

T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ROKA'DAN (*Eruca sativa*) POLİFENOLOKSİDAZ ENZİMİNİN  
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Negin SHABNAM

Y1213.040014

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı  
Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN

Aralık 2015





T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi**

Enstitümüz Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Gıda Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı Y1213.040014 numaralı öğrencisi Negin SHABNAM'ın "ROKA'NIN ( ERUCA SATİVA) FARKLI OLGUNLUK DÖNEMLERİNDE POLİFENALOKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 22.12.2015 tarih ve 2015/29 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ayrılığı ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Roka' dan (Eruca sativa) Polifenoloksidaz Enziminin  
Karakterizasyonu

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :29/12/2015

1)Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN

.....

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Güner ARKUN

.....

3) Jüri Üyesi : Doç.Dr. Sevim TUNALI

.....

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.



## YEMİN METNİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Roka’dan (*Eruca Sativa*) Polifenoloksidaz Enziminin Karakterizasyonu” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Bibliyografya’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (.../.../2015)

Negin SHABNAM



## ÖNSÖZ

Çalışmam süresince anlayışını, ilgisini, yardım ve desteğini esirgemeyen, ve sorduğum her soruya büyük bir sabırla cevaplayan, bilgi ve tecrübesiyle çalışmama ışık tutan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel Kahraman'a teşekkürlerimi sunarım. Tez için kullandığım roka yapraklarını temin eden Kudret Ateş'e teşekkür ederim. Ayrıca hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her koşulda beni çok büyük bir anlayışla karşılayan aileme ne kadar teşekkür etsem azdır.

Aralık 2015

Negin SHABNAM





## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET .....	xvii
ABSTRACT .....	xix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Roka.....	1
1.2 Polifenoloksidaz Hakkında Genel Bilgi .....	3
1.2.1 Polifenoloksidaz (PFO) enziminin biyokimyası ve PFO'nun adlandırılması ...	3
1.2.2 PFO'nun tabiattaki dağılım, homojenitesi ve molekül ağırlığı.....	3
1.2.3 PFO'nun substratları .....	4
1.2.4 PFO'nun katalizlediği reaksiyonlar .....	4
1.2.5 Enzimatik esmerleşme .....	4
1.3 PFO Enzimi ile İlgili Literatür Özetleri.....	5
1.4 Enzimler Hakkında Genel Bilgi .....	8
1.4.1 Enzim kinetiği.....	10
1.4.2 Enzim inhibisyonu .....	12
1.4.2.1 Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon.....	12
1.4.2.2 Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon .....	13
1.4.2.3 Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon .....	15
<b>2. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>17</b>
2.1 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	17
2.2 Kullanılan Cihazlar ve Modelleri .....	18
2.3 Kullanılan Kimyasallar.....	18
2.4 Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	19
2.5 Polifenoloksidaz Enziminin Aktivite Tayini .....	19
2.6 Enzim Kinetiği.....	19
2.7 PFO Enziminin İnhibitör İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	19
2.8 Enzim Aktivitesi Üzerinde pH Etkisi .....	20
2.9 Enzim Aktivitesi Üzerinde Uygun Sıcaklığın Bulunması.....	20
2.10 Enzim Aktivitesi Üzerinde Metal İyonların Etkisi .....	20
2.11 Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	20
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>23</b>
3.1 Enzim Aktivitesi Tayini .....	23
3.2 İnhibitör Etkisi.....	26
3.2.1 PFO enziminin inhibitör için enzim kinetiği .....	26

3.3 pH Etkisi .....	27
3.4 Sıcaklık Etkisi .....	29
3.5 Metal İyonların Etkisi .....	31
3.6 Protein Miktar Tayini.....	31
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>41</b>



## KISALTMALAR

<b>PFO</b>	: Polifenoloksidaz
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>dk</b>	: Dakika
<b>U</b>	: Ünite
<b>DOPA</b>	: Dihidroksifenil Alanin
<b>ES</b>	: Enzim-Substrat kompleksi
<b>ESI</b>	: Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
<b>I</b>	: İnhibitör
<b>E.C.</b>	: Enzim kodu
<b>B1</b>	: Booth 1 avokado tipi
<b>Jm</b>	: Julio Millan avokado tipi



## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 1.1</b> : Rokanın Besin Değeri (Url-1) .....	2
<b>Çizelge 2.1</b> : Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar ve Markaları .....	18
<b>Çizelge 3.1</b> : Roka'da PFO Enzimi İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri .....	25
<b>Çizelge 3.2</b> : Çeşitli Ürünlerin PFO'larının $K_m$ Değerleri .....	25
<b>Çizelge 3.3</b> : Roka'da PFO Enziminin Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Pirokateşol Substratı İçin $K_m$ , $V_{max}$ Değerleri ve İnhibisyon Türü .....	27
<b>Çizelge 3.4</b> : Farklı Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri .....	29
<b>Çizelge 3.5</b> : Farklı Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum Sıcaklık Değerleri ...	30



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Roka yaprakları .....	1
Şekil 1.2 : Enzim-substrat kompleks oluşumu ve ürüne dönüşmesi (Göksungur 2011)...	9
Şekil 1.3 : Bileşik enzimlerin yapısı .....	9
Şekil 1.4 : Michaelis-Menten grafiği .....	10
Şekil 1.5 : Lineweaver-Burk grafiği .....	12
Şekil 1.6 : Bir enzimin yarışmalı inhibitörü (Göksungur 2011).....	13
Şekil 1.7 : Yarışmalı inhibisyon şeması .....	13
Şekil 1.8 : Bir enzimin yarışmalı olmayan inhibitörü .....	14
Şekil 1.9 : Yarışmalı olmayan inhibisyon şeması.....	14
Şekil 1.10 : Yarı yarışmalı inhibisyon şeması .....	15
Şekil 1.11 : İnhibisyon türlerin $K_m$ ve $V_{max}$ değişimleri .....	16
Şekil 3.1 : Roka'da PFO enzimi için pirokateşol substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	23
Şekil 3.2 : Roka'da PFO enzimi için kateşin substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	24
Şekil 3.3 : Roka'da PFO enzimi için gallik asit substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	24
Şekil 3.4 : Roka'da PFO enzimi aktivitesi üzerine sitrik asidin inhibisyon etkisi .....	26
Şekil 3.5 : pH'nın Roka'da PFO aktivitesine etkisi .....	28
Şekil 3.6 : Roka'da PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	30
Şekil 3.7 : Metal iyonların roka'da PFO aktivitesine etkisi .....	31
Şekil 3.8 : Lowry yöntemine göre protein standart grafiği.....	32





## ROKA'DAN (*Eruca Sativa*) POLİFENOLOKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

### ÖZET

Yapılan bu çalışmada, Roka'da (*Eruca sativa*) Polifenoloksidaz ( PFO ) enziminin karakteristik özellikleri incelenmiştir. Organik bir bahçede yetiştirilen roka yaprakları distile su ile yıkandıktan sonra 50 mM fosfat tamponu ile blenderda homojenize edilmiştir. Elde edilen karışımdan soğutmalı santrifüj kullanarak ham ekstre elde edildi. Elde edilen ham ekstrede PFO enziminin substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, inhibisyon türü, metal iyonlarının etkisi çalışılmış ve protein tayini yapılmıştır.

Bu çalışmada enzimin üç farklı substrata ( pirokateşol, gallik asit, kateşin ) karşı ilgisi test edildi. Substratlar 5-30 mM konsantrasyonlarında çalışılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri ( pirokateşol;  $K_m = 10.24$  mM,  $V_{max} = 0.0018$  U/dk ), ( kateşin;  $K_m = 12.57$  mM,  $V_{max} = 0.0012$  U/dk ), ( gallik asit;  $K_m = 23.07$  mM,  $V_{max} = 0.0001$  U/dk ) Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek hesaplandı. Yapılan deneyler sonucu enzimin en çok pirokateşol substratına ilgi gösterdiği belirlendi.

Polifenoloksidaz enziminin aktivitesi üzerinde pH etkisi, 4.0-10.0 arasında test edildi ve en yüksek enzim aktivitesi pH = 7.0 olarak bulundu. Optimum sıcaklık enzim ( PFO ) aktivitesi için farklı sıcaklıklarda, 20-70 °C arasında 10°C artışlarla test edildi ve en yüksek aktivite 20°C'de bulundu.

İnhibitörlerin polifenoloksidaz aktivitesi üzerinde etkisini belirlemek için optimum şartlarda değişik konsantrasyonlarda sitrik asit inhibitörü kullanılarak,  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri ve inhibisyon türü Lineweaver-Burk grafiğı çizilerek hesaplandı. Çalışılan sitrik asit inhibitörü substratla rekabete girerek yarışmalı inhibisyona sebep olduğu belirlendi.

Çalışmamızda 6 farklı metal iyon (  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $K^+$  ) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Çalışılan metal iyonlarından  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  iyonlarının aktiviteyi arttırdığı,  $K^+$  varlığında ise polifenoloksidaz aktivitesinin diğer metallere göre önemli oranda arttığı gözlenmiştir.  $Fe^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları ise polifenoloksidaz aktivitesini inhibe ettikleri gözlenmiştir.

Çalışmamızda Lowry yöntemiyle protein miktarı tayin edildi ve bu yöntemde sığır serum albuminiyle standart kalibrasyon grafiğı çizilerek ekstrenin protein miktarı 488 mg/ml tayin edilmiştir.

**Anahtar kelimeler :** Roka, Polifenoloksidaz, Enzim, *Eruca sativa*



## CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE IN ROCKET SALAD (*Eruca Sativa*)

### ABSTRACT

At this study, characterization of polyphenol oxidase ( PPO ) enzyme in rocket salad ( *Eruca sativa* ) were determined. Rocket salad had been cultivated in specific organic garden, leaves of this plant homogenized in 50 mM pH = 7.0 phosphate buffer, then used refrigerated centrifuge for getting crude extract. PFO substrate specificity, optimum pH and optimum temperature, type of inhibition, the effect of metal ions and protein determination were assayed.

Substrate specificity was tested by using pyrocatechol, catechin and gallic acid at the different concentration (5-30 mM) and by plotting Linweaver-Burk graphs Km and Vmax values ( pyrocatechol; Km = 10.24 mM, Vmax = 0.0018 U/min ), ( catechin; Km = 12.57 mM, Vmax = 0.0012 U/min ), ( gallic acid; Km = 23.07 mM, Vmax = 0.0001 U/min ) were calculated. At the result of experiments pyrocatechol was selected as the best substrate for polyphenol oxidase enzyme.

A range of pH 4.0-10.0 was also tested and the highest enzyme activity was at pH = 7.0. The optimum temperature was determined by measuring the enzyme activity at various temperatures over the range of 20-70°C with 10°C increments. The optimum temperature was found to be 20 °C.

In this study, effect of citric acid on PPO activity at different concentrations (1-5 mM) on optimum conditions were evaluated. Km and Vmax values and type of inhibition by using Lineweaver-Burk graphs were calculated. Citric acid inhibitor compete with substrate for the active site of enzyme. These inhibitor have been identified as competitive inhibitor.

Effect of various metal ions such as, K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on enzyme activity were measured. From the results presence of K<sup>+</sup> caused a significant amount of activation of polyphenol oxidase activity. And presence of Fe<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup> strongly inhibited polyphenol oxidase activity.

Protein content in enzyme was determined by Lowry system, with bovine serum albumin as standard. The amount of protein by using standart graph 488 mg/ml calculated.

**Keywords** : Rocket salad, Polyphenol oxidase, Enzyme, *Eruca sativa*



## 1. GİRİŞ

### 1.1 Roka

Roka, Turpgiller familyasına ait gül kokulu bir bitkidir. Boyları 40 santimetreye kadar uzayabilir ve tüylü saplara sahiptir. Sapların ucunda büyüyen çiçeklerin rengi beyaza yakındır ve bu çiçeklerin üzerinde mor damarlar görülmektedir. Roka bitkisinde C vitamini oldukça yüklü miktarda bulunmaktadır (Villatoro-Pulido 2012). Aynı zamanda K vitamini, P vitamini ve çeşitli mineraller gibi besin değerlerini içermektedir. Zengin içeriği sayesinde roka birçok hastalıklara karşı korunmada yardımcı olabilmektedir (Url-1).



**Şekil 1.1** : Roka yaprakları

Rokanın sağlık üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Roka iştah açar, sindirimi kolaylaştırır, mideyi güçlendirir ve hazimsizliği giderir (Yaniv ve ark. 1998, Chun ve ark. 2015). İdrar söktürmede en başta gelen bitkilerden biridir. Diğer etkileri ise kanı temizlemesi, karaciğerden kaynaklanan ağrıları gidermesi ve sarılığa karşı etkili olmasıdır. Bağışıklık sistemini güçlendirerek vücudun kuvvetlenmesine sebep olur. Roka toksik maddelerin vücuttan atılmasını kolaylaştırır (Url-1).

**Çizelge 1.1 : Rokanın Besin Değeri (Url-1)**

Besin değeri	100g
Vitamin A (IU)	2373
Vitamin C (mg)	15
Vitamin E (mg)	0.4
Vitamin K (µg)	109
Riboflavin (mg)	0.1
Folat (µg)	97
Vitamin B6 (mg)	0.1
Kalsiyum (mg)	160
Demir (mg)	1.5
Magnezyum (mg)	47
Fosfor (mg)	52
Potasyum (mg)	369
Sodyum (mg)	27
Çinko (mg)	0.5
Bakır (mg)	0.1
Mangan (mg)	0.3
Su (g)	91.7
Karbonhidrat (g)	3.7
Yağ (g)	0.7
Omega 3 (mg)	170
Omega 6 (mg)	130
Protein (g)	2.6

## **1.2 Polifenoloksidaz Hakkında Genel Bilgi**

### **1.2.1 Polifenoloksidaz (PFO) enziminin biyokimyası ve PFO'nun adlandırılması**

Polifenoloksidaz (PFO) enzimi aktif bölgesinde bakır bulunan oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. PFO 1856 yılında Schoenbein tarafından bulunmuş ve tirozinaz, kresolaz, fenolaz, katekolaz, katekoloksidaz, o-difenoloksidaz ve mono fenoloksidaz olarak da adlandırılır. PFO enzimi iki kez Uluslararası Biyokimya Birliği'nin sınıflandırmasına girmiştir: EC 1.14.18.1 (monofenol, L-dopa: oksijen oksidoredüktaz) monohidroksifenolü o-pozisyonuna hidroksile eder. EC 1.10.3.1 (1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) o-dihidroksifenolleri okside edip hidroksi grubundan hidrojenleri uzaklaştırarak benzokinonlar oluşturur (Mayer ve ark. 1979).

### **1.2.2 PFO'nun tabiattaki dağılım, homojenitesi ve molekül ağırlığı**

PFO doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvanların organlarında ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı toprak türlerinde glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO enziminin varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar ve ark. 1989, Gul'ko ve ark. 1993, Mos'ko ve ark. 1992). PFO, hayvan ve bitki dokularında görülen bir enzimdir. Bitkilerin bütün kısımlarında bulunabilirken, hayvanların göz, tüy, saç ve derilerinde bulunur. Bitkisel dokularda önce inaktif şekilde sentezlenir ve zaman içerisinde farklı faktörlerle, etilen ve proteazlar ile aktif hale gelebilirler (Mayer ve ark. 1979). Polifenoloksidaz oranı bitkilerde olgunluk, tür, yaş, yetiştirme koşullarına bağlıdır (Spille 1997). PFO, şeker pancarında, farklı dokusal yapılarda ve kloroplastta peptid bağlarıyla aminoasitlere bağlı olarak bulunur. Ancak bu doku parçalandığında PFO serbest kalabilir. Farklı araştırmalarda bazı elma çeşitlerinde, üzüm kabuklarında, hıyarda ve diğer meyvelerde yüksek enzim aktivitesi görülmüştür. Başka bir çalışmada mantar da sap ve üst deri bölgelerinde PFO aktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Polifenoloksidaz ıstakozda en çok kütikül veya epidermis kısımlarında, çayda yaprak epidermisinde bulunmuştur. Bitkilerde ve kabuklu deniz ürünlerinde ise PFO miktarı çeşit, olgunluk ve yaşa bağlı olarak değişebilmektedir (Marshall ve ark. 2000, Spille 1997).

Yapılan başka bir araştırmada PFO enziminin kloroplast içinde bulunduğu gözlenmiştir (Halder ve ark. 1998).

Birçok kaynaktan elde edilen PFO enziminin farklı moleküler yapılar da olduğu bildirilmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara bağlıdır (Vamos-Vigyazo 1981).

### **1.2.3 PFO'nun substratları**

Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı PFO enzimine substrat olabilmektedir (Matheis ve ark. 1977, Czerkaskij 1970, Hughes ve ark. 1962, Erdüss ve ark. 1976, Negoro 1972, Burckhardt 1978, Herrmann 1973).

PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Bunlardan bazıları kateşinler, 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin), sinamik asit esterleri, tirozin ve 3,4-dihidroksifenil alanin (DOPA) (şakiroğlu 1994). PFO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorojenik asittir (Sato 1962). Klorojenik asidin doğada bulunan izo-klorojenik asit, neoklorojenik asit, pseudoklorojenik asit PFO'nun substratlarıdır (Sondheimer 1964).

Bazı meyve ve sebzelerde PFO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde çoğunlukla bulunmayan fenolik bileşiklerdir (Jen ve ark. 1974, Espin ve ark. 1988, Wildanger ve ark. 1973, Hanefeld ve ark. 1976, Martin ve ark. 1976).

### **1.2.4 PFO'nun katalizlediği reaksiyonlar**

PFO siyah, kahverengi veya kırmızı pigmentler oluşturarak (polifenolere) hızlıca polimerize olduğu monofenollerin o-difenollere hidroliz (EC 1.14.18.1, monofenol monooksijenaz, krezolaz aktivitesi) ve difenollerin o-kinonlara oksidasyonu reaksiyonlarını (EC 1.10.3.2, o-difenoloksidaz, kateşolaz aktivitesi) katalizler (Vaughn ve ark. 1984).

### **1.2.5 Enzimatik esmerleşme**

Enzimatik esmerleşme sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan PFO enziminin sebep olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur (Yang ve ark. 2001, Mathewson 2000).



PFO enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltgeyerek ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Meyve ve sebzelerde pembeden mavimsi-siyah rengine kadar farklı tonlardaki renk değişimlerine esmerleşme denir. Bu esmerleşme bazı fiziksel zedelenmeler nedeniyle (kesme, kabuk soyma, dilimleme, çarpma) ve depolanma suresinde meydana gelebilir (Laurila ve ark. 1998). Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenle temas etmez. Fakat, meyve veya sebze kesildiği yada zedelendiği zaman enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşikleri oluşturur (Yang ve ark. 2001, Matheewson 2000). Enzimatik esmerleşmenin olabilmesi için polifenoloksidaz , PFO'nun etkilediği polifenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması gibi çeşitli yöntemlerle önlenabilir (Pekyardımcı 1992).

### 1.3 PFO Enzimi ile İlgili Literatür Özetleri

Gawlik-Dziki ve ark (2007) tarafından PFO enzimi brokoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) çiçeğinden ekstrakte edilmiş ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. PFO, katekol ( $K_m = 12.34 \pm 0.057$  mM,  $V_{max} = 2000 \pm 8736$  U/ml/dk) ve 4-metil katekol ( $K_m = 21 \pm 0.087$  mM,  $V_{max} = 28.20 \pm 0.525$  U/ml/dk) substratlarına karşı yüksek aktivite göstermiştir. Katekol ve 4-metil katekol substrat olarak denendiğinde optimum pH = 5.7 olarak gözlenmiştir. Sodyum sülfat enzim üzerinde en etkili inhibitör olarak bildirilmiştir.

Ünal (2007), Türkiye'de yetiştirilmiş Anamur muzundan (*Musa cavendishii*) PFO enzimini ekstrakte etmiş ve enzimin karakteristik özelliklerini çalışmıştır. Optimum sıcaklık, optimum pH,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri  $30^\circ\text{C}$  , pH = 7.0, 8.5 mM ve  $0.754 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$  sırasıyla bildirilmiştir. En etkili inhibitörler ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid olarak saptanmıştır.

Amiour ve ark. (2015), Deglet Nour ve Ghars hurmasında polifenoloksidaz üzerinde, pH, sıcaklık ve bazı kimyasalların etkisini çalışmışlardır. Optimum pH = 6.4 ve pH = 7.2 ve optimum sıcaklık  $35^\circ\text{C}$  ve  $40^\circ\text{C}$  olarak tayin edilmiştir. En yüksek

inhibitör etkisi olan kimyasallar askorbik asit, sodyum metabisülfid ve sistein olarak bildirilmiştir. En yüksek fenol içeriği ve en yüksek anti-radikal aktivitesi, sırasıyla sodyum metabisülfid ve askorbik asit varlığında saptanmıştır. Enzimatik esmerleşme, Nour ve Ghars hurmasında, bazı kimyasallar ve yüksek pH ve sıcaklık ile tamamen inhibe edilebilir.

Ayaz ve ark. (2008), muşmula (*Mespilus germanica* L.) olgunlaşması sırasında, PFO enzimini karakterize etmişler ve toplam fenolik konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. En yüksek enzim aktivitesi olgunlaşma boyunca pH = 7.0 de ve optimum sıcaklık 193 ve 214. günleri için 30 °C, 207. gün için 20 °C olarak bulunmuştur. Optimum enzim ve substrat konsantrasyonları sırasıyla 0.1 mg/ml ve 40 mM olarak belirlenmiştir.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri birinci aşamada 476 U/mg protein ve 26 mM (193'üncü gün çiçeklenmeden sonra), ikinci aşamada 256 U/mg protein ve 12 mM (207'inci gün çiçeklenmeden sonra), üçüncü aşamada 222 U/mg protein ve 8 mM dır (214'üncü gün çiçeklenmeden sonra). Tüm olgunlaşma aşamalarında sodyum metabisülfid önemli ölçüde PFO aktivitesini inhibe etmiştir. Olgunlaşmanın birinci aşamasında  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Al^{3+}$ , ikinci aşamasında  $Cu^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$ , ve üçüncü aşamasında  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ve  $Ca^{2+}$  güçlü bir şekilde difenolaz aktivitesini inhibe etmiştir. Buna göre, olgunlaşmış muşmula meyvesinde kinetik parametreler değişmesine rağmen, PFO'nun optimum değerlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı sonucuna varmışlardır. Polifeniloksidaz aktivitesinin sulu ekstraksiyonlarında toplam meyve fenolik konsantrasyonlarında belirgin bir düşüş saptanmıştır.

Altunkaya ve ark. (2011) tarafından PFO enzimi makarnalık buğdaydan (*Triticum durum* L.) ekstrakte edilmiş ve iyon değişim kromatografisi ile kısmen saflaştırılmıştır. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6.5 ve 40 °C bulunmuştur. En iyi substrat spesifikliğı, katekol ile gözlenmiştir. Makarnalık buğdayların PFO enziminin askorbik asit, sistein, okzalik asit ve sitrik asit inhibitörlerine duyarlı olduğu bulunmuştur. En etkili inhibitörün askorbik asit olduğu gözlenmiştir.

Ünal ve ark. (2006), PFO enzimini Türkiye'de yetişen Emir üzümünden elde etmiş ve optimum pH, optimum sıcaklık, termal inaktivasyon, kinetik parametreler ve bazı PFO inhibitörlerinin özellikleri incelenmiştir. Kateşol substrat olarak kullanıldığında optimum pH 4.2 ve sıcaklık 25 °C bulunmuştur.  $K_m$  değeri  $25.1 \pm 2.72$  mmol<sup>-1</sup> ve

$V_{max}$  değeri  $0.925 \pm 0.04 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$  saptanmıştır. İnhibitör deneylerinde en etkili inhibitor askorbik asit, ardından sodyum metabisülfid olmuştur.

Gómez-López (2002) iki avokado (Booth 1 (b1PFO) and Julio Millán (jmPFO)) çeşidi üzerinde ham PFO ekstrakte etmiştir. Optimum pH iki ekstrakt için de pH = 7.5-7.6 olarak bulunmuştur. Substrat spesifikliğı deneylerinde  $V_{max}/K_m$  değerleri 4-metil katekol>klorojenik asit>pirogallol>katekol>kafeik asit>DL-DOPA (b1PFO) ve 4-metil katekol>klorojenik asit>pirogallol>kafeik asit>katekol>DL-DOPA>protokateşuik asit (jmPFO) sırasıyla bulunmuştur. İnhibitör etkinliğı ise L-sistein> askorbik asit> rezorsinol> glisin> NaCl şeklinde sıralanmıştır.

Zhao-Jian Gao ve ark (2009), pazıda (*Beta vulgaris* L. var *cicla*) PFO saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Saflaştırma prosedürü spesifik aktiviteye göre 39 kat saflaştırma ve toplam enzim aktivitesinde % 17 geri kazanım ile sonuçlanmıştır. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7.5 ve 45 °C olarak belirlenmiştir. Difenzolaz substrat olarak L-DOPA, katekol ve klorojenik asidi tercih etmiş ve monofenzolaz olarak 4-metoksifenol ve L-tirozin' e karşı düşük ilgi göstermiştir. Ayrıca enzimin  $K^+$ ,  $Na^+$ , SDS ve lauroil sarkozin ile aktive olduğu bulunmuş, ancak  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  gibi +2 değerlikli katyonlar ile inhibe edilmiştir. Bu enzimin aktivitesi askorbik asit, sistein, 1,4-ditiyotreitöl,  $\beta$ -merkaptöetanol, sodyum dietilditiokarbamat, sodyum metabisülfid, sodyum sülfid ve tiyöüre ile tamamen inhibe edilmiştir.

Waleed ve ark (2009), polifenoloksidazı kayısı, elma, patlıcan ve patates yumru köklerinde potasyum fosfat tamponu ile homojenize etmek suretiyle ekstrakte etmiş ve soğuk aseton ile çöktürmüştür. Patates PFO aktivitesi için optimum pH=6.4 ise diğer meyveler içinse pH=7.0 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık kayısı ve elma için 20°C iken patlıcan ve patates için 22°C bulunmuştur. Sıcaklığa en dayanıklı olarak patates ve ardından patlıcan, kayısı ve elma bulunmuştur. Dört kaynaktan elde edilen enzimlerin oda sıcaklığında ve nötr pH değerlerinde stabil olduğu fakat pH = 5'in altında stabiliteilerinin hızla azaldığı bulunmuştur. 3 ay süre ile pH = 7.0 'de +4 °C ve -18°C'de enzim çözeltileri depolandığında ise en yüksek stabiliteye sırasıyla patates, kayısı, patlıcan ve elmanın sahip olduğu bulunmuştur. Kayısı, elma, patlıcan ve patates PFO enzimi için kateşöl substratının  $K_m$  değerleri sırasıyla 4, 4.16, 1.25 ve 2.4 mM olarak bulunmuştur.

Gülçin ve ark (2005), ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) PFO enzimi için  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi, diyaliz, CM-Sephadex iyon değıştirme kromatografisi yoluyla ham

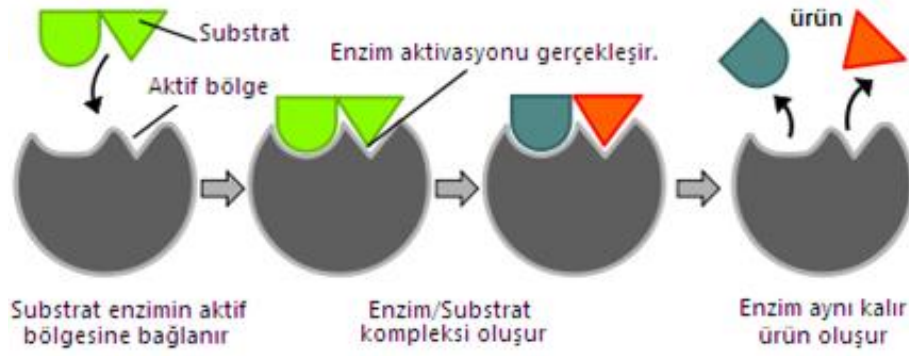
ekstre elde etmiş, saflaştırmış ve karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. Polifenoloksidaz, katekol, 4-metil katekol, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), L-tirosin, p-kresol, pirogallol, kateşin ve trans-sinamik asit substratlarına karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu sekiz substratın her biri için optimum pH ve sıcaklık koşulları tespit edilmiş ve L-tirozin en uygun substratlardan biri olarak bulunmuştur. Optimum pH, sıcaklık ve  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri, sırasıyla 4.5, 30°C ve  $7.90 \times 10^{-4}$  M, 11290 U/mL olarak bulunmuştur. Sodyum azid, benzoik asit, L-sistein klorür, sodyum siyanür, salisilik asit, tiyöüre, L-askorbik asit, glutatyon, sodyum dietil ditiyokarbamat, sodyum metabisülfid ve  $\beta$ -merkaptoetanolün inhibe edici etkisi olduğu test edilmiştir. En etkili inhibitörün  $K_i = 1.79 \times 10^{-9}$  M değerine sahip sodyum dietil ditiokarbamat olduğu bulunmuştur. Bu inhibitörün yarışmalı inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur.

Ziyan ve ark. (2003), Polifenoloksidazı yerelmasından (*Helianthus tuberosus*),  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzim için katekol substratı kullanılarak optimum pH değeri kabukta 7.5 ve meyvede 8.0 olarak belirtilmiştir. Optimum sıcaklık kabuk için 25 °C ve meyve için 30 °C olarak tayin edilmiştir. Bu çalışmada 6 inhibitör test edilmiş ve kabuk ve meyve için en etkili inhibitörler, tiyöüre ve sodyum azid olarak saptanmıştır. Kabuk için  $K_m$  değeri 5.09 mM ve  $V_{max}$  değeri 363.6 U/dk.ml, meyve için  $K_m$  değeri 4.03 mM ve  $V_{max}$  değeri 714.2 U/dk.ml olduğu belirtilmiştir.

#### **1.4 Enzimler Hakkında Genel Bilgi**

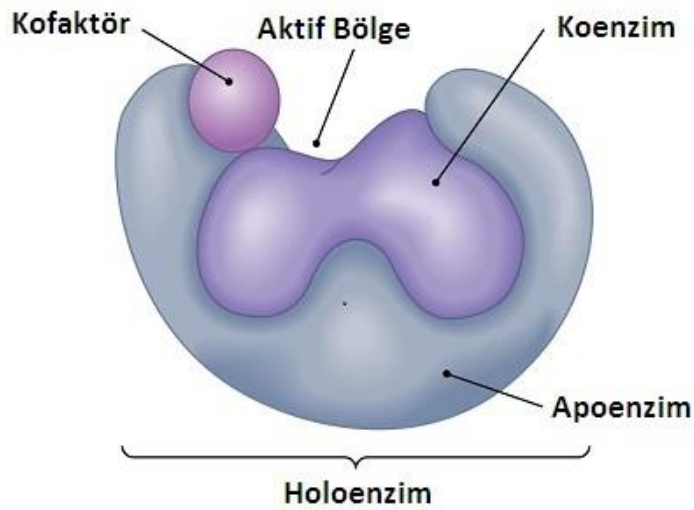
Enzimler, yüksek düzeyde spesifik ve biyolojik reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Yaklaşık 2000 farklı enzim bulunmaktadır. Her biri değişik kimyasal reaksiyonları kataliz ederler.

Enzimler, substrata bağlanarak ve bir enzim-substrat kompleksi oluşturarak kataliz aktivasyonunu azaltır. Her enzim molekülünde bir aktif bölge bulunur, substrat hidrojen bağları veya iyonik bağlar ile zayıf bir etkileşimle aktif bölgesine tutulur.



**Şekil 1.2 :** Enzim-substrat kompleks oluşumu ve ürüne dönüşmesi (Göksungur 2011)

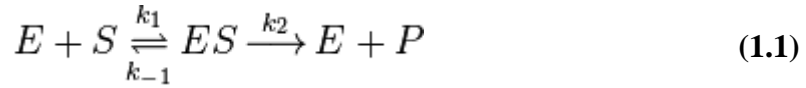
Enzimler yapı olarak iki kısımda incelenir: Basit enzimler ve bileşik enzimler. Sadece proteinden oluşan enzimlere basit enzimler denir. Sindirim enzimleri basit enzimler için örneklendirilebilir. Enzimin protein kısmı tarafından reaksiyon gerçekleşir. Bileşik enzimler iki kısımdan (protein + metal iyonlar veya organik moleküller) oluşmaktadırlar. Bileşik enzimlerin protein kısmına apoenzim ve diğer kısma koenzim veya prostetik grup denir. Enzimin etki edeceği kısmı protein belirlediği için bu enzimler birleşik görev yapmaktadırlar. Organizmalarda metal iyonları veya vitaminler eksik olduğu takdirde reaksiyon gerçekleştirilemez. Bazı koşullarda, enzimin aktivite göstermesi için metal iyonuna ihtiyacı vardır. Yani koenzim kısmında metal iyonu var ise buna 'kofaktör' denir. Koenzim kısmı bazen apoenzim kısmına sıkıca bağlanabilir bu bağlanan kısma 'Prostetik grup' denir. Apoenzim ve prostetik birleşimi için 'Holoenzim' denir.



**Şekil 1.3 :** Bileşik enzimlerin yapısı

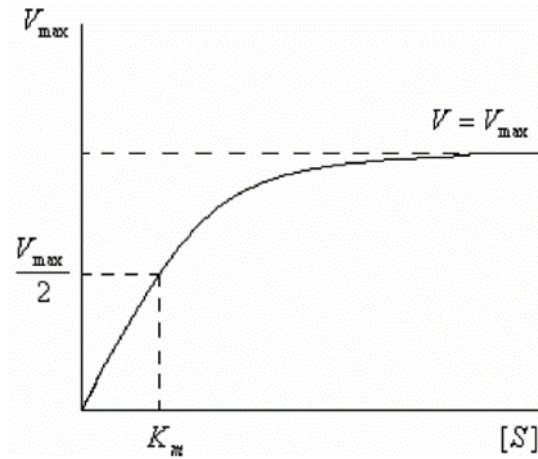
### 1.4.1 Enzim kinetiği

Enzim kataliz reaksiyonlarının mekanizması genellikle enzim-substrat reaksiyonu sistemlerde kinetik ölçümler yaparak incelenmiştir. Bu çalışmalarda, değişik substrat ve enzim konsantrasyonlarında enzim-katalizörlü reaksiyonların oranının ölçümünü içerir. Enzim katalizinde enzim substratı ile reaksiyona girip önce bir ‘Enzim-Substrat bileşiği’ oluşturur ve bu bileşik daha sonra ürün-enzime dönüşür.



Burada E enzim olarak, substrat S, enzim-substrat kompleksi ES, enzimle katalize edilen reaksiyon ürünü P, E ve S reaksiyonu  $k_1$  hızı ile ES kompleksini oluşturur,  $k_{-1}$  ters reaksiyon hızı yani ES'nin ayrışması ve E + S oluşum hızı, ES ayrışması ve E + P oluşumu  $k_2$  hızı ile oluşur.

1913 yılında enzim tepkimeleri üzerinde ilk kinetik çalışmalar Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğinde başlangıç enzim konsantrasyonu sabit alınıp tepkime hızının substrat konsantrasyonuna bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.4). Bunun çözümü ile Michaelis- Menten bağıntısı bulunur (1.2).



Şekil 1.4 : Michaelis-Menten grafiği

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

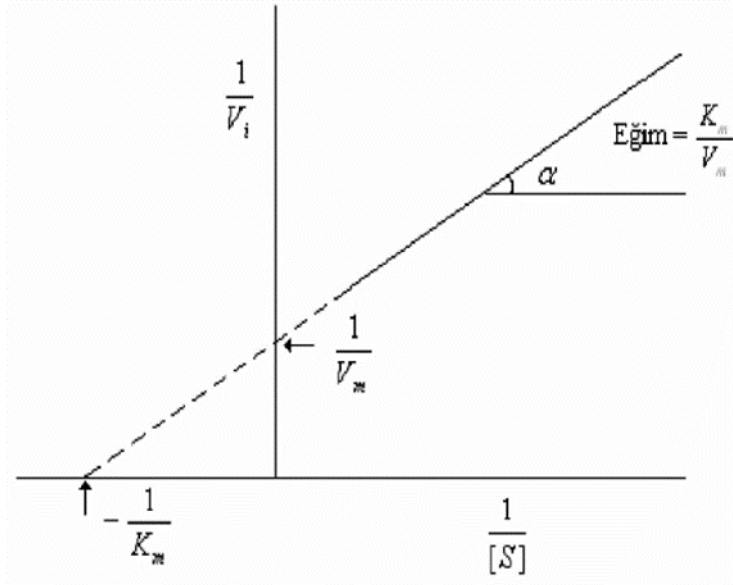
Maksimum hız olarak belirtilen ve Y eksenin kestiği noktaya  $V_{\max}$  denir.  $K_m$  sabiti (Michaelis- Menten sabiti) maksimum hızın yarısına ( $V_{\max}/2$ ) karşılık gelen substrat konsantrasyonuna denir.  $K_m$  ve  $V_{\max}$  enzim aktivitesinde önemli sabitler olarak belirlenir.

Michaelis-Menten grafiği üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda grafik doğrusaldır ve bunun nedeni substrat konsantrasyonunun düşük olmasındandır ( $[S] \ll K_m$ ). İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü kısımda substrat konsantrasyonu yüksek olduğu için  $[S] \gg K_m$  , reaksiyon hızı maksimum hıza eşit olur ( $V = V_{\max}$ ) ve tepkime hızı değişmez ve sabit bir şekilde devam eder.

Bir hiperbol grafiği olan Michaelis-Menten grafiğini, uygulamalarda kolaylık sağlayabilmesi için doğrusal bir denkleme dönüştürülmelidir. Ve doğru denkleme dönüşmesi için farklı yollardan eksen ölçekleri kullanılabilir hale getirilir. Lineweaver-Burk denklemi en çok kullanılan denklemler arasında yer alır (Lineweaver ve ark. 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.3)$$

Bu denkleme göre ordinatta  $1/V_{\max}$ , apsiste  $1/[S]$  değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise  $K_m/V_{\max}$  tır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 : Lineweaver-Burk grafiği

### 1.4.2 Enzim inhibisyonu

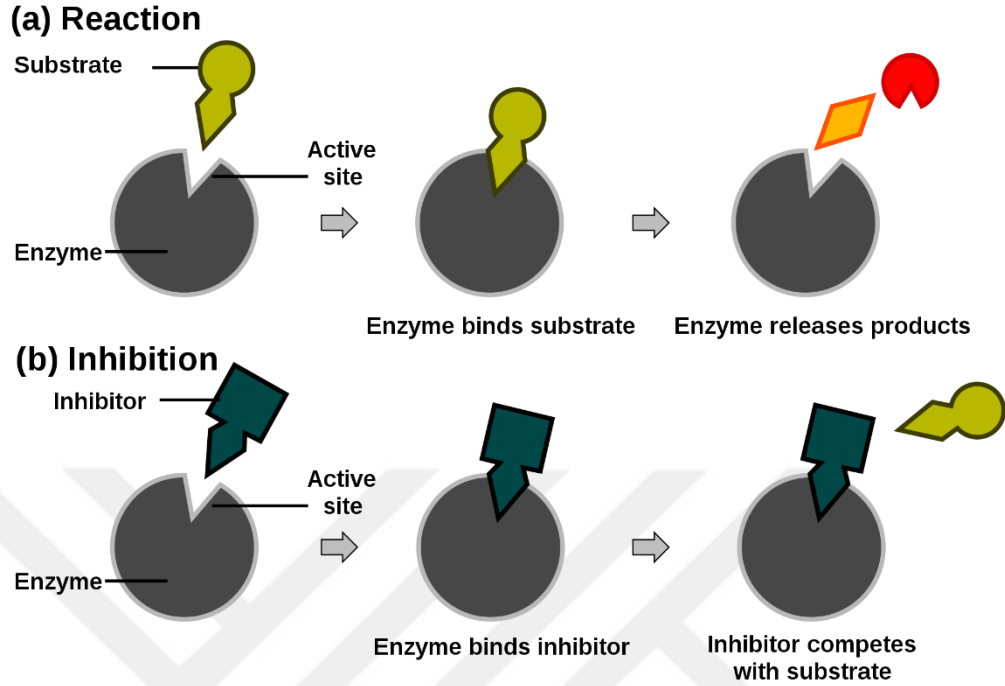
Bazı bileşikler, enzimlere bağlanır ve aktivitesini azaltır. Bu bileşikler, enzim inhibitörleri olarak bilinmektedir. Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olabilir. Ağır metaller (kurşun, kadmiyum, civa ve diğerleri) gibi geri dönüşümsüz inhibitörler, enzim ile sabit bir kompleks oluşturur ve enzim aktivitesini azaltır. Böyle bir enzim inhibisyonu (etilendiamintetraasetik asit) EDTA ve sitrat gibi şelatlama maddesi kullanılarak ters çevrilebilir. Geri dönüşümlü inhibitörler bağlanmasından sonra, enzimden daha kolay ayrılabilir. Geri dönüşümlü enzim inhibitörleri, yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibitörler olarak üç ana sınıfa ayrılır.

#### 1.4.2.1 Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

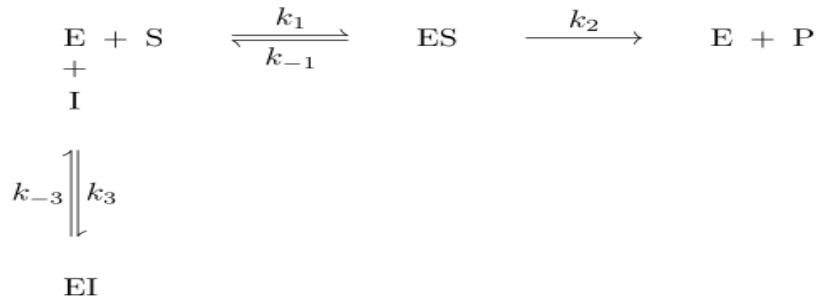
Yarışmalı inhibitörler, genellikle substrat analoglarıdır ve enzimin aktif yeri için substrat ile rekabet ederler. Yarışmalı inhibitörler, enzime geri dönüşümlü olarak bağlanır ve substratın bağlanmasını önlemektedir (Şekil 1.6). Diğer taraftan, substratın bağlanması inhibitörün bağlanmasını önler. Substrat ve inhibitör, enzim için rekabet eder. Substrat veya inhibitör enzime bağlanabilir ancak aynı anda bağlanmaları mümkün değildir. Bu inhibitörler enzime sıkı olmayan bir bağ ile bağlandıklarından dolayı, substrat konsantrasyonu yüksek olduğunda, substrat



inhibitörü bölgeden iter ve hiç inhibitör yokmuş gibi enzim reaksiyonunu katalize eder. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_m$  değeri artar.



Şekil 1.6 : Bir enzimin yarışmalı inhibitörü (Göksungur 2011)



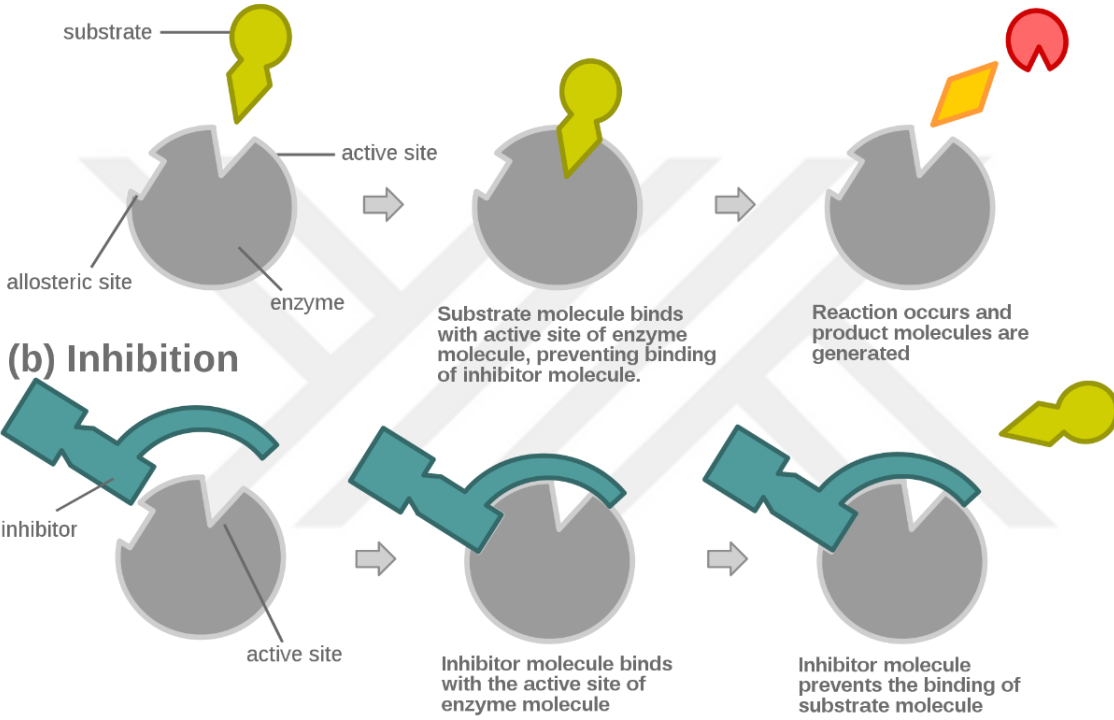
Şekil 1.7 : Yarışmalı inhibisyon şeması

#### 1.4.2.2 Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon

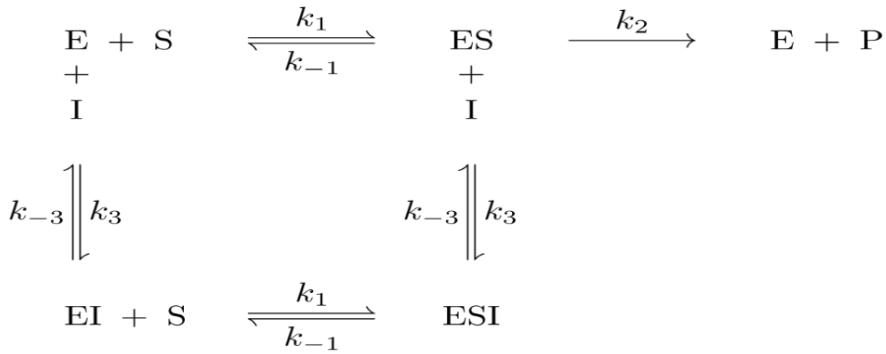
Yarışmalı olmayan inhibitör aktif bölgeden uzak olan ve aktif bölgede yapısal değişikliğe neden olan inhibitöre bağlanır. Sonuç olarak aktif bölgenin şekli değişir ve reaksiyon oluşamaz çünkü substrat enzime bağlanamaz. Bazen substrat, enzim-inhibitör kompleksine bağlanabilir ama substrat daha önce olduğu gibi doğru olarak aktif bölgeye uymuyor. Diğer bir deyişle yeteneği ya da bağlanmaya ilgisi azalır.

Yarışmalı olmayan inhibitör, substrat ile yarışmaya girmez ve substrat konsantrasyonu inhibisyon derecesi üzerinde bir etkisi yoktur. Diğer bir deyişle, yarışmalı olmayan inhibitörlerde substrat ve inhibitör arasında hiçbir rekabet yoktur, böylece substrat konsantrasyonunun artırılması enzim aktivitesinin maksimuma ulaşmasına izin vermez. Bu inhibisyon  $V_{max}$  değerinin azalması ile birlikte aktif enzim konsantrasyonunu azaltır. Substrat konsantrasyonunun inhibitor-enzim bağlanmasında hiçbir etkisi yoktur çünkü  $K_m$  değişmeden kalır.

### (a) Reaction



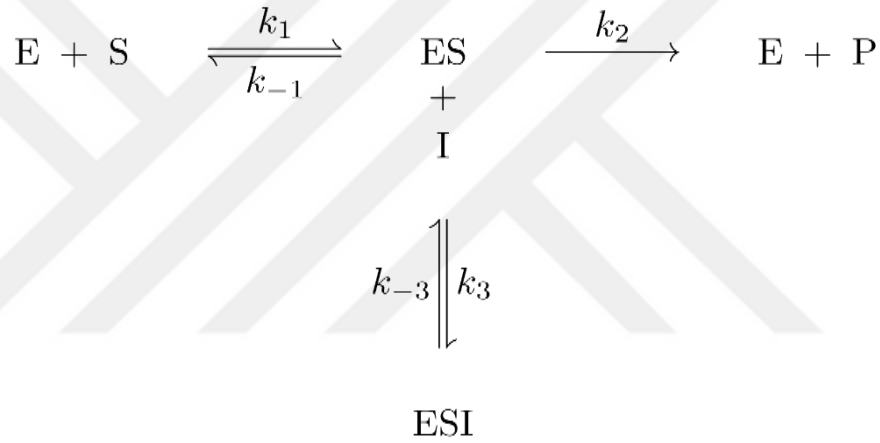
Şekil 1.8 : Bir enzimin yarışmalı olmayan inhibitörü






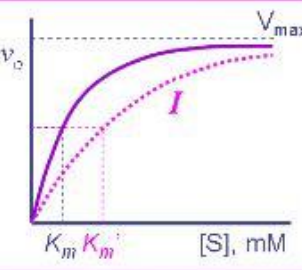
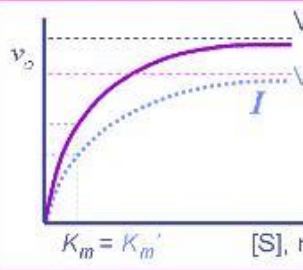
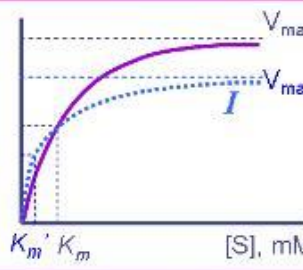
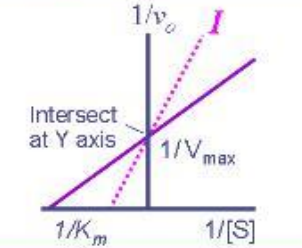
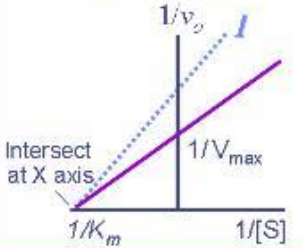
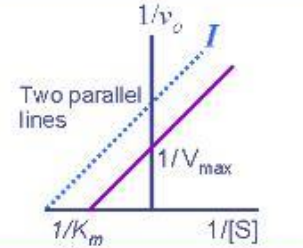
Şekil 1.9 : Yarışmalı olmayan inhibisyon şeması

### 1.4.2.3 Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Yarı yarışmalı inhibitörler, enzim-substrat kompleksine bağlanır. Yarışmalı olmayan inhibitörler ile ilgili olduğu gibi ESI kompleksi üründen oluşamaz. Ürün sadece ES kompleksinden oluşur. Yarı yarışmalı inhibitörün etkisi hem  $V_{\max}$  ve hem  $K_m$  değerini azaltır. Daha önce de belirtildiği gibi,  $K_m$  enzim için substrat afinitesinin ölçümüdür ve bir düşük  $K_m$  yüksek bir afiniteye karşılık gelir. Yarı yarışmalı inhibitörlerin olması substrat için enzim afinitesini artırır. İnhibitör ES kompleksine bağlandığından, inhibitör ES kompleksinin konsantrasyonunu azaltır. Enzim ve substrat dengesi daha fazla ES kompleks oluşumuna sebep olacaktır. Bu yüzden, enzim substrat için yüksek afinite gösterse bile, yüksek afinite yüksek  $V_{\max}$  değerine yol açmaz. Yarı yarışmalı inhibisyon nadir görülen inhibisyonlardandır.



Şekil 1.10 : Yarı yarışmalı inhibisyon şeması

	 Competitive	 Non-competitive	 Uncompetitive
Direct Plots	 <p><math>K_m</math> <math>K_m'</math> [S], mM</p>	 <p><math>K_m = K_m'</math> [S], mM</p>	 <p><math>K_m'</math> <math>K_m</math> [S], mM</p>
Double Reciprocal	<p><math>V_{max}</math> unchanged <math>K_m</math> increased</p>  <p>Intersect at Y axis <math>1/V_{max}</math> <math>1/K_m</math> <math>1/[S]</math></p>	<p><math>V_{max}</math> decreased <math>K_m</math> unchanged</p>  <p>Intersect at X axis <math>1/V_{max}</math> <math>1/K_m</math> <math>1/[S]</math></p>	<p>Both <math>V_{max}</math> &amp; <math>K_m</math> decreased</p>  <p>Two parallel lines <math>1/V_{max}</math> <math>1/K_m</math> <math>1/[S]</math></p>

Şekil 1.11 : İnhibisyon türlerin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değişimleri

## 2. MATERYAL VE METOD

Roka tohumları (Vilmorin) İstanbul Ulus semtinde bahçede yetiştirildi ve çalışmada yaprakları kullanıldı. Substrat olarak pirokateşol, kateşin, gallik asit ve inhibitör olarak sodyum sülfat ve sitrik asit, tampon çözeltisi olarak 50 mM, pH = 7.0 olan fosfat tamponu kullanıldı. Çalışmamızda terazi, blender, soğutmalı santrifüj, spektrofotometre cihazları kullanıldı. Deneylerde kullanılan ve gerekli olan araçlar ve kimyasal maddeler için İstanbul Aydın Üniversitesi laboratuvarından faydalanıldı.

### 2.1 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

- **Substrat çözeltilerin hazırlanması**

Pirokateşol : 50 mM lık çözelti hazırlamak için 0.02752 g tartıldı ve distile suda çözülerek 50 ml son hacim olacak şekilde de tamamlandı.

Kateşin : 50 mM lık çözelti hazırlamak için 0.7256 g tartıldı ve distile suda çözülerek 50 ml son hacim olacak şekilde de tamamlandı.

Gallik asit : 50 mM lık çözelti hazırlamak için 0.4703 g tartıldı ve distile suda çözülerek 50 ml son hacim olacak şekilde de tamamlandı.

Enzim aktivitesini belirlemek için 3 farklı substrat kullanıldı ve çözeltiler hazırlandıktan sonra belirli konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM ) seyreltmeler yapıldı.

- **İnhibitör çözeltisinin hazırlanması**

Sitrik asit : 0.2401 g tartılıp 25 ml 50 mM, pH=7 olan fosfat tamponunda çözüldü ve 50 mM lık çözelti hazırlandı.

İnhibitör çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli konsantrasyonlarda (1 mM, 2 mM, 5 mM) seyreltilip inhibitörün enzim aktivitesine etkisi belirlemiştir.

- **Tampon çözeltisi hazırlanması**

Öncelikle 50 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.7801 g) ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.7098 g), ayrı şekilde 100 ml distile suda çözümlenerek hazırlandı. Belirli oranlarda karıştırılan çözeltilerden pH metre ile ölçülerek pH = 7.0 ye ayarlandı.

## 2.2 Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

**Çizelge 2.1** : Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar ve Markaları

<b>Ekipmanlar</b>	<b>Markası</b>
Spektrofotometre	Optizen POP
Soğutmalı santrifüj	Bench-Top NF 400R
Blender	Waring Commercial Blender
pH metre	WTW pH3110
Su banyosu	STUART Water Bath SWBD
Terazi	AND GR200

## 2.3 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada sodyum dihidrojen fosfat (1.06345.100-Merck), di-sodyum hidrojen fosfat (1.06586.0500-Merck), sodyum sülfat (1066490500-Merck), sitrik asit (20200071-A&D kimya), gallik asit (27645.250G-R-Sigma), kateşin (C-1251-5G-Sigma), pirokateşol (C9510-100G-Sigma), folin-ciocelteau's fenol (1.09001.0500-Merck), sodyum karbonat (1.06392.1000-Merck), sodyum hidroksid (06203-Sigma), civa klorür (M1136-100G-Sigma), demir klorür (1.03943.0250-Merck), potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (1.08087.1000-Merck), potasyum klorat (3811-04-9-Merck), magnezyum nitrat (1.05853.0500-Merck), çinko asetat (493807-Carlo erba), bakır sülfat (12849-Sigma) kimyasalları kullanıldı.

## 2.4 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Rokalar iyice yıkandıktan sonra kurutulup 5 gram tartılıp ve 40 ml fosfat tamponu (pH=7) ile blenderda homojenizat haline getirildi. Elde edilen homojenizat filtre kağıdından süzöldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak 4000 rpm de, +4 °C sıcaklıkta, 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüm deneyler santrifüj sonrası elde edilen üst fazda gerçekleştirildi.

## 2.5 Polifenoloksidaz Enziminin Aktivite Tayini

Bir mikromol substratı optimal şartlarda bir dakikada ürüne çeviren enzim miktarına enzim aktivitesi denir. Bu çalışmada önceden hazırlanmış 50 mM fosfat tamponu (pH=7.0) ile farklı konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM) substrat çözeltileri hazırlandı. Aktivite ölçümü için 1.9 ml alınan substratlara (pirokateşol, kateşin, gallik asit) 0.1 ml ekstreden ilave edilerek dakikadaki absorbans değişimi spektrofotometrede 420 nm de, 10 dk boyunca okundu. Daha sonra Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek enzim aktivitesi tayin edildi. Çalışmamızda Gawlik-Dziki (2007) metodu modifiye edilerek kullanıldı.

## 2.6 Enzim Kinetiği

Michealis sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerlerini belirlemek için ölçümler yapıldıktan sonra  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunduktan sonra grafikleri çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  Lineweaver-Burk grafikleriyle çizilip ve hesaplandı.

## 2.7 PFO Enziminin İnhibitör İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

Bu çalışmada inhibitör için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 50 mM'lık pirokateşol substrat çözeltilisi 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM konsantrasyonlarında seyreltildi. İnhibitör çözeltilisi 1 mM, 2 mM, 5 mM konsantrasyonlarındaki sitrik asit ile çalışıldı. İnhibisyon testlerinde sırasıyla 1.9 ml + 0.1 ml inhibitör + 0.1 ml ekstreden alınıp 420 nm' de 10 dakika boyunca absorbanslar okundu. Aynı koşullar altında inhibitörsüz ortamda pirokateşol substratının  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri de belirlendi. Meydana gelen absorbans değişimlerinden Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bu grafikden hesaplandı.

## 2.8 Enzim Aktivitesi Üzerinde pH Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi, farklı pH değerlerinde fosfat tamponu kullanılarak araştırılmıştır. Enzimin optimum pH'ı pH = 4.0 ile pH = 10.0 arasında değişen farklı pH tamponları kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı.

Enzim üzerinde pH etkisini belirlemek için, 1.9 ml değişik pH değerlerinde (pH=4.0, pH=5.0, pH=6.0, pH=7.0, pH=8.0, pH=9.0, pH=10.0) hazırlanan pirokateşol substrat çözeltisinden ve 0.1 ml enzim ekstresinden alınıp 420 nm' de absorbanslar okundu ve yapılan ölçüm sonucunda % aktivitesi hesaplandı ve yüzde aktivite grafiği çizildi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri optimum pH olarak tayin edilmiş ve yapılan deneyler bu pH'da yapılmıştır.

## 2.9 Enzim Aktivitesi Üzerinde Uygun Sıcaklığın Bulunması

Polifenoloksidaz enzimi üzerinde sıcaklık etkisi, 20 ile 70°C arasında farklı sıcaklıklarda, incelenmiştir.

Sıcaklık etkisi, 0.1 ml enzim ekstraktını farklı sıcaklıklarda (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70 °C) 45 dakika boyunca inkübe ederek ve 1.9 ml pirokateşol varlığında 420 nm' de absorbansları alındı. Yüzde enzim aktiviteleri grafik üzerinde gösterildi. Enzim aktivitesinin maksimum görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak tespit edildi.

## 2.10 Enzim Aktivitesi Üzerinde Metal İyonların Etkisi

Çalışmamızda enzim aktivitesi üzerinde 6 farklı metal iyonu ile 5 mM konsantrasyonunda çalışıldı ve absorbans değişimi spektrofotometre de okundu.

Polifenoloksidaz fonksiyonu üzerinde metal iyonlarının etkisini incelemek üzere, 1.8 ml pirokateşol substrat + 0.1 ml metal iyonu ( $K^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) + 0.1 ml enzim ekstraktı 420 nm' de okundu ve % aktivitesi hesaplandı. Aktivite değişimleri grafik üzerinde gösterildi.

## 2.11 Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Protein tayini, Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum



albumini çözeltileri kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Aşağıda belirlenen ayıraçlar hazırlandı:

1. A ayıracı: % 2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi (0.1 N NaOH deki çözelti)
2. B ayıracı: % 0.5  $\text{CuSO}_4$  (%1 dipotasyum tartarattaki çözeltisi)
3. Seyreltik Folin ayıracı: Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.
4. C ayıracı (Alkali bakır çözeltisi): 50 ml A ayıracına 1 ml B ayıracı ilave edildi.

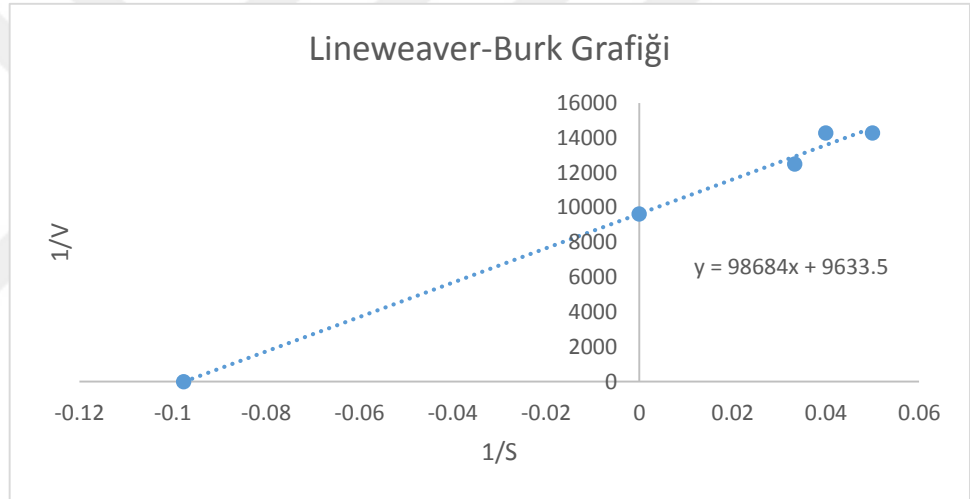
0.5 ml bitki ekstraktı alınıp, 2.5 ml C ayıracı ile karıştırılıp 10 dakika bekletildi. 0.25 ml seyreltik Folin ayıracı eklenip 30 dakika inkübe edildi. 750 nm'de köre karşı absorbans değerleri kaydedildi.



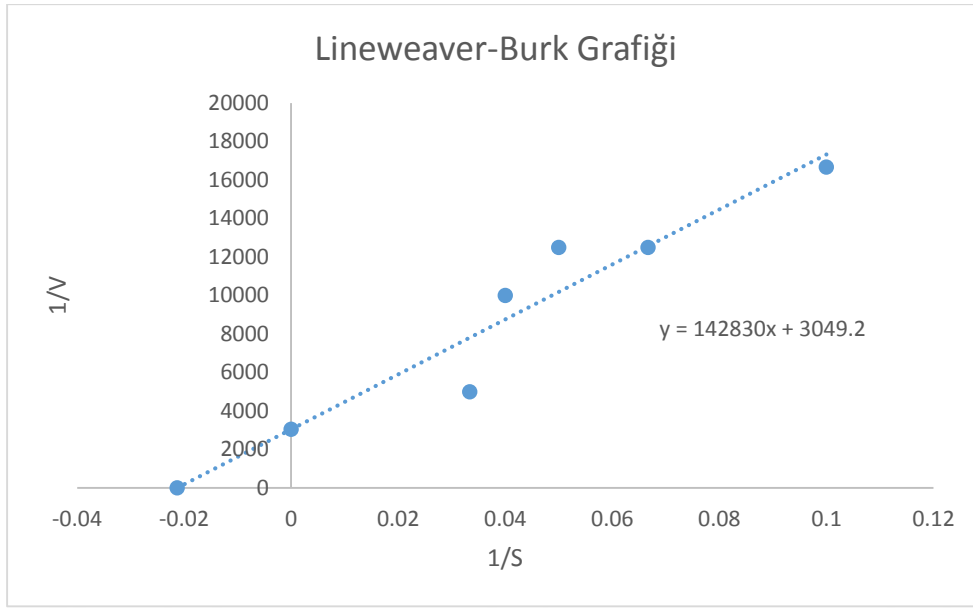
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzim Aktivitesi Tayini

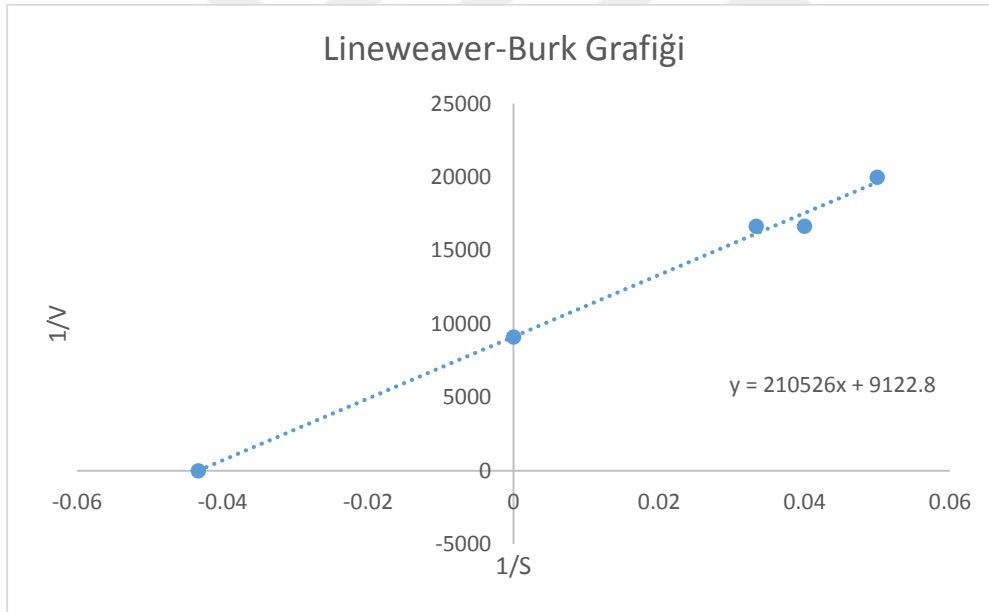
$K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için; pirokateşol, kateşin, gallik asit substratlarının enzim aktivitesinin değerleri farklı konsantrasyonlarda 420 nm' de spektrofotometrede tayin edildi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulundu ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu.



**Şekil 3.1** : Roka'da PFO enzimi için pirokateşol substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 3.2 :** Roka'da PFO enzimi için kateşin substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 3.3 :** Roka'da PFO enzimi için gallik asit substratı kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 3.1 : Roka'da PFO Enzimi İçin Km ve Vmax Değerleri**

Numune	Substrat	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (U/dk)
Roka	Pirokateşol	10.2438	0.00010
	Galik asit	23.0769	0.00011
	Kateşin	46.8414	0.00032

Maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten sabiti olarak (K<sub>m</sub>) adlandırılır. Bu değer, enzim ve substrat arasındaki ilişkiyi gösterir. K<sub>m</sub> değeri ne kadar küçük olursa enzimin substrata ilgisi o kadar yüksek olur. Bu çalışmada enzimin pirokateşol substratına ilgisinin diğer iki substrattan daha yüksek olduğu bulundu.

Çizelge 3.2 de farklı kaynaklardan elde edilen PFO'nun K<sub>m</sub> değerleri bulunmaktadır.

**Çizelge 3.2 : Çeşitli Ürünlerin PFO'larının Km Değerleri**

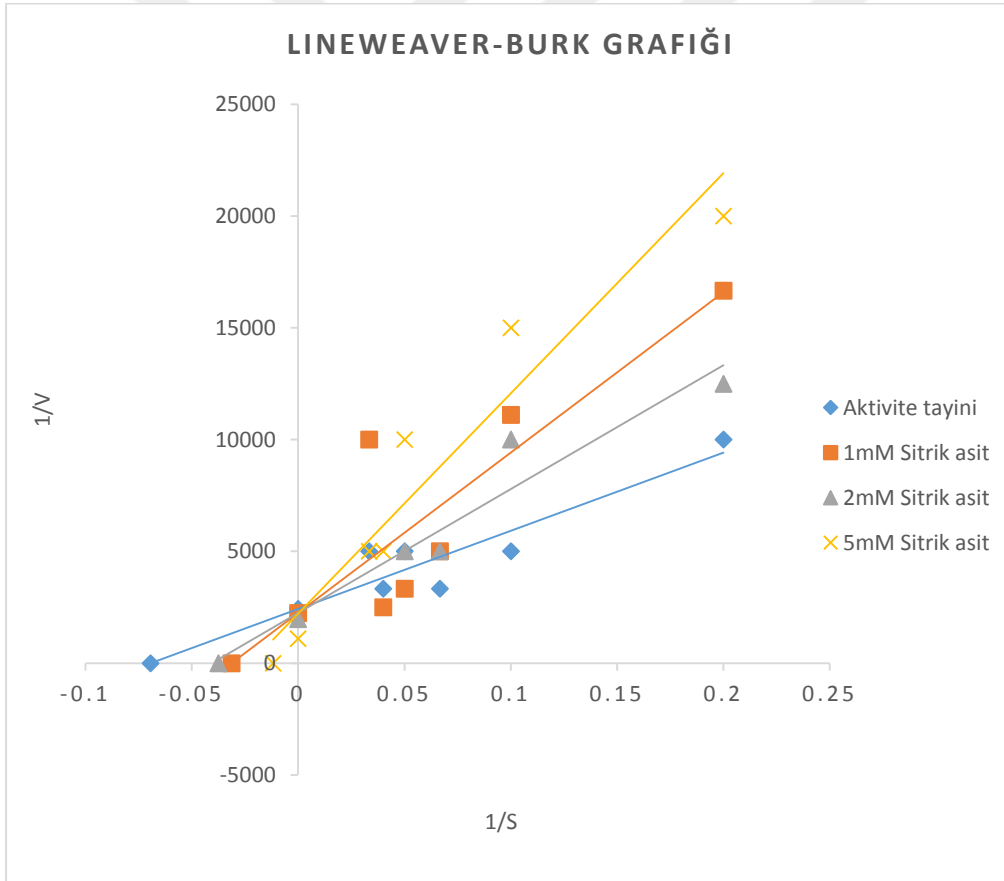
Ürün	Substrat	Km (mM)	Kaynak
Manyok kökleri	kateşol	28.21	Barthet, 1997
Hint çay yaprağı	kateşol	12.52	Halder ve ark, 1998
Zambak	kateşol	3.40	Yang ve Wang, 2008
Fasulye sürgünleri	kateşol	71.00	Nagai ve Suzuki, 2003
Enginar başı	kateşol	10.20	Aydemir, 2004
Anamur muzusu	kateşol	8.50	Ünal, 2007
Jonagored elması	kateşol	230.00	Rocha ve Morais, 2001

### 3.2 İnhibitör Etkisi

İnhibitörler tepkime hızını azaltıp veya engelleyen maddelerdir. İnhibitör, bir molekül yada iyon olabilir. Enzimin katalizlenmesini engelleyen olaya ise inhibisyon denir. İnhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için sitrik asit inhibitörü kullanıldı. Bu çalışmada 6 farklı pirokateşol substrat konsantrasyonu (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM) ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu (1 mM, 2 mM, 5 mM) hazırlandı. PFO enzim aktiviteleri belirlenerek inhibisyon türü bulundu.

#### 3.2.1 PFO enziminin inhibitör için enzim kinetiği

PFO enzimi için sitrik asit inhibitörü test edildi ve inhibitör için enzim kinetiği çıkarıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : Roka'da PFO enzimi aktivitesi üzerine sitrik asidin inhibisyon etkisi

**Çizelge 3.3** : Roka’da PFO Enziminin Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Pirokateşol Substratı İçin  $K_m$ ,  $V_{max}$  Değerleri ve İnhibisyon Türü

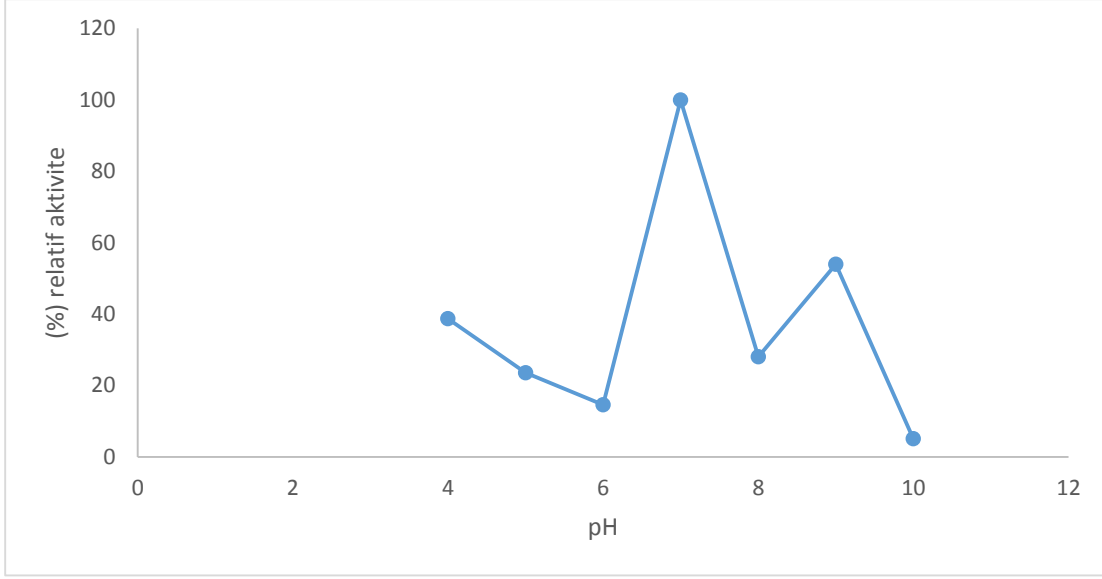
İnhibitör		$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/dk)	İnhibisyon Türü
	Aktivite Tayini	14.4089	0.00041	
	1mM	31.8996	0.00044	
Sitrik asit	2mM	23.1405	0.00042	Yarışmalı inhibisyon
	5mM	44.0011	0.00044	

Bu çalışmada ilk önce inhibitörsüz ortamda, optimum koşullarda altı farklı pirokateşol substrat konsantrasyonunu kullanarak aktiviteleri bulundu ve daha sonra inhibitör için 3 değişik konsantrasyonunda optimum koşullarda pirokateşol substratı kullanılarak aktivite tayin edildi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerlerinden Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.4). Elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden inhibisyon türü tayin edildi (Çizelge 3.3).

### 3.3 pH Etkisi

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir pH veya pH aralığı vardır. Bu optimum pH'nın altında ve üzerinde aktiviteleri düşer. Enzimler kuvvetli asit ve bazlara fazla dayanıklı değildirler. Ortam pH'sındaki aşırı olmayan değişiklikler enzimin ve çoğu kez de substratın iyonik durumunda değişikliklere neden olur. Enzimler aşırı pH değerlerinde aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların yapılarında değişimler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar (Koolman ve ark. 2005).

Bu çalışmada enzim aktivitesi ölçülüp ve sonuçlar % relatif aktivite olarak (Şekil 3.5) de gösterilmiştir. Aşağıda da gördüğümüz gibi pH değeri 4.0'ten 6.0'ye doğru azaldıkça aktivite de azalmış ve en yüksek aktivite 7.0'de gözlenmiştir. Optimum pH'dan sonra aktivitede düşme görülmüştür.



**Şekil 3.5 :** pH'nın Roka'da PFO aktivitesine etkisi

PFO ile farklı ürünlerde yapılan optimum pH çalışma sonuçları (Çizelge 3.4)'de verilmiştir. PFO'nun farklı ürünlerden elde edilen optimum pH değerleri pH = 3 ile pH = 7.5 aralığındadır ve bu çalışmada elde edilen sonuç (pH = 7.0) görülen değerlerle uyum içindedir (Yabaci 2008).



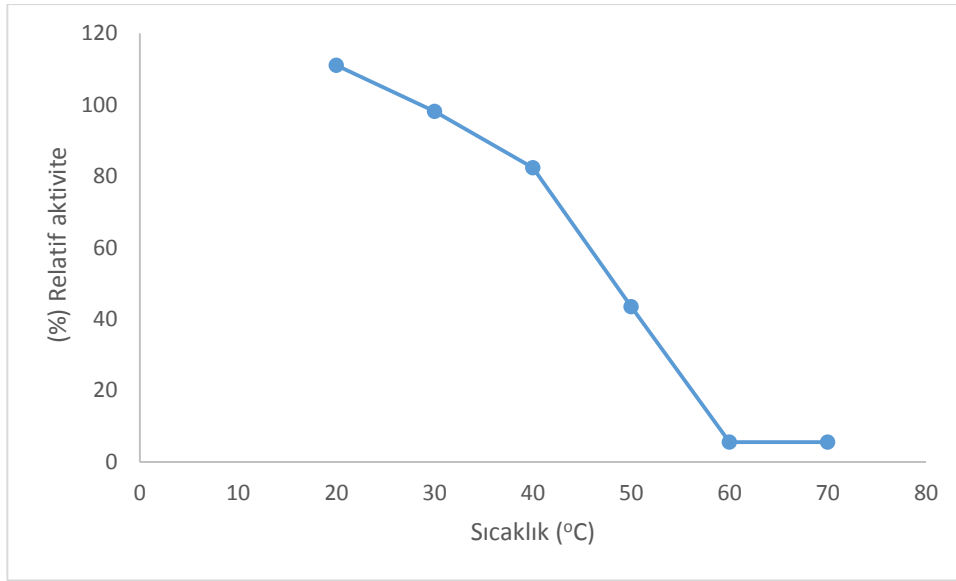
**Çizelge 3.4 :** Farklı Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri

Optimum pH	Ürün	Substrat	Referans
7.5	Cassava kökleri	kateşol, L-DOPA	Barthet, 1997
7.0	Muşmula	4-metil kateşol	Ayaz ve ark, 2008
5.0 -7.5*	Jonagored elması	kateşol	Rocha ve Morais, 2001
5.0	Hint çay yaprağı	kateşol	Halder ve ark, 1998
4.0 – 7.0*	Zambak	kateşol	Yang ve Wang, 2008
9.0	Fasulye sürgünleri	kateşol	Nagai ve Suzuki, 2003
7.0	Patlıcan	kateşol	Doğan ve ark, 2002
7.0	Anamur muzı	kateşol	Ünal, 2007
3.0	Napolyon üzümü	4-tert-butil kateşol	Delicado ve ark, 2007

\* Enzimin iki optimum pH'sı bulunmuştur.

### 3.4 Sıcaklık Etkisi

Kimyasal reaksiyonların hızı genellikle sıcaklıktaki artışla artar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları da sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler. Yüksek sıcaklıklar enzimatik reaksiyonda rol oynayan fonksiyonel grupların disosiyasyonunu etkileyebilir; enzimin aktivatörlere ve inhibitörlere ilgisini etkileyebilir; reaksiyonda substrat olabilecek oksijeninin çözünürlüğünü etkileyebilir. Bunların dışında, yüksek sıcaklık enzimleri inaktive edebilir. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum aktivitesi 20-40 °C'dir ve 45 °C'nin üzerinde denatürasyon başlar. Bu çalışmada enzim aktivitesi ölçülüp ve sonuçlar % relatif aktivite olarak (Şekil 3.6)'de verilmiştir.



**Şekil 3.6 :** Roka'da PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

PFO üzerinde sıcaklığın etkisi: 20 °C – 70 °C arasında her defasında 10 °C arttırılarak incelendi. Buna göre en yüksek aktivitenin 20 °C sıcaklığında olduğu bulundu. Sıcaklığın artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı.

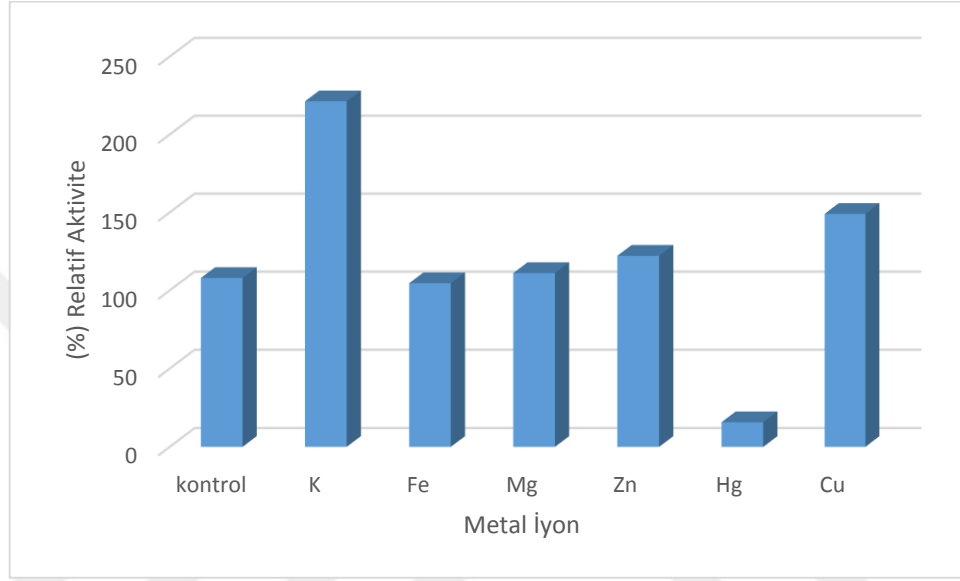
Optimum sıcaklık sonuçları farklı ürünlerden elde edilen PFO ile (Çizelge 3.5)'de verilmiştir. Optimum sıcaklık değerleri 12-45 °C arasında gözükmemektedir ve bu değerler çalışmamızda elde edilen sonuç (20° C) ile uyum içindedir. (Yabaci 2008)

**Çizelge 3.5 :** Farklı Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum Sıcaklık Değerleri

Optimum sıcaklık (°C)	Ürün	Referans
30-40 (iki izoenzim arasında)	Manyok kökleri	Barthet, 1997
30	Muşmula	Ayaz ve ark, 2008
40	Fasulye sürgünleri	Nagai ve Suzuki, 2003
25	Enginar	Aydemir, 2004
45	Dut	Arslan ve ark, 2004
30	Anamur muzu	Ünal, 2007
12	Çakşır bitkisi	Erat ve ark, 2006

### 3.5 Metal İyonların Etkisi

Enzimatik reaksiyonlarda bazı enzimler protein olmayan kofaktör ile bağlanır. Kofaktörler arasında çok sık rastlanan metal iyonları ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  gibi) yer alır. Metal iyonları substrat bağlanmasını ve katalizi kolaylaştırır. Enzim aktivitesi bu çalışmada 6 farklı metal iyon kullanılarak ölçülmüştür ve sonuçlar % relatif aktivite olarak (Şekil 3.7)'de gözlenmiştir.

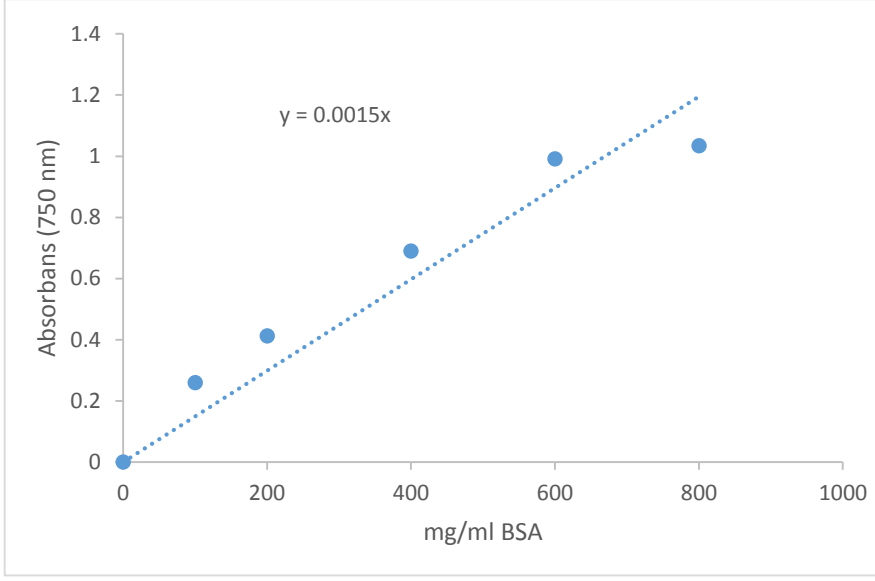


Şekil 3.7 : Metal iyonların roka'da PFO aktivitesine etkisi

Şekilde' de görüldüğü gibi  $Fe^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  varlığı enzim aktivitesini azaltmış ancak,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^{+}$  iyonları ise enzim aktivitesi üzerinde artışa neden olmuşlardır. Bu iyonlardan  $K^{+}$  iyonu PFO aktivitesi üzerinde en yüksek aktivasyon özelliğine sahip olduğu saptandı.

### 3.6 Protein Miktar Tayini

Sığır serum albumin çözeltisi 6 farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg) ve bölüm 2.11 de açıklandığı gibi Lowry deneyi uygulanarak standart grafiği çizildi. Protein miktarı elde edilen standart grafiğe göre 488 mg/ml belirlendi (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8 :** Lowry yöntemine göre protein standart grafiği

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada roka yapraklarından izole edilerek PFO'nun kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, substrat spesifikliğı, inhibitör etkisi, inhibisyon türü, optimum pH ve optimum sıcaklık, metal iyonların etkisi ve protein miktarı incelenmiştir.

Elde edilen bulgulardan;

- Denenen substratlar arasında enzimin en yüksek ilgisinin pirokateşol olduğı ( $K_m= 10.2438$  mM) bulundu. Yabacı (2008), çay PFO'su için en çok 4-metil kateşol ( $K_m= 10.30$  mM) için ilgi gösterdiğini ve kafeik asit ve gallik asit substratlarına ilgi göstermediğini belirtmiştir.
- Farklı inhibitör deneylerinde enzim aktivitesi belirlenerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon türü her iki inhibitör (sodyum sülfat ve sitrik asit) için yarışmalı inhibisyon olarak bulundu. Gülçin ve ark (2005), ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) PFO'su için inhibe edici etkisi olan birkaç inhibitör, L-sistein klorür, sodyum azid, sodyum siyanür, benzoik asit,  $\beta$  - merkaptoetanol, salisilik asit, sodyum dietil ditiyokarbamat, L-askorbik asit, glutasyon, tiyöüre ve sodyum metabisülfid test edildi. En etkili inhibitör bir yarışmalı inhibitör olarak sodyum dietil ditiokarbamat olduğı bulundu. Muşmula çalışmasında sodyum azid, sodyum metabisülfid, askorbik asit ve tiyöüre gibi inhibitörler kullanılmış ve farklı olgunluk dönemlerinde en etkili inhibitörün sodyum metabisülfid olduğı belirtilmiştir (Ayaz 2008). Farklı araştırmalara baktığımızda, Ünal (2007), inhibitör etkisini muz PFO aktivitesi üzerinde çalışmış ve NaCl, sitrik asit, askorbik asit inhibitörü ve sodyum metabisülfid inhibitörlerin arasında en etkili inhibitör askorbik asit ve sodyum metabisülfid olarak bulundu. Farklı bir çalışmada da brokoli üzerinde askorbik asit, sitrik asit ve sodyum sülfatin yarışmasız inhibisyona ve EDTA inhibitörün yarı yarışmalı inhibisyona sebep olduğı belirtilmiştir (Gawlik-Dziki 2007).

- Enzim aktivitesinin pH değeri 4.0 ve 6.0 arasında azalmış ve optimum enzim aktivitesi 7.0'de görülmüştür. PFO aktivitesi pH 7.0'den sonra düşmüştür. Zhao-Jian Gao ve ark (2009), kırmızı pazıda PFO enzimi için optimum pH değerini 7.0 olarak bulmuşlardır. Farklı meyve ve sebzelerin çalışmalarında PFO enziminin en yüksek pH değerleri 3-7.5 gibi değişik bir aralıkta bulunmuştur (Yabaci 2008).
- Optimum sıcaklık enzim aktivitesi için 20 °C'de tayin edildi. Sıcaklığın artması ile birlikte 20°C'den sonra enzimin aktivitesinde düşme belirtildi. Yabaci (2008) çay da optimum sıcaklığın 30 °C'de olduğu, 30 °C'den sonraki sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesinin düştüğünü belirtmiştir. Farklı meyve ve sebzelerle yapılan çalışmalarda en yüksek sıcaklık değerleri PFO enzimi için 12-45 °C aralığında bulunmaktadır (Yabaci 2008).
- Çalışmamızda denenen metal iyonları arasında en yüksek enzim aktivitesi K<sup>+</sup> varlığında bulundu. Ancak Fe<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup> varlığı enzim aktivitesinde pozitif bir etkisi olmadığı belirtildi. Zhao-Jian Gao ve ark (2009), kırmızı pazıda K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> PFO aktivitesi üzerinde artışa neden olduğunu ancak Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> enzim aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi olduğunu belirtmişlerdir.
- Protein tayini çalışmamızda Lowry yöntemi kullanılarak çizilen standart eğriden protein miktarı 488 mg/ml olarak bulundu. Kocatürk (2008), enginar çalışmasında ham ekstreden Lowry yöntemi ile bovin serum albumini standart olarak kullandığında 1650 mg/ml bulmuştur. Dedeoğlu (2009) farklı çalışmada mantar'da protein miktarını 1.38 mg/ml olarak bulmuştur. Araştırmalara göre protein miktarı geniş bir aralıkta değişebilmektedir.

Enzimler doğanın katalizörleri olduğundan enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Çalışmamızda incelediğimiz PFO enziminin, sentez reaksiyonlarında, tıpta, atık suların temizlenmesi ve biyosensör tasarımı gibi birçok alanda kullanılıyor olması, bunun yanında PFO enziminin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonlarının, gıdalarda görüntü, lezzet ve besinsel değerlerinin kaybına sebep olarak ciddi anlamda ekonomik kayıplara yol açması, bu enzim üzerinde yapılacak olan çalışmaların önemini artırmaktadır. Enzimatik esmerleşmenin derecesi aktif PFO konsantrasyonuna, fenolik bileşiklere, oksijen

varlığına, pH'ya ve dokuların sıcaklığı gibi şartlara bağlıdır. Günümüzde PFO enzimini inaktive etmek amacıyla kimyasal inhibitör kullanımı ve ısıl işlem uygulamaları gibi ticari yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemler gıdalarda bazı istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Bu yüzden gıdalarda istenmeyen kararma reaksiyonlarının önlenmesi noktasında PFO enzimlerinin incelenmesi, yapı ve mekanizmalarının aydınlatılması, PFO enzim inhibisyonuna olan etkisini belirlemek günümüzde bir ihtiyaç olmuştur. Bu çalışma, roka bitkisinde optimum koşullarının belirlenmesiyle birlikte PPO enzim aktivitesini kontrol ederek, inhibitör olarak kimyasalların kullanımıyla gıdalarda görüntü, lezzet ve besin değeri kayıplarının önüne geçilmesi yolunda bir adım oluşturmaktadır. Bu sayede kullanılan inhibitör ve uygulanan yüksek sıcaklığın gıdaların kalite özellikleri üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kaldırılarak, ekonomik kayıpların önüne geçebileceği, bunun da üreticiye ve tüketiciye, hatta pazarlamacıya, ihracat açısından bir fayda sağlayacağı kanaatindeyiz.





## KAYNAKLAR

- Altunkaya, A. ve Gökmen, V.** (2011). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from durum wheat (*Triticum durum* L.), *Journal of Cereal Science*, 55, 300-304.
- Amiour, D. S. ve Hambaba, L.** (2015). Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates, *Postharvest Biology and Technology*, 111, 77-82.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. ve Özensoy, O.** (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenoloxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties, *Food Chemistry*, 88, 479-484.
- Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. ve Colak, A.** (2008). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening, *Food Chemistry*, 106, 291-298.
- Aydemir, T.** (2004). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, *Food Chemistry*, 87, 59-67.
- Barthet, V. J.** (1997). Polyphenol Oxidases from cassava (*Manihot Esculenta* C.) root: extraction, purification and characterization, Submitted to Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGiU (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- Birdal, C.** (2011). Bazi meyve ve sebzelerdeki polifenoloksidaz enzim aktivitesi üzerine ultrason ve ultraviyole ışınlarının inhibisyon etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Burckhardt, R.** (1978). Verlust des fruchtigenen wohlgeschmackes bei verarbeiteten lebensmittein pflanzlicher Herkunft, der im Zusammenhang mit der Spaltung von Hydroxyzimtsaurcesteren (Depside) steht, *Disch. Lebensm. Rdsch*, 74, 205.
- Chun, J. H., Kim, S., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Chung, D. Y. And Kim, S. J.** (2015). Combined effect of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on the contents of glucosinolates in rocket salad (*Eruca sativa* Mill.), *Saudi Journal of Biological Sciences*, 99, 305-764.
- Czerkaskij, A.** (1970). Pink discoloration in canned Williams Bon Chretien pears, *Journal of Food Science*, 35, 608-611.
- Czerk Matheis, G. and Belitz. H. D.** (1997). Untersuchungen zur enzymatischen bräunung bei kartofflein (*Solanum tuberosum*) I. phenoloxidasen und phenolische inhaltsstoffe verschiedener Sorten, *Z. Lebens. Unters. Forsch*, 163(3), 186-92.

- Dedeoğlu, N.** (2009). Yenilebilen mantar türlerinden polifenoloksidazin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Balıkesir.
- Delicado, E. N., Megias, M. S., Lopez, A. J. P., Nicolas, J. M. L.** (2007). Characterization of polyphenoloxidase from Napoleon grape, *Food Chemistry*, 100, 108–114.
- Doğan, M., Arslan, O. ve Doğan, S.** (2002). Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenoloxidase from different aubergine, *Cultivars International Journal of Food Science and Technology*, 37, 415- 423.
- Erat, M., şakiroğlu, H. ve Kufrevioğlu, O. I.** (2006). Purification and characterization of polyphenoloxidase from *Ferula* sp, *Food Chemistry*, 95, 503–508.
- Erdss, T. and Fodor, L.** (1976). Removal of phenolic substances from wine, *Kerteszeti Egyetem Kozl*, 40, 283.
- Espin, J. C., Garcia, P. G., Tudela, J., and Canovas, F.G.** (1988). Study of stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2469-2473.
- Espin, J. C., Garcia, P. G., Varon, J. R., and Canovas, F. G.** (1988). Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2968-2975.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U. ve Swieca, M.** (2007). Characterization of polyphenoloxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata* L.), *Food Chemistry*, 107, 129-135.
- Göksungur, Y.** (2011). Reaction and fermentation kinetics in food engineering, Ege University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 50-92.
- Gómez-López, V. M.** (2002). Inhibition of surface browning, cut avocado, *Journal of Food Quality*, 369-379.
- Gul'ko, A. Y. and Khaziyev, F. K.** (1993). Soil polyphenoloxidases; their production, immobilization and activity, *Eurasian Soil Science*, 25(4), 101-113.
- Gülçin, İ., Kfrevioğlu, . İ. ve Oktay, M.** (2005). Purification and characterization of polyphenoloxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3), 297-302.
- Halder, J., Tamuli, P. ve Bhaduri, A. N.** (1998). Isolation and characterization of polyphenoloxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*), *Nutritional Biochemistry*, 9, 75-80.
- Hanefald, M. and Herrmann. K.** (1976). Über das Vorkommen von Proanthocyanidinen, Leukoanthocyaniden and Catechinen in Gemse, *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 161, 243-248.
- Herrmann, K.** (1973). Über die phenolischen inhaltsstoffe des obstes. *Erwerbsastbau*, 16, 193-200.
- Hughes, A. ve Swain, T.** (1962). Economic importance of flavonoid compounds. *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon Press, 513.
- Jen, J. J., and Kahler K. R.** (1974). Characterization of polyphenoloxidase in peaches grown in the Southcast, *Hort Science*, 9, 590-591.

- Kocatürk, S.** (2008). Enginar polifenoloksidazın alginate ve karragenan jellerde immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Koolman, J. ve Roehm, K. H.** (2005). Color Atlas of Biochemistry, 2nd Edition Thieme, Stuttgart, 88-94.
- Laurila, E., Kervinen R., Ahvenainen, R.** (1988). The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. Postharvest News and Information, 9(4), 53-66.
- Lineweaver, H., Burk, D.** (1934). The determination of enzyme dissociation constant. Journal of American Chemical Society, 56(3), 658-666.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
- Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C.** (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Martin, W. and Ruberte. R.** (1976). The polyphenol of Dioscorea alata (yam) tubers associated with oxidative browning, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24(1), 67-70.
- Matheis, G. and Belitz, H. D.** (1977). Studies on enzymatic browning of potatoes 170 (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1, 14, 18, 1) monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase, Z. Lebensm. Unters. Forsch, 163(3), 191-5.
- Mathewson, P. R.** (2000). Enzymes, Eagen Press Handbook Series, 37-38.
- Mayer, A. M. and Harel, E.** (1979). Polyphenoloxidases in plants, Phytochemistry, 18 193- 215.
- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, and N. A., Klenitskaya, I. A.** (1992). Immobilization of polyphenoloxidase by soil humus, Eurasion Science, 5, 60-65.
- Nagai, T. ve Suzuki, N.** (2003). Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.), Journal of Food Science 1(68), 16-20.
- Negoro, H.** (1972). Effect of polyphenolic compounds on pectinase action, Eiyō To Shokuryō, 25, 1.
- Pekyardımcı, Ş.** (1992). Polifenoloksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları, Gıda, 17(3), 181-186.
- Rocha, A. M. C. N. ve Morais, A. M. B.** (2001). Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) Extracted from "Jonagored" Apple, Food Control, 12, 85-90.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog. J. M.** (1989). Immobilization of enzymes on clays and soils, Soil Biology and Biochemistry, 21(2), 223-230.
- Sato, M.** (1962). The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid, Phytochemistry, 8, 353-362.
- Sondheimer. E.** (1964) Chlorogenic acids and related depsides, Botanical Review, 30, 667-712.
- Spille, G. A.** (1997). Caffeine, tea: the plant and its manufacture, chemistry and consumption of the beverage, CRC Press, Chapter 3, 1-38.

- Şakiroğlu, H.** (1994). Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenoloksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi.
- Ünal, M. Ü.** (2007). Properties of polyphenoloxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*), Food Chemistry, 100(3), 909-913.
- Ünal, M. Ü. ve Şener, A.** (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenoloxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir), Journal of the Science of Food and Agriculture, 86, 2374-2379.
- Vamos-Vigyazo, L.** (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 15(1), 49-127.
- Vaughn, K. C., Lax, A. R. and Duke, S. O.** (1984). Polyphenoloxidase: The chloroplast enzyme with no established function, Physiologia Plantarum, 72, 659-665.
- Villatoro-Pulido, M., Font, R., Saha, S., Obregon-Cano, S., Anter, J., Munoz-Serrano, A., De Haro-Bailon, A., Alonso-Moraga, A. and Del Rio-Celestino, M.** (2012). *In vivo* biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria subsp. Sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane, Food and Chemical Toxicology, 50, 1384-1392.
- Waleed A. M., Salih, H. S. and Sirwa, R. H.** (2009), Extraction and characterization of polyphenol oxidase from apricot, apple, eggplant and potato, Mesopotamia Journal of Agriculture, 37,1815-316.
- Wildanger, W. and Herrmann, K.** (1973). Die phenolicshen inhaltsstofee des obstes. H. Die flovonole des obstes, Z. Lebensm. Unters. Forsch, 151, 103-108.
- Yabaci, S. N.** (2008). Çay bitkisi polifenoloksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yagar H.** (2004). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 34(4), 387-397.
- Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., and Hayashi, N.** (2001). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1446-1449.
- Yang, Y. ve Wang, Z.** (2008). Some properties of polyphenoloxidase from Lily, International Journal of Food Science and Technology, 43, 102–107.
- Yaniv, Z., Schafferman, D. and Amar, Z.** (1998). Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa, Brassicaceae*) in Israel, Economic Botany, 52, 394–400.
- Zhao-Jian, G., Xiao-Hong, H., Xing-Guo, X.** (2009). Purification and characterisation of polyphenoloxidase from red swiss chard (*Beta vulgaris subspecies cicla*) leaves, Food Chemistry, 117, 342-348.
- Ziyan, E. ve Pekyardımcı, Ş.** (2003). Characterization of polyphenoloxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*), Turkish Journal of Chemistry, 27, 217-225.

#### Internet Kaynakları :

Url-1 <<http://bitkirehberi.net/roka-ve-faydalari>>, alındığı tarih: 08.11.2015.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad-Soyad** : Negin SHABNAM

**Doğum Tarihi ve Yeri** : 14.06.1988 / OROUMİYEH

**E-posta** : [neginshabnam@gmail.com](mailto:neginshabnam@gmail.com)

## **ÖĞRENİM DURUMU :**

Lisans : 2010, İslamik Azad Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

## **TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:**

Shabnam, N., Kahraman, S. (2015). Roka'dan (Eruca sativa) Polifenoloksidaz Enziminin Karakterizasyonu. *2.Uluslararası kongre – İlaç ve Eczacılık*, Kasım 27-29, 2015 İstanbul, Türkiye

