

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖVEM ERİĞİ (*Prunus spinosa* L.) POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

SEMRA PAKYILDIZ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. NİMET BALTAŞ
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI
YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE- 2016

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖVEM ERİĞİ (*Prunus spinosa* L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

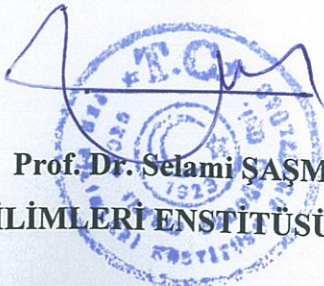
Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ danışmanlığında, Semra PAKYILDIZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/06/2016 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

İmzası



Prof. Dr. Selami ŞASMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlandı.

Bu konuyu yüksek lisans tezi olarak öneren, çalışmalarım süresince yardımını, bilgisini, hoşgörüsünü benden esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, her zaman örnek aldığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım süre boyunca bilgilerini, deneyimlerini, sevgilerini ve özellikle sabırlarını hiç eksiltmeden hep arttırarak bana yaklaşım tarzı gösteren değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Barboros DİNÇER'e bana katlandıkları için teşekkür ederim. Biyokimya Laboratuvarında çalışan arkadaşlarım Havva ATASEVER, Pelin BİRİNCİ ve Mehmet KILIÇARSLAN'a dostlukları ve her daim güler yüzlü bir ortamda çalışma sağladıkları için teşekkür ederim. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü hocalarıma çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince bir dönem projesinde çalıştırarak bana maddi destek sağlayan ve eğitimime destek olan Sayın Prof. Dr. Hasan BALTAŞ'a şükranlarımı sunarım. Çalışmaya başlayabilemem için gerekli hammaddeyi sağlayan Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiç bir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum. En büyük destekçim babam Mehmet PAKYILDIZ'a ve yanımızda olmasada her daim yanımda hissettiğim annem Hanife PAKYILDIZ'a teşekkür ederim. Bu tezi annem ve babama ithaf ederim.

Semra PAKYILDIZ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “GÖVEM ERİĞİ (*Prunus spinosa* L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 01/06/2016

Semra PAKYILDIZ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

GÖVEM ERİĞİ (*Prunus spinosa* L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Semra PAKYILDIZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ

Bu çalışmada, Gümüşhane İlinden toplanmış olan Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) polifenol oksidaz (PFO) enziminin biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. PFO'nun doğal elektroforez kromatogramında altı farklı izoenzimi olduğu belirlendi. Optimum PFO aktivitesi, pH'nın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı, 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında, sırasıyla 7.0, 7.0, 5.0, 5.0 ve 5.0 olarak bulundu. Enzimin optimum sıcaklığı aynı substratlar varlığında, sırasıyla 40, 30, 60, 60 ve 60°C olarak belirlendi. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 4-metilkatekol substratı varlığında 40 dakika sonunda, 40 °C'de aktivitesinin % 51,25' ini, 60 °C'de ise % 26,32' sini koruduğu gözlemlendi. 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları için difenolaz aktivitesine sahip Gövem PFO'sunun K_m değeri, Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla, sırasıyla, 0,838; 2,783; 2,771; 4,898 ve 6,994 mM olarak bulundu. Askorbik asit, sodyum metabisülfid, benzoik asit ve sodyum azid inhibitörleri için IC_{50} değeri sırasıyla 0,039; 0,010; 5,920 ve 50,020 mM olarak tespit edildi. Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1, 5 ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda PFO aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

2016, 67 sayfa

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, Gövem eriği (*Prunus spinosa* L.), Karakterizasyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE FROM GÖVEM PLUM (*Prunus spinosa* L.)

Semra PAKYILDIZ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Master Thesis
Supervisor: Yrd. Doç. Dr.Nimet BALTAŞ

In this study, biochemical properties of polifenol oxidase enzyme were characterized from Gövem plums (*Prunus spinosa* L.), collected from Gümüşhane province. It was determined that PPO had six isoenzymes in native electrophoresis chromatogram. Optimum PPO activity as a function of pH and temperature was determined using 4-methylcatechol, catechol, hidrocaffaic acid, catechin and epicatechin as substrate. The optimum pH of the enzyme, in the presence of 4-methylcatechol, catechol, hidrocaffaic acid, catechin and epicatechin substrates were found as 7.0, 7.0, 5.0, 5.0 and 5.0 respectively. The optimum temperature of the enzyme, in the presence of the same substrates were found 40, 30, 60, 60 and 60 °C respectively. When the thermal stability profile of the enzyme was investigated, at the end of fourty minutes, it was observed that, for 4-methylcatechol the enzyme retained over 51,25 % of its original PPO activity at 40°C and retained over 26,32 % of its original PPO activity at 60 °C. The K_m values of the Gövem PPO, diphenolase activity, for 4-methylcatechol, catechol, hidrocaffaic acid, catechin and epicatechin substrates were determined 0,838; 2,783; 2,771; 4,898 ve 6,994 mM, by Lineweaver-Burk curve, respectively. IC_{50} values of the enzyme for ascorbic acid, sodium metabisulphite, benzoic acid, and sodium azide inhibitors were determined as 0,039; 0,010; 5,920 ve 50,020 mM respectively. It was examined that the effect of the Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} and Al^{3+} ions, on the PPO activity, at the 1, 5, and 10 mM final concentrations.

2016, 67 pages

Keywords: Polyphenol Oxidase, Gövem plum (*Prunus domestica* L.), Characterization.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	3
1.3. <i>Prunus Spinosa</i> L. Eriğinin Morfolojik Özellikleri ve Halk Arasında Kullanım Alanları.....	4
1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi, Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması.....	6
1.5. Polifenol Oksidazın Substratları.....	12
1.6. Polifenol Oksidaz İle İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	22
2.2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	23
2.2.3. Kullanılan Çözeltiler.....	24
2.2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	24
2.2.3.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	25
2.2.3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	25
2.2.3.4. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	26
2.2.3.5. İnhibitör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	27
2.2.3.6. Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanışı.....	27
2.2.4. Deneysel Çalışmalar.....	27
2.2.4.1. Ham Ekstrağın Hazırlanması.....	27
2.2.4.2. Protein Tayini.....	28
2.2.4.3. Elektrofrez.....	28
2.2.4.3.1. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE).....	28

2.2.4.3.2. Substrat Boyaması	29
2.2.4.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini	29
2.2.4.5. PFO Enziminin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	30
2.2.4.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH' ın Etkisi.....	30
2.2.4.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	30
2.2.4.8. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi.....	31
2.2.4.9. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	31
2.2.4.10. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi	31
2.2.4.11. PFO Enziminin Bazı İnhibitörlere Karşı Davranışının İncelenmesi	31
2.2.4.12. Bazı Metal İyonlarının PFO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
3. BULGULAR.....	33
3.1. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)	33
3.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	33
3.2.1. Enzimin Substrat Özgünlüğü ve Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	33
3.2.2. Enzimin Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi.....	34
3.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	37
3.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi... 40	
3.2.5. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığının İncelenmesi.....	43
3.2.6. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi	45
3.2.7. Bazı İnhibitörlerin Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	47
3.2.8. Bazı Metal İyonlarının Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	51
5. ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gövem Eriğinin (<i>Prunus Spinosa</i> L.) görüntüsü.....	4
Şekil 2. Enzimatik kararmada polifenol oksidazın rolü.	7
Şekil 3. <i>Malus domestica</i> L.'nin 3 boyutlu PFO görüntüsü	7
Şekil 4. PFO' nun Bakır atomu merkezleri.	8
Şekil 5. <i>Malus domestica</i> L.'nin 3 boyutlu PFO'sunun bakır bağlanma bölgeleri.	8
Şekil 6. <i>Malus domestica</i> L.'nin optimum substrat molekülü yerleştirme görüntüsü.....	9
Şekil 7. Polifenol Oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi.....	10
Şekil 8. PFO için önerilen difenolaz çevrimi.	11
Şekil 9. Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri	12
Şekil 10. PFO'nun basit fenolik substratları.....	13
Şekil 11. PFO'nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları.	13
Şekil 12. Sinnamik asit, p-kumarik asit ve kafeik asit substratlarının açık yapıları.....	14
Şekil 13. PFO'nun flavonoid türevli substratları olan kateşin ve epikateşinin yapısı.....	15
Şekil 14. Çalışmada Kullanılan Gövem eriği.	28
Şekil 15. Ham enzim özütünde PFO'nun substrat boyaması	33
Şekil 16. 4-Metilkatekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	35
Şekil 17. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	35
Şekil 18. Hidrokafeik asit substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	36
Şekil 19. Kateşin substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.	36
Şekil 20. Epikateşin substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	37
Şekil 21. 4-Metilkatekol substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi. .	38
Şekil 22. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	38
Şekil 23. Hidrokafeik asit substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	39
Şekil 24. Kateşin substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	39

Şekil 25. Epikateşin substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	40
Şekil 26. PFO'nun 4-metilkatekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	41
Şekil 27. PFO'nun katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	42
Şekil 28. PFO'nun hidrokafeik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi	42
Şekil 29. PFO'nun kateşin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	43
Şekil 30. PFO'nun epikateşin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	43
Şekil 32. <i>Prunus spinosa</i> L. PFO'sunun hidrokafeik asit substratı varlığında +4 °C' deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.	45
Şekil 33. PFO' nun 4-metilkatekol substratı varlığında ısıl kararlılık eğrisi.....	46
Şekil 34. PFO' nun hidrokafeik asit substratı varlığında ısıl kararlılık eğrisi.	46
Şekil 35. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi	47
Şekil 36. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi	48
Şekil 37. PFO'nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.....	48
Şekil 38. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.....	22
Tablo 2. Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.	23
Tablo 3. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.	29
Tablo 4. <i>Prunus spinosa</i> L. PFO' sunun farklı substratlar varlığında elde edilen aktivite değerleri.	34
Tablo 5. <i>Prunus spinosa</i> L. PFO'sunun farklı substratlar varlığında elde edilen optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{maks} değerleri.....	41
Tablo 6. İnhibitörlerin 4-metilkatekol varlığında PFO aktivitesi üzerine etkisi.	47
Tablo 7. Bazı Metal İyonlarının 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında <i>Prunus spinosa</i> L.PFO aktivitesi üzerine etkisi.	50
Tablo 8. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların İzoenzim sayıları.	51
Tablo 9. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların İlgi Duyduğu Substratlar.	52
Tablo 10. Çeşitli Ürünlerden Elde Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri.	53
Tablo 11. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum Sıcaklık Değerleri.	54
Tablo 12. Çeşitli Ürünlerin PFO'larının K_m ve V_{max} Değerleri.	55

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovin serum albümin
EU	Enzim ünitesi
EU/mg	Özgül aktivite
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten sabiti
MOPS	3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
PMSF	Fenilmetilsülfonoflorid
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
PHPPA	3-(4 Hydroxyphenyl propionic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
V_{maks}	Maksimum hız
UV	Ultraviole
Kcal	Kilo Kalori
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DMF	Dimethyl formamide
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinone hydrochloride hydrate
PFO	Polifenol Oksidaz
L- Dopa	L- 3,4-Dihydroxyphenylalanine

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son yıllarda gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimler çeşitli endüstri kollarında ve özellikle gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Endüstriyel gıda enzimleri özellikle son zamanlarda tüketiciye cazip gelerek ve yüksek besleyicilik değerine sahip gıdaların geliştirilmesi ve üretiminde gittikçe artan bir öneme sahip olmaya başlamışlardır. Gıdaların korunmasına ilişkin olarak yapılması gereken temel uygulamalardan birisi dokulardaki kimyasal olayların kontrol altına alınmasıdır. Çünkü özellikle sebze ve meyvelerde meydana gelen kimyasal değişimler ürünün renginin bozulmasına ve daha da önemlisi besin değerinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu renk bozulmaları enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır.

Özellikle gıda endüstrisinde enzimatik kararın, meyve ve sebzelerin depolanması esnasında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu polifenol oksidaz enzimi havadaki oksijen ile teması sonucu, meyve ve sebzelerin renginde pembeden mavimsi siyaha kadar farklı tonlarda oluşan renk değişimine sebep olarak meyve ve sebzelerin görünümünü, tadını ve besleyici değerini bozan bir oksidasyon reaksiyondur. Birçok meyve sebze ürünlerinde bu renk değişimleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Bu durum ise tüketicinin istemediği bir durum olmakla birlikte üretici için ise büyük bir ekonomik problem olmaktadır. Bu nedenle enzimatik kararın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PFO enziminin nitelikleri üzerine çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir (Önez, 2006).

Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tonlardaki bu renk değişimine esmerleşme ya da kararın denir. Esmerleşmeyi etkileyen başlıca etkenler; sıcaklık, pH, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif polifenol oksidaz (PFO) (E. C. 1.14.18.1) konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir. Faktörlerden birinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla, enzimatik esmerleşme reaksiyonları durdurulabilir veya kontrol edilebilir.

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, özellikle ısı etkisi ile artan bir esmerleşmeye uğradıkları gözlenmektedir. Kurutulmuş ürünlerde renk esmerleşmesi daha çok enzimatik olmayan bir yolla meydana gelmektedir. Esmerleşme olayı, üretim sırasında uygulanan ısıl işlem sonucu oluştuğu gibi depolama sırasında da yavaş bir hızda devam etmektedir. Buna göre bu tip esmerleşme reaksiyonları ısı ile şiddetlenen ve düşük sıcaklıklarda zamana bağlı olarak sürekli artan bir olaydır (Wetherilt vd., 1992).

Enzimatik olmayan esmerleşme diye bilinen renk değişimleri, aminoasitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi reaksiyonun sonucudur ve oksijensiz ortamda da yürüyebilir. Koku ve renkte bir iyileştirme sağlayan bu reaksiyonlar lezzet endüstrisinde oldukça önemlidir. Olayın ilk aşamasında, amino grubu, şekerin indirgen hidroksil grubuna bağlanarak N-glikozitleri oluşturmaktadır. Bunu izleyerek gelişen karmaşık polikondensasyon olayları sonucunda, esmer renkli "melanoidin" adı verilen bileşikler oluşmaktadır. Enzimatik olmayan renk bozulmaları, ısı, ışık, metaller ve oksijen gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986; Bolin ve Steele, 1987).

Besinlerde esmerleşme denildiği zaman, genellikle besinin üretiminden oluşum sürecine kadar, esmerleşmenin zararlı etkileri belirtilir. Ancak bazı enzimatik esmerleşme reaksiyonları, besin için çok faydalıdır. Çay, kahve ve kakao, birçok ülke için oldukça önemli ürünlerdir (Ensminger vd., 1995). Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi, özellikle fermentasyon ve kuruma döneminde enzimatik esmerleşmeye bağlıdır. Ayrıca, üzüm, erik, hurma ve incir gibi bazı meyvelerin kurutulmasıyla, karakteristik sarı veya kahverengini almaları da enzimatik esmerleşmenin bir sonucudur.

Polifenol oksidazların, böcek ve mikroorganizmaların bitkilere saldırmasını ve çürük oluşumunu önlemede anahtar fizyolojik rol oynadığı düşünülür. Meyve ve sebzeler olgunlaştıkları zaman, onların fenolik bileşenlerinde meydana gelen azalmadan dolayı, hastalıklara karşı hassasiyetleri artar. PFO, fenolik bileşiklerden kinonların oluşumunu katalizler ve oluşan kinonlar, polimerizasyon reaksiyonlarıyla

polimerleşirler. Bu polimerleşme, antibakteriyal ve antifungal aktivite gösteren melaninlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Oluşan bu melaninler, aynı zamanda sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına yardımcı olur (Marshall vd., 2000).

Enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin, antibakteriyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olmaları, araştırmacıların enzimatik esmerleşmeye büyük bir ilgi duymasına neden olmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için, besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işleminin meydana gelmesi mümkündür. Bu nedenle, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konulması, etkilerinin anlaşılması ve çözümler bulunması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından, oldukça önemlidir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en geçerli yöntem, PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren, uygun yeni teknolojilerle birlikte, meyve ve sebzelerin kişi başına düşen tüketimindeki artış, birçok ülke için ekonomik yararlar sağlayacaktır (Labuza, 1992).

1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) Karadeniz Bölgesinde özellikle reçel, marmelat ve kaynatılmış meyve suyu olarak bolca tüketilmektedir. Gövem eriğinden üretilen bu ürünlerde meydana gelebilecek kararma reaksiyonları dikkate alınarak PFO enziminin biyokimyasal özellikleri çalışılırken meyvenin tümünün bir arada olduğu ham ekstraktta çalışıldı. Bu çalışmada, Gümüşhane İli'nden toplanmış olan Gövem Eriğinden (*Prunus spinosa* L.) polifenol oksidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle enzimin varlığı doğal elektroforez ile görüntülendi. Gövem PFO'sunun substrat spesifitesi, ilgi duyduğu substratların optimum pH ve sıcaklık değerleri ve bu substratların bazı kinetik parametrelerinin belirlendi. Ayrıca enzimin pH ve ısıl kararlılığı, metal iyonlarının ve bazı yaygın PFO inhibitörlerinin aktivite üzerine etkisi incelendi.

Esmerleşme duyuşal özellikler ve görünümde istenmeyen bozulmalara sebep olmakta, raf ömrünü kısaltmakta ve ürünün albenisini azaltmaktadır. Sebze ve meyvelerdeki enzimatik kararmalar tüketici ve üreticiler için ekonomik anlamda önemli bir problemdir (Creumiere, 2000). Karadeniz bölgesinde bolca yetişen Gövem eriğı halk arasında marmelat, reçel ve meyve suyu olarak tüketilmektedir. Meyveden üretilen ürünlerin üretimi, saklama koşulları ve raf ömrünün belirlenmesi açısından PFO enziminin karakterizasyonu oldukça gereklidir. Karadeniz bölgesinde yetişen meyvelerde polifenol oksidaz enziminin varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılıp, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceğı açısından önem arz etmektedir.

1.3. *Prunus Spinosa* L. Eriğinin Morfolojik Özellikleri ve Halk Arasında Kullanım Alanları

Gövem Eriğı, halk arasında çok farklı isimlerle yer almaktadır. Güvem, gövem, dağ eriğı, göğem, güğem, ayı eriğı, kum eriğı, domuz eriğı, yaban eriğı (Baytop, 1997), çoban üzümü (URL-1), deli erik, dağ eriğı (URL-2) olarak da anılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Gövem Eriğinin (*Prunus Spinosa* L.) görüntüsü.

Gövem Eriğı, gülgillerden olup Nisan-Mayıs aylarında beyaz renkli çiçek açan, 3 ya da 4 metreye kadar boylanabilen, dikenli bodur şeklinde olan bir ağaç türüdür. Ormanlarda, çit kenarlarında ve kırlarda rastlanır. Gövdeleri silindirik, kabuğu koyu gri renkli ve çok sık dallıdır. Küçük dallarının ucu dikenlidir. Meyveleri sonbahar veya kışa doğru olgunlaşan mavimsi siyah renkli, küremsi şekilli ve ekşimsi tada sahiptir. Çiçekler açtığı zaman çok hoş bir görüntü meydana gelir. Eni boyuna göre daha

kalındır. Gövem eriği içerisinde bulunan organik asitler, pektin ve çeşitli şekerler sayesinde oldukça lezzetlidir. Çoğu doktorun önerdiği bir meyve türüdür çok faydalıdır. Tıbbi nitelikler taşıdığı için günümüzde birçok ilacın yapımında kullanılmaya başlanmıştır. Gövem eriği Asya ve Avrupa ülkelerinde ayrıca Afrika'nın kuzey batısında yetişmektedir. Türkiye'de yetiştiği yerler: Marmara, Ege ve Karadeniz bölgesidir (URL-3).

Yabani erik türlerinin (*Prunus spp.*) içeriğinde yüksek oranda tanen bulunduğu, ayrıca aromatik ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Meyveler, aynı zamanda yüksek potasyum(9879,57mg kg⁻¹), kalsiyum (920,82mg kg⁻¹), magnezyum (916,68mg kg⁻¹), fosfor(659,15mg kg⁻¹), kükürt (122,69 mg kg⁻¹), sodyum (40,46 mg kg⁻¹), demir (30,1 mg kg⁻¹), ham lif (%2,10), içeriğine sahip olup belirli oranda selenyum (0,05 mg kg⁻¹) ve çinko (1,85 mg kg⁻¹)da içermektedir (Çalışır vd., 2005).

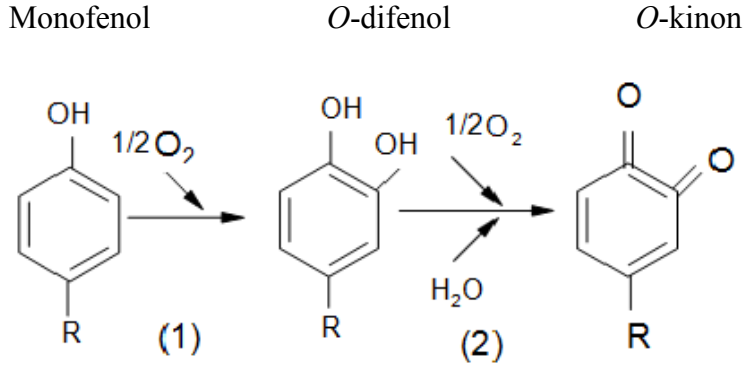
Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) taze olarak tüketildiği gibi pişirilerek tüketilmektedir. Hatta genellikle jöle ya da reçel, marmelat yapılarak raf ömrü arttırılmaktadır. Ayrıca bu yabani meyvenin, geleneksel tıpta kanamayı durdurucu, diüretik, bağırsak fonksiyonlarını arttırıcı etkiye sahip olduğu (Baytop, 1999) ve metabolizmayı aktive ederek, vücut direncini arttırdığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra, (Lust, 1980; Browicz, 1972; Fernandez-Garcia vd., 1998; Kumarasamy vd., 2004) içerdiği uçucu bileşiklerden dolayı alkollü içkileri aromalandırmak için kullanılmakta; vitamin, karoten, organik asit ve tıbbi yağlar gibi biyolojik aktif maddeler içermesinden dolayı da eczacılık ve gıda sektöründe tıbbi yağ ve alkolsüz içecek gibi ürünlerin üretilmesinde de kullanılmaktadır (Özcan, 2008).

Gövem Eriğinin meyvesinin yanı sıra kurutulmuş çiçeklerinden hazırlanan çay, vücuttaki zararlı maddelerin atılmasını sağlayarak kanı temizlediği bildirilmiştir. Bağırsakta oluşan solucanların düşürülmesini sağlar ve idrar sökücü özelliği bulunmaktadır. Bacakda meydana gelen romatizma ve gut ağrılarını azaltır. Ağız ve boğaz yolunda meydana gelen iltihaplanmaları sökmeyi sağlar. Solunum yolu hastalıklarına iyi gelir. Vücut direncini arttırır. İshal ve kabızlığı gidermeye yardımcı olur (URL-4).

Prunus spinosa L.'nin fenolik bileşimi değerlendirmek, antioksidan, antibakteriyel antifungal faaliyetlerinin, *in vitro* ortamda biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve bunun yanı sıra beslenme ve tıbbi potansiyelerini değerlendirmek için çalışmalar yapılmıştır. Yüksek fenolik içeriğe sahip olan gövem eriğinin fenolik bileşenlerinin neler olduğu tespit edilmiş ve bunların gallik asit, proto-catechuic asit, proto catechuic aldehit, klorojenik asit, vanilik asit, vanilin, ferulik asit, benzoik asit olduğu rapor edilmiştir. Gövem eriğinden elde edilen metanolik ekstraktın yüksek oranda antioksidan kapasiteye ve yüksek fenolik bileşikler içerdiğinden dolayı doğal ilaçların hazırlanmasında hammadde olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir (Aliyazıcıoğlu vd., 2015).

1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi, Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması

Uluslararası Biyokimya Derneği (IUB) enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmaya göre bütün PFO'ların, redoks reaksiyonlarını katalizlediğinden dolayı birinci sınıf enzim oldukarı belirlenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre PFO iki farklı aktivite göstermektedir ki bunlardan biri monofenolaz aktivitesi ya da tirozinaz aktivitesi olarak tanımlanan, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1), (Şekil 2). Diğeri ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinir (Cabanés vd., 1994; Rodríguez-Lopez vd., 1994; Espin vd., 1997; Fenoll vd., 2000; Espin vd., 2001; Cemeroğlu vd., 2001; Brooks vd., 2004).



(çoğunlukla renksiz) (çoğunlukla renksiz) (çoğunlukla kırmızı)

(1) Tirozinaz aktivitesi(hidroksilasyon)

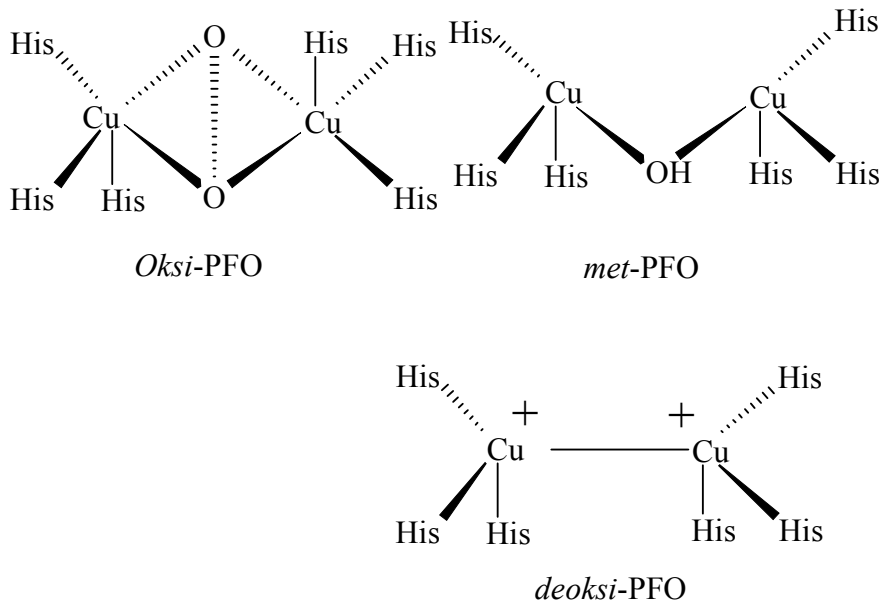
(2) Katekolaz aktivitesi(oksidasyon)

Şekil 2. Enzimatik kararmada polifenoloksidazın rolü (Cemeroğlu vd., 2001).

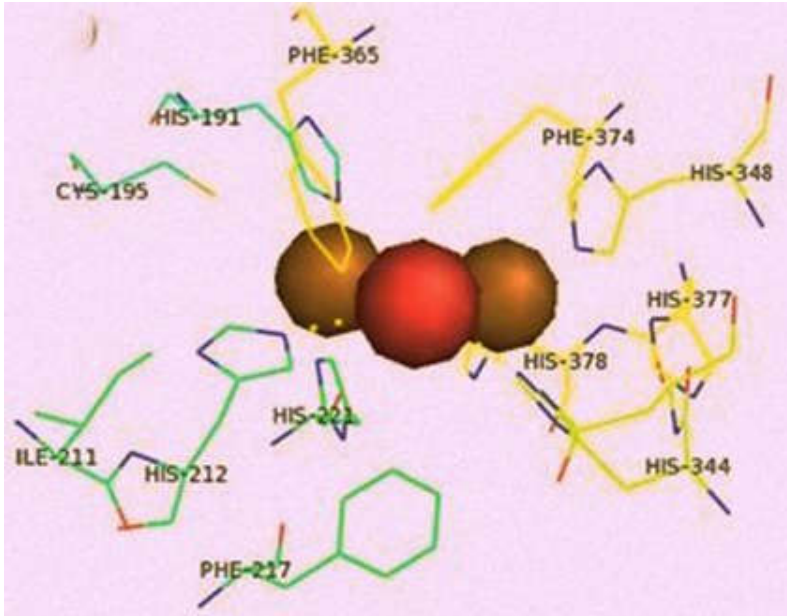


Şekil 3. *Malus domestica* L. PFO'sunun üç boyutlu görüntüsü (Liu vd., 2015).

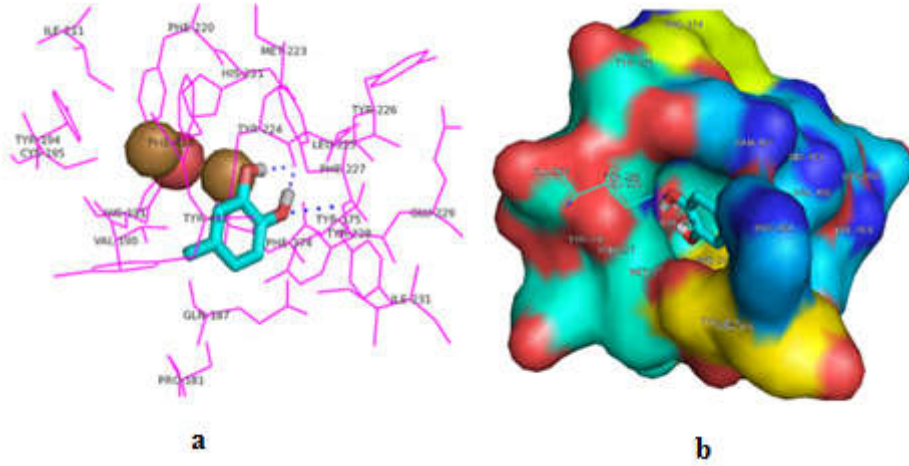
Malus domestica PFO'sunun üç boyutlu yapısı Şekil 3'te görülmektedir. Kimyasal ve spektroskopik araştırmalar, polifenol oksidazın binükleer bakır kompleksi içeren bir aktif bölgeye sahip olduğunu göstermiştir. Bakır atomunu merkezde bulunuşları sırasıyla "met" (Em), "deoksi" (Ed), "oksi" (Eo) halleridir (Cabanes vd.,1994; Espin vd.,2001). Em; Cu²⁺ -Cu²⁺ aktif bölgesi *met*polifenol oksidazdır. Ed; Cu⁺¹ - Cu⁺¹ aktif bölgesi PFO'nun indirgenmiş halidir. Eo; Cu²⁺ -O₂²⁻- Cu²⁺ aktif bölgesi *oksi*polifenol oksidazdır (Şekil 4, Şekil 5).



Şekil 4. PFO' nun Bakır atomu merkezleri.



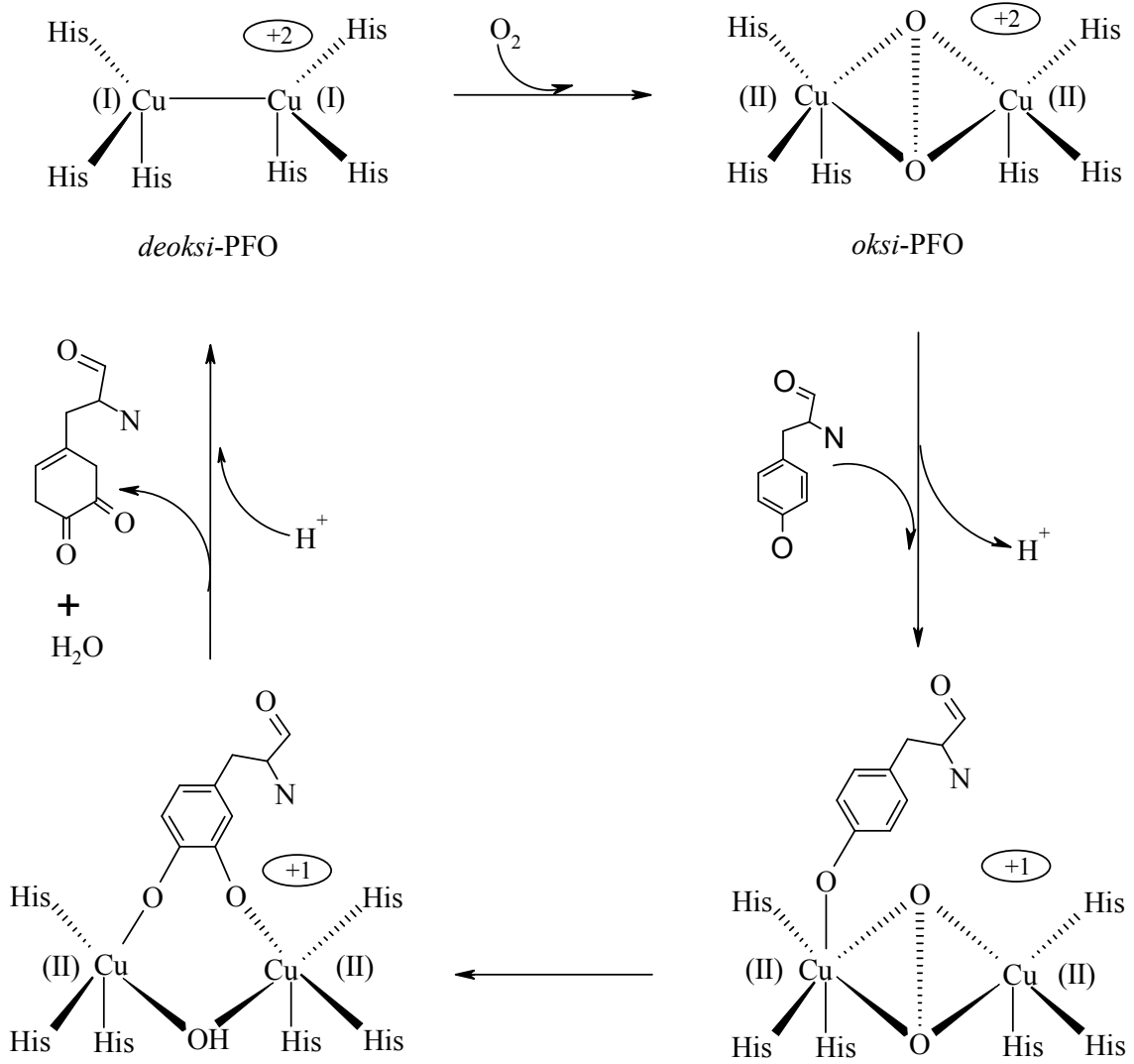
Şekil 5. *Malus domestica* L.'nin PFO'sunun bakır bağlanma bölgeleri(bakır atomları kahverengi ile gösterilmiştir) (Liu vd., 2015).



Şekil 6. *Malus domestica* L. PFO'sunun aktif bölgesi ve substrat molekülünün yerleşmesi (Liu, 2015). (a) *Malus domestica* L PFO enziminin 4-metilkatekol bağlanma yeri, (b) *Malus domestica* L. PFO' sunun üç boyutlu 4-metilkatekol bağlanma bölgesi (Liu vd., 2015).

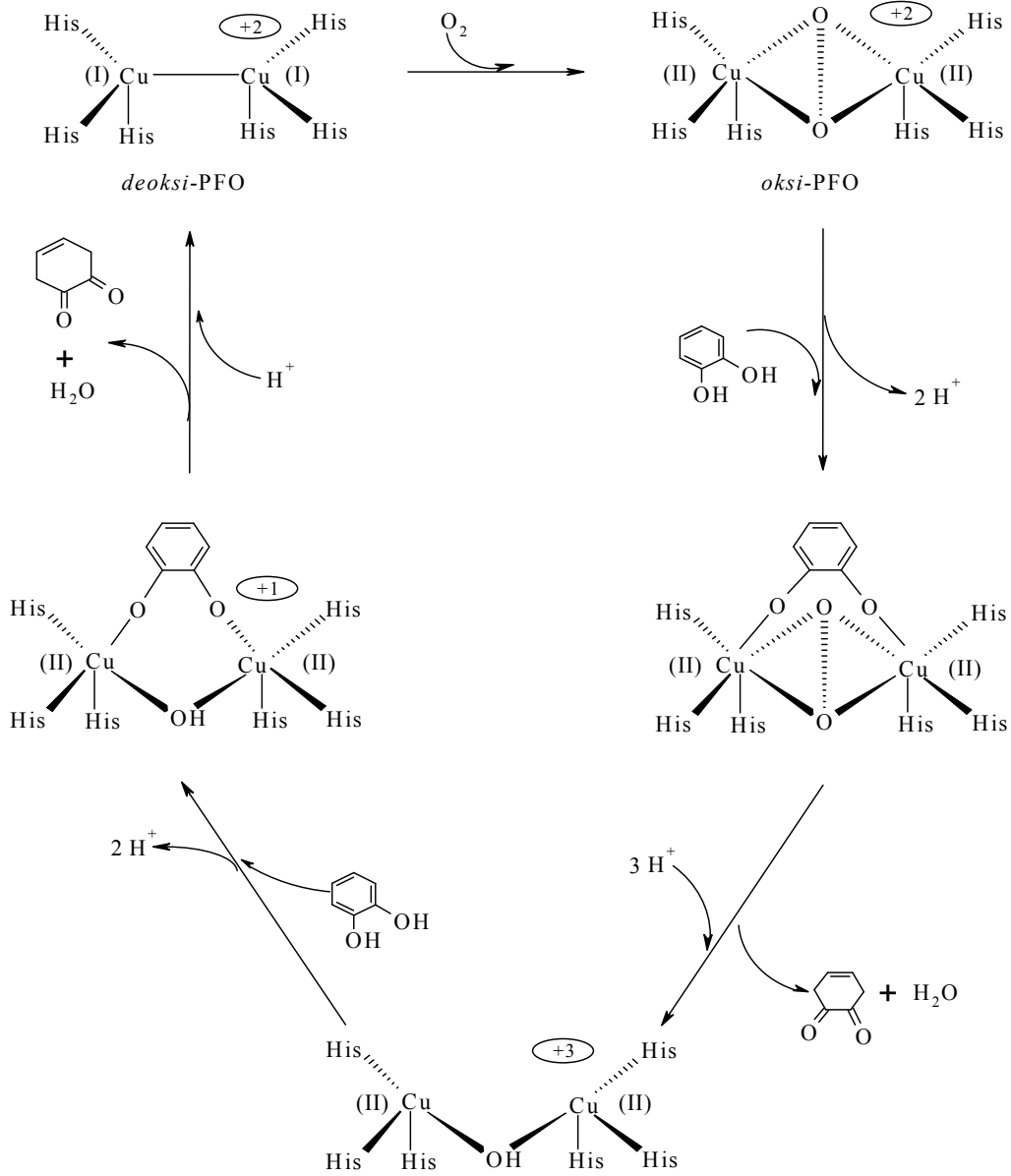
Yukarıdaki Şekil.6'da *Malus domestica* L.'nin substrat molekülünün yerleştiği aktif bölgenin görüntüsü verilmiştir. Birinci durumda *Malus domestica* L. PFO'sunun 4-metilkatekolun bağlanma yeri, ikinci durumda ise üç boyutlu bağlanma yeri gösterilmiştir.

Polifenol oksidazın monofenolaz ve difenolaz çevrimlerinin, genellikle birbirlerine ilişkin oldukları ifade edilir. Çünkü önce monofenolaz çevriminde bir difenol üretilir (kresolaz reaksiyonu) ve bundan sonra difenolaz çevriminde (katekolaz reaksiyonu) kullanılır (Şekil 7).



Şekil 7. Polifenol Oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003).

Monofenolaz çevriminde, deoksi-formundaki enzim oksijenle oksiforma dönüşür. Bununla birlikte fenolün hidroksi grubu, oksiformundaki $[Cu(I)-O_2-Cu(I)]$ PFO'nun bir bakır atomuna aksiyal pozisyonda bağlanır. Bu bağlanmayı orto pozisyonda bir oksijenlenme takip eder. PFO'nun bir monofenolü dönüştürebilecek tek aktif merkez formu oksiformudur. Bu form, $Cu(I)-O_2-Cu(I)$ şeklinde yazılabilir, fakat daha uygun olarak peroksit $[Cu(II)-O_2^{2-}-Cu(II)]$ şeklinde ifade edilir. Substratın bağlanmasından sonra oluşan bu beş koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesini takiben, fenolik substratın *orto*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir (Şekil 8).



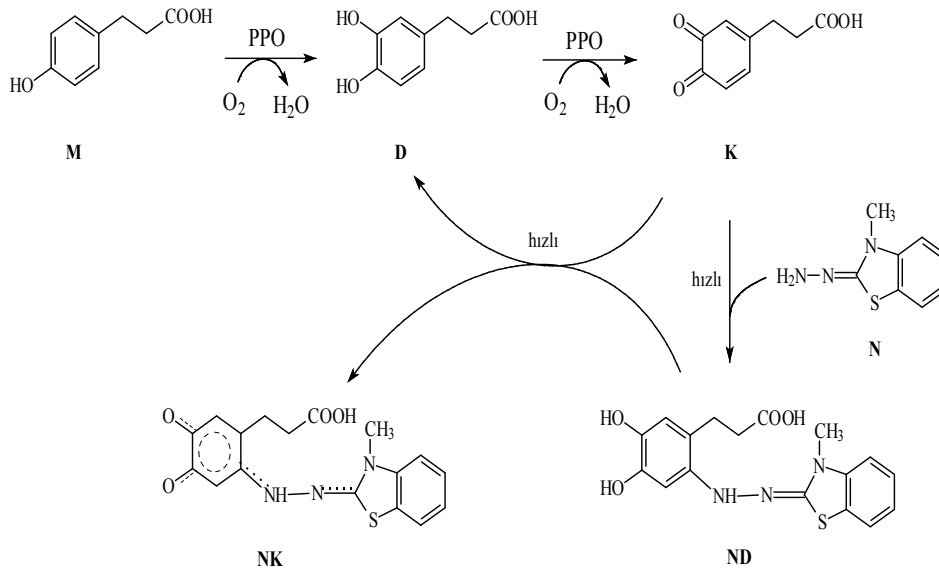
Şekil 8. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003).

Difenolaz çevriminde, oksi-formdaki PFO ya bir difenol bağlanır. Molekül içi elektron transferi sonucu *orto*-benzokinon ürünü oluşur ve bu sırada enzimin *deoksi*-formu, yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir.

Oluşturulan o-kinon bileşikleri, canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı bir şekilde kolayca polimerleşerek, koyu kahverengi suda az çözünen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşur. Hem monofenolaz ve hem de

difenolaz çevrimlerinde görüldüğü gibi, katalitik çevrimlerin ilginç bir tarafı, net reaksiyonda dışarıdan her hangi bir protona ihtiyaç duyulmamasına rağmen, oldukça yoğun bir proton akışının var olmasıdır. Örneğin, difenolaz çevriminde (Şekil 8) O-O bağının parçalandığı sırada üç protona ihtiyaç vardır.

PFO'un monofenolaz ve difenolaz aktivitesi 3-metil-2- benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofilik varlığında, oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metod nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen *o*-kinonlarını esas alır. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşan *o*-kinon nükleofil ile katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm civarındaki karakteristik absorpsiyonlar ile belirlenir (Rodriguez-Lopez vd., 1994) (Şekil 9).



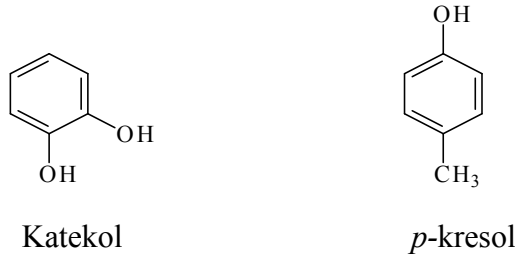
Şekil 9. Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: *o*-kinon, N: kromojenik nükleofil, ND: nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü).

1.5. Polifenol Oksidazın Substratları

Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içermesine rağmen bunlardan çok az kısmı PFO'ya substrat olabilmektedir. Fenolik ve polifenolik bileşikler sayısız bitki

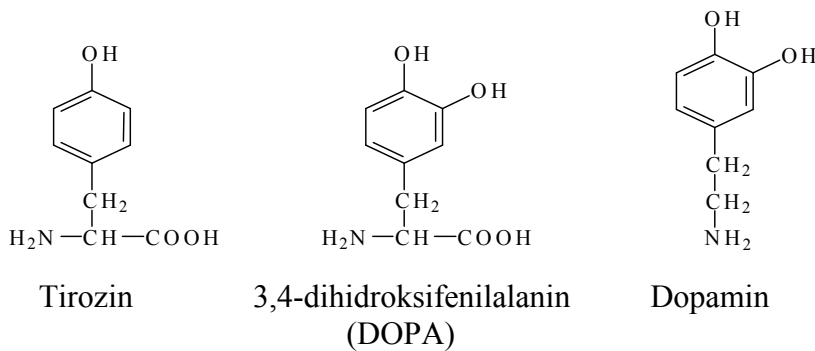
türünde ikincil metabolitler oldukları ve bu bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin, bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunma sisteminde rol oynadıkları tahmin edilmektedir. PFO ile katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Polifenolik bileşiklerin ayrıca antimutajenik, antikanserojenik, antiglisemik ve antioksidatif özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir. Bu özellikler, küf oluşumunun engellenmesi ve proteinsel besin değerinin artırılması amacıyla kullanılabilir (Friedman, 1997). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, bitkini türüne, kültürünün yapılmasına, büyüme ve saklanması sırasında çevresel şartlara ve olgunlaşma derecesine göre çeşitlilik göstermekte hem de bitkinin rengine ve tadına da katkıda bulunmaktadır (Marshall vd., 2000).

PFO'nun en yaygın olan substratları basit yapıları fenoller, klorojenik asit ve türevleri flavonoid tipi fenollerdir. Basit fenoller, katekol ve kresol gibi bileşiklerin yanında tirozin ve türevleri ile sinnamik asit türevleri de substrat olarak davranır (Şekil 10).



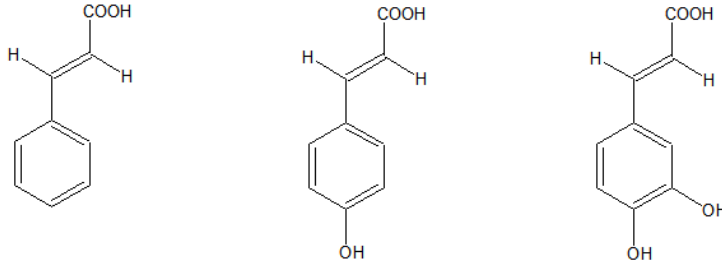
Şekil 10. PFO'nun basit fenolik substratları.

Birçok besin maddesinde bulunabilen tirozin, enzimatik oksidasyon sonucu, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli rol oynayan substratlardandır (Şekil 11).



Şekil 11. PFO'nun çeşitli monofenolik ve difenolik substratları.

Sinamik asit daha çok klorojenik asit türevleri ve flavonoidlerin oluşturulmasında rol oynar (Şekil 12). Bu türevlerin pek çoğu enzimatik olmayan yollarla bitkilerde esmerleşme reaksiyonlarına katılırlar. Patates klorojenik asit, patates yumrularının fenolik içeriğinin yaklaşık %90'ını oluşturur ve bu bileşiğin birçok izomeri çeşitli teknikler yardımıyla tespit edilmiştir. Patates, şeftali ve fasulye yaprağı PFO aktiviteleri, klorojenik asit ve kafeik asit varlığında oldukça farklılık gösteriyorken, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin varlığında benzer aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Whitaker, 1972).



Sinamik asit

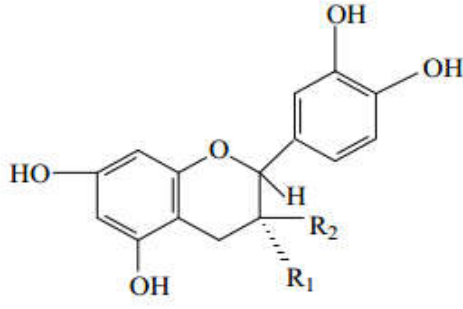
p-Kumarik asit

Kafeik asit

Şekil 12. Sinamik asit, *p*-kumarik asit ve kafeik asit substratlarının açık yapıları.

Flavonoidler ise bitkilerin çeşitli dokularında ve çok farklı oranlarda dağılmışlardır. Çoğunlukla kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında diğer bölgelere oranla daha yoğun bulunmaktadır. Çeşitli oranlarda bulunsalar bile flavonoid yapılı bileşikler bitkide esmerleşme reaksiyonun meydana gelmesi için yeterlidir.

Kateşinler (Şekil 13), flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olup doğada (+) – kateşin ve onun stereoizomeri olan (-) epikateşin olarak bulunurlar(Ganguly ve Seshado, 1958).



Kateşin: $R_1=H$, $R_2=OH$

Epikateşin: $R_1=OH$, $R_2=H$

Şekil 13. PFO'nun flavonoid türevli substratları olan kateşin ve epikateşinin yapısı.

Bitkilerin çeşitli dokularında mevcut bulunan fenolik bileşiklerin esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşturdukları kinonlar oldukça reaktif olup, ya diğer kinonlarla ya da aminoasitler, proteinler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi biyomoleküllerle renkli bileşikler oluştururlar. Bu fenolik bileşiklerin farklılığı, dokularda bulunma oranları ve buldukları yer açısından kahverengi-kırmızı polimerik pigmentlerin renk şiddetleri de değişmektedir.

1.6. Polifenol Oksidaz İle İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar

PFO enzimi ilk defa 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Ardından, bazı turunçgiller hariç, pek çok meyve ve sebze PFO enzimi tespit edilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli canlılardan, meyve ve sebzelerden karakterize edilen, polifenol oksidazların pH, sıcaklık, ilgi duydukları substratlar, inhibitörleri, metal iyonları varlığında sergiledikleri davranışları, izoenzim sayıları, molekül ağırlıkları ve diğer bazı fizikokimyasal parametreleri farklılık veya benzerlik gösterebilmektedir.

Yabani bir armut türü olan *Pyrus elaeagnifolia subsp. elaeagnifolia Pallas* polifenol oksidazı karakterize edilmiş ve 4- metilkatekol substratı için optimum pH ve sıcaklık değeri sırasıyla 7,0 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Enzimin 4-metilkatekol substratı varlığında K_m ve V_{max} değeri sırasıyla, 3,57 mM ve 4781 U/mg protein olarak saptanmıştır. Ayrıca doğal elektroforezde substrat boyamasında enzimin polifenol

oksidaz aktivitesine sahip iki tane izoenziminin olduğu tespit edilmiştir. PFO'nun en yaygın inhibitörlerinden birisi olarak bilinen askorbik asit ($IC_{50}= 0,036$ mM) en etkili inhibitor olarak belirlenmiştir (Baltaş, 2016).

Yapılan başka bir çalışmada, 2008 ve 2009 yıllarında üretilen Alyanak kayısı (*Prunus armenica* L.) PFO'su amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. PFO'nun üç tane izoenzimi olduğu kaydedilmiştir. Enzimin katekol ve klorojenik asit substratları için K_m değerlerini 40,4 – 73,4 ve 0,26 – 12,3 mM arasında bulunmuştur (Ünal ve Şener, 2016).

Bravo ve Osorio (2016), altın çilek meyvesinden polifenol oksidaz enzimini karakterize etmişler ve enzimin substrat ilgisinin sırasıyla klorojenik asit, 4-metilkatekol ve katekol olduğunu belirtmişlerdir. Klorojenik asit substratı için K_m ve V_{maks} değerleri $0,56\pm 0,07$ mM ve $53,15\pm 2,03$ U(mL⁻¹ min⁻¹) olarak verilmiştir. Klorojenik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları için, optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20, 25 ve 40 °C olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmalarında en kuvvetli inhibitor askorbik asit ve onu takiben L-sistein ve quersetin olarak bulunmuştur.

Aydın ve diğerleri tarafından (2015) yapılan bir çalışmada hemşin elması (*Malus communis* L.) PFO'su saflaştırıp, karakterize edilmiştir. Enzimin en çok ilgi duyduğu katekol substratı için optimum sıcaklık ve pH, K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 30-40 °C, pH 5,5; 3,40 mM ve 333,3EU/mL.dak olarak hesaplamışlardır. Enzimin E_a değerini 3,57 Kcal, k_{cat} değerini 24,57 (dak⁻¹) ve Q_{10} değerini ise 1,33 olarak bulmuşlardır.

Liu ve arkadaşları tarafından (2015) yapılan bir çalışmada, şeftali polifenol oksidazı ve kinetik özellikleri üzerine pektinin etkisi araştırılmıştır. Çalışmada PFO'nun en çok ilgi duyduğu substratlar kateşin, epikateşin ve katekol olarak bulunmuştur. Kateşin, epikateşin ve katekol substratları için K_m değerlerini $0,19\pm 0,02$, $0,18\pm 0,02$ ve $4,91\pm 0,22$ mM olarak bulmuşlardır. Aynı substratlar için V_{maks} değerlerini sırasıyla 229 ± 15 , 361 ± 27 ve 89 ± 7 U/dak olarak hesaplamışlardır.

Gong ve arkadaşları tarafından yapılan (2015) yapılan bir çalışmada, kestane çekirdeği polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim

kromatografisi yöntemi kullanılarak 4,6 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 32,5 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin en çok ilgi duyduğu katekol substratı için K_m değeri 92 mmol/L, V_{maks} değeri 1,53 Δ OD/dak, optimum pH'sı 7,0 ve optimum sıcaklığı 40 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca 4-metilkatekol ve gallik asit substratları için K_m değerleri 94 ve 100 mmol/L, V_{maks} değerleri ise 1,3 ve 0,99 mmol/L olarak hesaplanmıştır.

Mango polifenol oksidazı üzerine yapılan karakterizasyon çalışmasında enzimin en çok pirogallol, 3-metilkatekol, katekol, gallik asit ve protokateşuik asit substratları varlığında aktivite gösterdiği bulunmuştur (Cheema ve Sommerhalter, 2015). Mango meyvesinin, katekolaz aktivitesine sahip 53, 112 ve 144 kDa ağırlığına sahip 3 tane izoenzimi olduğunu belirlemişlerdir. Katekol, 3-metilkatekol ve pirogallol substratları için K_m değeri 14,62; 3,69 ve 7,31 mM, V_{maks} değeri ise 0,28; 0,24 ve 0.53 IU/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca enzimin sodyum askorbat, glutatyon ve kojik asit varlığında çok fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Batista ve diğerleri (2014) Wolf's elması (*Solanum lycocarpum*) olarakta bilinen meyvenin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış halinden, polifenol oksidaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin 47 ve 68 kDa ağırlığına sahip iki tane izoenzimi olduğu tespit edilmiştir. Enzimin katekol ve 4-metilkatekol substratı için K_m değeri 6,47 ve 0,15 mM olarak bulmuşlardır. Enzimin katekol ve 4-metilkatekol substratı için V_{maks} değeri ise 3,42 ve 3,01 U/mL olarak hesaplanmıştır. L-sistein, sodyum metabisülfid, askorbik asit, tiyüre ve sitrik asit varlığında enzimin oldukça inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Hurma meyvesinden saflaştırılan ve karakterize edilen polifenol oksidaz enziminin katekol substratı için optimum pH ve sıcaklık değeri 5,5 ve 55 °C, K_m değeri ise 0,025 mM olarak bulunmuştur (Navarro vd., 2014). Meyve özütünde polifenol oksidaz aktivitesine sahip dört tane izoenzim olduğu tespit edilmiştir.

Can ve diğerleri (2014), yomra elmasından polifenol oksidaz enzimini karakterize etmişlerdir. Enzimin optimum pH değeri L-tirozin, PHPPA, katekol, 4-metilkatekol ve L-dopa substratları varlığında 5,0; 7,0; 5,0; 7,0 ve 7,0 olarak

bulunmuştur. L-tirozin, PHPPA, katekol, 4-metilkatekol ve L-dopa substratları varlığında enzimin optimum sıcaklık değeri 20, 30, 40, 40 ve 40 °C olarak saptanmıştır. L-tirozin, PHPPA, katekol, 4-metilkatekol ve L-dopa substratları varlığında enzimin K_m değeri 9,30; 0,70; 7,90; 10,10 ve 2,50 mM olarak hesaplanmıştır. L-tirozin, PHPPA, katekol, 4-metilkatekol ve L-dopa substratları varlığında enzimin V_{maks} değeri ise 7,60; 1,02; 21,50; 24,80 ve 1,60 $\mu\text{M}/\text{dak}$ olarak saptanmıştır. Sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit substratları için IC_{50} değeri 0,07; 0,05; 30,04 ve 9,80 mM olarak hesaplanmıştır.

Palma-Orozco ve arkadaşları (2014) hidrofobik etkileşim ve iyon değişim kromatografisi yöntemlerini kullanarak mango (*Magnifera indica* cv. Manila) polifenol oksidaz enzimini 216 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 31,5 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin piogallol, 4-metilkatekol ve katekol substratları için K_m değerini 2,77; 3,14 ve 15,14 mM olarak bulmuşlardır. Pirogallol substratı varlığında enzimin optimum pH'sı 6,0 optimum sıcaklığı 20-70 °C aralığında olduğu saptanmıştır. Tropolon, askorbik asit, sodyum metabisülfid ve kojik asit inhibitörlerinin 0,1 mM konsantrasyonunda enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini belirtmişlerdir.

Jackfruit meyvesinden polifenol oksidaz enzimi aseton çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır (Tao vd., 2013). Enzimin molekül ağırlığı 130 kDa olarak belirlenmiştir. Katekol ve 4-metilkatekol substratları için K_m değerini 8,3 ve 18,2 mM olarak hesaplamışlardır. Katekol ve 4-metilkatekol substratları için optimum pH değerini ise 7,0 ve 6,5 olarak bulmuşlardır. Ayrıca sistein ve askorbik asitin meyvenin kararmasını 8 °C' de 15 gün boyunca azalttığını belirtmişlerdir.

Palma-Orozco ve arkadaşları (2011) *Pouteria sapota* meyvesinden saflaştırdıkları polifenol oksidaz enziminin, 16,1 ve 18 kDa molekül ağırlığına sahip iki tane izoenziminin olduğunu belirtmişlerdir. Molekül ağırlığı 16,1 kDa olan (PPO1) birinci izoenzim karakterize edilmiştir. Optimum pH'sı 7,0 optimum sıcaklığı 35 °C olarak bulunmuştur. Katekol ve pirogallol substratları için K_m değerini 44 ve 1,3 mM olarak hesaplamışlardır. Askorbik asit ve sodyum metabisülfidin en etkili inhibitörler olduğunu bildirmişlerdir.

Kajudan (Cashew elması) polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak 58,8 kat saflaştırılmıştır (Queiroz vd., 2011). Saflaştırılan enzimin katekol substratı varlığında optimum sıcaklık değeri 30 °C ve pH değeri 6,5 olarak saptanmıştır. Yine katekol substratı varlığında enzimin K_m değeri 18,8 mM ve V_{maks} değeri ise 13,6 U $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. HPLC yöntemi kullanılarak meyvenin gallik asit, protokateşuik asit ve sinamik asit içerdiği tespit edilmiştir. Cashew elmasının 5-hidroksimetil furfural içerdiği saptanmıştır.

Walissevski ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada vanilya fasulyesi polifenol oksidaz enziminin biyokimyasal özelliklerini karakterize etmişlerdir. 4-metilkatekol substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri 13,9 OD/dak ve 10,6 mM/L olarak saptanmıştır. Optimum sıcaklık değeri 37 °C, pH değeri ise 3,0 olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmasında askorbik asiti takiben en kuvvetli inhibitör 4-heksilresorsinol olarak saptanmıştır.

Guo ve diğerlerinin (2009), yaptıkları çalışmada yeşil fasulye den polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi yardımıyla saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Molekül ağırlıkları 39,0 ile 57,5 kDa aralığında olan dört tane izoenzim olduğu tespit edilmiştir. Bütün izoformlarının aktivitesinin pH 6,8 ile 7,2 arasında kararlı olduğu saptanmıştır. En yüksek aktiviteyi pirogallol substratı varlığında gözlemlemişlerdir. Enzim aktivitesinin en fazla askorbik asit varlığında inhibe olduğu saptanmıştır.

Ünal (2007), Anamur muzundan polifenol oksidaz enzimini saflaştırmış ve bazı biyokimyasal özelliklerini karakterize etmiştir. Enzimin katekol substratı varlığında, optimum sıcaklığı 30°C, optimum pH'sı ise 7,0 olarak saptanmıştır. E_a ve Z değerleri, sırasıyla, 155 kJ mol^{-1} ve 14,2 °C olarak hesaplanmıştır. Katekol substratı varlığında, enzimin K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 8,5 mM ve 0,754 $\text{OD}_{410} \text{dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İnhibitör etkisi çalışmalarında ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitör olarak tespit edilmiştir.

Sabancılar ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada Denizli narından affinite kromatografisi yardımı ile 67 kat saflaştırmışlar ve bazı özelliklerini karakterize etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı 7,5 optimum sıcaklığı 40°C ve Lineweaver-Burk grafiğinden V_{maks} ve K_m değerleri ise hesaplanmıştır.

Orenes-Pinero ve arkadaşlarının (2006), ayva PFO'sunu kısmi olarak saflaştırmışlar ve bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlemişlerdir. Enzimin 0,5 g/dm³ sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında ve asidik pH'da en fazla aktivite gösterdiğini saptamışlardır. SDS varlığında enzimin maksimum hız değerinin 15 kat daha fazla ve optimum pH değerinin 5,0 olduğu, her iki durumda da K_m değerinin 1,2 mM olduğu bildirmişlerdir. İnhibisyon çalışmalarında en etkili inhibitörün tropolon olduğunu bulmuşlardır.

Gülçin ve arkadaşları (2005), ısırgan bitkisinden amonyum sülfat ile çöktürme ve iyon değişim kromatografisi yardımıyla saflaştırdıkları polifenol oksidaz enziminin en fazla L-tirozin substratına spesifik olduğunu bulmuşlardır. L-tirozin substratı varlığında enzimin optimum pH ve sıcaklık değeri 4,5 ve 30°C olarak bulunmuştur. Yine aynı substrat varlığında K_m ve V_{maks} değerleri ise $7,90 \times 10^{-4}$ mM ve 11290 EU/mL olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda en etkili inhibitörün sodyum dietil ditiyokarbomat olduğunu bulmuşlardır.

Yağar (2004), kereviz köklerinden elde ettiği PFO enziminin substrat spesifitesi denemelerinde katekol, pirogallol, L-DOPA, *p*-kresol, resorsinol ve tirozin substratlarını kullanmıştır. Pirogallol, katekol ve L-DOPA için K_m değerleri 25°C'de sırasıyla; 4,5; 8,3 ve 6,2 mM olarak hesaplanmıştır. Optimum pH değeri katekol ve L-DOPA için 7,0; pirogallol için 7,5 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değeri katekol için 40°C ve L-dopa için 45°C bulunmuştur. İnhibitörlerin etki sırası şu şekilde bulunmuştur: L-sistein>askorbik asit>glisin>resorsinol>NaCl.

Arslan ve ark. (2004), dut polifenol oksidazını amonyum sülfat çöktürmesi ve affinite kromatografisi yöntemlerini kullanarak saflaştırmışlardır. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları varlığında optimum pH ve sıcaklık değerlerinin 4,5-8,0 ve 20-45°C arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Ziyan ve Pekyardımcı (2004), Ankara armudundan polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyon ve diyaliz yöntemi ile saflaştırıp bazı biyokimyasal özelliklerini aydınlatmışlardır. Enzimin pirogallol, 4-metilkatekol, D-tirozin, *p*-krezolve L-dopa substratları varlığında optimum pH değeri sırasıyla 8,2; 7,2; 7,0; 5,6; 5,0 ve 4,8 olarak saptanmıştır. Optimum sıcaklık 4-metilkatekol için 35°C olarak bulunmuştur. En etkili inhibitörler L-askorbik asit, L-sistein ve Dietilditiyokarbomat olarak tespit edilmiştir. Katekol substratı varlığında K_m ve V_{maks} değerleri 5,55 mM ve 344,5 IU/mL olarak hesaplanmıştır. Ankara armudu PFO'sunun üç izoenzimi polikirilamid jel elektroforezinde substrat boyaması ile tespit edilmiştir. İzoenzimlerin molekül ağırlıkları ise sodyum dodesil sülfat PAGE için 60, 20, 28 kDa olarak bulunmuştur.

Dinçer ve arkadaşları (2002) muşmula meyvesinden (*Mespilus germanica* L. Rosaceae) polifenol oksidaz enzimini karakterize etmişlerdir. Difenzolaz aktivitesine sahip olan enzimin 4-metilkatekol substratı varlığında en yüksek aktiviteyi gösterdiğini saptamışlardır. 4-metilkatekol substratı varlığında optimum pH ve sıcaklığı 6,5 ve 60 °C bulmuşlardır. Katekol, DOPA, epikateşin ve DHPPA substratları için optimum sıcaklık değerini 55, 55, 25 ve 35 °C olarak saptamışlardır. Katekol, DOPA, epikateşin ve DHPPA substratları için optimum pH değerini 8,5; 6,5; 5,5 ve 5,5 olarak bulmuşlardır.

Yağar ve Sağıroğlu (2000), ayva polifenol oksidazını amonyum sülfat ile çöktürme yaparak kısmen saflaştırmışlar ve katekol, pirogallol, L-dopa, *p*-kresol, resorsinol ve tirozin substratları içerisinde enzimin en çok katekol substratına ilgi duyduğu belirlenmiştir. Katekol, pirogallol ve L-dopa substratları için K_m değeri sırasıyla 4,54; 7,35; 1,78 mM olarak bulunmuştur. Katekol substratı için optimum pH ve sıcaklık değeri, 8.0 ve 40°C olarak belirlenmiştir. Ayva PFO'su üzerinde en etkili inhibitörlerin L-sistein, askorbik asit ve potasyum siyanid olduğu tespit edilmiştir.

Serradell ve arkadaşlarının (2000), polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çökeltmesi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri yardımıyla çilek meyvesinden saflaştırmışlardır. Katekol substratı için K_m değeri 11,2 mM, optimum pH değeri 50°C'de SDS varlığında ise 7,2 olarak bulunmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak Gümüşhane İli'nden toplanan Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar ve modelleriyle birlikte markaları Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601UV-VisibleSpektrophotometer
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific	Heraeus Multifugure X3R
Protein elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
pH metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Blendar	Sinbo	SHB-3002
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL

2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamımda kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 2 ' de verilmiştir.

Tablo 2.Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.

Kimyasal madde	Firma
Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Triton X- 114, PMSF, EDTA ve MgCl ₂	MP Biomedicals, Sigma
Protein Elektrofrezinde Kullanılan N, N, N' N'- tetrametilen diamin(TEMED), Amonyum persülfat (APS), Akrilamid, N, N'- metilen bisakrilamid, Gliserol, Bromofenol Mavisı, Glisin	Sigma, Fluka, Carlo Erba
Substratlar 4-MetilKatekol, Katekol, DHPPA, L-Trozin, <i>p</i> -Kumarik Asit, Hidrokafeik asit, L-dopa, Kateşin, Epikateşin	Sigma, Merck
İnhibitörler Sodyum Metabisülfıt, Benzoik Asit, Askorbik asit, Sodyum Azid	Sigma
Lowry Protein Tayininde Kullanılan Sığır Serum Albumini(BSA), Na ₂ CO ₃ , CuSO ₄ .5H ₂ O, Na-K Tartarat ve Folin Reaktifi	Sigma, Merck, Applichem
Çözücüler HCl, Asetik Asit ve Metanol	Merck, Tekkim
Tamponlar ve Diğer Kimyasallar, CH ₃ COONa, MOPS, NaHSO ₃ , Tris, MgCl ₂ , BaCl ₂ , CaCl ₂ , MnCl ₂ , NiCl ₂ , ZnCl ₂ , CoCl ₂ , NaCl, FeCl ₂ , NaCl, NaOH, Na ₂ HPO ₄ , Na ₂ CO ₃ , NaAc, Na ₂ CO ₄ , NaNO ₃ , NaHCO ₃ , Na ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₃ , NaHSO ₄ ,	Sigma, Merck

2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

2.2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0): 0,205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 4,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
2. Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0): 0,205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 5,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
3. MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,0'ya ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
4. MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,0'ye ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
5. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
6. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
7. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 10'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
8. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,0): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 11'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
9. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12,0): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 12'ye ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

2.2.3.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (a/h) Na_2CO_3): 0,4 g NaOH ve 2 g Na_2CO_3 saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
2. Lowry B Çözeltisi (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi): 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
3. Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K Tartarat Çözeltisi): 2 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
4. Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve lowry C karıştırılarak hazırlandı.
5. Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
6. Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1mg/mL): 5 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
7. 0,1 N NaOH içinde %0,1 (a/h) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

2.2.3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

1. Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 5,4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 8,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.
2. Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 0,2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 6,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.
3. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C'de saklandı.
4. N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Satın alındığı şekliyle kullanıldı.
5. Akrlamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,20 mg akrilamid ve 0,80 g N,N'-metilenbisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
6. Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

7. Bromofenol Mavisi: 10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
8. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL pH 6,8 1 M Tris-HCl, 100 µL %0.1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.
9. Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
10. Substrat Boyama Çözeltisi: 24 mM L-dopa 100 ml saf suda hazırlandı.

2.2.3.4. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanışı

1. 100 mM 4-MetilKatekol: 0,124 g 4-metilkatekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
2. 100 mM Katekol: 0,110 g katekol az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
3. 100 mM Hidrokafeik asit (3,4-dihidroksi sinnamik asit): 0,182 g hidrokafeik asit az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
4. 100 mM L-Tirozin: 0,181 g L-Tirozin az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
5. 100 mM *p*-Kumarik Asit: 0,164 g *p*-Kumarik Asit az saf suda çözülüp hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
6. 100 mM Epikateşin: 0,290 g epikateşin az miktarda metanolde çözülüp hacim metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.
7. 100 mM Kateşin: 0,290 g kateşin az miktarda metanolde çözülüp hacim metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.
8. 100 mM Gallik asit (3, 4, 5 trihidroksi benzoik asit): 0,170 g gallik asit az miktarda metanolde çözülüp hacim metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.
9. 100 mM PHPPA (3-(4-Hidroksifenil) propiyonik asit): 0,166 g PHPPA az miktarda metanolde çözülüp hacim metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.
10. 100 mM Kuarsetin: 0,302 g kuarsetin az miktarda metanolde çözülüp hacim metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

11. 10 mM MBTH: 0,022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

2.2.3.5. İnhibitör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanışı

1. 200µM Askorbik Asit: 0,352 mg askorbik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
2. 50 µM Sodyummetabisülfid: 0,095 mg Na₂S₂O₅ saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
3. 50 mM Benzoik Asit: 61,060 mg benzoik asit az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
4. 400 mM Sodyum Azid: 260,08 mg NaN₃ az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

2.2.3.6. Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanışı

Ekstraksiyon çözeltisi: 0,84 g sodyum asetat (50 mM), % 6 (a/h) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM PMSF 80 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.2.4. Deneysel Çalışmalar

2.2.4.1. Ham Ekstrağın Hazırlanması

Gümüşhane İli'nden toplanmış olan Gövem Eriği meyvesi (*Prunus spinosa* L.) soğuk zincir (+6-8 °C) içerisinde laboratuara kadar ulaştırıldıktan sonra sonra 50 g'ı beher içerisinde sıvı azot ile 20 dakika ozmotik şoka tabii tutuldu. Sonra, +4 °C 'deki 100 mL ekstraksiyon çözeltisi ilavesiyle, el blendırını yardımıyla 15 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 katlı beyaz tülbentten süzüldü. Elde edilen karışım +4 °C' de 15,000 devir/dk da 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant karakterizasyon çalışmalarında ham enzim kaynağı olarak kullanıldı.



Şekil 14. Çalışmada kullanılan Gövem Eriği (*Pyrus spinosa* L.).

2.2.4.2. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizilebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, deney tüpüne 10 µL ilave edildi. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL tamamlayacak şekilde 0,1N NaOH içindeki %0,1 (a/h) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi. Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO₄.5H₂O ve 0,1N NaOH içerisinde %2 Na₂CO₃) ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. 650 nm'de absorbanslar okundu. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.4.3. Elektroforez

Polifenol oksidaz enziminin varlığını gözlemleyebilmek için %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı (Sambrook vd.,1989).

2.2.4.3.1. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE)

Doğal PAGE %5'lik yığıma jeli ve %10'uk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 4).

Tablo 3.Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.

	%5'lik Yığma JeliBileşenleri (mL)	%10' luk Ayırma JeliBileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,1
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1. M Tris (pH 8,8)	---	2,5
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Doğal PAGE jeli yukarıdaki tabloya uygun şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırdı ve Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroferez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 30 mA'de yürütüldü.

2.2.4.3.2. Substrat Boyaması

Doğal elektroferez sonucu elektroferez sisteminden çıkartılan jel, substrat boyama çözeltisi (L- dopa) içerisinde hafifçe çalkalanarak 20 dakika kadar bekletildi. Protein bantları görünür hale gelen jelin görüntüleri kaydedildi.

2.2.4.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini

PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 496 nm'de 4-metilkatekol için ve 500 nm'de diğer bütün substratlar için, absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995). Aktivite ölçümleri için 10 µL enzim + 100 µL substrat (100 mM) + 100 µL MBTH (10 mM) + 20 µL DMF + 770 µL tampon (50 mM) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon karışımının nihai hacmi 1000 µL olacak şekilde hazırlandı. Enzim elüatının katılmadığı reaksiyon karışımı ise kör olarak kullanıldı. Absorbansdaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi (Espin vd., 1997).

2.2.4.5. PFO Enziminin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

PFO enziminin substrat özgünlüğünün belirlenmesi enzimin tirozinaz ya da difenolaz olup olmadığını teyid etmek açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla enzim aktivitesi, katekol, 4-metilkatekol, epikateşin, kateşin, hidrokafeik asit, *p*-kumarik asit, L-tirozin, PHPPA, gallik asit ve kuarsetin substratlarının 100 mM'lık çözeltileri kullanılarak nihai substrat konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde, 496 nm'de 4-metil katekol için ve 500 nm'de diğer bütün substratlar için, 1 dakikada absorbanstaki artış değerleri kaydedilerek analiz edildi. Absorbanstaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi ve aktiviteler en yüksek aktivite gözlenen substrata göre U/mL cinsinden hesaplandı.

2.2.4.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

PFO aktivitesi, pH'nın bir fonksiyonu olarak, 50 mM asetat tamponunda pH 4,0-5,0; 50 mM fosfat tamponunda pH 6,0-7,0 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8,0-9,0 ve 50 mM Glisin-NaOH tamponu pH 10,0 değerleri arasında, 4-metilkatekol, katekol, kateşin, epikateşin ve hidrokafeik asit substratları kullanılarak belirlendi. Bu substratlar varlığında belirlenen optimum pH, substrat özgünlüğünün, ısı özelliklerinin ve diğer parametrelerin belirlenmesi için kullanıldı (Colak vd., 2005).

2.2.4.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, 4-metilkatekol, katekol, kateşin, epikateşin ve hidrokafeik asit substratlarının optimum pH değerlerinde, enzim aktivitesi 10 °C'lik artışlarla 10-80 °C aralığında incelendi. İstenilen sıcaklıklar oda sıcaklığının altında olanlar soğutmalı inkübatörde, oda sıcaklığının üzerinde olanlar ise Thermoblok'ta ayarlandı. Tampon ve substrat karışımları belirtilen sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra karışıma enzim özütü ilave edildi ardından mümkün olduğu hızlı bir şekilde aktivite ölçümü yapıldı. Ölçümler sonucu optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri için 10 µL enzim + 100 µL substrat (100 mM) + 100 µL MBTH (10 mM) + 20 µL DMF + 770µL tampon (50 mM) çözeltisi ilave edildi (Espin vd., 1997; Dinçer vd., 2002, Colak vd., 2007).

2.2.4.8. Farklı Substratlar İçin Optimal Şartlarda Polifenol Oksidaz Kinetiğinin İncelenmesi

Meyve ekstraktındaki PFO'nun çeşitli substratlara karşı davranışını ve ilgisini incelemek için optimize edilmiş şartlarda 4-metilkatekol, katekol, kateşin, epikateşin ve hidrokafeik asit substratları için bir seri konsantrasyon aralığında PFO aktivitesi 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı elde edilen absorbans değerleri U/mg protein cinsinden hesaplandı. $1/[S]$ değerlerine karşılık elde edilen $1/V$ (U/mg protein) değerleri yardımı ile Lineweaver-Burk eğrileri çizilerek enzimin maksimum reaksiyon hızı (V_{maks}) ve Michaelis sabiti (K_m) değerleri belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.2.4.9. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek için, saf enzim, 30, 40 ve 60 °C sıcaklıklarda 1saat boyunca inkübe edildi ve her 10 dakikada bir optimum şartlar altında hem 4-metilkatekol hemde hidrokafeik asit substratı varlığında enzim aktivitesi ölçüldü. Kalan yüzde *Prunus spinosa* L. PFO'sunun aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

2.2.4.10. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4,0 ve 5,0 asetat tamponu, pH 6,0 ve 7,0 MOPS tamponu, pH 8,0 ve 9,0 tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları +4 °C'de toplam 24 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

2.2.4.11. PFO Enziminin Bazı İnhibitörlere Karşı Davranışının İncelenmesi

PFO'nun inhibisyon çalışmasında yaygın olarak bilinen benzoik asit (50-1,56mM), askorbik asit (200-12,5 µM), sodyum metabisülfid (50-3,125 µM) ve sodyum

azid (400-6,25 mM) inhibitörleri kullanıldı. İnhibitörlerin PFO aktivitesi üzerine etkisini ve enzimin bu maddelere karşı davranışını incelemek amacı ile inhibitör yokluğunda ve varlığında 4-metilkatekol substratı varlığında aktivite denemeleri yapıldı. Elde edilen veriler yardımı ile herbir inhibitör için IC_{50} değeri (varolan enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) hesaplandı.

2.2.4.12. Bazı Metal İyonlarının PFO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Prunus spinosa L. PFO' sunun aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 1mM, 5mM ve 10mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında, 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu, içermeyen karışımın aktivitesi elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

Hazırlanan enzim özütünde, polifenol oksidazın varlığı doğal elektrofrez ile ortaya konuldu. Doğal elektrofrez jeli substrat boyama çözeltisi (L-dopa) ile boyandı. Ham enzim özütünü içeren elektrofrez kromatogramında doğal boyama sonucunda en az altı tane izoenzim olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil15. Doğal PAGE elektrofrez. 1,1:Ham enzim özütü.

3.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.2.1. Enzimin Substrat Özgünlüğünün ve Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

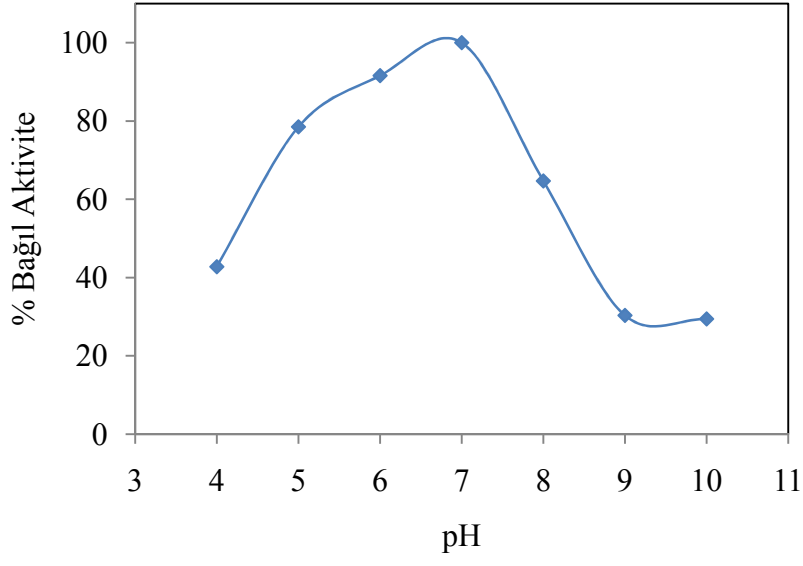
Karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirilebilmek amacıyla *Prunus spinosa* L. PFO' sunun katekol, 4-metilkatekol, epikateşin, kateşin, hidrokafeik asit, *p*-kumarik asit, L-tirozin, PHPPA, gallik asit ve kuarsetin substratları varlığında aktivite tayinleri yapıldı ve aktiviterler ünite (U/mL) cinsinden hesaplandı (Tablo 4). 1 U, 1 dakikada absorbansta 0.1 birimlik artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlandı (Batista vd., 2014).

Tablo 4.*Prunus spinosa* L. PFO' sunun farklı substratlar varlığında elde edilen aktivite değerleri.

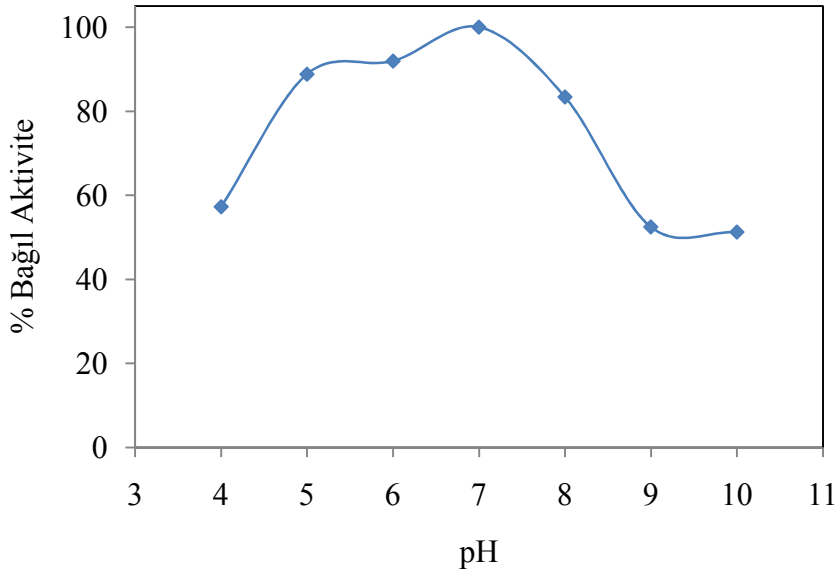
Substrat	Aktivite (U/mL.dak)
<i>p</i> -Kumarik asit	1
L-Tirozin	13
PHPPA	2
4-Metilkatekol	1518
Katekol	596
Hidrokafeik asit	936
Gallik asit	15
Kateşin	453
Kuarsetin	62
Epikateşin	363

3.2.2. Enzimin Aktivitesi Üzerine pH' ın Etkisi

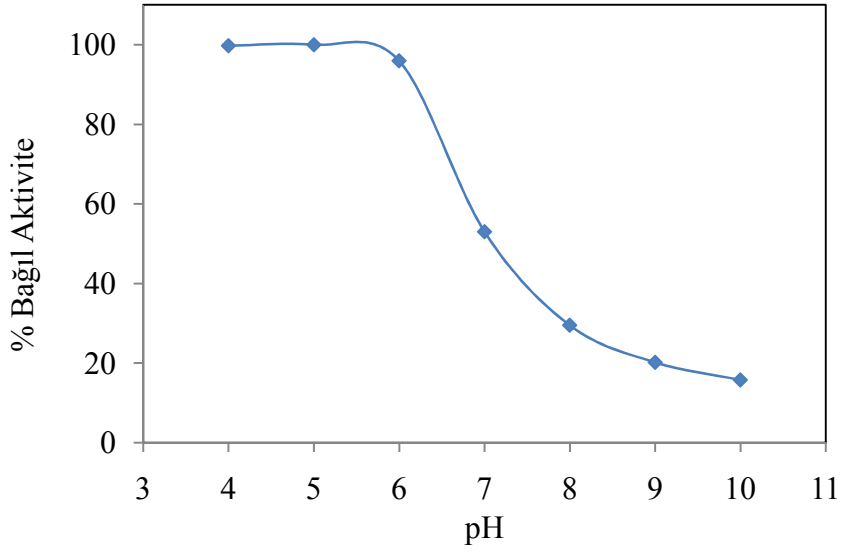
Prunus spinosa L. PFO'sunun 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek üzere, pH 4,0-10,0 değerleri arasında hazırlanan tamponlar kullanıldı. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiklerine bakıldığında, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerleri 4-metilkatekol için 7,0; katekol için 7,0; hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları için 5,0 olarak belirlendi (Şekil 16-20).



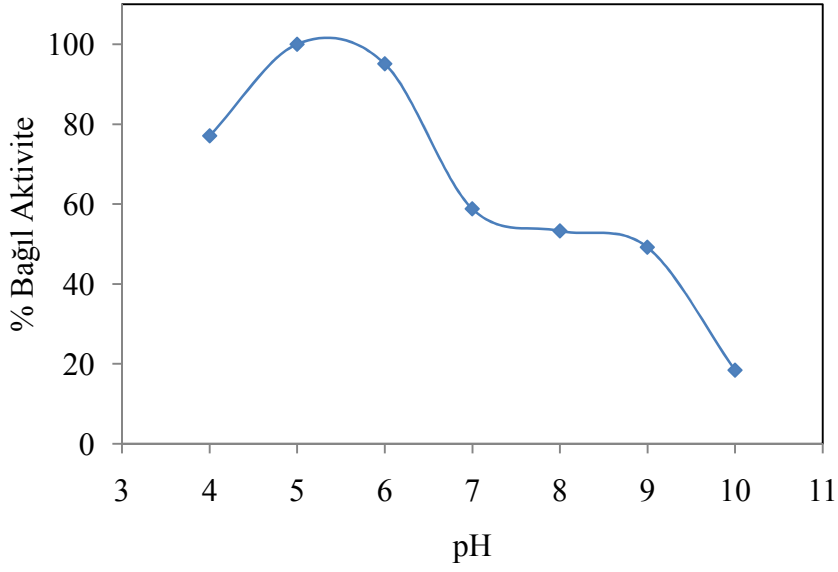
Şekil 16. 4-Metilkatekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.



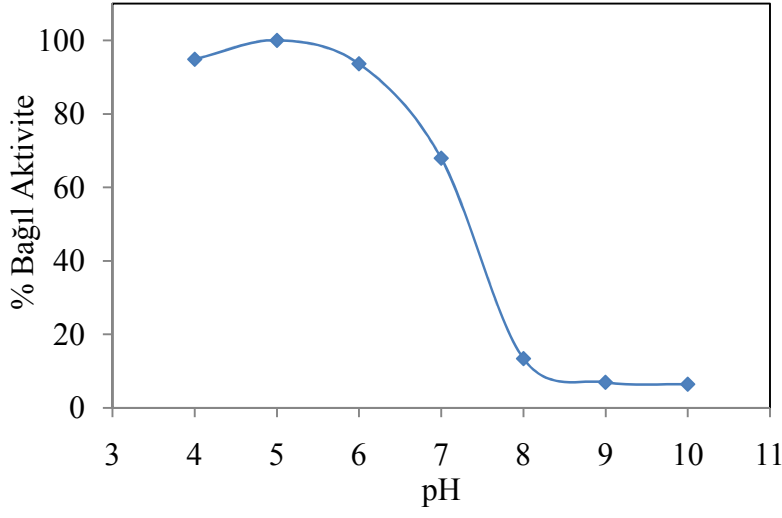
Şekil 17. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.



Şekil 18. Hidrokafeik asit substratı varlığında PFO aktivitesininpH ile değişimi.



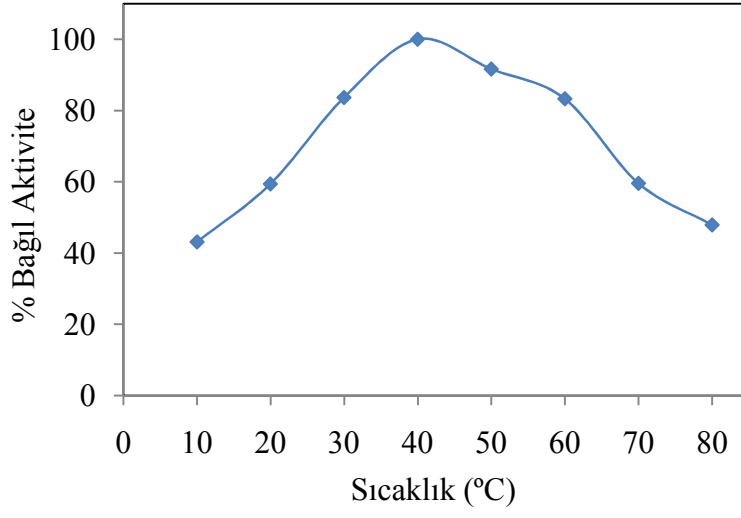
Şekil 19. Kateşin substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.



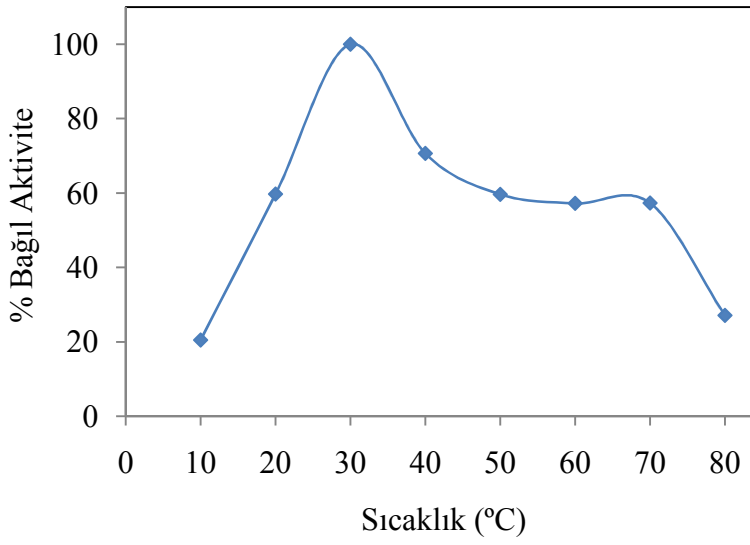
Şekil 20. Epikateşin substratı varlığında PFO aktivitesinin pH ile değişimi.

3.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

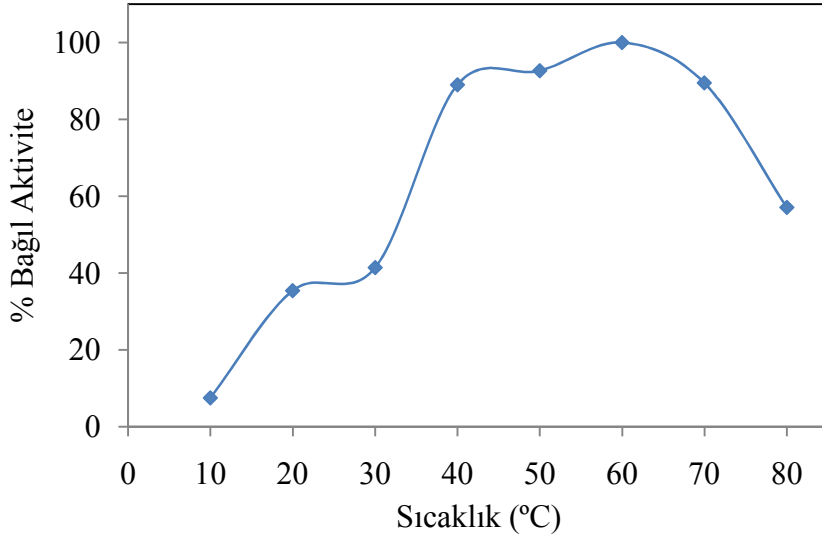
Gövem Eriği PFO'sunun, sıcaklık değişiminin aktivite üzerine etkisini incelemek için, 10 °C'lik artışlarla, 0-80 °C aralığında enzim aktivitesi ölçülerek, sıcaklık - % bağlı aktivite grafiği çizildi. Gövem Eriği PFO' sunun 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40, 30, 60, 60 ve 60 °C olarak belirlendi (Şekil 21-25).



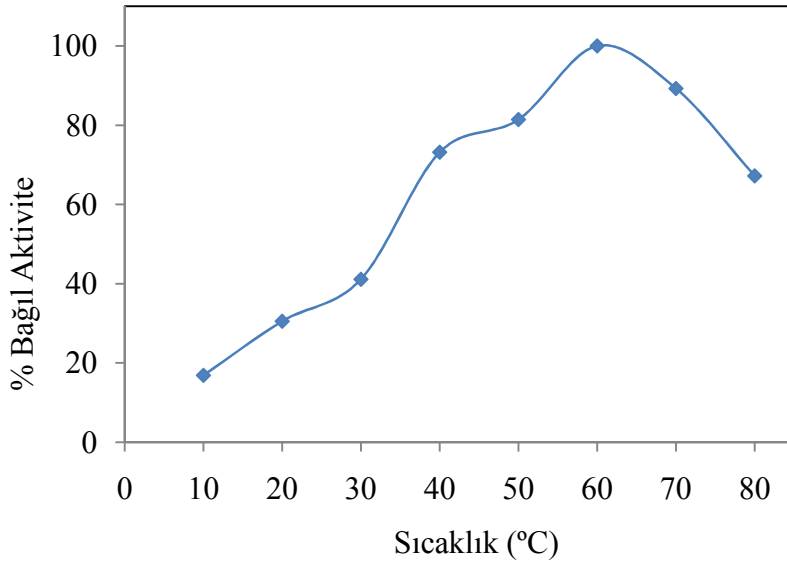
Şekil 21. 4-Metilkatekol substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



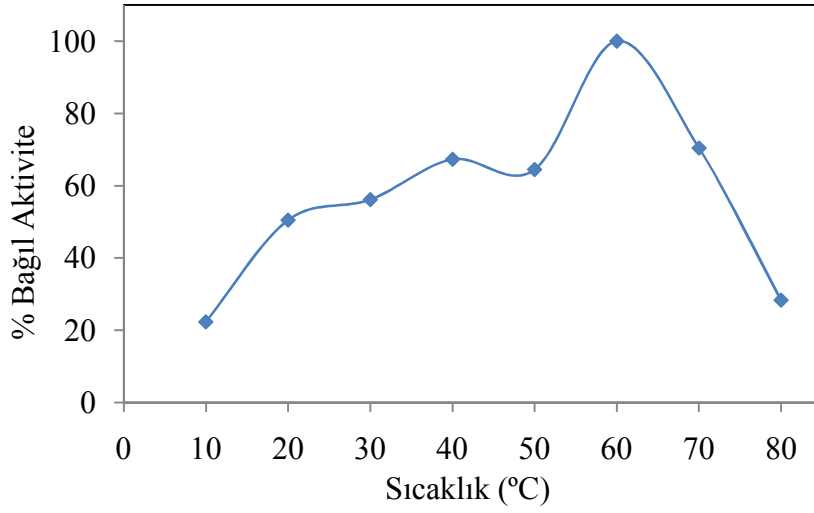
Şekil 22. Katekol substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 23. Hidrokafeik asit substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 24. Kateşin substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



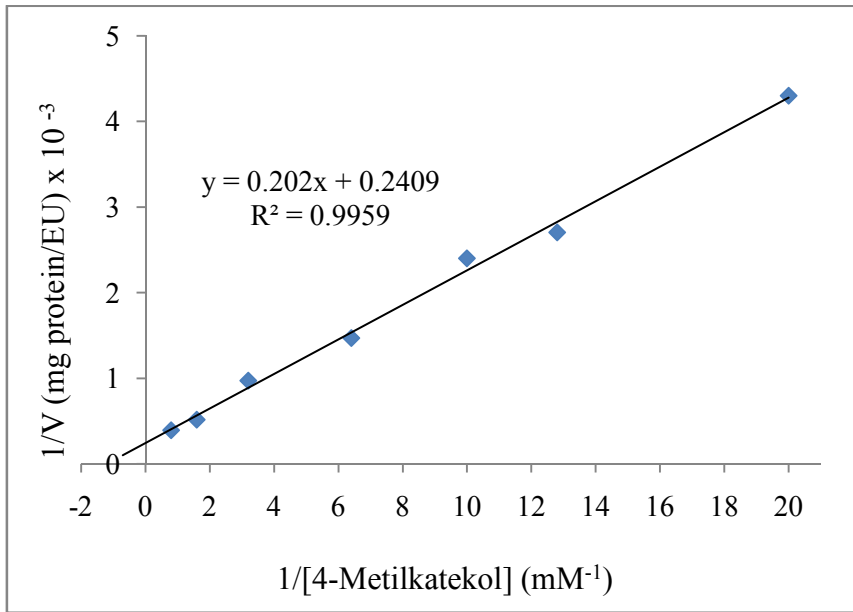
Şekil 25. Epikateşin substratı varlığında PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

3.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

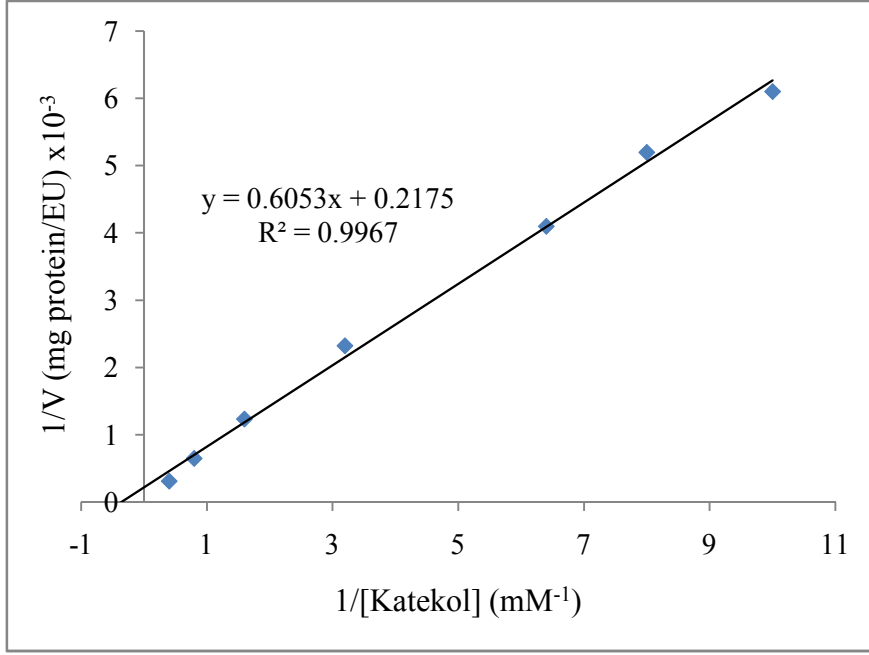
Gövem Eriği PFO'suna ait bazı kinetik verilerinin belirlenmesi amacı ile, 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratlarının değişen konsantrasyonlarında ve optimum reaksiyon şartlarında aktivite çalışmaları yapıldı. Denemeler sonucu her bir substrat için basit Michaelis-Menten grafiği çizildi ve Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) çizilen Lineaweaver-Burk grafiği yardımıyla her bir substrat için hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri, 4-metilkatekol için 0,838 mM; 4151,10 U/mg protein (Şekil 26), katekol için 2,783 mM; 4597,70 U/mg protein (Şekil 27), hidrokafeik asit için 2,771 mM; 7530,12 U/mg protein (Şekil 28), kateşin için 4,898 mM; 1910,58 U/mg protein (Şekil 29) ve epikateşin için 6,994 mM; 2406,74 U/mg protein (Şekil 30) olarak hesaplandı. Tablo 5'te verilen her bir substratın kendi V_{maks} (U/mg protein) değeri K_m (mM) değerine oranlandığında, Gövem Eriği PFO'sunun substrat ilgisi 4-metilkatekol>hidrokafeik asit>katekol>kateşin> epikateşin olarak sıralanabilir (Tablo 5).

Tablo 5. *Prunus spinosa* L. PFO'sunun farklı substratlar varlığında elde edilen optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{maks} değerleri.

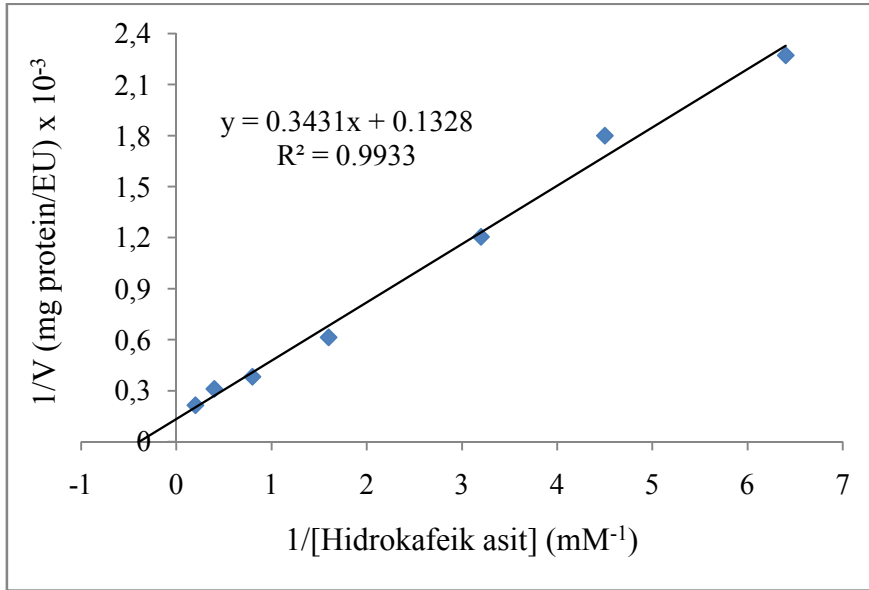
Substrat	pH	Sıcaklık (°C)	K_m (mM)	V_{maks} (U/mg protein)
4-Metilkatekol	7,0	40	0,838	4151,10
Katekol	7,0	30	2,783	4597,70
Hidrokafeik asit	4,0-6,0	60	2,771	7530,12
Kateşin	5,0	60	4,898	1910,58
Epikateşin	5,0	60	6,994	2406,74



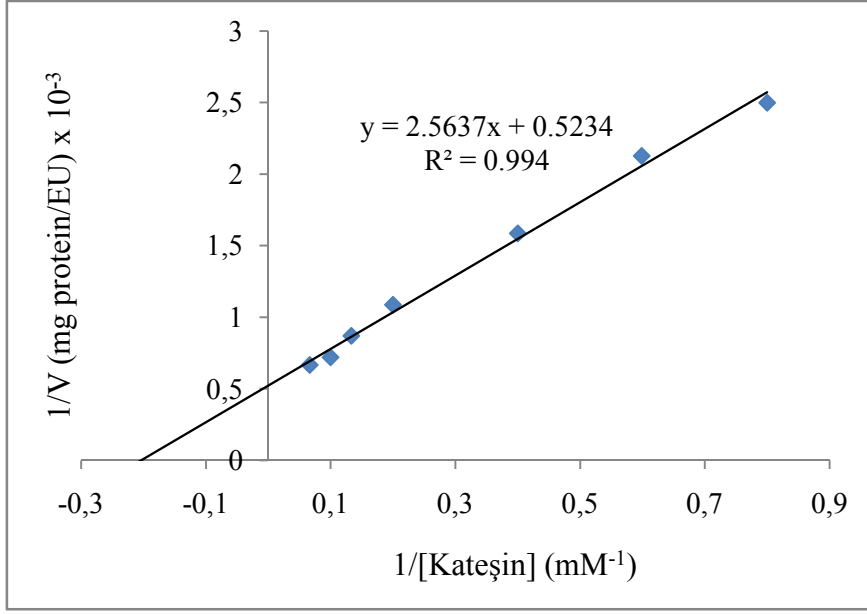
Şekil 26. PFO'nun 4-metilkatekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



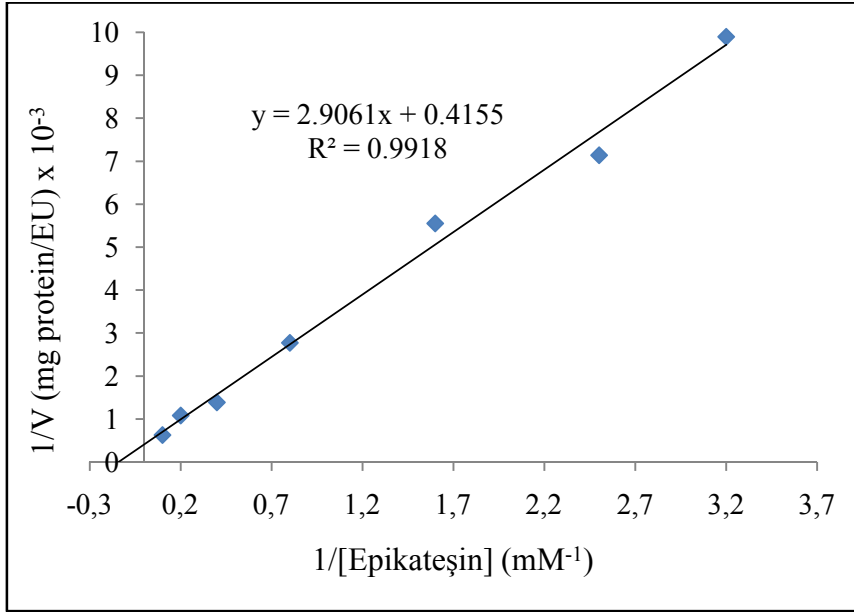
Şekil 27. PFO'nun katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 28. PFO'nun hidrokafeik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 29. PFO'nun kateşin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.

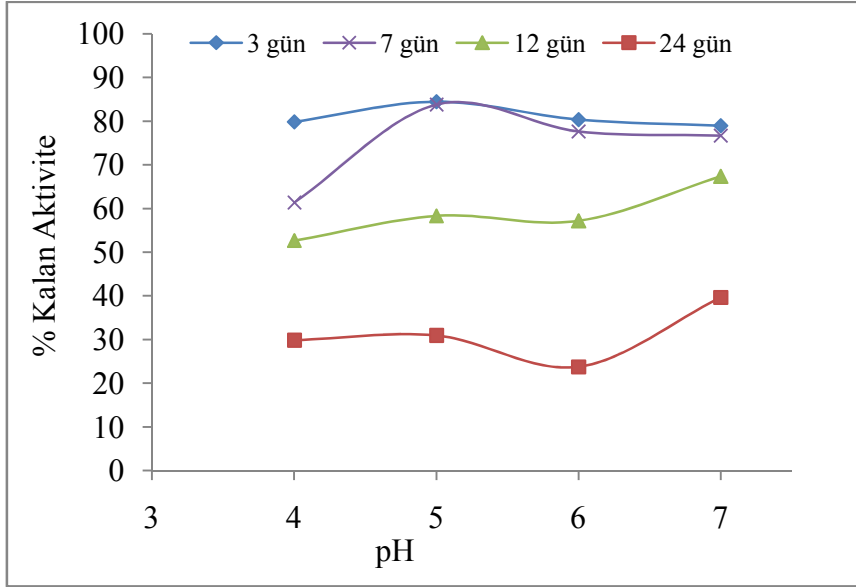


Şekil 30. PFO'nun epikateşin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.

3.2.5. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığının İncelenmesi

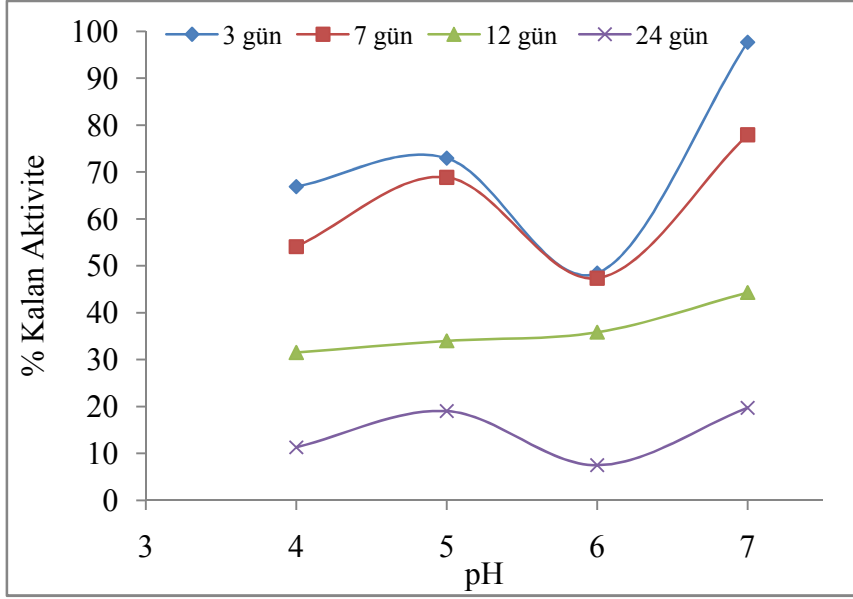
Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, ham enzim özütü 50 mM konsantrasyonda pH 4,0-7,0 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C' de 24 gün boyunca inkübe edildi.+4 °C' de inkübe edilen karışımlarda 3, 7, 12 ve 24. gün sonunda

optimum şartlar altında, 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda 3 gün sonunda pH 4,0'de enzim aktivitesinin % 79,83'ünü, pH 5,0'te % 84,45'ini ve pH 7,0'de ise % 78,96'sını koruduğu gözlemlendi. 24 gün sonunda ise, pH 5,0' de enzim aktivitesinin % 30,91'ini, pH 6,0'da % 23,77'sini ve pH 7,0'de ise % 39,67'sini koruduğu kaydedildi (Şekil 31).



Şekil 31. *Prunus spinosa* L. PFO'sunun 4- metilkatekol substratı varlığında +4 °C' deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.

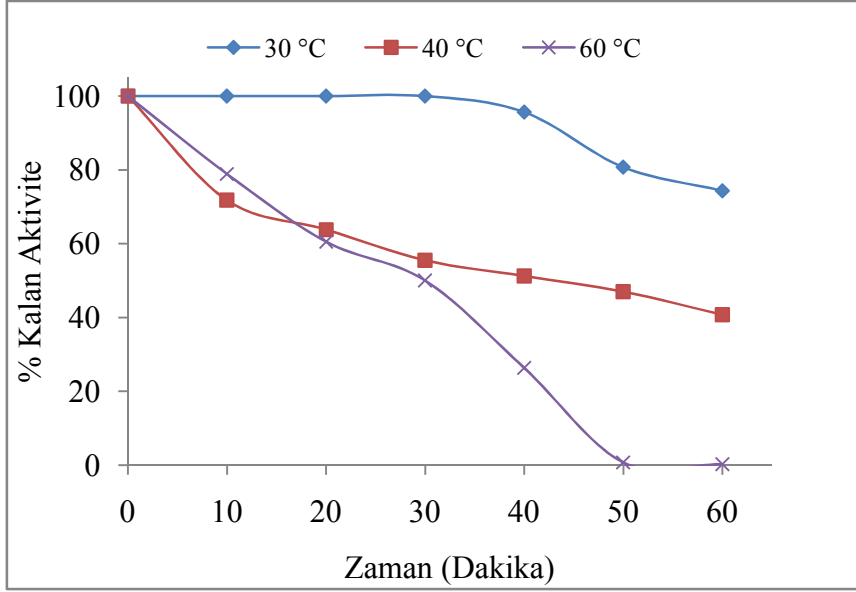
Hidrokafeik asit substratı varlığında yapılan pH kararlılığı çalışmasında, +4 °C' de enzim-tampon karışımlarında 3, 7, 12 ve 24. gün sonunda optimum şartlar altında, hidrokafeik asit substratı varlığında aktivite denemeleri yapıldı. Ölçümler sonucunda 7 gün sonunda pH 4,0' te enzim aktivitesinin % 54,18'ini, pH 5,0'te % 68,91'ini ve pH 7,0'de ise % 77,97'sini koruduğu kaydedildi. 24 gün sonunda ise, pH 5,0'te enzim aktivitesinin % 19,05'ini, pH 6,0'da % 7,52'sini ve pH 7,0'de ise % 19,74'ünü koruduğu gözlemlendi (Şekil 32).



Şekil 32. *Prunus spinosa* L. PFO'sunun hidrokafeik asit substratı varlığında +4 °C' deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.

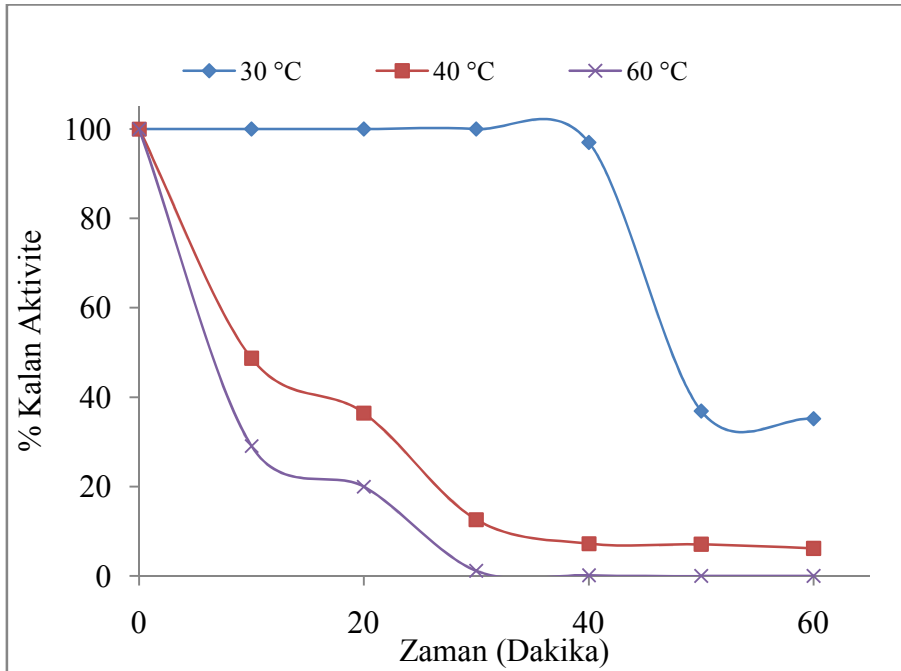
3.2.6. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla, ham enzim özütü, 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratlarının optimum sıcaklık değeri olan 40, 30 ve 60°C' de 1 saat boyunca inkübe edildi ve 10 dakikada bir 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarda, 4-metilkatekol substratı varlığında yapılan ölçümlerde, 30 °C' de ilk yarım saat boyunca enzimin aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. Yine 30 °C' de 1 saat sonunda enzim aktivitesinin % 25,68' ini kaybettiği tespit edildi. Enzim, 40 °C' de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin % 40,76' sını, 60 °C' de ise hemen hemen tamamını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 33).



Şekil 33. PFO' nun 4-metilkatekol substratı varlığında ısıl kararlılık eğrisi.

Ham enzim özütü, 30, 40 ve 60 °C' de 1 saat boyunca inkübe edildi ve 10 dakikada bir hidrokafeik asit substratı varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. 1 saatlik inkübasyon bitiminde 30 °C' de enzim aktivitesinin % 64,81'ini, 40 °C' de % 93,81'ini ve 60 °C' de ise tamamını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 34).



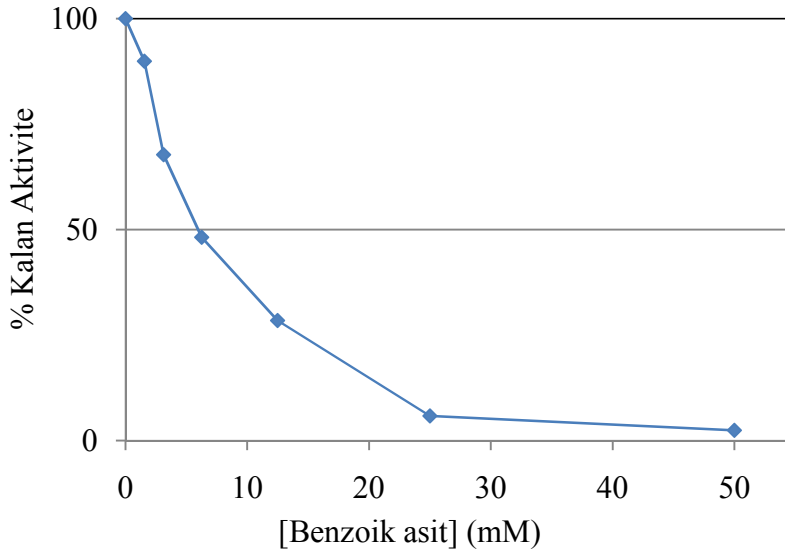
Şekil 34. PFO' nun hidrokafeik asit substratı varlığında ısıl kararlılık eğrisi.

3.2.7. Bazı İnhibitörlerin Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

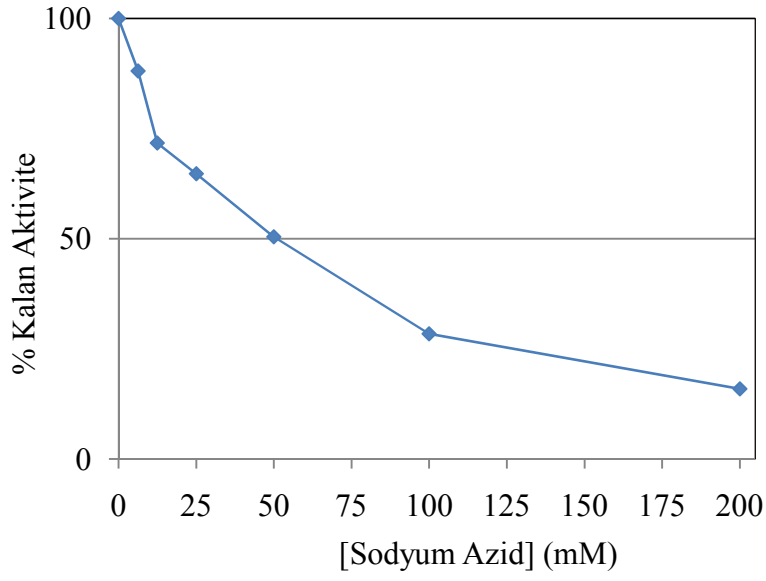
Enzimin 4-metilkatekol substratı varlığında benzoik asit (50-1,56 mM), askorbik asit (200-12,5 μ M), sodyum metabisülfid (50-3,125 μ M) ve sodyum azid (200-6,25 mM) inhibitörleri için inhibisyon çalışmaları yapıldı ve IC_{50} değerleri hesaplandı (Şekil 35-38). En kuvvetli inhibisyon, IC_{50} değeri 0,010 mM olan sodyum metabisülfid varlığında gözlemlendi (Tablo 6).

Tablo 6. İnhibitörlerin 4-metilkatekol varlığında PFO aktivitesi üzerine etkisi.

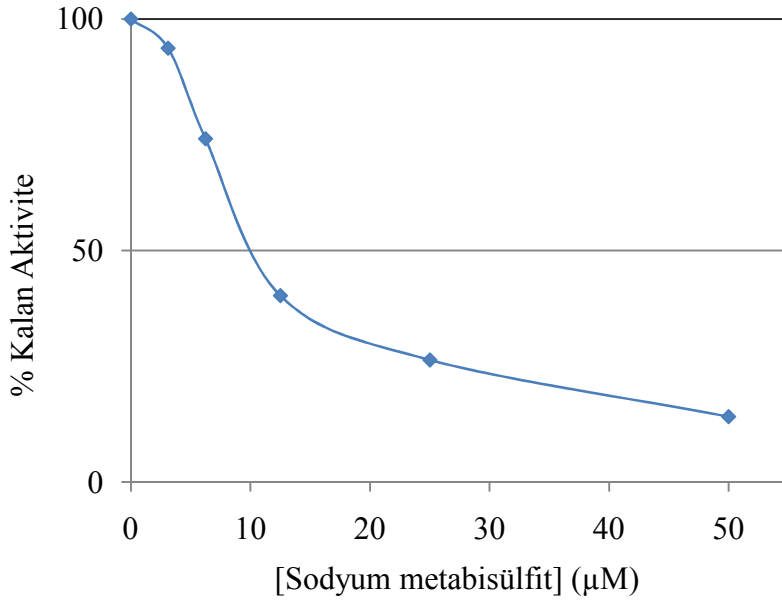
İnhibitör	IC_{50} (mM)
Sodyum metabisülfid	0,010
Askorbik asit	0,039
Sodyum azid	50,020
Benzoik asit	5,920



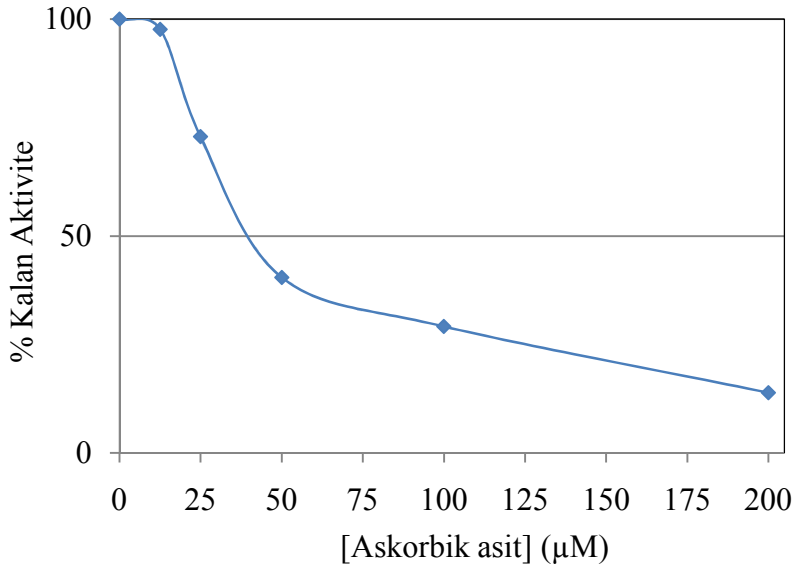
Şekil 35. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 36.PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 37. PFO'nun sodyum metabisülfit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 38. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.

3.2.8. Bazı Metal İyonlarının Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Prunus spinosa L. PFO'sunun aktivitesi üzerine 4-metilkatekol substratı varlığında bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1, 5 ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda çalışıldı. Yapılan çalışma sonucunda, 4-metilkatekol substratı varlığında, metal katyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonunda Gövem eriği PFO'sunun aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe etmedikleri gözlemlendi. Yine 4-metilkatekol substratı varlığında reaksiyon ortamına 5 mM Ba^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonları ilave edildiğinde enzim aktivitesinin yarısından fazlasını kaybettiği gözlemlendi (Tablo 7). 10 mM Hg^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} ve Mn^{2+} katyonlarının enzim aktivitesini sırasıyla %99,33, %91,70, %84,10 ve %68,80 inhibe ettikleri tespit edildi (Tablo 7).

Prunus spinosa L. PFO'sunun aktivitesi üzerine hidrokafeik asit substratı varlığında bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1, 5 ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda çalışıldı. 1 mM'lık nihai konsantrasyonda hemen hemen bütün katyonların enzimi inhibe ettiği gözlemlendi. 4-metilkatekol substratı varlığında 1 mM Hg^{2+} enzim aktivitesinin %10,2'sini korurken, hidrokafeik asit substratı varlığında %51,5'ini koruduğu gözlemlendi. Yine hidrokafeik asit substratı varlığında, 10 mM

konsantrasyonda Na⁺, K⁺ ve Ni²⁺ iyonları hariç diğer metal iyonları varlığında enzim aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybetmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Bazı Metal İyonlarının 4-metilkatekol ve hidrokafeik asit substratları varlığında *Prunus spinosa* L. PFO aktivitesi üzerine etkisi.

Metal iyonları	Bağlı Aktivite (%) (4-Metilkatekol)			Bağlı Aktivite (%) (Hidrokafeik asit)		
	1 mM	5 mM	10 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100	100	100
Na ⁺	103,7	71,6	64,1	103,2	79,6	61,1
K ⁺	84,7	77,8	66,4	84,1	72,7	60,0
Mg ²⁺	90,9	89,3	88,9	70,6	39,5	26,9
Ca ²⁺	94,1	64,5	35,1	91,4	80,3	55,0
Ba ²⁺	76,5	28,5	15,9	85,2	58,9	32,6
Mn ²⁺	94,1	55,9	31,2	89,9	61,4	38,9
Co ²⁺	146,3	91,7	77,9	64,4	57,7	49,3
Ni ²⁺	103,0	89,0	70,8	95,1	93,2	92,7
Zn ²⁺	119,2	95,8	92,6	98,1	71,8	38,6
Cd ²⁺	88,6	49,7	32,6	86,2	53,7	43,5
Hg ²⁺	10,2	2,95	0,67	51,5	38,1	31,2
Al ³⁺	110,8	21,5	8,3	54,7	7,9	2,8

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada, Gümüşhane İli'nden toplanan Gövem Eriğinde (*Prunus spinosa* L.) PFO'nun varlığı doğal PAGE elektroforezinde görüntülendi ve enzimin biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. PFO, hem katalizlediği reaksiyonlar hem de fizyolojik görevleri açısından, içinde bulunduğu canlıya ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak, aynı organizmanın farklı çeşitlerinde değişik biyokimyasal özelliklere sahip olabilir ve farklı aktivite gösterebilir.

Doğal PAGE jelinde, L-dopa ile boyama sonrasında PFO aktivitesine sahip altı tane izoenzimin varlığı tespit edildi (Şekil 15). Literatürde birden fazla izoenzime sahip olan oldukça fazla sayıda örnek mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, *Pyrus Elaeagnifolia* yabani armutu PFO' sunun iki tane (Baltaş,2016), alyanak kayısı PFO' sunun üç tane (Ünal ve Şener, 2016), Wolf's elmasının (*Solanum lycocarpum*) PFO' sunun iki tane (Batista vd., 2014), yeşil fasulye PFO'sunun dört tane (Guo vd., 2009), hurma meyvesi PFO' sunun dört tane (Navarro vd., 2014) ve mango meyvesi PFO'sunun üç tane izoenzimi (Cheema ve Sommerhater, 2015) olduğu bildirilmiştir.

Tablo 8. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO 'ların İzoenzim Sayıları.

Ürün	İzoenzim Sayısı	Kaynak
Yabani Armut	İki	Baltaş, 2016
Alyanak Kayısı	Üç	Ünal ve Şener, 2016
Mango Meyvesi	Üç	Cheema ve Sommerhater, 2015
Hurma	Dört	Navarro vd., 2014
Wolf Elması	İki	Batista vd., 2014
Yeşil Fasulye	Dört	Guo vd., 2009

Prunus spinosa L. PFO' sunun substrat spesifitesi çalışmaları katekol, 4-metilkatekol, epikateşin, kateşin, hidrokafeik asit, *p*-kumarik asit, L-tirozin, PHPPA, gallik asit ve kuarsetin substratları kullanılarak yapıldı. Sonuçlar U (1 EU, 1 dakikada absorbansta 0.1 birimlik artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlandı) cinsinden hesaplandı (Tablo 4). Sonuçlara bakıldığında, en çok aktivite gösterdiği substrattan en az aktivite gösterdiği substrata doğru 4-metilkatekol, hidrokafeik asit, katekol, kateşin,

epikateşin, kuarsetin, gallik asit, L-tirozin, PHPPA ve *p*-kumarik asit şeklinde sıralama yapılabilir. Aktivite gösterdiği substrat profiline bakıldığında enzimin difenolaz aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Önceki yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında difenolaz aktivitesine sahip PFO içeren meyve ve sebze örnekleri oldukça fazladır. Yapılan çalışmalarda, şeftali PFO'sunun (Liu vd., 2015) en çok kateşin, epikateşin ve katekol substratları varlığında aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Hemşin elması PFO' sunun katekol substratı varlığında (Aydın vd., 2015), bir tür yabani armut olan *Pyrus Elaeagnifolia* PFO' sunun 4-metilkatekol substratı varlığında (Baltaş,2016), kestane çekirdeği PFO' sunun 4-metilkatekol ve gallik asit (Guo vd., 2015) ve muşmula PFO' sunun 4-metilkatekol substratı varlığında (Dinçer vd., 2002) en çok aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Katekol ve 4-metilkatekol substratına spesifik olarak katekolaz aktivitesine sahip meyveler arasında Anamur muzı (Ünal, 2007), alyanak kayısı (Ünal ve Şener, 2016), şeftali (Liu vd., 2015), kestane (Gong vd., 2015), Wolf's elması (Batista vd., 2014) ve hurma (Navarro vd., 2014) yer almaktadır. Difenolaz aktivitesine sahip, Gövem PFO' su için elde edilen bu veriler, literatürde bahsi geçen ve difenolaz aktivitesine sahip,katekol ve 4-metilkatekol gibi küçük moleküler ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar olduklarını gösteren sonuçlarla uyumludur (Ünal ve Şener; 2016; Baltaş, 2016; Gong vd., 2015; Liu vd., 2015; Aydın vd., 2015; Batista vd., 2014; Navarro vd., 2014; Ünal, 2007; Özen vd., 2004; Dinçer vd., 2002). Ayrıca, bu enzimin 4-metilkatekol gibi küçük substrata ilgi duyması, enzimin, küçük substrat bağlanma bölgesine sahip olduğunu gösterir.

Tablo 9. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların İlgi Duyduğu Substratlar.

Ürün	Substrat Spesifitesi	Kaynak
Yabani Armut	4-Metilkatekol	Baltaş, 2016
Altın Çilek	4- Metilkatekol, Katekol, Klorojenik asit	Bravo ve Osorio, 2016
Şeftali Meyvesi	Kateşin, Epikateşin, Katekol	Liu vd., 2015
Kestane Çekirdeği	Katekol, 4-Metilkatekol, Gallikasit	Gong vd., 2015
Wolf Elması	Katekol, 4-Metilkatekol	Batista vd., 2014

Enzimin aktivitesi üzerine pH' nın etkisi incelendiğinde, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerleri 4-metilkatekol için 7,0; katekol için 7,0; hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları için 5,0 olarak belirlendi (Şekil 16-20). Literatürde, PFO enzimlerinin optimum pH aralığı 3,0 ile 8,0 aralığında değişmektedir. Yomra elmasının optimum pH değeri L-tirozin, PHPPA, katekol, 4-metilkatekol ve L-dopa substratları için 5,0; 7,0; 5,0; 7,0 ve 7,0 olarak rapor edilmiştir (Can vd., 2014). Mango PFO' sunun optimum pH'sı pirogallol substratı varlığında 6,0 (Palma-Orozco vd., 2014), ısırgan bitkisi PFO' sunun L-tirozin substratı varlığında 4.5 (Gülçin vd., 2005), ayva PFO' sunun 5,0 (Orenos-Pinero vd., 2006), hurma PFO' sunun katekol varlığında 5,5 (Navarro, 2014) ve dut PFO' sunun 4-metilkatekol ve pirogallol substratı varlığında optimum pH değeri 4,5-8,0 olarak bulunmuştur (Arslan vd., 2004).

Tablo 10. Çeşitli Ürünlerden Elde Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri.

Optimum pH	Ürün	Substrat	Kaynak
7,0	Yabani Armut	4-Metilkatekol	Baltaş, 2016
7,0	Kestane Çekirdeği	Katekol	Gong vd., 2015
5,5	Hemşin Elması	Katekol	Aydın vd., 2015
5,5	Hurma	Katekol	Navarro vd., 2014
7,0	Yomra Elması	4-Metilkatekol	Can vd., 2014
7,0	Jack Fruit	Katekol	Tao vd., 2013
6,5	Muşmula Meyvesi	4-Metilkatekol	Dinçer vd., 2005
4,5	Isırgan Bitkisi	L-Tirozin	Gülçin vd., 2005
4,5 – 8,0	Dut	4-Metilkatekol, Pirogallol	Arslan vd., 2004

Gövem eriği PFO' sunun 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40, 30, 60, 60 ve 60 °C olarak belirlendi (Şekil 21-25). Muşmula meyvesi PFO' sunun katekol substratıyla 55 °C'de, 4-metilkatekol substratıyla 35 °C'de, DHPPA substratıyla 35 °C'de en yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Dinçer vd., 2002). Trabzon hurması PFO' sunun katekol substratıyla 20 °C'de, 4-metilkatekol substratıyla 40°C'de, DHPPA substratıyla 60 °C'de ve L-dopa substratıyla 10 °C'den yüksek difenolaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Özen, 2004). Hemşin elması PFO' sunun katekol substratı

varlığında optimum sıcaklığı 30-40 °C (Aydın vd., 2015), *Pyrus Elaeagnifolia* yabancı armut PFO' sunun 4-metilkatekol substratı için 30 °C (Baltaş,2016) ve altın çilek meyvesi PFO' sunun klorojenik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları için, sırasıyla 20, 25 ve 40 °C olduğu rapor edilmiştir (Bravo ve Osorio, 2016). Vanilya fasulyesi PFO' sunun 4-metilkatekol substratıyla optimum sıcaklık değeri 37 °C (Walissevski vd., 2009), Denizli narı için 40 °C (Sabancılar vd., 2007) ve kereviz kökü PFO' sunun katekol substratıyla 40 °C, L-dopa substratı varlığında 45 °C (Yağar, 2004) ve hurma için katekol substratı varlığında 55 °C olarak bildirilmiştir (Navarro vd., 2014).

Tablo 11. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum Sıcaklık Değerleri.

Optimum Sıcaklık (°C)	Ürün	Kaynak
30 °C	Yabancı Armut	Baltaş, 2016
30-40 °C	Hemşin Elması	Aydın vd., 2015
55 °C	Hurma	Navarro vd., 2014
37 °C	Vanilya Fasülyesi	Walissevski vd., 2009
40 °C	Denizli Narı	Sabancılar vd., 2007
40 °C	Kereviz Kökü	Yağar, 2004
55 °C	Muşmula Meyvesi	Dinçer vd., 2002
50 °C	Çilek Meyvesi	Serradell vd., 2000

Gövem PFO' sunun 4-metilkatekol, katekol, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında, K_m ve V_{maks} değerleri çizilen Lineaweaver-Burk eğrisi yardımı ile hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri, 4-metilkatekol için 0,838 mM, 4151,10 U/mg protein (Şekil 26), katekol için 2,783 mM, 4597,70 U/mg protein (Şekil 27), hidrokafeik asit için 2,771 mM, 7530,12 U/mg protein (Şekil 28), kateşin için 4,896 mM, 1910,58 U/mg protein (Şekil 29) ve epikateşin için 6,994 mM, 2406,74 U/mg protein (Şekil 30) olarak hesaplandı. Her bir substratın kendi V_{maks} (U/mg protein) değeri K_m (mM) değerine oranlandığında, Gövem Eriği PFO'sunun substrat ilgisi 4-metilkatekol> hidrokafeik asit> katekol>kateşin > epikateşin olarak sıralanabilir (Tablo 5). Alyanak kayısı PFO' sunun katekol ve klorojenik asit substratları için K_m değerlerini 40,4 ve 73,4 mM olarak rapor edilmiştir (Ünal ve Şener, 2016). Bununla birlikte muşmula meyvesi PFO'sunun K_m ve V_{maks} değerlerinin sırasıyla, katekol için 5,7 mM, 88 µM/dak, 4-metilkatekol varlığında 7,5 mM, 130 µM/dak, DHPPA için 1,9 mM, 7,2

$\mu\text{M/dak}$ olduğu rapor edilmiştir (Dinçer vd., 2002). Şeftali PFO' sunun kateşin, epikateşin ve katekol substratları için K_m değerleri $0,19\pm0,02$; $0,18\pm0,02$ ve $4,91\pm0,22$ mM, V_{maks} değerleri ise sırasıyla 229 ± 15 ; 361 ± 27 ve 89 ± 7 U/dak olarak bildirilmiştir (Liu vd., 2015). Trabzon hurması PFO'sunun, K_m ve V_{maks} kinetik değerleri sırasıyla, katekol için 12,4 mM; 55,2 $\mu\text{M/dak}$, 4-metilkatekol için 14,6 mM, 49,5 $\mu\text{M/dak}$, DHPPA için 12,8 mM; 17,2 $\mu\text{M/dak}$ olarak hesaplanmıştır (Özen, 2004). Bir çeşit yabani armut olan *Pyrus elaeagnifolia* PFO' sunun 4-metilkatekol substratı valığında K_m ve V_{max} değeri sırasıyla, 3,57 mM ve 4781 U/mg protein olarak saptanmıştır (Baltas., 2016). Altın çilek meyvesi PFO' sunun klorojenik asit substratı için K_m ve V_{maks} değeri $0,56\pm0,07$ ve $53,15\pm2,03$ U ($\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$) olarak bildirilmiştir (Bravo ve Osorio, 2016). Hemşin elması (*Malus communis* L.) PFO'sunun katekol substratı için K_m ve V_{maks} değerini sırasıyla 3,40 mM ve 333,3EU/mL.dak olarak hesaplamışlardır (Aydın vd., 2015). Kestane çekirdeği PFO'sunun 4-metilkatekol ve gallik asit substratları için K_m değerleri 94 ve 100 mmol/L, V_{maks} değerleri ise 1,3 ve 0,99 mmol/L olarak hesaplanmıştır (Gong vd., 2015). Mango meyvesinden elde edilen ve katekolaz aktivitesine sahip PFO enziminin, katekol, 3-metilkatekol ve pirogallol substratları için K_m değerleri 14,62; 3,69 ve 7,31 mM, V_{maks} değerleri ise 0,28; 0,24 ve 0,53 IU/mL olarak bulunmuştur (Cheema ve Sommerhalter, 2015). Wolf's elması (*Solanum lycocarpum*) PFO' sunun katekol ve 4-metilkatekol substratı için K_m değeri 6,47 ve 0,15 mM, V_{maks} değeri ise 3,42 ve 3,01 U/mL olarak bildirilmiştir (Batista vd., 2014).

Tablo 12. Çeşitli Ürünlerin PFO'larının K_m ve V_{max} Değerleri.

Ürün	Substrat	K_m	V_{max}	Kaynak
Yabani Armut	4-Metilkatekol	3,57 mM	4781 U/mg protein	Baltaş, 2016
Şeftali	Katekol	4,91 mM	89 U/dak	Liu vd., 2015
Cashew Elması	Katekol	18,8 mM	13,6 U/min.mL	Queiroz vd., 2011
Isırgan Bitkisi	L-Tirozin	$7,90 \times 10^{-4}$ mM	11290 EU/mL	Gülçin vd., 2015
Wolf Elması	Katekol	6,47 mM	3,42 U/mL	Batista vd., 2014
Trabzon Hurması	Katekol	12,4 mM	55,2 $\mu\text{M/dak}$	Özen, 2004

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, 4-metilkatekol substratı varlığında, 3 gün sonunda pH 4,0'de enzim aktivitesinin % 79,83'ünü, pH 5,0'te % 84,45'ini ve pH 7,0'de ise % 78,96'sını koruduğu gözlemlendi. 24 gün sonunda ise, pH 5,0'de enzim aktivitesinin % 30,91'ini, pH 6,0'da % 23,77'sini ve pH 7,0'de ise % 39,67'sini koruduğu kaydedildi (Şekil 31).

Hidrokafeik asit substratı varlığında yapılan pH kararlılığı denemelerinde, +4 °C' de enzim-tampon karışımlarında 3, 7, 12 ve 24. gün sonunda optimum şartlar altında, hidrokafeik asit substratı varlığında aktivite denemeleri yapıldı. Ölçümler sonucunda 7 gün sonunda pH 4,0' te enzim aktivitesinin % 54,18'ini, pH 5,0' te % 68,91'ini ve pH 7,0'de ise % 77,97'sini koruduğu kaydedildi. 24 gün sonunda ise, pH 5,0'te enzim aktivitesinin % 19,05'ini, pH 6,0'da % 7,52'sini ve pH 7,0'de ise % 19,74'ünü koruduğu gözlemlendi (Şekil 32). Hurma PFO' sunun pH 5,5' de 80 °C'de 70 dakika inkübasyonu sonucunda aktivitesinin %90'ını kaybettiği belirtilmiştir. Oysaki enzim 60 °C'de 10 dakika inkübe edildiğinde enzim aktivitesinin %90'ını kaybettiği gözlemlenmiştir (Navarro vd., 2014).

Gövem PFO'su, 30 °C'de 30 dakika inkübe edildiğinde, 4-metilkatekol substratı varlığında yapılan ölçümlerde, enzimin orijinal aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. Yine 30 °C'de 1 saat sonunda enzim aktivitesinin % 25,68' ini kaybettiği tespit edildi. Enzim, 40 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin % 40,76' sını, 60 °C'de ise hemen hemen tamamını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 33).

Yapılan ısı kararlılık çalışmalarında 60 ve 70 °C'de ilk 10 dakika içerisinde PFO enziminin hemen hemen aktivitesinin yarısının kaybolduğu bildirilmiştir (Ünal, 2007; Orenes-Pinero vd., 2006). Altın çilek PFO' su 70 °C' de 30 dakika inkübe edildiğinde 4-metilkatekol varlığında orijinal aktivitesinin %30' unu, klorojenik asit substratı varlığında %20'sini koruduğu gözlemlenmiştir. Altın çilek PFO'su 80 °C' de 30 dakika inkübe edildiğinde orijinal aktivitesinin %90' ını kaybettiği bildirilmiştir (Bravo ve Osorio, 2016).

Gövem PFO'su, 30, 40 ve 60 °C' de 1 saat boyunca inkübe edildi ve 10 dakikada bir kalan aktivite ölçümleri hidrokafeik asit substratı varlığında yapıldı. 60 dakikanın sonunda, 30 °C' de enzim aktivitesinin % 64.81'ini, 40 °C' de % 93.81'ini ve 60 °C' de ise tamamını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 34).

Oksijen veya fenolik reaktantların uzaklaştırılmasıyla veya PFO inhibitörlerinin kullanılmasıyla, birçok canlıda meydana gelen enzimatik esmerleşme, azaltılabilir veya durdurulabilir. Enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından kullanılan birçok inhibitör vardır (Dogan vd., 2004, Ünal, 2007). Enzimatik esmerleşmenin önlenmesi için, en sık başvurulan yol, inhibitörlerin kullanımudur. PFO inhibitörü olarak en çok kullanılan fakat insan sağlığına birçok yan etkiye sebep olan SO₂ ye alternatif yeni inhibitör arama çalışmaları tiyol içeren bileşikler üzerinden devam etmiştir. Ancak, bu bileşiğin insan sağlığına vermiş olduğu zararlardan dolayı, tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

Askorbik asit, benzoik asit, sodyum metabisülfid ve sodyum azid inhibitörlerinin PFO aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Enzim aktivitesinin yarısını inhibe etmek için gerekli olan inhibitor konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplandı. Askorbik asit, benzoik asit, sodyum metabisülfid ve sodyum azid için IC₅₀ değeri 4-metilkatekol substratı varlığında 0,039 mM, 5,920 mM, 0,010 mM ve 50,020 mM olarak hesaplandı. Viktorya üzümü PFO'su için inhibitor etki sırasının askorbik asit> L-sistein>sodyum metabisülfid olduğu bildirilmiştir (Rapeanu vd., 2006). Anamur muzunu PFO' su için askorbik asit ve sodyum metabisülfid olduğu rapor edilmiştir (Ünal, 2007). Isırgan PFO' sunun en etkili inhibitörü dietil ditiyokarbomat olduğu bulunmuştur (Gülçin vd., 2005). Yapılan başka bir çalışmada metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,0185; 0,0036; 4,0231 ve 0,4653 mM olarak rapor edilmiştir (Baltas, 2016). Yomra elması ile yapılan PFO karakterizasyon çalışmasında, sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit substratları için IC₅₀ değeri 0,07; 0,05; 30,04 ve 9,80 mM olarak hesaplanmıştır (Can vd., 2014). Mango PFO' su için tropolon, askorbik asit, sodyum metabisülfid ve kojik asit inhibitörlerinin 0.1 mM konsantrasyonunda enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini belirtmişlerdir (Palma-Orozco vd., 2014). Jackfurit meyve PFO' sunun L-

sistein ve askorbik asit varlığında 8 °C'de 15 gün boyunca kararmadığı bildirilmiştir (Tao vd., 2013). Vanilya fasulyesi PFO'su için askorbik asiti takiben en etkili inhibitörün 4-hekzilresorsinol olduğu rapor edilmiştir (Walissevski d., 2009). Yapılan birçok çalışmada askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum dietil ditiyokarbomat, L-sistein, tropolon ve sodyum askorbat en etkili inhibitörler olarak rapor edilmiştir (Ünal ve Şener, 2016; Liu vd., 2015; Gong vd., 2015; Cheema ve Sommerhalter, 2015; Batista vd., 2014; Navarro vd., 2014; Can vd., 2014; Palma-Orozco vd., 2011; Guo vd., 2009; Ünal, 2007; Rapeanu vd., 2006; Gülçin vd., 2005; Ziyen ve Pekyardımcı, 2004; Yağar ve Sağıroğlu, 2000)

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

Gövem PFO'sunun aktivitesi üzerine 4-metilkatekol substratı varlığında Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1, 5 ve 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarında çalışıldı. Katyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonda enzimin aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe etmedikleri gözlemlendi. Reaksiyon ortamına 5 mM Ba^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonları ilave edildiğinde enzim aktivitesinin yarısından fazlasını kaybettiği gözlemlendi (Tablo 7). Hg^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} ve Mn^{2+} katyonlarının 10 mM nihai konsantrasyonda enzimin aktivitesini sırasıyla %99,33, %91,70, %84,10 ve %68,80 inhibe ettikleri tespit edildi (Tablo 7).

Hidrokafeik asit substratı varlığında, Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonda hemen hemen bütün katyonların enzimi inhibe ettiği gözlemlendi. 4-metilkatekol substratı varlığında 1 mM Hg^{2+} enzim aktivitesinin %10,2'sini korurken, hidrokafeik asit substratı varlığında %51,5'ini koruduğu gözlemlendi. Yine hidrokafeik asit substratı varlığında, 10 mM konsantrasyonda Na^+ , K^+ ve Ni^{2+} iyonları hariç diğer metal iyonları varlığında enzim aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybetmiştir (Tablo 7).

Yapılan alışma sonucunda elde edilen verilere bakıldığında, Gövem Eriği polifenol oksidazının, gösterdiği biyokimyasal özelliklerinin, kinetik parametrelerinin, metal iyonlarına ve inhibitörlere karşı sergilediği davranışların diğer sebze ve meyvelerden karakterize edilen PFO enzimleri ile benzerlik gösterdiği belirlendi.

5. ÖNERİLER

Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimindeki değişmelerinin, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin engellenmesine ihtiyaç vardır. Bu da, ancak esmerleşmeyi sağlayan PFO aktivitelerinin kapsamlı karakterizasyonu ile sağlanabilir.

Gövem eriği (*Prunus spinosa* L.) Karadeniz Bölgesinde özellikle reçel, marmelat ve kaynatılmış meyve suyu olarak bolca tüketilmektedir. Gövem eriğinden üretilen bu ürünlerde meydana gelebilecek kararma reaksiyonları dikkate alınarak PFO enziminin biyokimyasal özellikleri çalışılırken meyvenin tümünün bir arada olduğu ham ekstraktta çalışıldı. Bu çalışmada, Gümüşhane İli'nden toplanmış olan Gövem Eriği (*Prunus spinosa* L.) polifenol oksidaz enziminin (PFO) biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Bu amaçla öncelikle enzimin varlığı doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile görüntülendi. Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifitesi çalışıldı ve en çok ilgi duyduğu substratların sırasıyla 4-metilkatekol, hidrokafeik asit, katekol, kateşin ve epikateşin olduğu belirlendi. 4-metilkatekol, hidrokafeik asit, katekol, kateşin ve epikateşin substratları için optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenerek bu substratların bazı kinetik (K_m ve V_{maks}) parametreleri hesaplandı. Ayrıca, enzimin pH ve ısıl kararlılığı, metal iyonlarının ve bazı inhibitörlerin aktivite üzerine etkisi incelendi.

Bu tezde yapılan çalışmalara ilave olarak, enzim uygun bir kromatografik yöntem kullanılarak saflaştırılabilir, fakat izoenzim sayısının fazla oluşundan dolayı belki her bir izoenzim ayıramayabilir. Önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde, saflaştırmada en çok kullanılan yöntemler arasında amonyum sülfat veya organik bir çözücü ile çöktürme, affinite, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi sayılabilir. Doğal elektrozde varlığı tespit edilen altı tane izoenzimin birbirinden ayrılarak ve her bir izoenzim biyokimyasal özellikleri bakımından karakterize edilebilir. İzoenzimlerin çeşitli kimyasal maddeler varlığındaki davranışları incelenerek, yeni inhibitörlerin araştırılması ve bu inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konulması, özellikle gıda sektörü için önemli yararlar sağlayacaktır. Bununla birlikte izole edilen PFO izoenzimlerinin monofenolaz ve difenolaz izoenzimleri farklı tekniklerle birbirinden ayrılarak karakterize edilebilir.

KAYNAKLAR

- Aliyazıcıoğlu, R., Yıldız, O., Şahin, H., Eyüpoğlu, O.E., Ozkan, M.T., Karaoğlu, Ş.A., and Kolaylı, S., 2015.** Phenolic Components and Antioxidant Activity of *Prunus Spinosa* From Gümüşhane, Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 51, No: 2, DOI 10. 1007/s10600-015-1278-8.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S., and Ozensoy, O., 2004.** Purification of Mulberry (*Morus alba* L.) Polyphenol Oxidase by Affinity Chromatography and Investigation of its Kinetic and Electrophoretic Properties. *Food Chemistry*, 88 , 479 - 484.
- Aydın, B., Gulcin, I., and Alwasel, S.H., 2015.** Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Hemşin Apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, 18, 2735-2745.
- Bock, W.C., Katz, A.G., Markham, G.D., and Glusker, J.P., 1999.** Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions. *Journal of the American Chemistry Society*, 121, 7360-7372.
- Baltas, N., 2016.** Investigation of a Wild Pear Species (*Pyrus elaeagnifolia* subsp. *Elaeagnifolia Pallas*) from Antalya, Turkey: Polyphenol Oxidase Properties and Anti-Xanthine Oxidase, Anti-Urease and Antioxidant Activity. *International Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1080/10942912.2016.1171777.
- Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., and Fernandes, K.F., 2014.** Extraction, Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Solanum lycocarpum* Fruits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 211-217.
- Baytop, T., 1997.** Türkçe Bitki asları sözlüğü, TDK yayınları s, 578, Ankara.
- Baytop, T., 1999.** Türkiye’de bitkiler ile tedavi. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s, 204-205.
- Bravo, K., and Osorio, E., 2016.** Characterization of Polyphenol Oxidase from Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Fruit. *Food Chemistry*, 197, 185-190.
- Bolin, H.R. and Steele, R. J. 1987.** Nonenzymatic Browning in Dried Apples During Storage. *Journal of Food Science*, 52(69), 1654-1657.
- Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W., and O’Conner, K.E., 2004.** Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 486-492.
- Browich, K., 1972.** *Prunus*, In: Davis P.H.(ed.), *Flora of Turkey and East Eagen Islands*. Vol, 4, University Press, Edinburgh, pp, 8-12.
- Cabanes, J., Garcia-Canovas, F., and Garcia-Carmona, F., 1994.** Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine.

Spectrophotometric determination of intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 917, 190-197.

- Can, Z., Dinçer, B., Şahin, H., Baltaş, N., Yıldız, O., and Kolaylı, S., 2014.** Polyphenol Oxidase Activity and Antioxidant Properties of Yomra Apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(6), 829-835.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın, No, 6, 512s, Ankara.
- Cemeroğlu, B., Yemencioğlu, A., ve Özkan, M., 2001.** Meyve ve sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolamaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No, 24, Ankara.
- Cheema, S., and Sommerhalter, M., 2015.** Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Ataulfo Mango. *Food Chemistry*, 171, 382-387.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S., and Ayaz, A.F., 2005.** Diphenolases from Two Cultivars of Cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) Fruits at Early Stage of Maturation. *Food Chemistry*, 90, 801-807.
- Colak, A., Kolcuoğlu, Y., Faiz, Ö., Özen, A., and Dincer, B., 2007.** Comparative Characterization of Diphenolases from two Mulberry Fruits (*Marula alba* L. and *Morus nigra* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 2961-2972.
- Creumiere, F., 2000.** Inhibition of Enzymatic Browning in Food Products Using BioIngredients. A. Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements of the Degree of Master of Science. Department of Food Science and Agricultural Chemistry.
- Çalışır, S., Haciseferoğulları, H., Özcan, M., and Arslan, D., 2005.** Some Nutritional and Technological Properties of Wild Plum (*Prunus ssp.*) Fruits in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 66, 233-237.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., Mc Call, K.A., Fierke, C.A., and Toone, E.J., 2001.** Thermodynamics of metal ion binding: 1. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 40, 5338-5344.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., and Güner, S., 2002.** Characterization of Polyphenol Oxidase from Medlar Fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae). *Food Chemistry*, 77, 1-7.
- Ensminger, A.H., Ensminger, M.E., Koland, J.E., and Robson, J.R.K., 1995.** The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition, CRC Press, Boca Raton, LA.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., and Garcia-Canovas, F., 1995.** A Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 43, 2807-2812.

- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., and Garcia-Canovas, F., 1997.** Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities for Mushroom Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1084-1090.
- Espin, J.C., and Wichers, H.J., 2001.** Effect of Captopril on Mushroom Tyrosinase Activity *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, 289-300.
- Fernandez Garcia T., Martin, M.E., and Casp, A., 1998.** Quantification of Signification Volatile Componenets of Pacharan. *Zeitschrift for Lebensmittel-Unttersuchung and Forschung*. 2006, 414-416.
- Friedman, M., 1997.** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Ganguly, K., and Seshado, T.R., 1958.** Isolation of the more Commanly Occuring leucoanthocyanidins of Plants. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 17, 168- 173.
- Gong, Z.,Li, D., Liu, C., Cheng, A., and Wang, W., 2015.** Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Chestnut Kernel. *Food Science and Technology*, 60, 1095-1099.
- Guo, L., Maa, Y., Shi J., and Xue, S., 2009.** The Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Turkish Alyanak Apricot (*Prunus armenica* L.). *Food Chemistry*, 190, 741-747.
- Gülçin, İ., Kührevioğlu, Ö. İ., and Oktay, M., 2005.** Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and Inhibitory Effects of some Chemicals on Enzyme Activiyt. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3), 297-302.
- Kumarasamy, Y.,Cox, P.J., Jaspar, M., Nahar, L., and Sarker, S.D., 2004.** Comparative Studies on Biological Activities of *Prunus padus* and *P. Spinosa*. *Fitoterapia*, 75, 1,77-80.
- Labuza, T.P., Lillemo, J.H., and Taoukis, P.S., 1992.** Inhibition of Polyphenol Oxidase by Proteolytic Enzymes. *Fruit Processing*, 2, 9-13
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleave of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. DOI: 10. 1038/227680a0.
- Liu, L.,Cao, S., Yang, H., and Qi, X., 2015.** Pectin plays an important role on the kinetics properties of polyphenol oxidase from honeydew peach. *Food Chemistry*, 168, 14-20.
- Liu, F.,Zhao, J.H., Wen X., Ni., Y.Y., 2015.** Purification and Structural Analysis of Membrane-boundn Polyphenol Oxidase from Fuji Apple. *Food Chemistry*, 183, 72-77.
- Linewear, H., Burk, D., 1934.** The Determination of Enzyme Dissociation Constants.

Journal of American Chemical Society, 56, 658-666.

Lust, J., 1980. The herb book, Bantam, New York.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.

Marshall, M.R., Kim, J., and Wei, C., 2000. Enzymatic Browning in fruits, Vegetables and Seafoods.

Navarro, J.L., Tarrega, A., Sentandreu, M.A., and Sentandreu, E., 2014. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Persimmon. Food Chemistry, 157, 282-289.

Orenes-Pinero, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 2006. Latent Polyphenoloxidase from Quince Fruit Pulp (*Cydonia oblonga*): purification, activation and some properties. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 2172-2178.

Önez, Z., 2006. “Üzümden (*vitis vinifera* L.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Özcan, T., 2008. Some Vitamin and Organic Acid Contents in the Fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *Dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in-Turkey. IJFS Journal of Biology, 67(2), 105- 114.

Özen, A., Colak, A., Dincer, B., and Güner, S., 2004. A Diphenolase from Persimmon Fruits (*Diospyros kaki* L.) , Ebenaceae. Food Chemistry, 85, 431- 437.

Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A., Dorantes-Alvarez, L., Sampedro, J.G., and Najera, H., 2011. Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mamey (*Pouteria sapota*). Phytochemistry, 72, 82-88.

Palma-Orozco, G., Marrufa-Hernandez, N.A., Sampedro, J.G., and Najera, H., 2014. Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mango (*Magnifera indica* cv. Manila). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 9832-9840.

Queiroz, C., Riberio da Silva, A.J., Mendes Lopes, M.L., and Fialho E., Valente-Mesquita, V.L., 2011. Polyphenol Oxidase Activity, Phenolic Acid Composition and Browning in Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. Food Chemistry, 125, 128-132.

Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J., and Garcia-Canovas, F., 1994. A Continuous Spectrophotometric Method for the Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone. Analytical Biochemistry, 216, 205-212.

- Sabancılar, İ., Emre, Ö., Baycan, Y.S., Demir, H., ve Erge, H., 2007.** Denizli Narından Afinite Kromatografisi Yardımı ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitim ABD, Van. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, Van.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989.** Molecular Cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Siegbahn, P.E.M., 2003.** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 8, 567-576.
- Serradell, M.A., Rozenfeld, P.A., Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.V., and Anon, M.C., 2000.** Polyphenoloxidase Activity from Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva) : Characterisation and Partial Purification. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 1421-1427.
- Tao, Y.M., Yao, L.Y., Qin, Q.Y., and Shen, W., 2013.** Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 61(51), 12662-12669.
- Unal, M.U., and Sener, A., 2016.** Two-year Comparison of the Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Turkish Alyanak Apricot (*Prunus armenica* L.). Food Chemistry, 190, 741-747.
- URL-1, 2016.** <http://www.nazimtanrikulu.com/Syf=26&Syz=211238>(05 Mayıs2016).
- URL-2, 2016.** <http://www.agaclar.net/forum/teorik-bilgiler/250-2.html>(05 Mayıs 2016).
- URL-3, 2016.** <http://www.erik.gen.tr/guvem-erigi.html>(05 Mayıs2016).
- URL-4, 2016.** <http://bitkirehberi.net/cakal-erigi-prunus-spinosa-bitkisi>(05 Mayıs 2016).
- Ünal, M.Ü., 2007.** Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). Food Chemistry, 100, 1421-1427.
- Yagar, H., and Sağıroğlu, A., 2000.** Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince, Trakya University, departmen of Chemistry, 22030 Edirne-Turkey.
- Yagar, H.,2004.** Some Biochemical Properties of Poliphenol Oxidase from Celery. Preparative Biochemistry and Biotechnology vol, 34, no, 4, 378-397.
- Ziyan, E., and Pekyardımcı, Ş., 2003.** Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol Oxidase. Turkish Journal of Chemistry, 28, 547-557.
- Wetherilt, H., 1992.** Evaluation of urtica species as potential sources of important

nutritients. Food Science and Human Nutrition, 29, 15-26.

Whitaker, J.R., 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York, Chapters 22-24.

Waliszewski, K.N., Marquez, O., Pardo, V.T., 2009. Quantification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Vanilla Bean. Food Chemistry. 117, 196-203.

ÖZGEÇMİŞ

Semra PAKYILDIZ, 08/01/1983 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Artvin'in Hopa ilçesinde tamamladı. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2006 yılında lisansını tamamladı.2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladı ve halen devam ettirmektedir. Semra PAKYILDIZ orta seviyede İngilizce bilmektedir.