İnhibitörleri.....	23
1.1.11.7. Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Termal Kararlılığı.....	23
1.2. Oksidasyon Reaksiyonları.....	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Polifenol Oksidaz Enziminin Patates ve Tarodan Elde Edilmesi.....	33
3.2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Şeftali ve Mantardan Elde Edilmesi.....	33
3.2.3. <i>Rumex crispus</i> 'tan 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonu Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri,.....	34
3.2.4. Enzimatik Oksidasyon Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi.....	34
3.2.5. Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi.....	36
3.2.5.1. Optimum pH' ının Belirlenmesi.....	36
3.2.5.2. Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	36
3.2.5.3. Standart Grafiklerin Elde Edilmesi.....	36
3.2.5.4. Km ve Vm Değerlerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.5.5. Enzimatik Oksidasyon Reaksiyonu Sonucu Oluşan Ürünlerin İncelenmesi.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET**DOĞAL VE SENTETİK SUBSTRATLARIN ENZİMATİK OKSİDASYON REAKSİYONLARI**

Polifenol oksidaz oksidoredüktazlar sınıfına ait bir enzimdir. Bu enzim monofenollerin hidroksilasyonunu ve o-dihidroksifenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalizler. Diğer enzimler gibi polifenol oksidaz da substratlarına karşı spesifiktir.

Polifenol oksidaz enzimi birçok sebze ve meyvede bulunur. Bu çalışmada polifenol oksidaz enzimi patatesten elde edildi. Bunun yanı sıra taro, şeftali ve mantardan elde edilen enzim çözeltilerinin aktivitesi patates enzim çözeltisiyle karşılaştırıldı. Taro enzim çözeltisinin aktivitesinin patates enzim çözeltisinden daha az olduğu bulundu. Patates, şeftali ve mantar enzim çözeltilerinin ise benzer aktivite gösterdiği spektrofotometrik yöntemle belirlendi. *Rumex crispus* bitkisinden 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon izole edildi. Bu antrakinon, p-krezol, p-nitrofenol, alizarin, sodyum alizarin-5-sülfonat substrat olarak kullanıldı. Bu çalışmada polifenol oksidaz enzimi kullanılarak p-krezol dışında daha önce çalışılmamış bu substratların oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlandı.

Çalışmada kullanılan substratların enzimatik oksidasyon reaksiyonu verdikleri spektrofotometrik ve kromatografik olarak kanıtlandı. Ayrıca her substrat için polifenol oksidaz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, Km ve Vm değerleri belirlendi.

2004, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon, p-krezol, p-nitrofenol, alizarin, sodyum alizarin-5-sülfonat, polifenol oksidaz, oksidasyon reaksiyonları, enzim.

ABSTRACT**THE ENZYMATIC OXIDATION REACTIONS OF NATURAL AND SYNTHETIC SUBSTRATES**

Polyphenol oxidase is an enzyme belongs to the group of oxidoreductases. This enzyme catalyses the hydroxylation of monophenols and the oxidation of o-dihydroxyphenols to o-quinones. Polyphenol oxidase is also specific to its substrates as other enzymes.

Polyphenol oxidase is found in many vegetables and fruits. Polyphenol oxidase enzyme was obtained from potato in this study. Besides, the enzyme solutions of taro, peach and mushroom were compared with the potato enzyme solution. It was determined the activity of the taro enzyme solution was less than the potato enzyme solution. It was also determined by spectrophotometric method the potato, peach and mushroom enzyme solutions have similar activity. 1,5-dihydroxy-3-methoxy-7-methyl-anthraquinone was isolated from *Rumex crispus* plant. This anthraquinone, p-cresol, p-nitrophenol, alizarin, sodium alizarin-5-sulfonate were examined as substrates. In this study, it was aimed to make the oxidation reactions of this substrates have not been studied before except p-cresol by using polyphenol oxidase enzyme.

It was proved as spectrophotometric and chromatographic the substrates used in the study gave enzymatic oxidation reaction. In addition to, optimum pH, optimum temperature, K_m and V_m values of polyphenol oxidase enzyme was determined for each substrates.

2004, 70 pages

Keywords: 1,5-dihydroxy-3-methoxy-7-methylanthraquinone, p-cresol, p-nitrophenol, alizarin, sodium alizarin-5-sulfonate, polyphenol oxidase, oxidation reactions, enzyme.

ÖNSÖZ

Bir çeşit katalizör olan enzimler şimdiye kadar var olan birçok geleneksel yöntemlerde farklı amaçlarla kullanılmışlardır. Enzimlerin özellikle atıkların temizlenmesi ve antibiyotiklerin yapılması sırasındaki önemi benimsenmiştir. Taze kesilmiş çoğu sebze ve meyvelerin kahverengileşmesine sebep olduğundan dolayı polifenol oksidaz enzimi de çoğu araştırmacının yıllar öncesinden dikkatini çekmiştir. Bu çalışmada ise polifenol oksidaz enziminden faydalanarak farklı substratlarla enzimatik oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için de doğal ve sentetik substratlar kullanılmıştır.

Bana bu çalışmayı yapma olanağını sağlayan, çalışmamı büyük bir ilgi ve özenle yöneten, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN'A (İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü), çalışma arkadaşlarıma , aileme ve eşime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DIECA	Dietilditiyokarbamat
Dopa	3,4-dihidroksifenilalanin
EC sayısı	Enzim Katalog Numarası
[E_t]	Toplam Enzim Derişimi
ES	Enzim-Substrat Kompleksi
[ES]	Enzim-Substrat Kompleksinin Derişimi
K_m	Michealis-Menten Sabiti
LDH	Laktat Dehidrojenaz
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
P	Piruvat
PEP	Fosfo Enol Piruvat
[S]	Substrat Derişimi
[S]_{ilk}	İlk Substrat Derişimi
[S]_{son}	Son Substrat Derişimi
UV-VIS	Ultraviyole-Görüntür Bölge Spektroskopisi
V	Herhangi Bir Andaki Reaksiyon Hızı
V₁	0,0625 mM'lık Substrat İçin Hesaplanan Reaksiyon hızı
V₂	0,125 mM'lık Substrat İçin Hesaplanan Reaksiyon hızı
V₃	0,25 mM'lık Substrat İçin Hesaplanan Reaksiyon hızı
V₄	0,5 mM'lık Substrat İçin Hesaplanan Reaksiyon hızı
V_m	Maksimum Reaksiyon Hızı

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1.11.4. Patatesten elde edilen polifenol oksidazın % mol olarak amino asit bileşimi.....	21
Çizelge 3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adı, formülü ve alındıkları firma adı.....	31
Çizelge 3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve özellikleri.....	32
Çizelge 3.2.4. Substratların maksimum absorpsiyon yaptıkları dalgaboyları.....	35
Çizelge 4.1. Taro ve patates enzim çözeltileri kullanıldığında p-krezol için gözlenen absorbans değerleri.....	39
Çizelge 4.2. p-nitrofenolün absorbans değerleri.....	40
Çizelge 4.3. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonun absorbans değerleri.....	40
Çizelge 4.4. Alizarinin absorbans değerleri.....	41
Çizelge 4.5. Sodyum alizarin-5-sülfonatın absorbans değerleri.....	41
Çizelge 4.6. P-nitrofenol için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	41
Çizelge 4.7. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	42
Çizelge 4.8. Alizarin için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	42
Çizelge 4.9. Sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	42
Çizelge 4.10. p-nitrofenol için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	43
Çizelge 4.11. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	43
Çizelge 4.12. Alizarin için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	44
Çizelge 4.13. Sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri.....	44
Çizelge 4.14. P-nitrofenol için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri.....	44

Çizelge 4.15. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri.....	45
Çizelge 4.16. Alizarin için standart grafik elde edilirken okunan absorbans Değerleri.....	46
Çizelge 4.17. Sodyum alizarin-5-sülfonat için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri.....	46
Çizelge 4.18. P-nitrofenol için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri.....	47
Çizelge 4.19. P-nitrofenol için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi.....	48
Çizelge 4.20. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri.....	49
Çizelge 4.21. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi.....	49
Çizelge 4.22. Alizarin için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri.....	50
Çizelge 4.23. Alizarin için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi.....	50
Çizelge 4.24. Sodyum alizarin-5-sülfonat için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri.....	51
Çizelge 4.25. Sodyum alizarin-5-sülfonat için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. P-nitrofenolün standart grafiği.....	45
Şekil 4.2. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon standart grafiği.....	45
Şekil 4.3. Alizarinin standart grafiği.....	46
Şekil 4.4. Sodyum alizarin-5-sülfonatın standart grafiği.....	47
Şekil 4.5. P-nitrofenolün $1/V-1/[S]$ grafiği.....	48
Şekil 4.6. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonun $1/V-1/[S]$ grafiği.....	50
Şekil 4.7. Alizarinin $1/V-1/[S]$ grafiği.....	51
Şekil 4.8. Sodyum alizarin-5-sülfonatın $1/V-1/[S]$ grafiği.....	52



1. GİRİŞ

Laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık, basınç, asit veya baz katalizörlerle ve susuz ortamlarda heterojen katalizörler varlığında gerçekleşebilen reaksiyonlar canlı organizmalarda düşük sıcaklıklarda, nötral çözeltilerde şaşırtıcı bir şekilde gerçekleşmektedir. Moleküllerin hidrolizi, oksidasyonu ve karmaşık yapılu bileşiklerin sentezleri bahsedilen reaksiyonlar arasında sayılabilir. Bu reaksiyonların yürüyüşlerini anlamak çok önemlidir. Bu kimyasal değişimleri gerçekleştirmek için organizmalar organik katalizörleri kullanmaktadır. Bu katalizörler hücrelerde veya hücre sıvılarında az oranda bulunurlar. Bu katalizörler enzim olarak adlandırılırlar. Yani enzimler protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Etkinlik ve spesiflik bakımından diğer katalizörlere göre oldukça fazla üstünlük gösteren enzimlerle yapılan çalışmaların sayısı ve önemi giderek artmaktadır.

Bu çalışmada da doğal ve sentetik substratların enzimatik oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Oksidasyon reaksiyonunu sağlamak amacıyla polifenol oksidaz enzimi kullanılmıştır. Elde edilmesinde kullanılan yöntemin gerek uygulama kolaylığı gerekse ekonomik ve hızlı olmasından dolayı polifenol oksidaz enzimi tercih edilmiştir.

Polifenol oksidaz enzimi katekolaz ve krezolaz etkilerine sahip iki fonksiyonlu bir enzimdir. Krezolaz etkisi krezol gibi monofenol bileşiklerini orto dihidroksi fenol bileşiklerine oksitlemesiyle görülür. Katekolaz etkisi ise katekol gibi orto dihidroksi fenol bileşiklerini orto kinonlara oksitlemesiyle açıklanabilir.

Polifenol oksidaz enziminin bu özelliklerinden dolayı bu enzimi kullanarak önceki çalışmalarda yer almamış farklı substratlarla çeşitli oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Enzimler

1.1.1. Tarihçe

Şarap, sirke, bira ve peynir üretimi için kullanılan enzimatik reaksiyonlar çoktan beri bilinmektedir. Ancak modern çağlarda sistemli çalışmalara başlanmıştır.

1713 yılında REAUMUR karganın mide sıvısında etin çözüldüğünü gözlemiştir. SPALLANZAN (1783) tel ile sarılmış etle hayvanları beslemiş ve çözünme olayının gerçekleştiğini anlamıştır.

CAGNARD ve LATOUR ve aynı anda ama bağımsız olarak KÜTZİNG (1838) bira mayasının hücrelerinin fermantasyona sebep olduğunu açıklamışlardır.

1857 yılında PASTEUR fermantasyon üzerine yaptığı ünlü araştırmasını yayımlayarak bira mayası hücrelerinin metabolik reaksiyonları ve fermantasyon arasındaki bağımlılığı vurgulamıştır.

Enzim kelimesi KÜHNE tarafından ilk defa 1878 yılında kullanılmıştır. BUCHNER 1897 yılında bira mayasından bir sıvı elde etmiş ve bu sıvı fermantasyona sebep olmuştur. Buradan sıvıda enzim olduğu anlaşılmış ve bu enzim zimaz olarak adlandırılmıştır. Zimazın birkaç enzim karışımı olduğu daha sonra anlaşılmıştır. 19. yüzyılda birçok enzim ekstraktı elde edilmiştir.

1830 yılında DUBRUNFAUT, maltın sulu ekstraktında nişastayı maltoza dönüştüren etkinin olduğunu gözlemiştir. Bu ekstraktan, PAYEN ve PERSAZ (1833) etanol ile çöktürmeyle amilazı elde etmişlerdir. Acı badem ekstraktında bulunan enzim 1837 yılında LIEBIG ve WÖHLER tarafından ayrılmış ve saflaştırılmıştır.

İzole edilen ilk enzimler şunlardır: Pepsin, tripsin, lipaz, invertaz ve üreaz.

1835 yılında BERZELIUS' un, enzimlerin katalitik etkisini hayvan ve bitki yaşamı için önemini ortaya koyarak ispatlaması önemlidir.

Düşük konsantrasyonlarda bile enzimlerin çok aktif maddeler oldukları anlaşılmıştır. Enzimlerin saflaştırılması için WILLSTAELTER, modern kromatografiye benzer bir yöntem kullanmıştır: Katı maddeler üzerine adsorpsiyon ve tuzlu çözeltilerle elüsyon. Bu incelemeler enzimlerin makromolekül yapısını ispatlamıştır.

Saf, kristal şekilde elde edilen ilk enzim üreazdır. Daha sonra pepsin, tripsin, karboksipeptidaz, tirozinaz, katalaz ve birçok enzim elde edilmiştir.

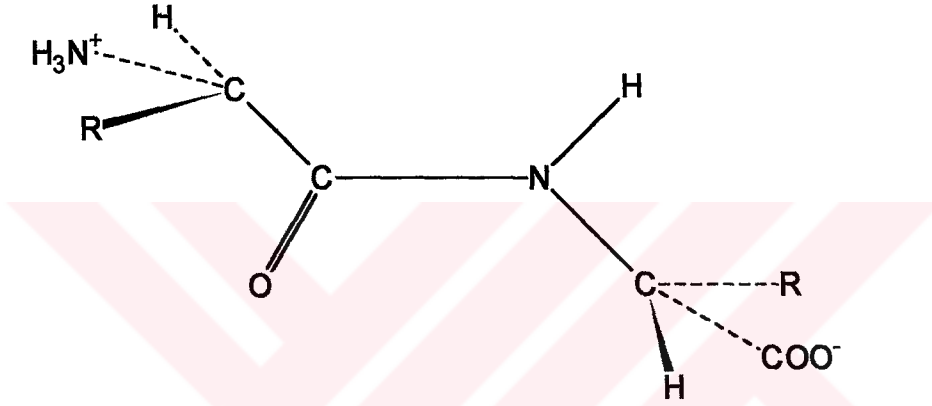
Proteinlerin saflaştırma yöntemleri enzimlerinkiyle aynıdır. Şimdiye kadar elde edilen bütün enzimlerin basit protein veya belirli prostetik grup içeren protein yapısında oldukları ispatlanmıştır.

Birçok enzimin molekül ağırlığı ölçülmüş ve ribonükleazda bulunan amino asitlerin sıralanması tespit edilmiştir (NENITESCU, 1985).

1.1.2. Proteinler

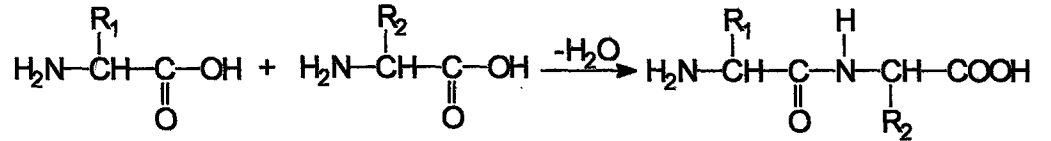
Protein kelimesi Yunanca “proteios” kelimesinden türetilmiş olup ilk, birinci anlamına gelmektedir. Hücre kuru ağırlığının % 50’ sinden fazlasını, yaş ağırlığının ise yaklaşık % 15-20’ sini proteinler oluşturur.

Proteinler çok sayıda tekrarlayan L-amino asit ünitelerinin peptid bağı ile bağlanmalarıyla oluşurlar. Peptid bağı bir amino asitin α -NH₂ grubu ile diğer bir amino asitin α -COOH grubu arasında bir mol su çıkmasıyla oluşan bir amid bağıdır ve trans konfigürasyonundadır. Bir peptid bağının yapısı aşağıdaki gibidir:



Yukarıda da görüldüğü gibi C-N bağı çift bağ karakterindedir. C-N grubuna bağlanmış dört atom C-N grubu ile aynı düzlemindedir ve peptid bağında rezonans kararlılığı vardır. Ayrıca C-N bağının kısmen çifte bağ karakterinde olması molekülün serbest dönmesini engellemiştir. Moleküle katı bir yapı kazandırmıştır. Serbest dönme sadece C-R, C-NH₃⁺, C-COO⁻ ve -H bağlarında olabilir.

Bir peptid bağı ile birleşmiş olan iki amino asite dipeptid, iki peptid bağı ile birleşmiş üç amino asite tripeptid adı verilir. Aşağıda bir dipeptidin oluşumu gösterilmiştir:



dipeptid

Genel olarak bir peptid 10 amino asitten daha az sayıda amino asit içeriyorsa oligopeptid, 10 veya daha fazla amino asit içeriyorsa polipeptid adı verilir. Uzun polipeptid zincirleri de proteinleri oluşturur.

1.1.3. Proteinlerin İyonik Özellikleri

Amino asitler, peptidler gibi proteinler de amfoterik özellik gösterirler. Bir proteinin taşıdığı yükün pH' ya bağlı olarak değişimi zayıf asit, zayıf baz, amino asitler ve peptidler için olduğu gibi Henderson-Hasselbach denklemi ile açıklanır.

Amino asit dipolar iyon şeklindeyken artı ve eksi yüklerin sayısı birbirine eşittir. Yani iyonun taşıdığı net yük sıfırdır. İşte bu noktadaki pH' ya izoelektrik pH denir ve pI ile gösterilir. Proteinler ve polipeptidler için yaklaşık pI değerleri iyonlaşan grupların sayısından hesaplanır. Örneğin tamamen protonlanmış durumdaki vazopressinin pI değeri şu şekilde hesaplanır: pH 8,9' da hormonun yapısında bulunan lizin amino asitinin $-NH_3^+$ grubu tamamen yüksüz $-NH_2$ grubuna dönüşecektir, bu durumda hormonun üzerindeki yük +1' dir. pH 12,5' un üzerinde ise molekül -1 yüklüdür. Bu nedenle pI hesaplanmasında kullanılacak pKa değerleri $pK_a=10,1$ ve $pK_a=12,5$ olacaktır ve pI değeri;

$$pI=10,1+12,5/2=11,3 \text{ olarak bulunur.}$$

1.1.4. Proteinlerin Ayrıştırılması ve Saflaştırılması

1.1.4.1. Molekül Büyüklüğüne Bağlı Yöntemler

Proteinler geniş boyutlu ve yüksek molekül ağırlıklı moleküller olmaları nedeniyle birbirlerinden veya daha küçük moleküllerden diyaliz, ultrasantrifüjleme, jel filtrasyonu gibi yöntemlerle ayrıştırılabilir.

Bir hücre veya doku ekstraktındaki proteinler küçük moleküllerden diyaliz yöntemiyle ayrıştırılabilirler. Selofan gibi son derece küçük (ultramikroskopik) gözenekleri olan bir keseye konulan büyük moleküller örneğin proteinler kese içinden çıkmazken küçük moleküller çıkabilirler. Böylece bir hücre ve doku ekstraktı içeren bir kese tamamen su içerisine konulduğunda tuz ve glukoz gibi küçük moleküller gözeneklerden geçecekler buna karşılık proteinler geçemeyeceklerdir. Keseden dışarıya çıkan küçük moleküller derişimlerinin az olduğu yöne doğru daha kolay hareket edeceklerinden kesenin konulduğu saf su birkaç kez değiştirilirse protein çözeltisinde

küçük, çözünen maddelerin derişimi giderek ihmal edilecek bir değere düşecektir. Böylece proteinler küçük moleküllerden arındırılmış olurlar.

Jel filtrasyonu (moleküler eleme) kromatografisi proteinleri moleküler büyüklüklerine göre ayırmada kullanılan bir tür kromatografik yöntemdir. Bu yöntemde bilinen ve kontrol edilmiş büyüklükte gözenekler içeren son derece hidrate edilmiş sentetik, polimerik jeller (dekstran gibi) kolon denilen uzun cam bir tüp içine konur. Protein karışımı yavaşça bu kolondan aşağı doğru geçirilir. Küçük proteinler polimer yataklarındaki küçük gözeneklere girebilirler ve böylece hareketleri gecikir. Buna karşılık büyük proteinler bu oyuklara giremediklerinden daha hızlı bir şekilde kolondan çıkarlar. Ara büyüklükteki proteinlerin hızı ise ikisinin arasında bir hızdır. Kolona protein karışımı uygulandıktan sonra alttan kolondan küçük fraksiyonlar halinde sıvı alınırsa her bileşen ayrıştırılabilir. Bu ayırışma benzer proteinlerde molekülün büyüklüğü ve molekül ağırlığı ile orantılıdır. Bu nedenle benzer proteinlerden molekül ağırlığı bilinen proteinlerle bilinmeyenler karşılaştırılır.

Ultrasantrifüjleme, proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayırmada kullanılabilecek daha güvenilir bir yöntemdir. Yüksek çekim güçleri altında moleküller molekül ağırlıkları ve şekilleriyle orantılı olan bir hızla çökelirler. Ultrasantrifüjler yerçekiminden yaklaşık 500000 defa daha büyük bir kuvvet üretirler. Belirli bir santrifüj gücü altında çözülmüş moleküller dairesel hareketten kaynaklanan alanın yarattığı kuvvetle kendi kuvvetleri tam eşit ve zıt oluncaya kadar çözelti içinde hareket ederler. Böylece farklı molekül ağırlıklı moleküller ayrılmış olurlar. Ultrasantrifüjleme yöntemleri son derece değerli olmasına rağmen genel olarak daha yavaş sonuç alınan, daha pahalı ve daha hassas cihazlar gerektirmektedir.

1.1.4.2. Elektriksel Yüke Dayanan Yöntemler

Elektroforez yöntemi elektriksel yüke dayanan yöntemlerden biridir. Protein karışımından oluşan bir çözelti iki elektrot arasına konduğunda yüklü protein molekülleri net yüklerine, taşıyıcı ortamın özelliklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olan bir hızla hareket ederler. Elektroforez, yüklü moleküllerin uygulanan bir elektrik alanında net yüklerine, taşıyıcı ortamın özelliklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak farklı hızda hareket etmeleri esasına dayanan bir yöntemdir. Küçük peptidlerde

olduğu gibi proteinlerin polipeptid zincirlerinin de karakteristik izoelektrik noktaları vardır. Belirli bir pH' da bir protein karışımı net negatif yüklü, net pozitif yüklü ya da yüksüz proteinler içerebilir. Böyle bir karışım bir elektrik alanına konulursa pozitif yüklü olan proteinler negatif kutba (katot), negatif yüklü olan pozitif kutba (anot) hareket ederlerken yüksüz olanlar hareketsiz kalacaktır. Ayrıca yük yoğunluğu fazla olan proteinler aynı tür yükü daha az oranda içeren proteinlere göre çok daha hızlı hareket edeceklerdir. Elektroforez için yaygın olarak kullanılan destek ortamları kağıt, selüloz asetat ve inert jeldir.

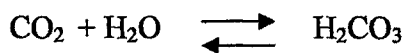
Elektroforez yöntemi proteinlerin kesin sınırlarla ayrılmış bantlar oluşturarak ayrılmasını sağlayan gelişmiş bir tekniktir. Ortam olarak kararlı bir pH aralığı sağlayacak şekilde bir amfolit (küçük, çok sayıda yük taşıyan moleküller) kullanılarak hazırlanır (poliamino karboksilik asit gibi). Ayrımı yapılacak bileşikler (proteinler gibi) izoelektrik noktalarına denk düşen pH değerine kadar hareket ederler. Bu pH' da protein üzerindeki net yük sıfır olur ve hareket durur. Elektroforez yöntemi ile izoelektrik noktaları arasında 0,01 pH ünitesi fark olan bileşikler rahatlıkla ayrıştırılabilir. Başka bir deyişle aralarında net bir yük farkı olan proteinler ayrıştırılabilir.

Bunlardan başka iyon değiştirici kromatografi ve inert materyaller üzerinde adsorpsiyona dayanan yöntemler de proteinlerin saflaştırılması için kullanılan diğer yöntemlerdir.

1.1.5. Enzimlerin Özellikleri

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen proteinlerdir. Enzim katalizli reaksiyonlardaki reaktiflere substrat denir. Vücuttaki her bir reaksiyon için özel bir enzim mevcuttur. Diğer katalizörler gibi enzimler de reaksiyon boyunca değişime uğramazlar ve reaksiyonun dengesini değiştirmezler. Ancak sistemin daha kısa sürede dengeye ulaşmasına yardım ederler. Enzimler diğer katalizörlere göre etkinlik ve spesifiklik yönünden farklı özellikler gösterir.

1.1.5.1. Etkinlik



Bir enzim molekülü saniyede 600000 tane CO_2 molekülünü H_2CO_3 ' e dönüştürür. Bu kataliz olmasaydı vücuttaki bu reaksiyon 1/10000000 oranında daha düşük bir hızla gerçekleşirdi.

Enzimlerin bu etkisi reaksiyonun aktivasyon enerjisine bakılarak açıklanabilir. Aktivasyon enerjisi reaktiflerin tepkime vermeleri için gereken minimum enerjidir. Düşük aktivasyon enerjili reaksiyonlar daha hızlı gerçekleşirler.

1.1.5.2. Spesifiklik

Enzimler diğer katalizörlerden çok daha fazla spesifiktir. Özel bir enzim çok az sayıda substrata etki eder.

Anahtar-kilit modeline göre enzimler kilit gibi spesifik, katı bir yapıya sahiptir. Bir maddenin substrat olması içinse kilite uyan bir anahtar şeklinde olması gerekir. Enzime substratın bağlandığı ve ürüne çevrildiği bölgeye aktif bölge denir. Anahtar-kilit modeli enzim spesifikliğini açıklar. Fakat aktif bölge uymadığı zaman substratın bağlanması için enzim biraz şeklini değiştirir (NENITESCU, 1985; LYGRE, 1990).

1.1.6. Kofaktörler

Enzimlerde protein kısmından başka protein olmayan ve kofaktör denilen bir kısım bulunur. Kofaktörler birçok enzimin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir. Kofaktörler inaktif olan protein yapısındaki apoenzimlerin, aktif holoenzime çevrilmesi için gerekli kimyasal maddelerdir. Bunlar ikiye ayrılır: 1- Esansiyel iyonlar 2- Organik bileşikler yani koenzimler. Esansiyel iyonlar da ikiye ayrılır: a- Aktivatör iyonlar; enzime gevşek olarak bağlı olup, genellikle substratla bağlanmaya iştirak ederler. b- Metal iyonları; enzime sıkı olarak bağlıdır ve katalitik reaksiyona direkt olarak iştirak ederler. Enzimin kofaktörlerinden organik bileşikler de ikiye ayrılır. a- Kosubstratlar b- Prostetik gruplar.

Koenzimler yapılarının bir parçası olarak vitamin içerirler. Genellikle enzimatik reaksiyonun tamamında elektronların, özel atomların ve fonksiyonel grupların transferinde ara taşıyıcı olarak rol oynarlar (NENITESCU, 1985; KALAYCIOĞLU ve ark., 2000).

1.1.7. Enzimlerin Sınıflandırılması

Canlı organizmalarda kimyasal proseslerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, doğada bulunan enzimlerin sayısının şimdiye kadar bilinenlerden daha fazla olması beklenilmektedir. Substratlara veya katalizledikleri reaksiyonlara göre enzimler sınıflandırılır. Emulsin, zimaz ve pepsin bilinen en eski enzimlerdir. Enzimler reaksiyon tipine veya substrata –az takısı eklenerek adlandırılırlar. Örneğin hidroliz reaksiyonunu katalizleyen enzimler hidrolazlar, hidrojenin uzaklaştırılmasını katalizleyen enzimler dehidrojenazlar olarak isimlendirilirler. Bu yaygın bir kullanım şekli olmakla beraber enzimlerin sistematik ve bilimsel olarak sayısal sınıflandırılmaları yapılmıştır. Enzimlerle katalizlenen 6 ana reaksiyon grubu vardır ve bu gruplardaki enzimlerin her birine belirli bir enzim katalog numarası (EC sayısı) verilmiştir. Bu tür bir sınıflandırma bir enzimi ve kaynağını doğru olarak saptamada son derece önemlidir. Ancak günlük laboratuvar çalışmalarında biyokimyacılar enzimlerin katalog numaraları yerine yaygın isimlerini kullanmaktadırlar. Uluslararası Biyokimyacılar Derneği enzimler için sayısal sınıflandırma sistemini kabul etmektedir. Enzim aktivitelerinin sınıflandırıldığı 6 temel grup aşağıda özetlenmiştir. Bu grupların her biri de ayrıca kendi içlerinde sınıflara ayrılmıştır:

1. Oksidoredüktazlar:
 - a) CHOH gruplarına etkili olanlar
 - b) Aldehit ve keton gruplarına etkili olanlar
 - c) Kükürt içeren gruplara etkili olanlar
2. Transferazlar:
 - a) Azotlu grup taşıyıcısı olanlar
 - b) Kükürtlü grup taşıyıcısı olanlar
3. Hidrolazlar:
 - a) Ester gruplarına etki edenler
 - b) Peptit bağlarına etki edenler
4. Liyazlar (bağ kıran reaksiyonlarda) :
 - Karbon-azot bağını kıranlar
5. İzomerazlar:
 - Cis-Trans izomerlerinin oluşumunu katalizleyenler

6. Ligazlar (bağ oluşumu reaksiyonlarında) :

C-C bağı oluşturanlar

Buna göre her grup kendi içinde alt gruplara ayrılabilir ve tüm enzimler dört sayıdan oluşan bir kısaltma ile tanımlanır.

Örneğin; EC 1.1.1.27 şeklinde bir belirtimde EC bu enzimin enzim kataloğuna göre tanımlandığını, 1 sayısı bu enzimin bir oksidoredüktaz olduğunu, ikinci 1 sayısı enzimin -CHOH üzerinde etkili olduğunu, üçüncü 1 sayısı ise enzimin kofaktör olarak NAD^+ kullandığını göstermektedir. Günlük kullanımda bu enzim kısaca laktat dehidrojenaz enzimi olarak adlandırılır (NENITESCU, 1985; TÜKEL, 1994).

1.1.8. Enzim Katalizli Reaksiyonlara Etki Eden Faktörler

1.1.8.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Düşük substrat konsantrasyonlarında substrat konsantrasyonunun artması enzimin aktivitesini büyük ölçüde artırır. Yüksek substrat konsantrasyonunda ise konsantrasyon artışının enzim aktivitesine etkisi yoktur.



Enzim konsantrasyonu sabitken substratın konsantrasyonu arttığında belli bir noktada enzim substratla doygun hale gelir. Bu yüzden fazla miktarda substrat varlığında enzimin aktivitesi substrat konsantrasyonundan bağımsız hale gelir.

1.1.8.2. Sıcaklığın Etkisi

Diğer reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da yüksek sıcaklıklarda daha hızlı gerçekleşir. Fakat sıcaklık 30-40 °C' yi aştığında enzimin aktivitesi düşer. Bu durumda enzimler katalitik aktivitelerini kaybederler. Çünkü enzimler de diğer proteinler gibi yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar.

1.1.8.3. pH' ın Etkisi

Enzim aktivitesi pH ile değişir. Enzimler genellikle nötr pH değerlerinde en etkindirler. Yüksek pH' larda proteinler denatüre olurlar. Substratın iyonik gruplarının ve enzimin aktif bölgesinin pK_a değerleri vardır ve farklı pH değerlerinde farklı iyonik formlarda bulunurlar. Etkin bir bağlanma için substratın ve aktif bölgenin özel bir iyonik form gerekirse enzim bu iyonik formun bulunduğu pH' da en etkin olur.

1.1.8.4. Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi

Birçok madde enzimlere onların katalitik etkinliğini arttırmak ya da azaltmak için bağlanırlar. Birçok enzim aktif bölgeye metal iyonları veya vitamin türevleri bağlandığında aktif hale gelirler. Maddeler enzimlerin düzenleyici bölgelerine bağlanarak enzimin aktivitesini azaltabilir veya arttırabilirler.

1.1.9. Önemli Enzimler

I.Hidrolaz

1. Esteraz:

- a) Lipaz: Lipid \rightarrow asit + gliserin
- b) Kolinesteraz: Asetilkolin \rightarrow kolin + asetik asit

2. Glikozidaz

- a) Oligozaharidaz: α -Glikozidaz, invertaz
- b) Polizaharidaz: α -Amilaz, β -Amilaz

3. Amidaz

Üreaz: Üre \rightarrow $CO_2 + NH_3$

4. Proteaz

- a) Endopeptidaz: Protein \rightarrow peptit
- b) Ekzopeptidaz: Karboksipeptidaz, Aminopeptidaz

II.Transferaz

1.Transmetilaz

2.Transaçilaz

Arilamino-transaçilaz: Asetil-CoA + arilamin \rightarrow asetil-arilamin

3. Transglikozilaz

4. Transfosfataz

Hekzokinaz: D-Glukoz + ATP \rightarrow D-Glukoz-6-fosfat + ADP

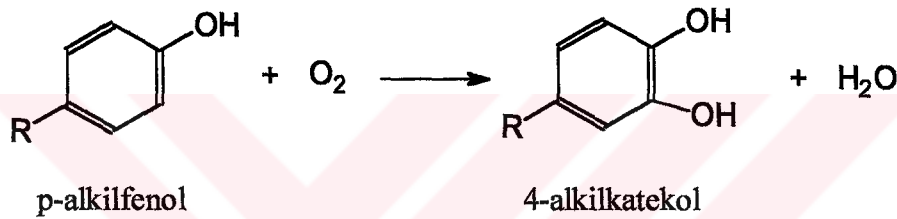
5. Transaminaz

Transaminaz L-glutamik: L-glutamik asit + piruvik asit \rightarrow L-alanin + α -ketoglutarik asit

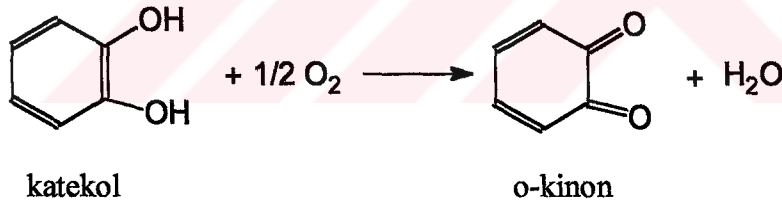
III. Oksidoredüktaz

1. Oksidaz

a) Monofenol-oksidad:



b) Polifenol-oksidad:



2. Peroksidaz

a) Peroksidaz:



b) Katalaz: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$

IV. Liyaz

1. Karboliyaz

a) Karboksilaz: $\text{CH}_3\text{COCOOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{CO}_2$

b) Karboligaz

Karboligaz asetaldehit: $R-CHO + OHC-CH_3 \rightarrow R-CHOH-COCH_3$

c) Aldolaz

2. Hidrataz

Fumaraz: Fumarik asit + $H_2O \leftrightarrow$ Malik asit

V. İzomeraz

Okso-izomeraz: D-glukopiranoz-6-fosfat \leftrightarrow D-fruktofuranoz-6-fosfat (NENITESCU, 1985).

1.1.10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzimatik aktivite tayini için birçok yöntem bilinmektedir. Açığa çıkan gaz (CO_2) veya kullanılan gaz (O_2) ölçümü, substrat azalmasının veya ürün oluşumunun spektrofotometrik olarak izlenmesi ve bir boyar maddenin tükenmesi enzimatik aktivite tayini için kullanılan yöntemlerdir. Enzim aktivitesinin ölçümü için birim zamanda azalan substratın miktarı veya oluşan ürünün miktarı ölçüleceğinde söz konusu maddelerin özelliğine bağlı olarak uygun herhangi bir kimyasal yöntem kullanılabilir. Ancak katalitik etkiyi tam olarak ölçebilmek için katalizlenen reaksiyonun denge denklemini, substratın azalışını veya ürünün artışını ölçebilecek yöntemi, enzimin kofaktörünün olup olmadığını, enzim aktivitesinin substrat derişimine ne şekilde bağlı olduğunu, optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerini bilmek gereklidir.

Tek bir substratın ürün haline dönüştüğü geri dönüşümlü bir enzimatik reaksiyonun kinetiği genellikle Micheales-Menten eşitliği (1.1.10.1) denilen

$$V = V_m[S]/K_m + [S] \quad (1.1.10.1)$$

eşitliği ile açıklanabilir. Bu eşitlikte;

V: Herhangi bir andaki reaksiyon hızını, V_m : Maksimum reaksiyon hızını,

[S]: Substrat derişimini, K_m : Micheales-Menten sabitini göstermektedir.

Micheales-Menten kinetiğine uyan enzimatik bir reaksiyon iki temel reaksiyondan oluşur. Bunlar enzim substrat kompleksinin oluşması ve bu kompleksin ürün ve enzime parçalanmasıdır.



Yukarıdaki reaksiyonlarda k_1 , k_{-1} , k_2 ve k_{-2} reaksiyonların ok yönündeki hız sabitlerini göstermektedir.

Eğer toplam enzim derişimi (serbest ve substrat ile bağı enzim ES toplamı) $[E_t]$ olarak gösterilirse, serbest enzim miktarı $[E_t]-[ES]$ olur. Substrat derişimi $[S]$, $[E_t]$ ' den çok çok büyük olacağından enzime bağlanmış olan substrat miktarı toplam substrat miktarı yanında ihmal edilebilir. Buna göre yukarıdaki iki reaksiyondan ES' nin oluşma ve parçalanma hızları yazılabilir:

$$1. \text{ ES kompleksinin oluşma hızı} = k_1 ([E_t]-[ES]) [S] \quad (1.1.10.2)$$

Enzim ile ürünün ES kompleksi oluşturma hızı çok yavaş olduğundan ihmal edilir.

$$2. \text{ ES kompleksinin parçalanma hızı} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (1.1.10.3)$$

Dinamik denge durumunda ES' nin oluşma hızı ES' nin parçalanma hızına eşittir. O halde;

$$3. \quad k_1 ([E_t]-[ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (1.1.10.4)$$

olur.

1.1.10.4. eşitliğinin sol tarafı çarpılır ve sağ tarafı $[ES]$ ortak çarpan parantezine alınarak sadeleştirilirse,

$$k_1 [E_t] [S] - k_1 [ES] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (1.1.10.5)$$

olur. Bu da

$$k_1 [E_t] [S] = k_1 [ES] [S] + (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (1.1.10.6)$$

şeklinde yazılabilir. Sonuç olarak

$$k_1 [E_t] [S] = (k_1 [S] + k_{-1} + k_2) [ES] \quad (1.1.10.7)$$

eşitliği elde edilir. Buradan;

$$[ES] = [E_t] [S] / [S] + (k_2 + k_{-1}) / k_1 \quad (1.1.10.8)$$

olur. İlk hız V , ES cinsinden ifade edilirse

$$V = k_2 [ES] \quad (1.1.10.9)$$

olacaktır. 1.1.10.9 eşitliğinde $[ES]$ yerine konulursa;

$$V = k_2 [E_t] [S] / [S] + (k_2 + k_{-1}) / k_1 \quad (1.1.10.10)$$

olacaktır.

1.1.10.9 eşitliğinde enzimin tamamı ES kompleksi halinde olduğu zaman maksimum hız ve Micheales-Menten sabiti,

$$V_m = k_2 [E_t] \quad (1.1.10.11)$$

$$K_m = k_2 + k_{-1}/k_1 \quad (1.1.10.12)$$

olarak gösterilebilir. 1.1.10.10 eşitliği 1.1.10.11 ve 1.1.10.12 eşitliklerine göre yeniden düzenlenirse;

$$V = V_m [S]/K_m + [S] \quad (1.1.10.1)$$

Böylece daha önce sözü edilen 1.1.10.1 eşitliği yani Micheales-Menten eşitliği elde edilmiş olacaktır. Özel bir durum olarak ilk hız maksimum hızın yarısı olduğu zaman ($V = \frac{1}{2} V_m$);

$$V_m/2 = V_m [S]/K_m + [S] \quad (1.1.10.13)$$

olacaktır. 1.1.10.13 eşitliğinin her iki tarafı V_m ile bölünürse;

$$\frac{1}{2} = [S]/K_m + [S] \quad (1.1.10.14)$$

olur. K_m için 1.1.10.14 eşitliği çözümlerse $K_m = [S]$ bulunur.

Enzimatik reaksiyon hızının substrat derişimine bağlı olarak değişimi grafiğe geğirildiğinde, elde edilen eğri bir hiperboldür ve Micheales-Menten eğrisi olarak bilinir. Bu eğri iki önemli parametre ile karakterize edilir. Bunlardan birisi maksimum hız V_m , diğeri ise Micheales-Menten sabiti K_m ' dir. Belirli pH ve sıcaklıkta bir enzimin belirli bir substrata olan ilgisi K_m ile ifade edilir ve enzimin karakteristiğidir. Bir enzimin K_m ' sinin büyük olması enzimin söz konusu substrata ilgisinin az olduğunu, küçük olması ise substratına ilgisinin büyük olduğunu gösterir.

Micheales-Menten grafiğini kullanarak V_m ve K_m değerlerini saptamak zordur çünkü V_m değerine yaklaşılr ama ulaşılamaz. Bu nedenle Micheales-Menten eşitliği lineer bir grafik verecek şekilde yeniden düzenlenebilir. Line-Weaver Burk grafiği bu tür bir grafiğe örnektir. Line-Weaver Burk grafiğini çizebilmek için Micheales-Menten eşitliğinin tersi (1.1.10.15) alınırsa eşitlik;

$$1/V = 1/V_m + K_m/V_m \times 1/[S] \quad (1.1.10.15)$$

şekline dönüşür.

Farklı $1/[S]$ değerlerine karşılık gelen $1/V$ değerleri grafiğe geğirildiğinde bir doğru grafiği elde edilir. Bu şekilde elde edilen grafik Line-Weaver Burk grafiği olarak bilinir.

1.1.11. Polifenol Oksidaz Enzimi

Bakır içeren oksidazlar O_2 ' i H_2O_2 ' e indirgeyen enzimler (amin oksidaz, galaktoz oksidaz), O_2 ' i H_2O ' ya indirgeyen enzimler (askorbat oksidaz, sitokrom oksidaz) ve O_2 ' i H_2O ' ya indirgeyen monooksijenazlar (dopamin- β -hidroksilaz, polifenol oksidaz) olarak üç grupta incelenir. Buna göre polifenol oksidaz O_2 ' i H_2O ' ya indirgeyen bakır içeren monooksijenazlar grubuna giren bir enzimdir. Polifenol oksidaz enzimi özellikle sebze ve meyvelerin kahverengileşmesine sebep olduğu için çoğu araştırmacının dikkatini çekmiştir. Bu enzim tirozinaz, krezolaz, katekolaz, difenolaz ve fenolaz gibi değişik isimlerle anılmaktadır. Bunun sebebi ise polifenol oksidazın birçok farklı fenolik bileşikleri substrat olarak kullanmasıdır. Uluslararası Biyokimyacılar Birliği' nin Enzim Komisyonu' na göre polifenol oksidaz enzimi iki şekilde adlandırılır: Tirozinaz olarak da bilinen EC 1. 14. 18. 1-monofenol monooksijenaz ve EC 1. 10. 3. 2 o-difenol: O_2 oksidoredüktaz. Bu sınıflandırma farklılıkları sadece enzimin krezolaz ve katekolaz olarak katalizlediği iki reaksiyondan kaynaklanmaktadır (WALSH, 1977).

Enzimatik kahverengileşme olayı üzerine yapılan önceki çalışmalarda tirozinaz ve lakaz olmak üzere iki aktivite türü tanımlanmaktadır. Lakazın tirozinazdan veya polifenol oksidazdan farkı p-difenolleri oksitlemesidir. Lakaz bazı bitkilerde ve mantarlarda bulunur. Daha sonra polifenol oksidaz olarak adlandırılan yeni bir oksidaz sisteminin p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-krezol gibi monohidroksi fenolik bileşiklerin havayla oksidasyonunu katalizlediği belirlenmiştir. Polifenol oksidaz bir organik (fenolik) molekülün moleküler oksijenle oksidasyonunu katalizlediği belirlenen ilk enzimdir.

Polifenol oksidaz bitkilerin bazı dokularında ve hayvanların deri, kıl, tüy ve gözlerinde bulunur. Bu enzimin bitkilerdeki miktarı bitkinin cinsine bağlıdır. Bu yüzden elma, üzüm, avokado, patates gibi farklı bitkilerdeki polifenol oksidaz miktarı da farklıdır.

1.1.11.1. Ekstraksiyonu

Polifenol oksidazın bitkilerden ekstraksiyonla izole edilmesi zordur. Fenolik bileşikler polifenol oksidazı inaktif hale getirebileceğinden enzimin yapısını ve aktivitesini bozmayacak bir ayırma ve saflaştırma yöntemi kullanılmalıdır. Polifenolleri asetonla çöktürme işleminden sonra tampon çözeltiyle ekstraksiyon polifenol oksidazın izole edilmesinde sık kullanılan bir yöntemdir. Polifenol oksidazı saflaştırmak için kalsiyum sülfat veya amonyum sülfat kullanıldıktan sonra diyaliz ya da Sefadeks G-25 ile kromatografi işlemleri yapılır. Daha iyi bir saflaştırma için sıklıkla adsorpsiyon, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi veya bu yöntemlerin kombinasyonu kullanılır. Kalsiyum fosfat üzerindeki adsorpsiyon elma ve buğdaydan elde edilen polifenol oksidaza uygulanmıştır. Ispanak, armut ve şeftaliden elde edilen polifenol oksidazı saflaştırmak içinse karboksimetil selüloz ya da dietilaminoetil selüloz kolonları kullanılmıştır. İyon değişimi kromatografisinin Sefadeks üzerindeki jel filtrasyon kromatografisiyle birlikte kullanımı son yıllarda daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

1.1.11.2. Aktivitesini Belirleme Yöntemleri

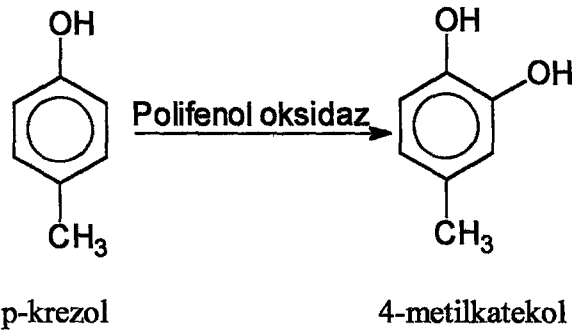
P-krezol ve tirozin polifenol oksidazın en çok kullanılan monohidroksi fenol substratlarıdır. Bu enzimin monofenolaz aktivitesini belirlemek için absorbandsadaki artış incelenebilir.

Spektrofotometrik yöntemler polifenol oksidaz enziminin difenolaz aktivitesini belirlemek için de sıklıkla kullanılır. Katekol veya metilkatekol gibi uygun bir substratla inkübe edilen polifenol oksidaz enziminin aktivitesi oluşan renkli ürünlerin absorbandsının izlenmesiyle belirlenebilir (ZAWISTOWSKI ve ark.,1979).

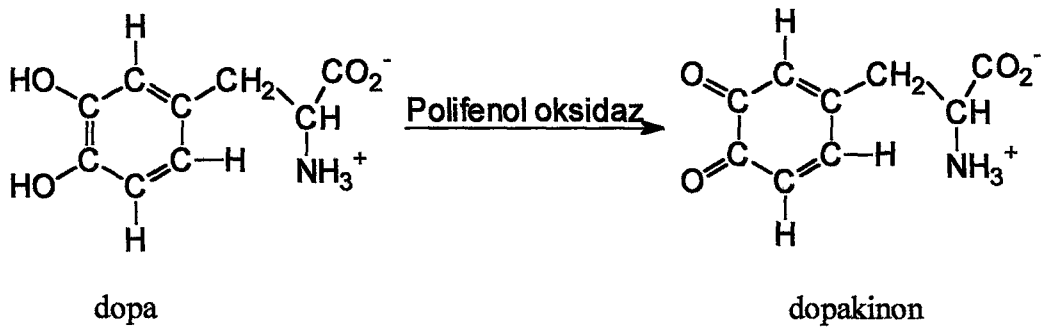
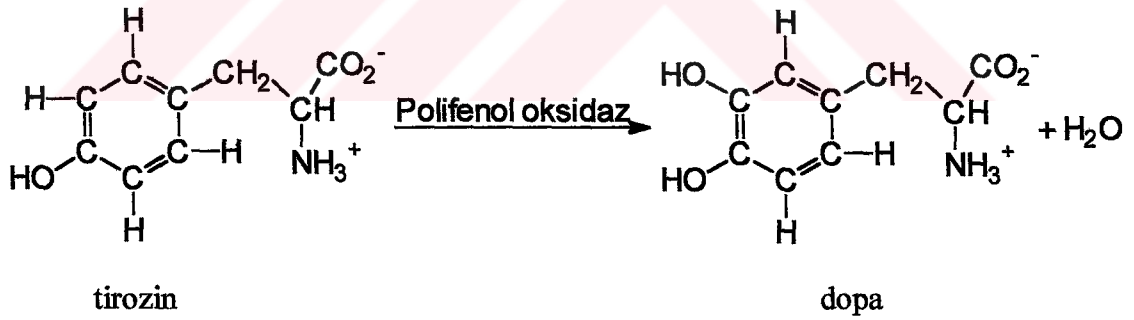
1.1.11.3. Katalizlediği Reaksiyonlar

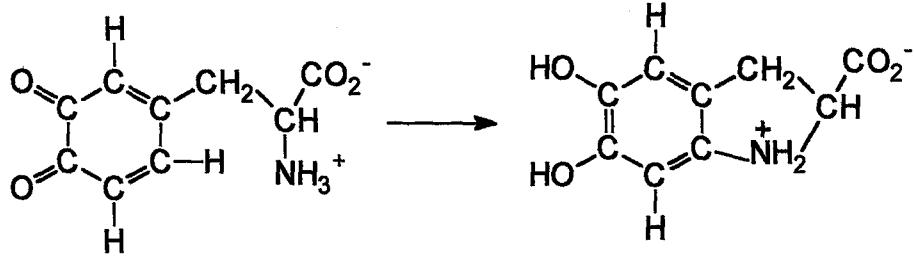
Polifenol oksidaz iki farklı reaksiyon türünü katalizleyebilen bir enzimdir: Bu reaksiyonlar monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu ve o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonudur. Son ürünler kahverengi-siyah melanin pigmentlerini oluşturmak üzere enzimatik olmayan bir reaksiyonu daha sonra verebilirler. Bu iki enzimatik

aktivite monofenolaz (hidroksilaz veya krezolaz) ve difenolaz (katekolaz veya oksidaz) olarak tanımlanır (MAYER ve ark., 1966; HYODO ve URITANI, 1967; MONTGOMERY ve BENJAMIN, 1973; ZAWISTOWSKI ve ark., 1979; VIGYAZO, 1981; LOURENÇO ve BATISTUTI, 1985; LUH ve PARK, 1985; MAYER, 1987, LOURENÇO ve ark., 1992, FRIEDMAN, 1997).



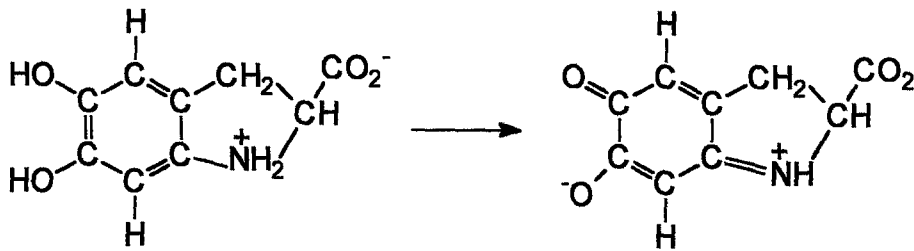
Tirozinden melanin oluşumunun mekanizması şöyledir:





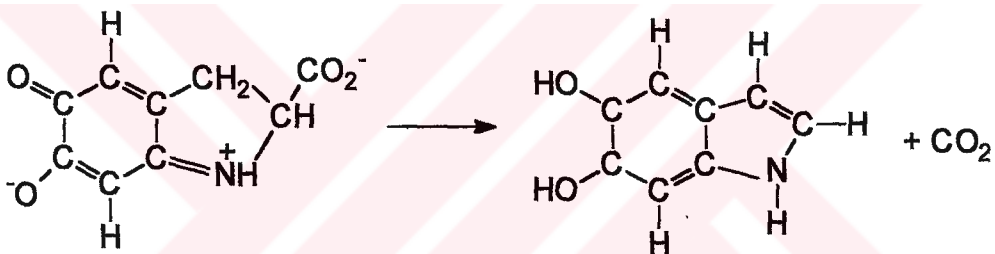
dopakinson

lökodopakrom



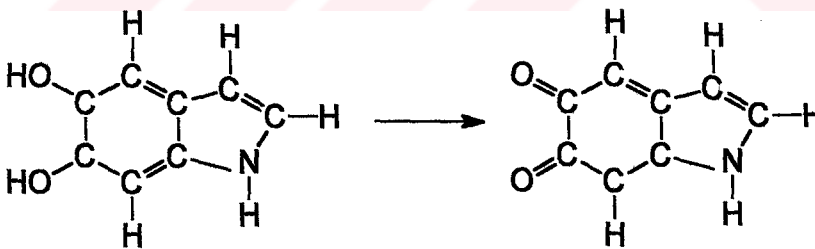
lökodopakrom

dopakrom



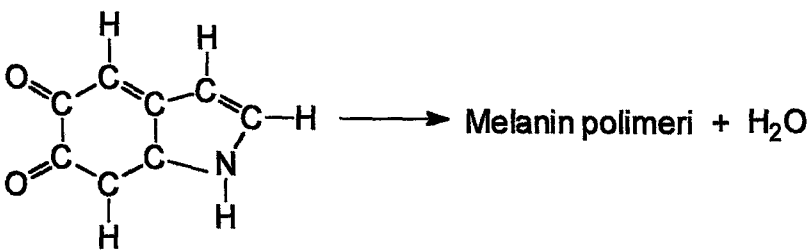
dopakrom

5,6-dihydroksiindol

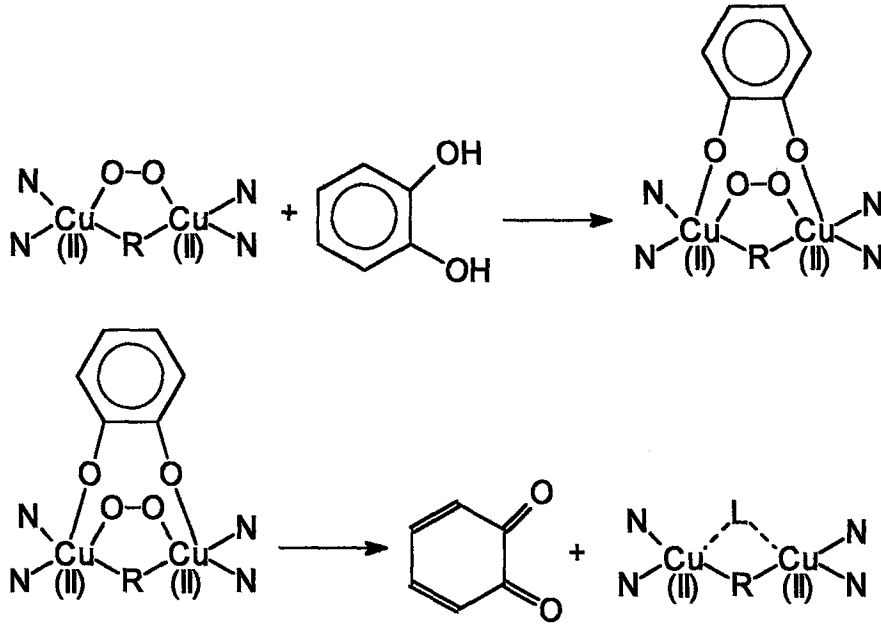


5,6-dihydroksiindol

indol-5,6-kinon



indol-5,6-kinon



Burada N protein ligandını, R iç protein köprüsünü, L ise dış ligandı göstermektedir.

Polifenol oksidaz enziminin difenolaz aktivitesinin monofenolaz aktivitesinden 5-10 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Polifenol oksidaz enzimi substrat spesifikliği yönünden önemli bir enzimdir.

1.1.11.4. Moleküler Yapısı

Polifenol oksidaz bakır atomu içeren dört polipeptid zincirinden oluşmuş bir tetramerdir. Elektroforez ve jel filtrasyonu sonucu polifenol oksidazın farklı formları için molekül ağırlığı 12000-400000 gibi geniş bir aralıkla ifade edilmektedir. Patatesten elde edilen polifenol oksidazın ortalama molekül ağırlığı ise 96000 g/mol olarak bulunmuştur. Çizelge 1.1.11.4'te patatesten elde edilen polifenol oksidazın % mol olarak amino asit bileşimi görülmektedir (ZAWISTOWSKI ve ark., 1979, VIGYAZO, 1981).

Çizelge 1.1.11.4. Patatesten elde edilen polifenol oksidazın % mol olarak amino asit bileşimi

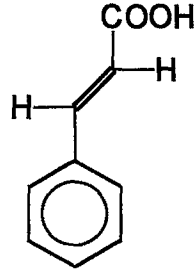
Amino asit	% Mol
Alanin	7,8
Arginin	3,9
Aspartik asit	10,7
Sistein	1,4
Glutamik asit	10,0
Glisin	8,1
Histidin	2,0
İzolösin	5,5
Lösin	9,1
Lizin	6,5
Metiyonin	2,0
Fenilalanin	4,6
Prolin	5,5
Serin	7,1
Treonin	5,5
Tirozin	3,4-3,6
Valin	6,8

1.1.11.5. Substrat Spesifikliği

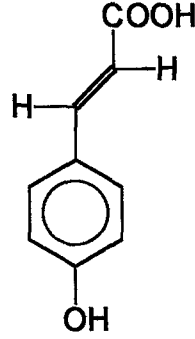
Bitkilerden elde edilen polifenol oksidaz enzimi hem mono hem de o-difenol bileşiklerine yüksek oranda etki eder. Bu substratlar için enzimin saflığına ve kaynağına bağlı olarak kinetik parametrelerde (K_m ve V_m) önemli farklılıklar bulunmuştur. Sadece patatesten elde edilen yüksek molekül ağırlığına sahip olan polifenol oksidaz enzimi monofenollerin oksidasyonunu katalizleyebilmektedir. Molekül ağırlığı düştükçe polifenol oksidazın o-difenollere olan spesifikliği artmaktadır (ZAWISTOWSKI ve ark., 1979).

Sebze ve meyvelerde bulunan polifenol oksidazın en önemli fenolik substratları klorojenik asit, tirozin, 3,4-dihidroksifenilalanindir.

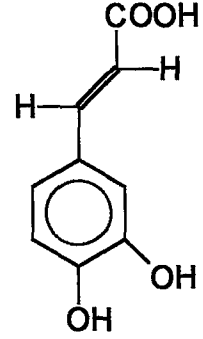
P-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve sinapik asit ise patateste bulunan fenolik bileşiklerdir.



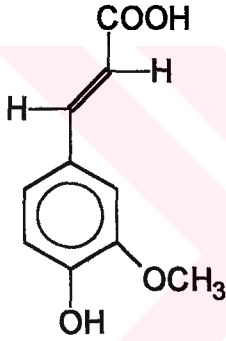
sinnamik asit



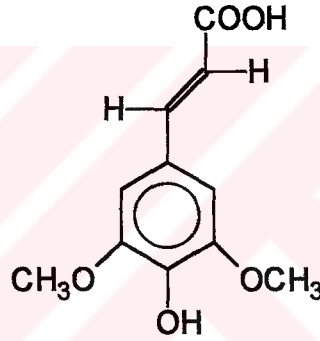
p-kumarik asit



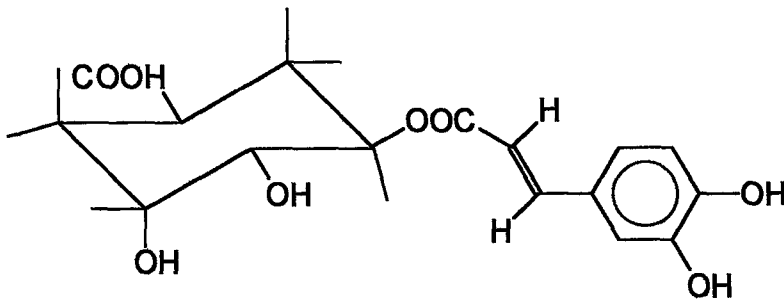
kafeik asit



ferulik asit



sinapik asit



klorojenik asit

Bu fenolik bileşiklerin kan şekeri ve kolesterol düşürücü, kanser önleyici etkileri vardır.

Mono ve o-difenollerde bulunan süstitüentlerin türü ve konumu substrat reaktivliğini belirlemede önemlidir. Monofenoller para konumunda $-CH_3$ grubu varsa

daha kolay hidrosillenirler. O-difenollerin oksidasyon oranı ise para konumunda elektron sunan bir süstitüentin varlığıyla artarken elektron çeken bir süstitüentin varlığıyla düşer (ZAWISTOWSKI ve ark., 1979, FRIEDMAN, 1977).

1.1.11.6. İnhibitörleri

Polifenol oksidazı inhide eden geniş bir bileşik sınıfı bilinmektedir. Bu inhibitörlerin etkisi konsantrasyona, polifenol oksidaz kaynağına, pH ve sıcaklığa bağlıdır. İnhibitörlerin özellikleri kullanılan substratın monofenol ya da o-difenol olmasına göre de değişir.

Polifenol oksidaz siyanür, karbon monoksit, sodyum dietilditiyokarbamat (DIECA), 2-merkaptobenzotiyazol, azid ve EDTA gibi şelat yapıcı reaktiflerle inhide olabilir. Halojen içeren anorganik iyonların da bu enzim için inhibitör etkisi yaptığı bilinmektedir. Sodyum klorür zayıf bir inhibitördür.

Kiraz, elma, kayısı ve patatesten elde edilen polifenol oksidaz için benzoik asit bir yarışmalı inhibitördür.

Polifenol oksidazın iki farklı aktif bölgesi olduğu için askorbik asit ve SO₂ gibi indirgenme reaktifleri de polifenol oksidazı inhide eder ancak reaksiyon sırasında kendileri de oksitlendiğinden bu reaktiflerin etkileri geçicidir. Sülfidler (sodyum sülfid, sodyum bisülfid) polifenol oksidaz için en etkili inhibitörlerdir. Sülfidler patatesten elde edilen polifenol oksidaz üzerindeki etkisi pH' a bağlıdır. Ancak elmadan elde edilen polifenol oksidazda bu etki pH' a bağlı değildir.

1.1.11.7. Optimum pH , Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılığı

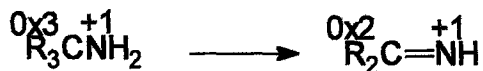
Elma, armut, şeftali, üzüm, muz, avokado, patates ve mantardan elde edilen polifenol oksidazın optimum pH' ı 5,0-7,0 arasındadır. pH 4,0 ' ın altında polifenol oksidaz inaktiftir. Kaynağına bağlı olarak değişmekle birlikte polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklığı 25-30 °C aralığında olup genellikle termal kararlılığı düşüktür. 70-90 °C civarında enzim aktifliğini tamamen kaybeder (ZAWISTOWSKI ve ark., 1979; VIGYAZO, 1981).

1.2. Oksidasyon Reaksiyonları

Anorganik kimyacılar oksidasyonu iki şekilde tanımlarlar: Elektronların kaybı ve oksidasyon sayısının artışı. Organik kimyada bu tanımlar teknik olarak doğru olsa da uygulaması kolay değildir. Bazı organik oksidasyon ve redüksiyonlarda elektronlar doğrudan transfer edilirken bu reaksiyon mekanizmalarının çoğu doğrudan elektron transferini içermez. Bazı durumlarda oksidasyon sayısını belirlemek kolaydır. Örneğin CH_4 ' deki karbonun oksidasyon sayısı -4 ' tür. Bir moleküldeki karbon atomlarının farklı oksidasyon durumlarında olmaları onlara neyin bağlı olduğuna bağlıdır. Organik kimyacılar oksidasyonu bir moleküldeki bir fonksiyonel grubun oksidasyon sayısı daha yüksek bir gruba dönüşmesi olarak tanımlamıştır. Bu sınıflandırma sadece tek bir karbon atomuna veya iki komşu karbon atomuna uygulanabilir. Buna göre 1,3-diklorpropan klorometanla aynı oksidasyon durumundadır fakat 1,2-diklorpropan daha yüksek oksidasyon durumundadır. Herhangi bir bileşiğin aynı kategorideki başka bir bileşiğe dönüşmesi bir oksidasyon veya redüksiyon değildir. Organik kimyadaki çoğu oksidasyonlar bir oksijen atomu kazanımı veya bir hidrojen atomu kaybı şeklindedir.

Oksidasyon sayısının belirlenmesi için gerekli kurallar şöyle sıralanabilir:

- Metan serisinde bulunan hidrokarbonlarda C atomunun oksidasyon sayısı 0' dir.
- Oksidasyon sayısı; herbir hidrojen veya alkil grubunun daha kuvvetli e^- çeken bir grupla yer değiştirmesi sonucu artar ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, halojen, CO_2 , v.b.).
- Karbona bağlı aynı süstitüentlerin; oksidasyon sayısının artışına göre sıralanışı şöyledir: $\text{CH}_3\text{X} > \text{RCH}_2\text{X} > \text{R}_2\text{CHX} > \text{R}_3\text{CX}$
- Bazı yapılardan düşük oksidasyon sayısından, yüksek oksidasyon sayısına geçişler;



(+1)

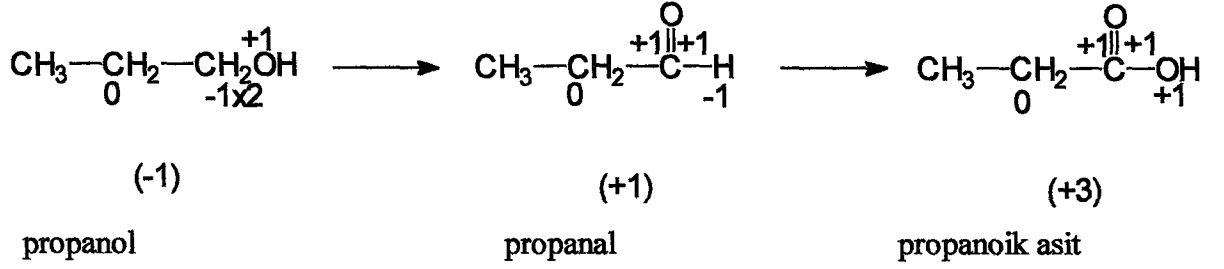
(+2)



(+3)

(+4)

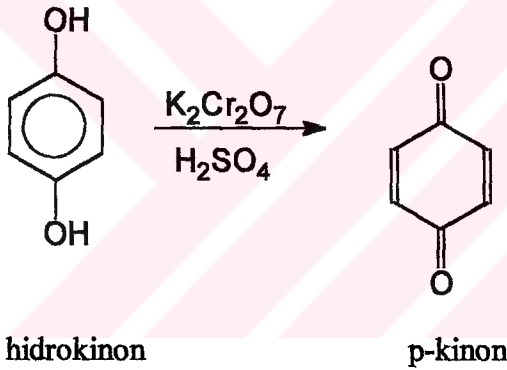
- Bir C atomunun oksidasyon sayısı hesaplanırken her H bağı için -1 , C-C bağı için 0 ve O, N, S, Br gibi heteroatomlarla yapılan bağlar için $+1$ değeri verilir.



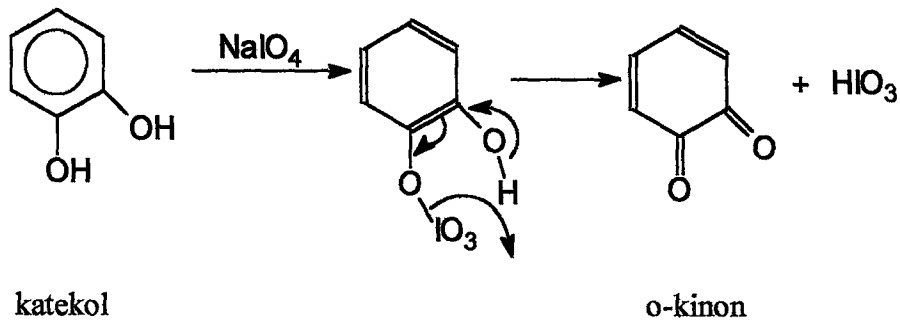
Oksidasyonlar beş grupta sınıflandırılır:

- Hidrojenin eliminasyonu
- C-C bağlarının kırılmasını içeren reaksiyonlar
- Hidrojenin oksijenle yerdeğiştirme reaksiyonları
- Oksijenin substrata katılma reaksiyonları
- Oksidatif bileşikler

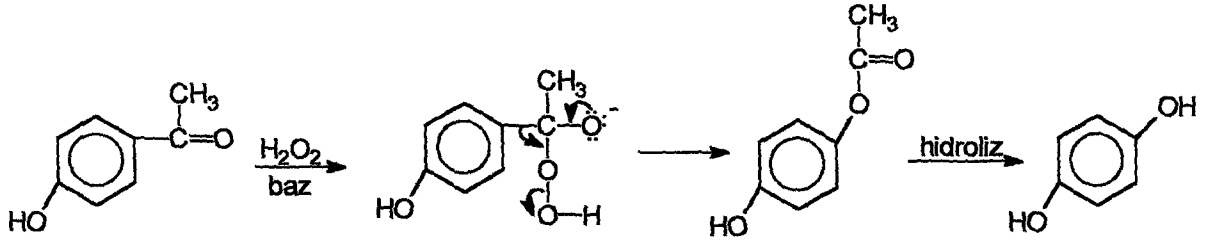
Fenollerin ve aromatik aminlerin kinonlara oksidasyonu şu şekilde gerçekleşir.



Orto ve para dioller orto ve para kinonlara kolaylıkla oksitlenirler. Dikromat asidi, gümüş oksit, kurşun tetraasetat, HIO_4 ve atmosferik oksijen oksitleme ajanı olarak kullanılır. Sadece bir $-\text{OH}$ ve $-\text{NH}_2$ grubu içeren halkalar için etkin bir reaktif $(\text{KSO}_3)_2\text{N-O}$ (dipotasyum nitrodisülfonat; Fremy tuzu) dur.



Alkali H_2O_2 ile bir aromatik aldehit ArCHO veya keton ArCOR bir fenole dönüşür, fakat orto veya para-pozisyonunda bir $-\text{OH}$ veya $-\text{NH}_2$ grubu olmalıdır:



hidroksifenil metil keton

hidroksifenil asetat

hidrokinon

Kondense aromatik sistemler (naftalin içeren) çeşitli oksitleme ajanlarıyla kinonlara doğrudan oksitlenebilirler. Verim genellikle yüksek değildir. İyi verim serik amonyum sülfat ile elde edilir. Benzen güçlü oksitleme ajanlarıyla böyle oksitlenemez fakat elektrolitik olarak benzokinona oksitlenebilir (MARCH, 1992).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Elmadan elde edilen polifenol oksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla manometrik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler kıyaslanmıştır (MAYER ve ark., 1966).

Kabuğu soyulmuş patates eşit ağırlıkta saf su ile homojen hale getirilerek homojenat naylon kumaştan süzölmüş ve 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Temel reaksiyon karışımı olarak 3 mL saf su, 1 mL 0,1 M potasyum fosfat pH 6,0 tamponu, 1 mL 0,006 M katekol ve 0,5 mL homojenat kullanılarak polifenol oksidaz enziminin aktivitesi incelenmiştir (HYODO ve URITANI, 1967).

Kiraz ekstraktından elde edilen polifenol oksidaz enzimi Sefadeks kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi ve poliakrilamid-jel elektroforez yöntemleriyle saflaştırılarak enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve substrat spesifikliği gibi özellikleri incelenmiştir (BENJAMIN ve MONTGOMERY, 1973).

Polifenol oksidaz oksidoredöktaz sınıfına ait bir enzimdir ve moleköler oksijen varlığında difenolleri oksitler. Enzim katalog numarası 1. 14. 18. 1'dir. Monofenolün sistematik adı dihidroksifenil alanin: Oksijen oksidoredöktazdır. Bu enzim orto ve visinal (3, 4, 5-trihidroksi) -OH grupları içeren fenolik bileşikleri oksitler. Ayrıca monofenolleri o-dihidroksi fenollere dönüştürür. İlk olarak mantarda bulunduğu tespit edilmiştir. Etki ettiği substrata göre bu enzim tirozinaz, krezolaz, katekol oksidaz, fenolaz, o-difenol oksidaz olarak da bilinmektedir (VIGYAZO, 1981).

Brezilya'da bulunan farklı bir patates türüyle yapılan bir çalışmada patatesler yıkanıp kabuğu soyulmuş ve küçük dilimler haline getirilmiştir. 100 g patates 0,2 M pH 7,5 tamponu ile homojen hale getirilmiştir. Homojenat süzölerek 40 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Katı amonyum sülfat ekstrakta sürekli karıştırılarak eklenmiştir. 60 dakikalık karıştırma işleminden sonra preparat 40 dakika santrifüj edilmiş ve pelet atılmıştır. Temiz süpernatanta doygunluğa kadar amonyum sülfat eklenmiştir. Santrifüjle çökelti elde edilerek az bir hacimde aynı tamponla çözülmüş ve bir Sefadeks G-25 kolona uygulanmıştır. Kolondan 5 mM pH 7,5 fosfat tamponu geçirilmiştir. Fraksiyonlar katı amonyum sülfat ile doyurulmuş santrifüjle çökelti elde edilmiştir. Çökelti 3 mL 5 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile

çözölmüştür. Enzim fraksiyonu diyaliz edilerek Sefadeks G-200 kolonda saflaştırılmıştır.

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometreyle ölçölmüştür. Reaksiyon karışımı 0,4 mL klorojenik asit; 0,2 mL enzim örneği ve 0,5 mL pH 6,6 fosfat tamponundan oluşmuştur (BATISTUTI ve LOURENÇO, 1985).

Polifenol oksidaz enzimi %0,5'lik polietilen glikol ve 10 mM sodyum tetratiyonat içeren 0,5 M pH 7,3 fosfat tamponu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme ve kolon kromatografisi işlemlerinden sonra enzim saflaştırılmıştır. Buna göre kivi meyvesinde monofenol oksidaz ve difenol oksidaz bulunduğu anlaşılmıştır (PARK ve LUH, 1985).

Polifenol oksidaz enziminin fasulye, bakla, bezelye, ıspanak, tütötn, domates gibi bitkilerin ekstraktlarındaki aktivitesi incelenmiştir. Polifenol oksidaz enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu bitkinin bakla olduğu bulunmuştur. En düşük enzim aktivitesi ise bezelyede gözlenmiştir (FLURKEY, 1986).

L-serin'in varlığında ve yokluğunda 4-metil katekol'ün kimyasal ve enzimatik oksidasyonu araştırılmış ve bunun için polifenol oksidaz enzimi kullanılmıştır. Oluşan ürünler ise spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (CABANES ve ark., 1987).

Polifenol oksidaz enziminin ekstraksiyonu için 0,1 M sodyum sitrat-0,2 M potasyum fosfat pH 5,8 tamponuna fenol adsorbanları eklenmiştir. Ekstrakt 4°C'de saklanmıştır. Dondurulmuş çilekler azot atmosferinde toz haline getirilerek ekstrakta eklenmiştir. Magnetik karıştırıcıda 4 dakika karıştırma işleminden sonra süspansiyon 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant süzölmüş ve böylece enzim ekstraktı elde edilmiştir. Polifenol oksidaz enziminin aktivitesini belirlemek içinse substrat olarak katekol kullanılmış ve polifenol oksidaz enziminin özellikleri incelenmiştir (EBELING ve MONTGOMERY, 1990).

ZAWISTOWSKI ve ark. (1991) polifenol oksidaz enziminin ekstraksiyon, saflaştırma işlemleriyle birlikte aktivitesini, substrat spesifikliğini, inhibitörlerini, optimum pH değerini ve termal kararlılığını araştırmışlardır.

Patates yıkanıp kabuğu soyularak doğranmış ve 0,1 M sodyum fosfat pH 7,0 tamponuyla homojen hale getirilmiştir. Süspansiyon süzölmekle 40 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant amonyum sülfat ile doyurulmuştur. Çökelti santrifüjlenerek 5

mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponunda çözülmüştür. Polifenol oksidaz enzimi saflaştırılmıştır.

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi 4-metil katekol, klorojenik asit, kafeik asit ve katekol substratları kullanılarak sırasıyla pH 4,0; 4,5; 5,5 ve 6,5'de ölçülmüştür. Polifenol oksidaz enziminin protein konsantrasyonu ve molekül kütlesi belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleriyle birlikte inhibitörlerin enzim üzerine etkisi incelenmiştir (LOURENÇO ve ark., 1992).

3 g patatese 9,0 mL sitrat-fosfat pH 4,5 tamponu eklenerek ezilmiş, homojenat 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 4°C'de polifenol oksidaz enziminin kaynağı olarak saklanıp enzimin aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlar fenol konsantrasyonunun patatesteki enzimatik kahverengileşme olayı için iyi bir indikatör olarak kullanılabileceğini göstermiştir (MA ve ark., 1992).

Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için 4-metil katekol, dopamin, p-krezol gibi substratlar kullanılmış ve sodyum benzoat, askorbik asit gibi bazı maddelerin enzim üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir (WHITAKER, 1994).

Patatesin çürümesi gibi bazı olumsuz durumların polifenol oksidaz enziminin biyosentezine neden olduğu bulunmuştur. 50°F'tan daha düşük sıcaklıklarda polifenol oksidaz enziminin aktivitesi düşmüş, daha yüksek sıcaklıklarda ise polifenol oksidaz enziminin aktivitesinin arttığı monomerik polifenollerin polimerik pigmentlere dönüşmesinden dolayı gerçekleşen patatesteki renk değişiminden anlaşılmıştır. 4,20 ve 33°C'de saklanan patates yumrusu için şu sonuçlar bulunmuştur: 20°C'de 30 gün sonra filizlenme gözlenirken 4 ve 33°C'de ise 160 gün sonra bile filizlenme gözlenmemiştir. 20°C'de saklanan patates yumrusundaki polifenol oksidaz enziminin aktivitesi artarken 33°C'de hızla azalmıştır.

Patatesin enzimatik kahverengileşme reaksiyonu primer substrat tirozinin polifenol oksidaz enziminin katalizi ile başlamıştır. Tirozin, polifenol oksidaz enziminin aktivitesi ve patatesin kahverengileşme oranı arasında bir ilişki bulunmuştur. Sistein, N-asetil-L-sistein gibi sülfüdril bileşiklerinin ve indirgenmiş glutatyonun meyve ve sebzelerdeki enzimatik kahverengileşme reaksiyonlarını katalizleyen polifenol oksidaz enzimi için iyi inhibitörler olduğu tespit edilmiştir (FRIEDMAN, 1997).

Polifenol oksidaz enziminin kaynağı patates ekstraktını kullanarak fenollerin belirlenmesi için bir amperometrik biyosensörün hazırlanması amaçlanmıştır.

Biyosensör glutaraldehit ve serum albüminli patates ekstraktının bir oksijen zarı üzerine sabitlenmesiyle yapılmıştır. Bu biyosensör katekol, pirogallol, fenol ve p-krezolün farklı konsantrasyonları için doğrusal cevaplar sağlamıştır (VIEIRA ve FILHO, 1997).

Farklı zamanlarda mantarlar 92°C'de ısıtılmış, mantarın şapka kısmı ayrılarak sıvı azotta dondurulmuş ve -80°C'de saklanmıştır. Dondurulmuş dokular 1 dakika boyunca 50 mL 30 mM sodyum fosfat ile karıştırılarak 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant süzülerek polifenol oksidaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Taze kesilmiş sebze meyvelerin kahverengileşmesi gıda endüstrisi için ciddi bir sorun olmuştur. Mantardaki bu sorun polifenol oksidaz enziminden kaynaklandığı için bu etkinin incelenmesi amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak incelenmiş, mantarın farklı dokularında polifenol oksidaz enziminin aktivitesi gözlenerek en büyük etkinin gövdede olduğu belirlenmiştir (DEVECE ve ark., 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışmada kullanılan bitki, polyganaceae familyasına ait *Rumex crispus* (L.) olarak belirlenmiştir. Çalışma boyunca kullanılan tüm bitki İstanbul Teknik Üniversitesi Kampüsü' nden toplanmıştır. Bitki Nisan-Temmuz ayları aralığında yeşil görünümlü, tohumlu, iri yapraklı olup, Temmuz ayından itibaren rengi bordo-kahverengiye dönerek kurumakta, tohumlar dikensi bir hal alıp, yaprakları büzüşmektedir.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalar süresince kullanılan kimyasal maddelerin adı, formülü ve alındıkları firma adı Çizelge 3.1.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adı, formülü ve alındıkları firma adı.

Kimyasal Madde Adı, Formülü	Firma Adı
Alizarin (C ₁₄ H ₈ O ₄)	Merck
Alüminyum tabaka (Kieselgel 60 F ₂₅₄)	Merck
Dietil eter (CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃)	Merck
Diklormetan (CH ₂ Cl ₂)	Merck
Etil alkol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck
Etil asetat (CH ₃ COOCH ₂ CH ₃)	Merck
Hidrokinon (C ₆ H ₆ O ₂)	Merck
Kloroform (CHCl ₃)	Merck
P-krezol (C ₇ H ₈ O)	Merck
Metil alkol (CH ₃ OH)	Merck
P-nitrofenol (C ₆ H ₅ NO ₃)	Merck
Potasyum monohidrojenfosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck

Çizelge 3.1.1. (Devam) Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adı,formülü ve alındıkları firma adı.

Silikajel	Merck
Sodyum alizarin-5-sülfonat (C ₁₄ H ₇ SO ₇ Na)	Merck
Sodyum dihidrojenfosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlar ve özellikleri Çizelge 3.1.2.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve özellikleri.

Cihazın Adı	Özellikleri
Etüv	Nüve marka, FN 400 model
İnkübatör	Nüve marka, ES 500 model
Magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı	Nüve marka, MK 390 model
Mikser	Arçelik, 220 V, 140 W
Santrifüj Cihazı	Hettich marka, EBA 8S model
UV Cihazı	Shimadzu marka,1601 model,UV-VIS Spektrofotometresi

3.2. YÖNTEM

Bu bölümde polifenol oksidaz enziminin bir tür patates olan tarodan, patatesten, şeftaliden ve mantardan elde edilmesi, *Rumex crispus* bitkisinin kökünden 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonu ayırma ve saflaştırma işlemleri, substratların enzimatik oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi, polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin (optimum pH ve optimum sıcaklık belirlenmesi, standart grafiklerin elde

edilmesi, Km ve Vm değerlerinin belirlenmesi) ve enzimatik oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin incelenmesi anlatılacaktır.

3.2.1. Polifenol Oksidaz Enziminin Patates ve Tarodan Elde Edilmesi

Polifenol oksidaz enzimini elde etmek için öncelikle patates kullanıldı. İyice yıkanan bir patatesin kabuğu soyularak tartıldı. 100 g olarak tartılan patates mikserde kk parçalara ayrıldı. Kk parçalar halindeki patates 250 mL' lik bir behere alınarak üzerine 100 mL yani patatese eşit miktarda saf su eklendi. Patates-su karışımı magnetik karıştırıcıda beş dakika karıştırılarak homojen bir karışımın elde edilmesi sağlandı. Homojen karışım naylon süzgeçten szlerek sznt beş dakika 10000 devirle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı (HYODO ve URITANI, 1967).

Aynı işlemler patates yerine bir tür patates olan taro bitkisi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin şeftali ve Mantardan Elde Edilmesi

Polifenol oksidaz enziminin şeftaliden hazırlanmasında önce aseton tozu elde edilmesi ve sonra bundan enzimin ekstraksiyonu olmak üzere iki aşamalı bir işlemden oluşan yöntem uygulanmıştır.

Bu amaçla bir miktar şeftali iyice yıkandıktan sonra çekirdekleri çıkarılmış ve beş-altı parçaya bölünmüştür. Bundan 200 g tartılıp bir mikserde aktarılmıştır. zerine daha önce derin dondurucuda bekletilerek $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulmuş 400 mL aseton eklenmiştir. Mikser iki dakika çalıştırılarak şeftaliler bu soğuk aseton içinde parçalanmışlardır. Elde edilen bulamaç nuçe hunisi kullanılarak szlmştr. Süzgeç kağıdı üzerindeki kalıntı mikserde tekrar alınarak ve üzerine yeniden 200 mL, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek işlem üç defa tekrar edilmiştir. Süzgeç kağıdı üzerindeki son kalıntı bir kapsüle alınarak oda sıcaklığında bir gece kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Ancak sarı renkli pudra görünümündeki bu materyale yaygın terimiyle aseton tozu denmektedir. Aseton tozu kullanılan kadar $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de

saklanmıştır. Deneyleerde kullanılan enzim ekstraktı bu aseton tozundan üretilmiştir. Aynı işlemler şeftali yerine mantar kullanılarak tekrarlanmıştır.

Şeftali ve mantardan hazırlanan aseton tozundan ikişer gram tartılarak iki ayrı behere alınmıştır. Her iki aseton tozu üzerine +4 °C' ye kadar soğutulmuş 0,05 M pH 6,8 fosfat tampon çözeltisinden 150 mL eklenmiştir. Karışım magnetik karıştırıcı ile otuz dakika karıştırılmış ve enzimin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Santrifüjden (10000 devir) geçirilerek ekstraktın berraklaşması sağlanmıştır. Elde edilen süpernatant şeftali ve mantar enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır (YEMENİCİOĞLU ve CEMEROĞLU, 1996).

3.2.3. *Rumex crispus*'tan 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonu Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri,

2004 yılı Temmuz ayında İstanbul Teknik Üniversitesi Kampüsü' nden toplanan *Rumex crispus* bitkisinin kök kısmı ince toz haline getirilip havada kurutularak ekstraksiyon işlemi için hazırlandı.

İnce toz haline getirilmiş kök, iki hafta boyunca oda sıcaklığında dietil eterle ekstrakte edildi ve daha sonra süzüldü. Ham ekstrakt 2 M HCl (100 mL) ile hidroliz edildi. Koyu kırmızı renkli çözelti kloroform ile ekstrakte edildi ve organik faz Na₂SO₄ ile kurutuldu. Çözücü vakumda uçuruldu. Kalan sarı renkli katı, silikajel kolonuna alınarak kolondan kloroform ve metanol geçirildi. Elde edilen fraksiyonlar preparatif ince tabakayla petrol eteri: benzen (1:1) ve petrol eteri: etil asetat: asetik asit (95:4:1) çözücü sistemleriyle saflaştırıldı. Mg(CH₃COO)₂ ile kırmızı renk veren fraksiyondan 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon saf olarak elde edildi (GÜNAYDIN ve ark., 2001).

3.2.4. Enzimatik Oksidasyon Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi

Çalışma boyunca p-krezol, p-nitrofenol, 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon, alizarin ve sodyum alizarin-5-sülfonat bileşikleri substrat olarak kullanılmıştır. Bu substratların 0,0625 mM' lık etanol çözeltileri kullanılarak bu maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları SHIMADZU marka, 1601 model, çift

ışınli UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 1 cm'lik kuvartz hücreler ile spektrum taraması yapılarak belirlenmiştir. Etanol kör çözelti olarak kullanılmıştır. Tarama sonucunda çalışma sırasında kullanılan bütün substratların maksimum absorpsiyon yaptıkları dalgaboyları çizelge 3.2.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.2.4. Substratların maksimum absorpsiyon yaptıkları dalgaboyları

Substrat	Maksimum Dalgaboyu (nm)
p-krezol	230
p-nitrofenol	314
1,5-dihidroksi-3-metoksi-7- metilantrakinon	430
Alizarin	431
Sodyum alizarin-5-sülfonat	425

Bütün substratlar için 3 mL saf su, 1 mL 0,1 M pH 6 fosfat tamponu, 0,5 mL enzim çözeltisi kör çözelti olarak kullanıldı. Öncelikle her substrat için hazırlanan kör çözeltiler sırayla hücreye konularak, cihaz substratların maksimum absorpsiyon yaptıkları dalgaboylarında bu çözeltilerin yaptığı absorpsiyonlara karşı sıfırlandı. Enzim kaynağı olarak taro, patates, şeftali ve mantar kullanıldığında oksidasyonun nasıl değiştiğini incelemek için p-krezol substratının kör çözeltilerine taro, patates, şeftali ve mantardan elde edilen enzim çözeltileri eklenerek 230 nm'de reaksiyonun ilerleyişi UV-VIS spektrofotometresinde incelendi. Ancak taro enzim çözeltisi kullanıldığında reaksiyonun çok yavaş ilerlediği belirlendi. Patates, şeftali ve mantar enzim çözeltilerinde de benzer etki gözlemlendiği için sonraki çalışmalarda patates enzim çözeltisi kullanıldı. Daha sonra bütün substratların kör çözeltilerine 0,5 mL patates enzim çözeltisi eklenerek hazırlanan örnek çözeltilerinde bir reaksiyon gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için UV-VIS spektrofotometresinde üç dakika boyunca bir dakika aralıklarla her substrat için absorbans okundu. Bunun sonucunda çalışmada kullanılan bütün substratların UV-VIS spektrofotometresinde gözlenen absorbans düşmesinden dolayı reaksiyon verdiği belirlendi (HYODO ve URITANI, 1967).

3.2.5. Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi

Polifenol oksidaz enziminin özellikleri incelenirken her seferinde öncelikle enzimin önceki çalışmalarda kullanılan substratı p-krezol ile deneyler yapılmıştır.

3.2.5.1. Optimum pH' ının Belirlenmesi

NaH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 tampon çözeltileri kullanıldı. Bütün substratlar için 3 mL saf su, 1 mL 0,1 M fosfat tamponu, 0,5 mL patates enzim çözeltisi, 1 mL 0,0625 mM substratın etanol çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımları 28 °C sıcaklıkta sekiz dakika bekletilerek UV-VIS spektrofotometresinde absorbans okundu. Kör çözelti karışımı oluşturan substrat dışındaki bileşenlerden hazırlandı (VIGYAZO, 1981).

3.2.5.2. Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Bütün substratlar için 3 mL saf su, 1 mL optimum pH tamponu, 0,5 mL patates enzim çözeltisi, 1 mL 0,0625 mM substratın etanol çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımları 15, 20, 25, 30 °C sıcaklıklarda sekiz dakika bekletilerek UV-VIS spektrofotometresinde absorbans okundu. Kör çözelti karışımı oluşturan substrat dışındaki bileşenlerden hazırlandı (VIGYAZO, 1981).

3.2.5.3. Standart Grafiklerin Elde Edilmesi

Bütün substratlar için etanol kör çözelti olarak kullanıldı ve substratların 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 mM'lık etanol çözeltileri UV-VIS spektrofotometresinde incelenerek absorbanslar okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık substrat derişimleri grafiğe geçirildi (HYODO ve URITANI, 1967).

3.2.5.4. Km ve Vm Değerlerinin Belirlenmesi

Bütün substratların 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 mM'lık derişimleri için ayrı ayrı 3 mL saf su, 1 mL optimum pH tamponu, 0,5 mL patates enzim çözeltisi, 1 mL substratın etanol çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımları bütün substratlar için belirlenen optimum sıcaklıkta on dakika bekletilerek bu süre sonunda 1 mL 1 M HCl ile reaksiyonlar durduruldu ve UV-VIS spektrofotometresinde absorbanslar okundu. 3 mL saf su, 1 mL optimum pH tamponu, 0,5 mL patates enzim çözeltisi, 1 mL 1 M HCl çözeltilerinden oluşan karışım kör çözelti olarak kullanıldı. Önceden çizilen standart grafiklerden yararlanılarak okunan absorbans değerlerine karşılık gelen substrat derişimleri belirlendi. Harcanan substrat derişimleri on dakika olan reaksiyon süresine bölünerek her derişim için bütün substratların hızları hesaplandı. Hız ve substrat derişimlerinin tersi alınarak $1/V-1/[S]$ grafikleri çizildi. Bu grafiğin $1/V$ ve $1/[S]$ eksenini kestiği noktalar kullanılarak bütün substratlar için polifenol oksidaz enziminin Km ve Vm değerleri belirlendi (HYODO ve URITANI, 1967).

3.2.6. Enzimatik Oksidasyon Reaksiyonu Sonucu Oluşan Ürünlerin İncelenmesi

Enzimatik oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan ürünü inceleyebilmek için bütün substratların optimum pH tamponunda çözülmesiyle 4 mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden bir erlene 20 mL alınmış ve patates kütesinin yarısına eşit miktarda saf su eklenerek derişik hazırlanan patates enzim çözeltisinden de 30 mL alınarak substrat çözeltisiyle karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım her substratın optimum sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Bu süre sonunda p-krezolün olduğu karışımın rengi sarıdan kahverengiye, p-nitrofenol ve 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon bulunan karışımların rengini sarıdan açık yeşile, alizarin ve sodyum alizarin-5-sülfonatın bulunduğu karışımların renginin de turuncudan bordoya döndüğü gözlenmiştir. Bütün karışımların suyunun yarısı uçurularak kalan karışımlar 15 mL dietil eterle beşer defa ekstrakte edilmiştir. Dietil eterli ekstraktlar, substrat ve enzim çözeltisi ince tabakada incelenerek dietil eterli ekstraktta substrat ve enzim çözeltisinden

farklı olarak sarı renkli enzimatik oksidasyon reaksiyonu ürünlerinin bulunduğu gözlenmiştir. Bu ürünlerin saflaştırılarak çoğaltılması için preparatif çalışmalar devam etmektedir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Enzimatik oksidasyon reaksiyonları sırasında polifenol oksidaz enziminin fonksiyonunu belirlemek amacıyla hidrokinon substratı kullanıldı. Ancak UV-VIS spektrofotometresi ile reaksiyon ilerleyişi incelenirken absorbandsa hiçbir değişim olmadığı gözlemlendi. Hidrokinon o-difenol bileşigi olmadığından dolayı beklendiği gibi hidrokinonun polifenol oksidaz enzimi için substrat niteliği taşımadığı belirlendi.

Taro ve patatesten ayrı ayrı hazırlanan enzim çözeltilerinin aktifliğini kıyaslamak amacıyla önceki çalışmalarda polifenol oksidaz enziminin spesifik substratı olarak nitelendirilen p-krezol bileşigi substrat olarak kullanıldı. UV-VIS spektrofotometresinde 230 nm'de hem taro hem de patates enzim çözeltileri kullanıldığında üç dakika boyunca otuz saniye aralıklarla gözlenen absorbands değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Taro ve patates enzim çözeltileri kullanıldığında p-krezol için gözlenen absorbands değerleri

Zaman (Saniye)	Absorbans (Taro)	Absorbans (Patates)
0	0,705	0,705
30	0,701	0,673
60	0,695	0,611
90	0,689	0,524
120	0,683	0,442
150	0,677	0,351
180	0,672	0,273

Çizelge 4.1'den de anlaşılacağı gibi patates enzim çözeltisi kullanıldığında p-krezolün absorbandsı taro enzim çözeltisi kullanıldığında gözlenen absorbandsdan çok daha azdır. Absorbans derişimle doğru orantılı olarak değiştigi için bu sonuçlara göre patates enzim çözeltisi kullanıldığında harcanan p-krezol miktarı daha fazladır. Yani patatesten hazırlanan enzim çözeltisinin tarodan hazırlanan enzim çözeltisinden daha aktif olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde patates, şeftali ve mantar enzim çözeltilerinin aktifliği karşılaştırıldığında p-krezolün başlangıç absorbands

değerleri üç enzim çözeltisi için de farklı olmakla birlikte gözlenen absorban değerleri ortalama 0,003 olarak belirlenmiştir. Buna göre patates, şeftali ve mantar enzim çözeltilerinin benzer aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Rumex crispus bitkisinin kökleri üzerinde yapılan ekstraksiyon ve kromatografik işlemler sonucunda 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon saf olarak elde edilmiştir. Bu madde bitkiden elde edildiği için çalışmada doğal substrat olarak kullanılmıştır.

Enzimatik oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirilirken reaksiyonların ilerleyişi sekiz dakika boyunca UV-VIS spektrofotometresinde izlenmiş ve absorban değerleri iki dakikada bir okunmuştur. Çizelge 4.2.' de p-nitrofenolün absorban değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. p-nitrofenolün absorban değerleri

Zaman (dakika)	Absorbans
0	0,621
2	0,606
4	0,584
6	0,533
8	0,482

Çizelge 4.3' de 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonun absorban değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinonun absorban değerleri

Zaman (dakika)	Absorbans
0	0,025
2	0,012
4	0,008
6	0,006
8	0,004

Çizelge 4.4' de alizarinin absorban değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.4. Alizarinin absorbens değerleri

Zaman (dakika)	Absorbans
0	0,275
2	0,256
4	0,243
6	0,198
8	0,147

Çizelge 4.5' de sodyum alizarin-5-sülfonatın absorbens değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sodyum alizarin-5-sülfonatın absorbens değerleri

Zaman (dakika)	Absorbans
0	0,284
2	0,263
4	0,214
6	0,187
8	0,121

P-krezol için UV-VIS spektrofotometresinde gözlenen absorbens değerlerine göre önceki çalışmalarda (VIGYAZO, 1981) belirlendiği gibi optimum pH 6,0 ve optimum sıcaklık 25 °C olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. P-nitrofenol için optimum pH belirlenirken okunan absorbens değerleri

pH	Absorbans
5,0	0,601
6,0	0,482
7,0	0,609
8,0	0,618

Çizelge 4.6' ya göre absorbansın en düşük olduğu yani p-nitrofenolün en çok harcandığı pH 6,0 polifenol oksidazın p-nitrofenol için optimum pH değeridir.

Çizelge 4.7. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilntrakinon için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri

PH	Absorbans
5,0	0,008
6,0	0,007
7,0	0,005
8,0	0,009

Çizelge 4.7' ye göre absorbansın en düşük olduğu yani 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilntrakinonun en çok harcandığı pH 7,0 polifenol oksidazın 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilntrakinon için optimum pH değeridir.

Çizelge 4.8. Alizarin için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri

pH	Absorbans
5,0	0,083
6,0	0,147
7,0	0,214
8,0	0,231

Çizelge 4.8' e göre absorbansın en düşük olduğu yani alizarinin en çok harcandığı pH 5,0 polifenol oksidazın alizarin için optimum pH değeridir.

Çizelge 4.9. Sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum pH belirlenirken okunan absorbans değerleri

pH	Absorbans
5,0	0,163
6,0	0,121
7,0	0,283
8,0	0,149

Çizelge 4.9' a göre absorbansın en düşük olduğu yani sodyum alizarin-5-sülfonatın en çok harcandığı pH 6,0 polifenol oksidazın sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum pH değeridir.

Çizelge 4.10. p-nitrofenol için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri

Sıcaklık (°C)	Absorbans
15	0,586
20	0,603
25	0,443
30	0,473

Çizelge 4.10' a göre absorbansın en düşük olduğu yani p-nitrofenolün en çok harcandığı sıcaklık 25 °C olup bu sıcaklık polifenol oksidazın p-nitrofenol için optimum sıcaklık değeridir.

Çizelge 4.11. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantakinon için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorbans değerleri

Sıcaklık (°C)	Absorbans
15	0,008
20	0,005
25	0,004
30	0,006

Çizelge 4.11' a göre absorbansın en düşük olduğu yani 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantakinonun en çok harcandığı sıcaklık 25 °C olup bu sıcaklık polifenol oksidazın 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantakinon için optimum sıcaklık değeridir.

Çizelge 4.12. Alizarin için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorban değerleri

Sıcaklık (°C)	Absorbans
15	0,070
20	0,063
25	0,058
30	0,139

Çizelge 4.12' ye göre absorbanın en düşük olduğu yani alizarinin en çok harcandığı sıcaklık 25 °C olup bu sıcaklık polifenol oksidazın alizarin için optimum sıcaklık değeridir.

Çizelge 4.13. Sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum sıcaklık belirlenirken okunan absorban değerleri

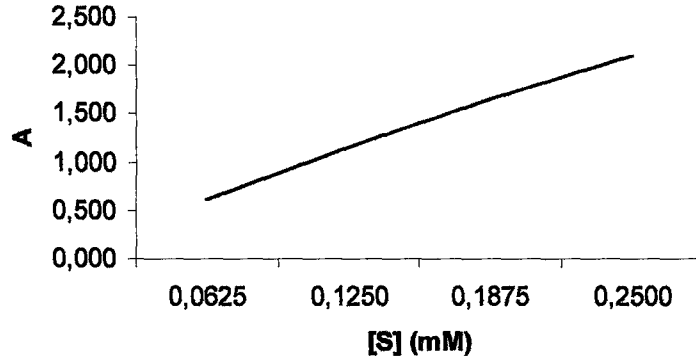
Sıcaklık (°C)	Absorbans
15	0,273
20	0,204
25	0,257
30	0,246

Çizelge 4.13' e göre absorbanın en düşük olduğu yani sodyum alizarin-5-sülfonatın en çok harcandığı sıcaklık 20 °C olup bu sıcaklık polifenol oksidazın sodyum alizarin-5-sülfonat için optimum sıcaklık değeridir.

Çizelge 4.14. P-nitrofenol için standart grafik elde edilirken okunan absorban değerleri

[S] (mM)	Absorbans
0,0625	0,623
0,125	1,151
0,25	2,112
0,5	3,913

Çizelge 4.14' deki değerler grafiğe geçirildiğinde p-nitrofenol için Şekil 4.1' deki standart grafik elde edilmiştir.

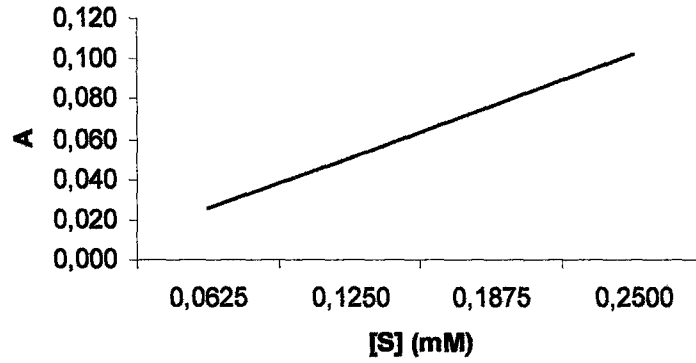


Şekil 4.1. P-nitrofenolün standart grafiği

Çizelge 4.15. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri

[S] (mM)	Absorbans
0,0625	0,026
0,125	0,051
0,25	0,102
0,5	0,178

Çizelge 4.15' deki değerler grafiğe geçirildiğinde 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için Şekil 4.2' deki standart grafik elde edilmiştir.

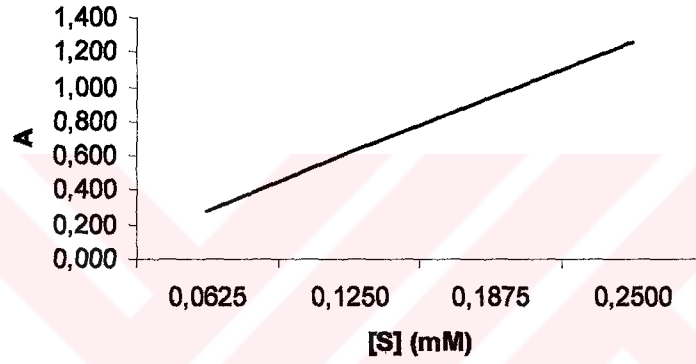


Şekil 4.2. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon standart grafiği

Çizelge 4.16. Alizarin için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri

[S] (mM)	Absorbans
0,0625	0,279
0,125	0,620
0,25	1,265
0,5	2,515

Çizelge 4.16' daki değerler grafiğe geçirildiğinde alizarin için Şekil 4.3' deki standart grafik elde edilmiştir.

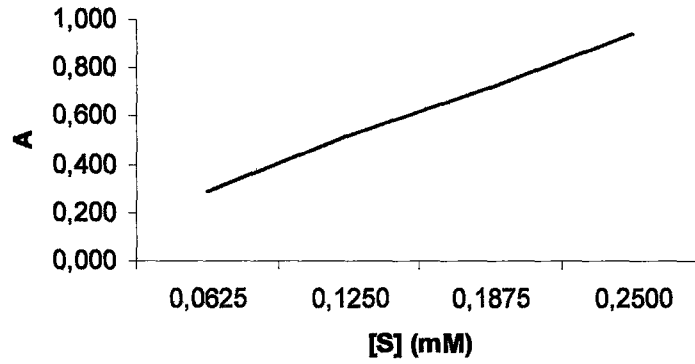


Şekil 4.3. Alizarinin standart grafiği

Çizelge 4.17. Sodyum alizarin-5-sülfonat için standart grafik elde edilirken okunan absorbans değerleri

[S] (mM)	Absorbans
0,0625	0,288
0,125	0,522
0,25	0,940
0,5	1,810

Çizelge 4.17' deki değerler grafiğe geçirildiğinde sodyum alizarin-5-sülfonat için Şekil 4.4' deki standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Sodyum alizarin-5-sülfonatın standart grafiği

P-nitrofenol için hız ölçümü yapılırken UV-VIS spektrofotometresinde okunan absorbanslar ve standart grafikten yararlanılarak elde edilen son p-nitrofenol derişimleri Çizelge 4.18' de verilmiştir.

Çizelge 4.18. P-nitrofenol için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri

[S] _{son} (mM)	Absorbans
0,0438	0,439
0,0281	0,344
0,0750	0,708
0,1970	1,750

Harcanan p-nitrofenol derişimi on dakika olan reaksiyon süresine bölünerek p-nitrofenolün başlangıçtaki her derişimi için reaksiyon hızları $V = [S]_{ilk} - [S]_{son} / 10$ eşitliğine göre aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$V_1 = 0,0625 - 0,0438 / 10 = 0,0019 \text{ mM/dak} \quad V_2 = 0,125 - 0,0281 / 10 = 0,0097 \text{ mM/dak}$$

$$V_3 = 0,25 - 0,0750 / 10 = 0,0175 \text{ mM/dak} \quad V_4 = 0,5 - 0,1970 / 10 = 0,0389 \text{ mM/dak}$$

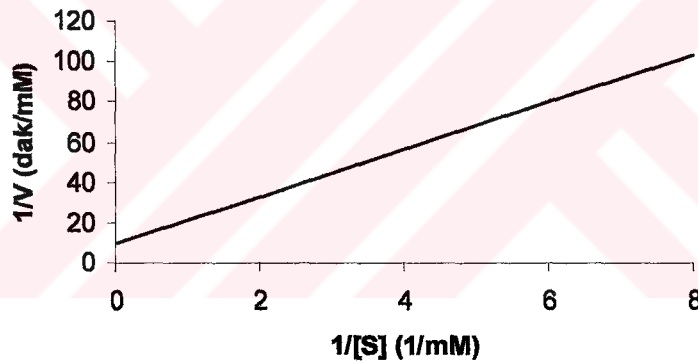
Diğer substratlar için de benzer şekilde hız hesapları yapılmıştır.

Çizelge 4.19' da p-nitrofenol için hesaplanan hız değerleri, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi verilmiştir.

Çizelge 4.19. P-nitrofenol için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi

V (mM/dak)	[S] (mM)	1/V(dak/mM)	1/[S] (1/mM)
0,0019	0,0625	526	16
0,0097	0,125	103	8
0,0175	0,25	57	4
0,0389	0,5	33	2

Çizelge 4.19' daki 1/V ve 1/[S] değerleri grafiğe geçirildiğinde p-nitrofenol için Şekil 4.5' deki 1/V-1/[S] grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin 1/[S] eksenini kestiği nokta $-1/K_m = -0,8'$ e eşit olup $K_m = 1,25$ mM olarak hesaplanmıştır. Aynı grafiğin 1/V eksenini kestiği nokta ise $1/V_m = 10'$ a eşit olup $V_m = 0,10$ mM/dak olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. P-nitrofenolün 1/V-1/[S] grafiği

1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için hız ölçümü yapılırken UV-VIS spektrofotometresinde okunan absorbanslar ve standart grafikten yararlanılarak elde edilen son 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon derişimleri Çizelge 4.20' de verilmiştir.

Çizelge 4.20. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri

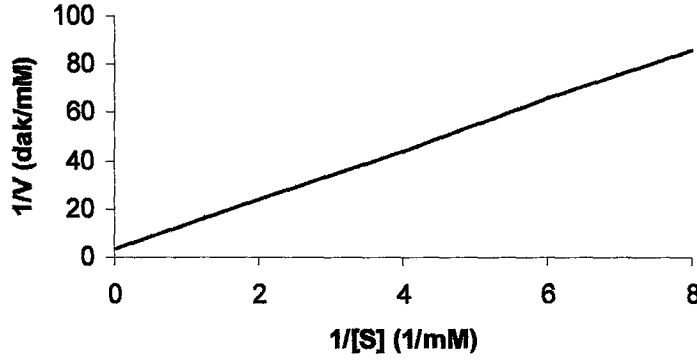
[S] (mM)	Absorbans
0,0625	0,003
0,125	0,005
0,25	0,011
0,5	0,034

Çizelge 4.21' de 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon derişimleri için hesaplanan hız değerleri, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi verilmiştir.

Çizelge 4.21. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi

V (mM/dak)	[S] (mM)	1/V (dak/mM)	1/[S] (1/mM)
0,0059	0,0625	170	16
0,0116	0,125	86	8
0,0227	0,25	44	4
0,0417	0,5	24	2

Çizelge 4.21' deki $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri grafiğe geçirildiğinde 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon için Şekil 4.6' daki $1/V-1/[S]$ grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin $1/[S]$ eksenini kestiği nokta $-1/K_m = -0,3'$ e eşit olup $K_m = 3,33$ mM olarak hesaplanmıştır. Aynı grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta ise $1/V_m = 3'$ e eşit olup $V_m = 0,33$ mM/dak olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilntrakinonun $1/V-1/[S]$ grafiği

Alizarin için hız ölçümü yapılırken UV-VIS spektrofotometresinde okunan absorbanslar ve standart grafikten yararlanılarak elde edilen son alizarin derişimleri Çizelge 4.22' de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Alizarin için hız ölçümü yapılırken okunan absorbans değerleri

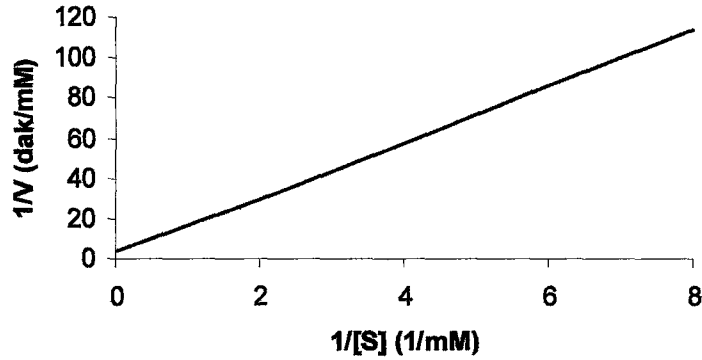
[S] (mM)	Absorbans
0,0344	0,131
0,0375	0,144
0,0781	0,360
0,1701	0,862

Çizelge 4.23' de alizarin için hesaplanan hız değerleri, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi verilmiştir.

Çizelge 4.23. Alizarin için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi

V (mM/dak)	[S] (mM)	1/V (dak/mM)	1/[S] (1/mM)
0,0028	0,0625	357	16
0,0088	0,125	114	8
0,0172	0,25	58	4
0,0375	0,5	30	2

Çizelge 4.23' deki $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri grafiğe geçirildiğinde alizarin için Şekil 4.7' deki $1/V-1/[S]$ grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin $1/[S]$ eksenini kestiği nokta $-1/K_m = -0,3'$ e eşit olup $K_m = 3,33$ mM olarak hesaplanmıştır. Aynı grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta ise $1/V_m = 4'$ e eşit olup $V_m = 0,25$ mM/dak olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.7. Alizarinin $1/V-1/[S]$ grafiği

Sodyum alizarin-5-sülfonat için hız ölçümü yapılırken UV-VIS spektrofotometresinde okunan absorbanlar ve standart grafikten yararlanılarak elde edilen son alizarin derişimleri Çizelge 4.24' de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Sodyum alizarin-5-sülfonat için hız ölçümü yapılırken okunan absorban değerleri

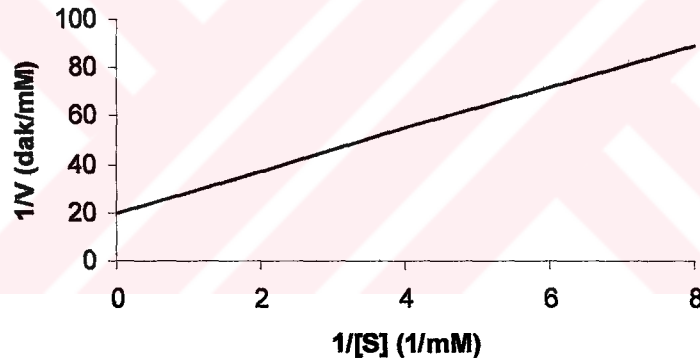
[S] (mM)	Absorbans
0,0156	0,145
0,0125	0,122
0,0688	0,319
0,2297	0,873

Çizelge 4.25' de sodyum alizarin-5-sülfonat için hesaplanan hız değerleri, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi verilmiştir.

Çizelge 4.25. Sodyum alizarin-5-sülfonat için hesaplanan hız, substrat derişimi, hızın tersi ve substratın başlangıç derişiminin tersi

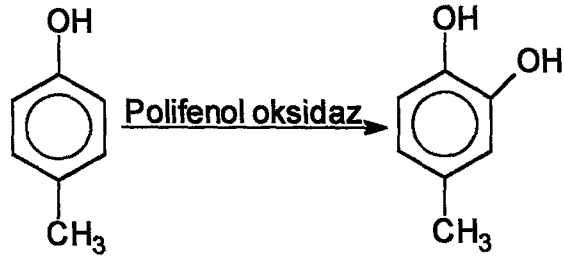
V (mM/dak)	[S] (mM)	1/V (dak/mM)	1/[S] (1/mM)
0,0047	0,0625	213	16
0,0113	0,125	89	8
0,0181	0,25	55	4
0,0375	0,5	37	2

Çizelge 4.25' deki $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri grafiğe geçirildiğinde sodyum alizarin-5-sülfonat için Şekil 4.8' deki $1/V-1/[S]$ grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin $1/[S]$ eksenini kestiği nokta $-1/K_m = -2,3'$ e eşit olup $K_m = 0,44$ mM olarak hesaplanmıştır. Aynı grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta ise $1/V_m = 20'$ ye eşit olup $V_m = 0,05$ mM/dak olarak hesaplanmıştır.



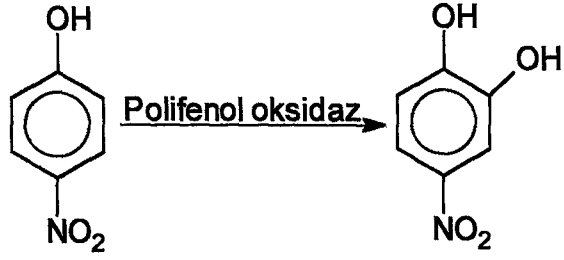
Şekil 4.8. Sodyum alizarin-5-sülfonatın $1/V-1/[S]$ grafiği

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda kullanılan substratlar dikkate alındığında polifenol oksidaz enzimi varlığında enzimin krezolaz etkisine göre şu reaksiyonlar gerçekleşmiştir:



p-krezol

4-metilkatekol



p-nitrofenol

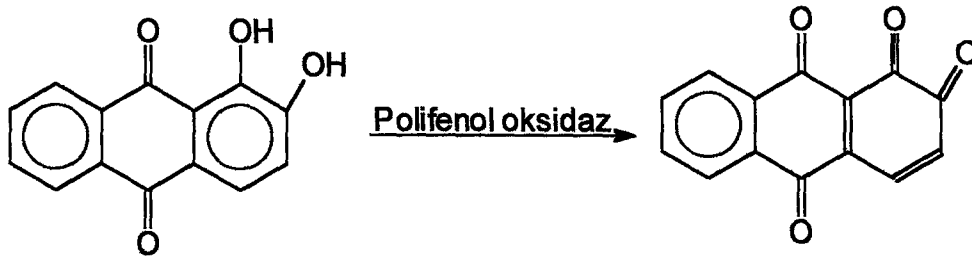
4-nitrokatekol



1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon

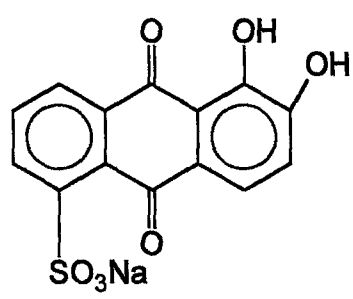
1,2,5,6-tetrahidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon

Polifenol oksidaz enziminin katekolaz etkisi ise aşağıdaki reaksiyonların gerçekleşmesiyle anlaşılmıştır:



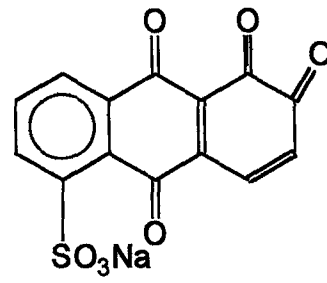
alizarin

1,2-dioksoalizarin



sodyum alizarin-5-sülfonat

Polifenol oksidaz →



sodyum-1,2-dioksoalizarin-5-sülfonat



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda bitkilerdeki polifenol bileşikleri ve özellikle çeşitli sebze ve meyvelerin yapısında bulunan polifenol oksidaz enzimlerini incelemeye yönelik önemli çalışmalar yapılmıştır.

Genel olarak çeşitli meyve ve sebzelerin kahverengileşmesine sebep olduğu için polifenol oksidaz enzimi gıda teknolojisi açısından incelenmektedir. Öncelikle enzimin bu etkisinin giderilmesi için çalışmalar yapılmıştır.

Kimya bilimi açısından düşünüldüğünde ise polifenol oksidaz enzimi organik kimyada önemli bir organik bileşik sınıfı olan fenolik bileşiklerin sentezinde gerekli bir katalizör olarak incelenebilir.

Özellikle sebze ve meyvelerdeki fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen bu enzimin hem doğal hem de sentetik olmak üzere farklı substratlar için spesifik olabileceği ve bunların oksidasyon reaksiyonlarını da katalizleyebileceği düşünülmüş ve bu çalışma yapılmıştır.

Çalışmamız boyunca patatesten polifenol oksidaz enzimi sulu çözelti halinde izole edilmiştir. Taro, şeftali ve mantardan da enzim çözeltisi elde edilmiştir. Enzim kaynağı olarak taro kullanıldığında aktifliğinin patatese göre düşük olduğu bulunmuştur. Bunun yanında şeftali ve mantar enzim çözeltilerinin ise benzer aktivite gösterdiği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda bu yüzden enzim kaynağı olarak patates kullanılmıştır. Ayrıca polifenol oksidaz enziminin aktivitesini ortaya çıkarabilecek çeşitli substratlar araştırılmıştır. Bunun sonucunda hidroksil grubu içeren antrakinonlar polifenol oksidaz enzimi için substrat niteliği taşıdığından dolayı yapısında bu tür antrakinon bulundurduğu bilinen *Rumex crispus* bitkisinin kök kısımlarına ekstraksiyon, kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi işlemleri uygulanmış ve 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon saf olarak elde edilmiştir. Bu bileşik bitkiden elde edildiği için çalışmada doğal substrat niteliği taşımaktadır. P-krezol, p-nitrofenol, alizarin ve sodyum alizarin-5-sülfonat bileşikleri ise sentetik substratlar olarak incelenmiştir. UV-VIS spektrofotometresinde göre p-krezol, p-nitrofenol, 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metilantrakinon, alizarin ve sodyum alizarin-5-sülfonat substratlarının hepsinde gözlenen absorpsiyon azalışından dolayı bu substratların miktarlarının enzimatik ortamda azaldığı görülmüştür. Çünkü

absorbans derişimle orantılıdır. Bu sonuç ise çalışmada kullanılan substratların polifenol oksidaz ile enzimatik oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştiğinin en büyük kanıtıdır. Ayrıca reaksiyonlar sırasında gözlenen renk değışimleri ve ince tabakada yapılan kromatografik çalışmalar da bu sonucu desteklemiştir.

Bu çalışmada da olduğu gibi doğal ve sentetik substratların enzimatik oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirilirken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; enzimin maksimum aktivite gösterebilmesi için optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerini deneysel ortamda sağlama mecburiyetidir. Ayrıca bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda daha iyi sonuç elde edebilmek için kullanılan enzim çözeltisinin ve substratın mümkün olduğunca derişik kullanılması önerilebilir.

Farklı substratlar kullanılarak spesifik ürünlerin elde edilmesi amaçlanan bu çalışmada istenen enzimatik oksidasyon ürünleri (p-metilkatekol, p-nitrokatekol, 1,2,5,6-tetrahidroksi-3-metoksi-7-metil-antrakinon, 1,2-dioksoalizarin, sodyum-1,2-dioksoalizarin-5-sülfonat) sentezlenmiştir. Bütün enzimatik çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da kullanılan enzimin özellikleri incelenmiş ve her substrat için polifenol oksidaz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık koşulları, Km ve Vm değerleri Çizelge 5.1' deki gibi bulunmuştur.

Substrat	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Km (mM)	Vm (mM/dak)
p-nitrofenol	6,0	25	1,25	0,10
1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metil antrakinon	7,0	25	3,33	0,33
Alizarin	5,0	25	3,33	0,25
Sodyum alizarin-5-sülfonat	6,0	20	0,44	0,05

Polifenol oksidaz enzimi kullanılarak fenolik bileşiklerin -OH gibi polar fonksiyonel gruplarının artmasını sağlayan bu çalışmayla ilaç yapımında kullanılan bu bileşiklerin suda çözünürlük özelliklerinin artmasıyla birlikte daha kolay incelenebilecekleri de düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- ADAMS, J. B., 1994. Green Colour Development in Potato Cooking Water. **Food Chem.**, 49: 295-298.
- ALMEIDA, N. E. M., NOGUEIRA, J. N., 1995. The Control of Polyphenol Oxidase Activity in Fruits and Vegetables. **Plant Foods Hum. Nutr.**, 47: 245-256.
- AL-SAIKHAN, M. S., HOWARD, L. R., MILLER, J. C., 1995. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Different Genotypes of Potato. **J. Food Sci.**, 60: 341-343.
- AVE, D. A., EANNETTA, N. T., TINGERY, W. M., 1986. A Modified Enzymic Browning Assay for Potato Glandular Trichomes. **Am. Potato J.**, 43: 533-558.
- BACHEM, C. W. B., SPECKMAM, G. J., VAN DER LINDE, P. C. G., VERHEGGEN, F. T. M., HUNT, M. D., STEFFENS, J. C., ZABEAU, M., 1994. Antisense Expression of Polyphenol Oxidase Genes Inhibits Enzymatic Browning in Potato Tubers. **Biotechnology**, 12: 1101-1105.
- BASSETT, J., DENNEY, R. C., JEFFERY, G. H., MENDHAM, J., 1978. **Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis**. Fourth Edition, Longman Group Limited, 693-772s, London.
- BATISTUTI, J. P., LOURENÇO, E. J., 1985. Isolation and Purification of Polyphenol Oxidase from a New Variety of Potato. **Food Chemistry**, 18: 251-263.
- BENJAMIN, N. D., MONTGOMERY, M. W., 1973. Polyphenol Oxidase of Royal Ann Cherries: Purification and Characterization. **Journal of Food Science**, 38: 709-806.
- CABANES, J., CANOVAS, F. G., CARNOVA, F. G., 1986. Chemical and Enzymatic Oxidation of 4-methylcatechol in the Presence and Absence of L-serine. Spectrophotometric Determination of Intermediates. **Biochimica et Biophysica Acta**, 914: 190-197.
- DACRUZ VIEIRA, I., FILHO, O. F., 1997. Amperometric Biosensor for the Determination of Phenols Using a Crude Extract of Sweet Potato. **Analytical Letters**, 30 (5): 895-907.
- DEVECE, C., LOPEZ, J. N. R., FENOLL, L. G., TUDELA, J., CATALA, J. M., DE LOS REYES, E., CANOVAS, F. G., 1999. Enzyme Inactivation Analysis for Industrial Blanching Applications: Comparison of Microwave, Conventional, and Combination Heat Treatments on Mushroom Polyphenol Oxidase Activity. **J. Agric. Food Chem.**, 47: 4506-4511.
- EBELING, P. W., MONTGOMERY, M. W., 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization. **Journal of Food Science**, 55 (5): 1320-1324.
- FLURKEY, W. H., 1986. Polyphenol Oxidase in Higher Plants. **Plant Physiol.**, 81: 614-618.
- FRIEDMAN, M., 1997. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 1523-1540.
- GÜNAYDIN, K., TOPÇU, G., İON, R. M., 2001. 1,5-Dihydroxyanthraquinones and an Anthrone from Roots of *Rumex Crispus*. **Natural Product Letters**, 16 (1): 65-70.
- HYODO, H., URITANI, I., 1967. Properties of Polyphenol Oxidases Produced in Sweet Potato, Tissue After Wounding. **Arch. Biochem. Biophys.**, 122: 299.

- KALAYCIOĞLU, L., SERPEK, B., NİZAMLIOĞLU, M., BAŞPINAR, N., TİFTİK, A. M., 2000. *Biyokimya*. 213-223, 235, 243-247, 249, 251, 266-267s, Ankara.
- LOURENÇO, E. J., NEVES, V. A., DASILVA, M. A., 1992. Polyphenol Oxidase from Sweet Potato: Purification and Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 40:2369-2373.
- LYGRE, G. D., 1990. **General, Organic and Biological Chemistry**. Central Washington University Press, 474-478, 481-483, 489s, Washington.
- MA, S., SILVA, J. L., HEARNSBERGER, J. O., GARNER, J. O., 1992. Prevention of Enzymatic Darkening in Frozen Sweet Potatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by Water Blanching: Relationship among Darkening, Phenols, and Polyphenol Oxidase Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 864-867.
- MARCH, J., 1992. **Advanced Organic Chemistry**. Fourth Edition, 1048-1092s.
- MAYER, A. M., HAREL, E., SHAUL, R. B., 1966. Assay of Catechol Oxidase-a Critical Comparison of Methods. *Phytochemistry*, 5: 783-789.
- MAYER, A. M., 1987. Polyphenol Oxidases in Plants-Recent Progress. *Phytochemistry*, 26 (1): 11-20.
- MCMURRY, J., 1996. **Organic Chemistry**. Fourth Edition, 519-525s.
- NENITESCU, C. D., 1985. **Chimie Organica, Volume II**. 777-782s.
- PARK, E. Y., LUH, B. S., 1985. Polyphenol Oxidase of Kiwifruit. *Journal of Food Science*, 50: 678-684.
- TÜKEL, S., 1994. *Biyokimya*. 84-134s, Adana.
- VIGYAZO, L. V., 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase In Fruits and Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49-83.
- YEMENİCIOĞLU, A., CEMEROĞLU, B., 1998. Hale Haven Şeftalilerinde Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Bazı Nitelikleri. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 22, 261-265.
- WALSH, C., 1977. **Enzymatic Reaction Mechanisms**. W. H. Freeman and Company, 449-463s, New York.
- WHITAKER, J. R., 1994. Polyphenol Oxidase. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2: 543-555.
- ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C. G., ESKIN, N. A. M., 1979. **Polyphenol Oxidase**. University of Manitoba Press, 217-255, Canada.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Gaziantep'te doğdum. İlk öğrenimimi Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde, orta öğrenimimi Hatay'da tamamladım. 1997 yılında girdiğim Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2001 yılında Kimyager ünvanıyla mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde, Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı yerde görev yapmaktayım.

