



**YONUZ ERİK (*Prunus divaricata* var) POLİFENOL OKSİDAZININ
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Hazırlayan: Sakine GÜNDOĞAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

IĞDIR/2023

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
IĞDIR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YONUZ ERİK (*Prunus divaricata* var) POLİFENOL OKSİDAZININ
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Sakine GÜNDOĞAN

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

IĞDIR/2023

TAAHHÜTNAME

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

Sakine GÜNDOĞAN



ÖZET

YONUZ ERİK (*Prunus divaricata* var) POLİFENOL OKSİDAZININ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

GÜNDOĞAN, Sakine

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik ve Bilimleri Ana bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA

Eylül 2023, 55 Sayfa

Bu çalışmada polifenol oksidaz enzimi Yonuz erikten (*Prunus divaricata* var) afinite kromatografisi metodu ile Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak %5,97 verimle 12,80 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tespiti SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Saflaştırılan polifenol oksidazın SDS-PAGE ile tek bant halinde, 83,06 kDa ağırlığında olduğu belirlendi. Enzimin monofeolik ve difeolik substratları varlığında aktivite tayini yapıldı ve en iyi aktiviteyi 4-metil katekol varlığında gösterdiği belirlendi. Yonuz erikten saflaştırılan, polifenol oksidaz enziminin kinetik karakterizasyonu en yüksek aktivite gösterdiği, 4-metil katekol, katekol ve DHPPA substratları varlığında gerçekleştirildi. Enzimin optimum pH değeri 4-metil katekol ve DHPPA substratları kullanıldığında 7,0, katekol substratı kullanıldığında 6,0 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık 4-metil katekol, katekol ve DHPPA substratları varlığında sırası ile 20 °C, 40 °C ve 30 °C olarak belirlendi. Polifenol oksidazın K_m ve V_{max} değerleri ile substrat spesifikliğinin bir göstergesi olan V_{max}/K_m değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanarak belirlendi. En etkili substratının en yüksek olan V_{max}/K_m değerine sahip olan 4-metil katekol (1666,67 EU/mL/mM) olduğu, bunu DHPPA (1253,13 EU/mL/mM) ve katekol (452,08/ EU/mL/mM) substratlarının izlediği tespit edildi. Polifenol oksidazının inhibisyonu amacı ile yaygın kullanılan esmerleşme karşıtı kimyasal ajanlar incelendi. Bu amaçla askorbik asit, sitrik asit, sodyum metabisülfid, L-sistein, kafeik asit, fumarik asit, maleik asit ve tartarik asit için PFO aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri belirlendi. Enzimin en etkili inhibitörünün en düşük IC_{50} değerine sahip askorbik asit (IC_{50} : 0,0564 mM) olduğu en zayıf inhibitörünün ise en yüksek IC_{50} değerine sahip sitrik asit (IC_{50} : 17,465 mM) olduğunu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, saflaştırma, karakterizasyon, inhibisyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF YONUZ PLUM (*Prunus divaricata* var) POLYPHENOL Oxidase

GÜNDOĞAN, Sakine

Master's Thesis

Department of Bioengineering and Sciences

Advisor: Asst. Prof. Dr. Elif Duygu KAYA

September 2023,55 Pages

In this study, polyphenol oxidase enzyme was purified 12.80 times with 5.97% yield by affinity chromatography method and Sepharose-4B-L-tyrosine-p-aminobenzoic acid affinity gel from Yonuzu plum (*Prunus divaricata* var). Control of the purity of the enzyme and determination of its molecular weight were carried out by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified polyphenol oxidase was determined by SDS-PAGE to be a single band, weighing 83.06 kDa. The activity of the enzyme was determined in the presence of monopheolic and diphenolic substrates and it was determined that it showed the best activity in the presence of 4-methyl catechol. Kinetic characterization of the polyphenol oxidase enzyme purified from plum was performed in the presence of the substrates 4-methyl catechol, catechol and DHPPA, where it showed the highest activity. The optimum pH value of the enzyme was determined as 7.0 when 4-methyl catechol and DHPPA substrates were used, and 6.0 when the catechol substrate was used. The optimum temperature was determined as 20 °C, 40 °C and 30 °C in the presence of 4-methyl catechol, catechol and DHPPA substrates, respectively. K_m and V_{max} values of polyphenol oxidase and V_{max}/K_m values, which are an indicator of substrate specificity, were determined using Lineweaver-Burk graphs. The most effective substrate was 4-methyl catechol (1666.67 EU/mL/mM), which had the highest V_{max}/K_m value, followed by DHPPA (1253.13 EU/mL/mM) and catechol (452.08/EU/mL). /mM) substrates were detected. Commonly used anti-browning chemical agents for the inhibition of polyphenol oxidase were examined. For this purpose, inhibitor concentration (IC_{50}) values that reduce PFO activity by half were determined for ascorbic acid, citric acid, sodium metabisulfite, L-cysteine, caffeic acid, fumaric acid, maleic acid and tartaric acid. It was determined that the most effective inhibitor of the enzyme was ascorbic acid (IC_{50} : 0.0564 mM) with the lowest IC_{50} value, and the weakest inhibitor was citric acid (IC_{50} : 17.465 mM) with the highest IC_{50} value.

Key Words: Polyphenol oxidase, purification, characterization, inhibition.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu Kaya'ya ve yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Ayşe TÜRKHAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince sabrını, ilgisini, sevgisini, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan anneme, babama, kardeşlerime, sevgili eşime ve canım oğluma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sakine GÜNDOĞAN

IĞDIR/2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimatik esmerleşme.....	1
1.2. Polifenol oksidaz (PFO)	1
1.3. Polifenol oksidazların doğada dağılımı	1
1.4. Polifenol oksidazların katalizlediği reaksiyonlar	2
1.5. Polifenol oksidazın substratları	5
1.6. Polifenol oksidaz aktivitesinin tespiti.....	7
1.7. Polifenol oksidazın endüstrideki önemi	7
1.8. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi	8
1.8.1. Fiziksel yöntemlerle polifenol oksidazın kontrolü	9
1.8.2. Kimyasal yöntemlerle polifenol oksidazın kontrolü.....	10
1.9. Yonuz Erik (<i>Prunus Divaricata</i> Var).....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	19
3.1.2. Çözeltilerin hazırlanması	20
3.2. Metot	22
3.2.1. Enzim özütünün hazırlanışı ve soğuk aseton çöktürmesinin yapılışı	22
3.2.2. Aktivite tayini	22
3.2.3. Afinite kromatografisi	23

3.2.4. Afinite jelinin sentezi.....	23
3.2.5. Enzim ekstraktının afinite kolona yüklenmesi ve elüsyonu	25
3.2.6. Kalitatif protein tayini	25
3.2.7. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini	25
3.2.8. SDS jel elektroforezi.....	26
3.2.9. Kinetik Çalışmalar	26
3.2.9.1. PFO enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	26
3.2.9.2. PFO enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi.....	27
3.2.9.3. PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	27
3.2.9.4. PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. PFO'nun Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	28
4.2. SDS-Polakrilamid Jel Elektroforezi	30
4.3. Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Karakterizasyonu	32
4.3.1. Optimum pH	32
4.3.2. Optimum sıcaklık.....	34
4.3.3. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	36
4.3.4. İnhibitör Etkisi	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKÇA	46
ÖZGEÇMİŞ.....	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mili litre
mM	Mili molar
Na	Sodyum
pH	Asitlik derecesi
µM	Mikro molar

Kısaltmalar

DHPPA	3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid
DMF	Dimetil Formamid
DOPA	Dihidroksi fenilalanin
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
HPCD	Yüksek basınçlı karbondioksit
HPP	Yüksek basınçlı işletme
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEF	Vurgulu elektrik alan
PFO	Polifenol Oksidaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	Tetra etil metilen daimin
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
UST	Ultrasound
UV	Mor ötesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Polifenol oksidaz enziminin monofenolaz aktivitesi.....	3
Şekil 1.2. Polifenol oksidaz enziminin difenolaz aktivitesi.....	3
Şekil 1.3. Kinonların enzimatik olmayan oksidatif reaksiyonları.....	4
Şekil 1.4. Polifenol oksidazın substratları	6
Şekil 1.5. Taze ve kurutulmuş Yonuz erik (<i>Prunus divaricata</i> var).....	13
Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin hazırlanması.....	24
Şekil 4.1. Afinite kromatografisi ile Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin Aktivite-Absorbans-tüp sayısı grafiği	28
Şekil 4.2. Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 4.3. Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı, A: Saf enzim elüatı, B: Protein standardı	31
Şekil 4.4. 4-Metil Katekol substratı için optimum pH grafiği	33
Şekil 4.5. DHPPA substratı için optimum pH grafiği.....	33
Şekil 4.6. Katekol substratı için optimum pH grafiği	33
Şekil 4.7. 4-Metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği	35
Şekil 4.8. Katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği	35
Şekil 4.9. DHPPA substratı için optimum sıcaklık grafiği	35
Şekil 4.10. 4-Metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	36
Şekil 4.11. Katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	37
Şekil 4.12. DHPPA substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 4.13. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine askorbik asitin inhibisyon etkisi.....	39
Şekil 4.14. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine sitrik asitin inhibisyon etkisi	40
Şekil 4.15. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine sodyum metabisülfitin inhibisyon etkisi.....	40
Şekil 4.16. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine L-sisteinin inhibisyon etkisi.....	41
Şekil 4.17. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine kafeik asitin inhibisyon etkisi	41
Şekil 4.18. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine tartarik asitin inhibisyon etkisi.....	42
Şekil 4.19. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine tartarik asitin inhibisyon etkisi	42
Şekil 4.20. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine maleik asitin inhibisyon etkisi	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin saflaştırma tablosu	29
Çizelge 4.2. Yonuz erik PFO substrat ilgisi.....	32
Çizelge 4.3. Yonuz erik PFO kinetik özellikleri.....	38
Çizelge 4.4. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine inhibitörle etkisi ile elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	43



1. GİRİŞ

1.1. Enzimatik Esmerleşme

Meyve, sebze ve onlardan elde edilen ürünler; içerdikleri vitaminler, mineraller, lifler ve antioksidanlar gibi bileşikler sayesinde sağlıklı beslenme için yeri doldurulamaz öğelerdir. Tüketiciler sebze ve meyvelerin içerdiği biyoaktif maddelerin obezite, kanser, alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar gibi dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisinin vurgulanması sayesinde gün geçtikçe daha çok bitkisel ağırlıklı beslenmeye özen göstermekte taze sebze, meyve ve bunların ürünlerine olan talep artmaktadır (Ionita vd., 2017).

Dünyada yetişen sebze ve meyve mahsullerinin yarısı hasat sonrası bozulma reaksiyonları nedeniyle kaybedilmektedir (Martinez and Whitaker, 1995). Enzimatik esmerleşme meyve ve sebzelerin toplanması, depolanması ve işlenmesi sırasında gerçekleşen oksidatif bir bozulma reaksiyonudur. Bu reaksiyon fenolik bileşiklerin enzimatik katalizli oksidasyonu sonucu ürünün renk, lezzet, besin değeri, yumuşaklık gibi duyuşal parametrelerini bozar ve son üründe kalite kayıplarına dolayısı ile ekonomik kayıplara neden olur. Bu reaksiyonların ana sorumlusu fenolik bileşikleri oksitleyerek substrat olarak kullanan polifenol oksidaz enzimleridir (Brandelli and Lopez, 2005).

Polifenol oksidazlar (PFO) meyve ve sebzelerdeki birçok monofenolik ve difenolik bileşigi substrat olarak kullanır, havadaki oksijenle yükseltgeyerek enzimatik esmerleşmeye sebep olur (Martinez and Whitaker, 1995; Brandelli and Lopez, 2005).

1.2. Polifenol Oksidaz (PFO)

Meyve ve sebzelerde esmerleşme reaksiyonlarının başlıca sorumlusu Polifenol oksidazlardır. PFO oksijen varlığında çok sayıda fenolik bileşigi katalizleme yeteneğine sahip, aktif bölgesinde bakır içeren, oksidoredüktaz grubu enzimin genel adıdır (Yoruk and Marchall, 2003).

1.3. Polifenol oksidazların doğada dağılımı

1856 yılında PFO enzim ilk kez Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1995). 1895 yılında Lindet elma şarabı üzerinde çalışırken esmerleşmenin doğasını fark etmiş ve 1920'de Onslow, bitki dokusunun enzimatik

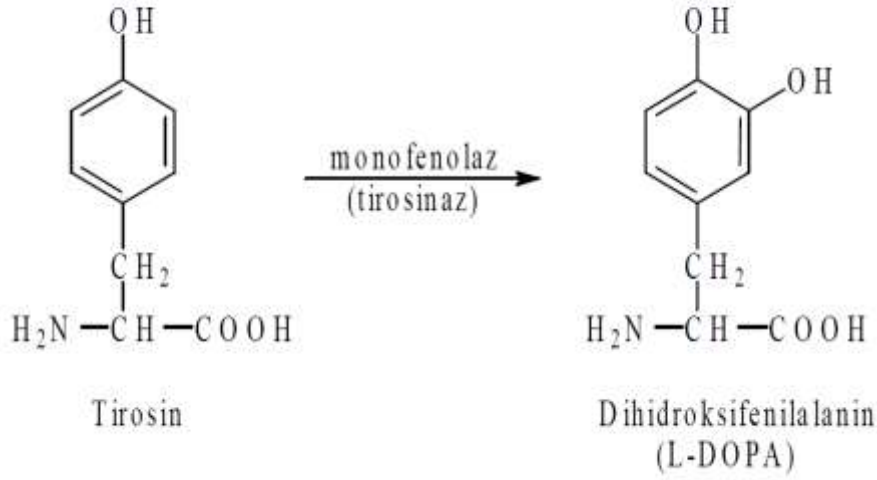
esmerleşmesinin, katekol, protokatekuik asit ve kafeik asit gibi *o*-difenolik bileşiklerin yanı sıra uygun enzimlerin (oksijenazlar) ve havanın varlığına bağlı olduğunu göstermiştir. "Oksijenaz" terimi daha sonra "fenolaz" veya "polifenol oksidaz" olarak değiştirilmiştir. 1937'de Kubowitz, PFO'nun bakır içeren bir enzim olduğunu göstermiştir (Mesquita and Queiroz, 2013).

Polifenol oksidazlar başta bitkisel dokular olmak üzere, deniz canlılarında (karides ve yengeç) (Yoruk and Marshall, 2003), mantarlarda, bakterilerde, böceklerde ve insanlar da dahil olmak üzere bazı hayvanlarda bulunur (Whitaker, 1995).

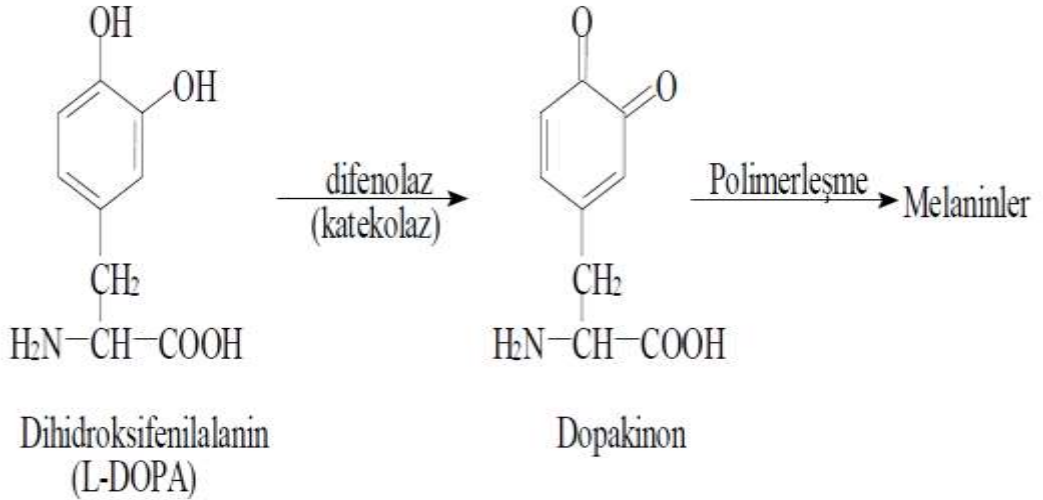
Yüksek bitkilerde, enzim bitkiyi böceklere ve mikroorganizmalara karşı korur ve yaralandığında, mikroorganizmaların daha fazla saldırısına ve kurumaya karşı geçirimsiz bir melanin kabuğu oluşturur (Whitaker, 1995). PFO bitkilerde genellikle tilakoid membranda, peroksizomlarda, kloroplastta ve mitokondride bulunur (Panadare ve Rathod, 2018). Doku zedelendiğinde, kesildiğinde, soyulduğunda, hastalandığında, plastidlerde bulunan fenolik bileşikler, enzim ve oksijen bir araya gelerek hızla kahverengi melanin pigmentlerini oluşturur (Mesquita and Queiroz, 2013). Böceklerde, dış iskeletin sklerotizasyonunda ve melanin içinde kapsülleyerek mikroorganizmalara karşı korumada görev aldığı bildirilmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda ise polifenol oksidaz cilt, saç ve göz pigmentasyonundan sorumlu tutulmaktadır (Whitaker, 1995).

1.4. Polifenol oksidazların katalizlediği reaksiyonlar

Polifenol oksidazlar iki tip reaksiyonu katalizler ilki; monofenollerin hidroksilasyonla *o*-difenolere dönüşümü olan krezolaz veya monofenolaz tipi reaksiyon (E.C.1.14.18.1) ve ikincisi; *o*-difenollerin oksidasyonu ile *o*-kinonlara yükseltgenmesi olarak tanımlanan difenolaz veya katekolaz tipi reaksiyon (E.C.1.10.3.2) (Mesquita ve Queiroz, 2013). PFO'nun aktivitesi sonucu oluşan *o*-kinonlar son derece reaktif bileşiklerdir ve enzimatik olmayan kondensasyon reaksiyonu ile kahverengi melanin pigmentine dönüşürler (Zhou vd., 2018). Enzim kaynağına bağlı olarak, hem monofenolik hem de difenolik her iki substrat kategorisi üzerinde etkili olabilir, bu nedenle yaygın olarak polifenol oksidazlar olarak bilinirler (Saranya vd., 2020).



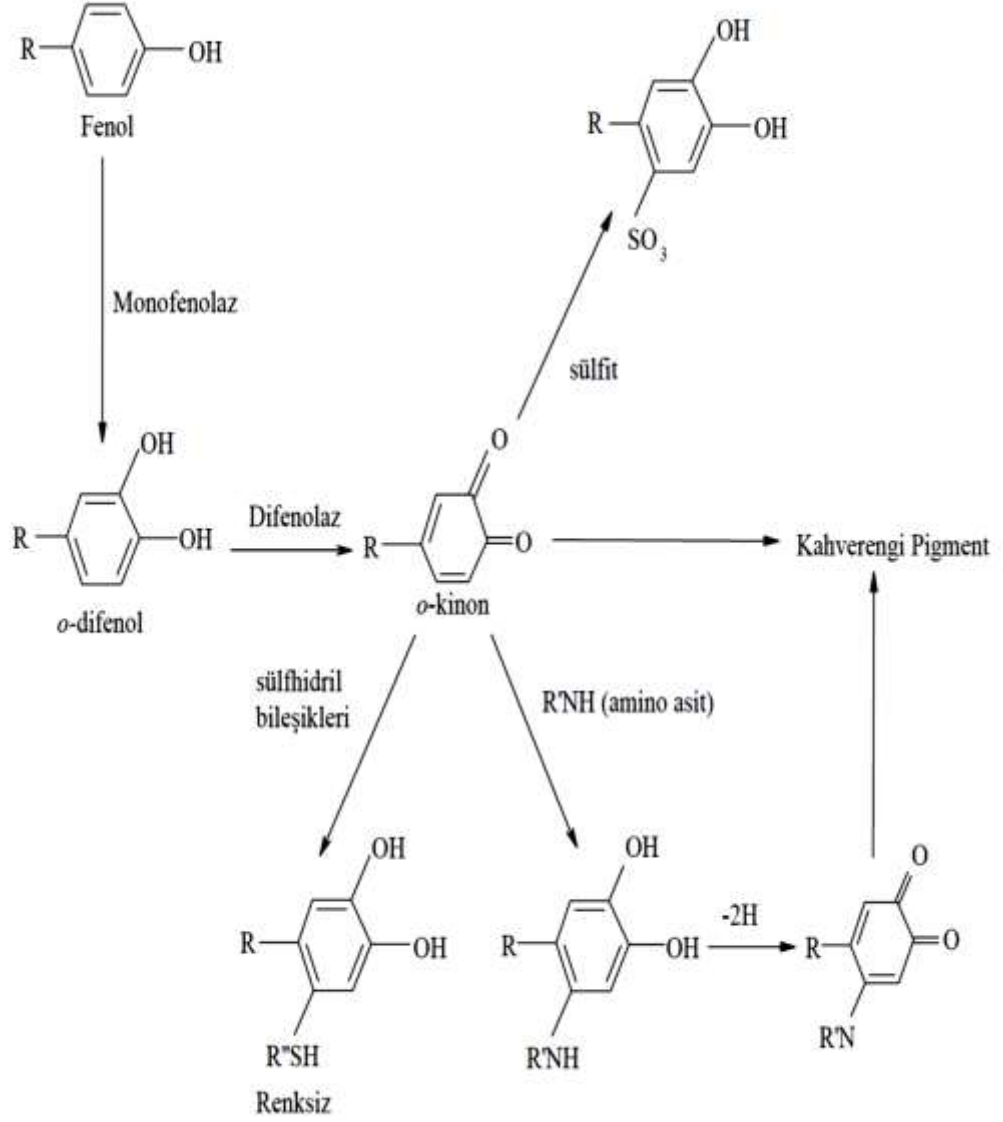
Şekil 1.1. Polifenol oksidaz enziminin monofenolaz aktivitesi (Can, 2010)



Şekil 1.2. Polifenol oksidaz enziminin difenolaz aktivitesi (Can, 2010).

PFO 'ın reaksiyonu sonucu oluşan genellikle renksiz kinonoid bileşikler sülfhidril, amin, amid, indol ve imidazol süstitüentleri ile proteinlerin nükleofil grupları dahil çeşitli hüresel bileşenleri kovalent olarak değiştiren ve çapraz bağlayan oldukça reaktif, elektrofilik moleküllerdir (Steffens, vd., 1994). Kinon bileşikleri bitki proteinlerindeki temel aminoasitlerin yan zincirleriyle etkileşime girerek kovalent kondenzasyonlara yol açma potansiyeline sahiptir. Aminoasitlerin -SH ve -NH, grupları çoğunlukla kinonlar tarafından bağlanmaya veya alkilasyona duyarlıdır. Bu durum gıda

proteinlerinin besin değerinin azalmasına neden olmaktadır (Yoruk ve Marchall, 2003). Ayrıca fenolik tirozin grupları içeren veya bir fenolik asite psödopeptit bağı yoluyla bağlanan gıda proteinleri de PFO için substrat görevi görerek modifikasyona tabi tutulur (Matheis and Whitaker 1984).

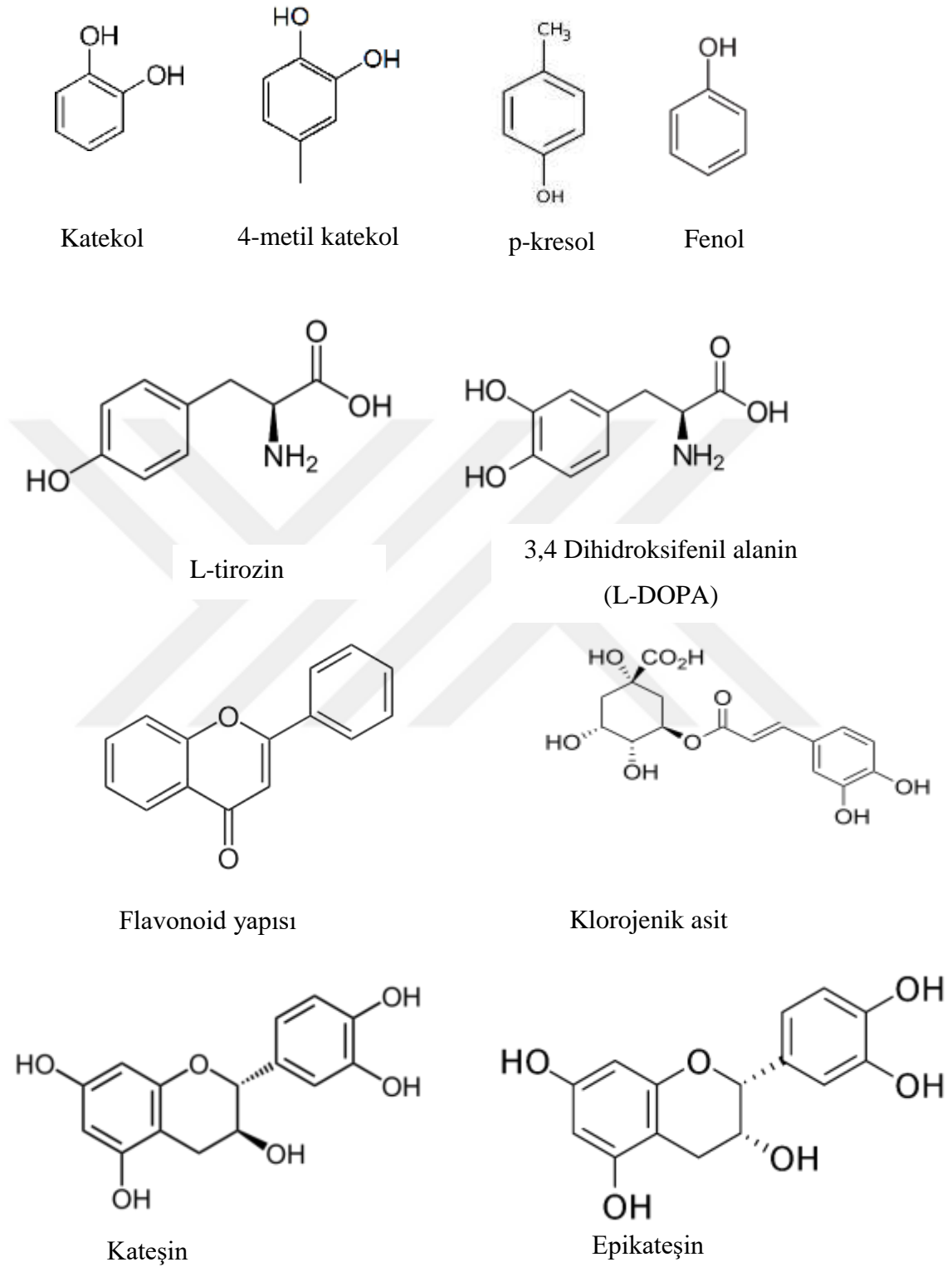


Şekil 1.3. Kinonların enzimatik olmayan oksidatif reaksiyonları (Özen, 2008)

1.5. Polifenol oksidazın substratları

Polifenol oksidazın substratları meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur (Queiroz, vd., 2008). Sebze ve meyveler çok sayıda fenolik bileşikler içerirler ve bunların bir kısmı polifenol oksidaz enzimi için uygun substrattır. Gıda materyalinde bulunan ve esmerleşmeye katılan fenolik bileşikler dört gruba ayrılabilir: basit fenoller, fenolik asitler, sinamik asit türevleri ve flavonoidler (Mesquita and Queiroz, 2013). Basit fenoller, L-tirozin gibi monofenolleri ve katekol, resorsinol ve hidrokinon gibi o-difenolleri içerir. PFO'nun temel substratları fenollerdir ve enzimin reaktivitesi, her fenol türüne göre değişmektedir.

Katekol en çok kullanılan “model substrat” olmakla beraber 4-metil katekol, *p*-krezol, L-DOPA, gibi fenol türevleride substrat olarak kullanılmaktadır (Panadare and Ratrod, 2018). Fenolik asitler öncül bileşik olarak benzoik asitten sentezlenen asitleri içerir ve bitkilerde yaygın olarak bulunur. Gallik asit, vanilik asit, siringik asit, protokatekuik asit bu gruptaki bileşiklere örnek olarak verilebilir. Sinamik asit türevleri özellikle sebze ve meyvelerdeki enzimatik esmerleşme reaksiyonlarından sorumlu tutulan klorojenik başta olmak üzere kafeik asit, quinik asit, *p*-kumarik asit, sinaptik asit gibi bileşikleri içerir (Mesquita and Queiroz, 2013). Flavonoidler bitkilerin kök, gövde yaprak, meyve ve tohum gibi yenilebilen kısımlarında bulunmaktadır (Kuyumcu, 2014). Flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olan kısım ise katekinlerdir. Doğada (+)- katekin ve (-)- epikatekin olarak bulunmaktadırlar. PFO ve peroksidaz enzimleri tarafından substrat olarak kullanılırlar (Pourcel vd., 2006).



Şekil 1.4. Polifenol oksidazın substratları (URL 1)

1.6. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tespiti

Polifenol oksidaz enziminin aktivite tayini substratların yapısına (monofenolik ya da difenolik) bağlı olmak üzere manometrik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilebilir (Yoruk and Marchall, 2003).

Monometrik ve paografik yöntemlerin her ikisinde PFO'nun reaksiyonu esnasında harcanan O₂ miktarının tespiti esasına dayanırken tükenen oksijenin ölçüm yöntemi açısından farklılık gösterir. Monometrik yöntemde tüketilen miktarı O₂ bir respirometre yardımı ile belirlenirken, Palografik yöntemde tüketilen oksijen miktarı daha hassas bir elektrot yardımı ile gerçekleştirilir. Kronometrik metotta askorbik asit kullanılarak ilk renk değişiminin gözlemlendiği zamanın belirlenmesi esasına göre gerçekleştirilir (Yoruk and Marchall, 2003).

Spektrofotometrik yöntemlerin üstün tarafı pratik ve kolay uygulanabilir olmasıdır bu sayede diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilirler. Burada ya substratların PFO katalizi ile azalması takip edilir ya da reaksiyon sırasında oluşan ürünün oluşum hızı ölçülür (Whitaker, 1995). Genellikle PFO'nun fenolik bileşiklerle reaksiyonu sonucu oluşan o-kinonların UV / Vis emiliminin izlenmesi yani ürünün oluşum hızının ölçülmesi tercih edilir. Ancak o-kinonlar kararsız ara bileşiklerdir ve zaman içinde polimerize olabilirler (Fenoll vd., 2000). Sonuç olarak, UV / Vis emilimi değişebilir ve doğru olmayan kinetik ölçümlere neden olabilir.

PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin spektrofotometrik tayininde 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil kullanılarak tayin işlemi oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirilir. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşturulan o-kinon, nükleofil ile renkli katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm ve civarında absorbanans gösterir (Özel, 2008).

1.7. Polifenol Oksidazın Endüstrideki Önemi

Polifenol oksidazlar endüstriyel uygulamalar için yüksek potansiyele sahip enzimlerden biri olduğu için bu alandaki birçok çalışmaya konu olmuştur. Polifenol oksidazlardan; biyoteknolojik L-Dopa üretiminde (Chu vd., 1993), atık sularda fenol tayini ve giderimi (Öztan, 2007; Wang vd., 2020), gıda endüstrisinde enzimatik kararmanın optimizasyonu, bazı gıda katkı maddelerinin üretimi, teaflavin üretimi (Sharma, vd., 2009), gıda güvenliğinde biyojenaminlerin tespitinde, endüstriyel

proseslerdeki toksik bileşiklerin giderilmesi ya da dönüştürülmesi yoluyla bioremediasyonda ve tekstil endüstrisinde boya giderimi, biyosensör olarak birçok alanda polifenol oksidaz sınıfı enzimlerden faydalanılmıştır (Faria vd., 2007; Kanteev and Fishman, 2015; Nawaz vd., 2017; Min vd., 2019).

1.8. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonlarının Önlenmesi

Meyve ve sebzelerdeki fenolik substratların PFO tarafından oksidasyonunun, birçok meyve ve sebzenin olgunlaşma, taşıma, depolama ve işleme sırasında meydana gelen esmerleşmenin ana nedeni olduğu düşünülmektedir. Bu sorun, besin kalitesini ve görünümünü etkiler, tüketicinin tarafından kabul edilebilirliğini azaltır ve dolayısıyla hem gıda üreticileri hem de gıda işleme endüstrisi üzerinde önemli ekonomik etkilere neden olur. Bu nedenle polifenol oksidazlar gıda teknolojisinde kritik enzimler olarak kabul edilmiş ve hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır (Nuñez-Delgado vd., 2005; Queiroz, vd., 2008).

Polifenol oksidaz kaynaklı esmerleşme reaksiyonları gıda kalitesini, besin değerini ve duyu özelliklerini azalttığı için enzim aktivitesini kontrol etmek amacıyla birçok teknik ve mekanizma geliştirilmiştir. Bu mekanizmalar reaksiyonun meydana gelmesi için gereken temel elemanlar; oksijen, bakır, enzim ve substrat üzerine etki gösterir (Queiroz, vd., 2008). Reaksiyonun gerçekleşmesi için uygun sıcaklık ve pH koşullarında, polifenol oksidaz enzimi, fenolik substratlar, enzim aktivatörü (bakır ve oksijenin) bir arada bulunması gereklidir (Pekyardımcı, 1992). Bu nedenle enzimatik esmerleşmenin kontrolü için bahsi geçen faktörlerden bir ya da birkaçının eliminasyonu gereklidir (Queiroz, vd., 2008).

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin doğal bileşenleridir, bunların gıda ürünlerine işlenmesi sırasında hasar gören bitki dokusunda plastidlerde bulunan enzim ile kofullarda bulunan fenolik bileşiklerin teması kaçınılmaz olacaktır (Queiroz, vd., 2008). Ayrıca oksijen varlığı da kaçınılmazdır bu nedenle kararmanın engellenmesinde en geçerli yöntem PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Polifenol oksidazın kontrolü amacıyla fiziksel ve kimyasal çok sayıda yöntem önerilmiştir (Sui vd., 2023).

1.8.1. Fiziksel Yöntemlerle Polifenol Oksidazın Kontrolü

Polifenol oksidazın fiziksel yöntemlerle kontrolü için; ısıt işlemler, yüksek basınçlı işleme (HPP), yüksek basınçta karbondioksit (HPCD), mor ötesi (UV) ışık, vurgulu elektrik alan (PEF), ultrasound (UST), kullanılmıştır.

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ısıt işlemler enzimlerin inaktivasyonunu sağlar, mikroorganizmalara karşı etkili ve ekonomiktir. Ancak bu işleme yöntemi, gıdanın renginde, tadında ve dokusunda istenmeyen değişikliklere neden olabileceği gibi, vitamin ve mineraller gibi ısıya duyarlı besin maddelerini de tahrip edebilmektedir. Aynı zamanda bazı PFO'lar termal inaktivasyona karşı güçlü bir direnç gösterdiği bilinmektedir. PFO'nun ısıt kararlılığı gıdanın kaynağı, türü, doğası ve davranışı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilir. Bu durum her ürün için polifenol oksidazın ısıt kararlılığının optimizasyonunu gerektirmektedir (Iqbal vd., 2019; Sui vd., 2023). Bu nedenle son yıllarda geleneksel ısıt işlemlere alternatif teknolojiler araştırılmaktadır (González-Cebrino vd., 2013)

Ultrason (UST), PFO'nun kovalent olmayan bağlarını kırmak için kullanılan bir yöntemdir. Mekanik olarak 20 ila 100 kHz arasındaki frekanslarda UST kaviteasyon ile sonuçlanır, bu da kabarcıkların hızlı bir şekilde oluşmasına, büyümesine ve aniden parçalanmasına neden olur, lokalize aşırı yüksek sıcaklıklara (5.500 °C) ve basınç (50 MPa) oluşumu ile sonuçlanır. Bu patlama ve yüksek sıcaklık, enzimdeki vander-waals ve hidrojen bağlarının yapısını bozarak yapısal değişikliklere ve aktivite kayıplarına neden olur (Sánchez-Rubio vd., 2016; Iqbal vd., 2019).

Vurgulu elektrik alan (PEF) metodu; Bu işlem, mikrosaniyeler boyunca 20-80 kV düzeyinde yüksek voltaj darbeleri uygulayan iki elektrot içeren bir hazneye gıdanın yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Mikroorganizmalar için etkili bir yöntem olsa bile polifenol oksidaz üzerine etkinliği elektrik alan kuvvetine ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Queiroz, vd., 2008).

Yüksek basınçlı işleme (HPP), oda sıcaklığında gıda enzimlerini etkisiz hale getirmek, böylece nihai ürünlerin raf ömründen ödün vermeden gıdaların lezzetini, aromasını ve besin değerini korumak için kullanılan yeni bir gıda işleme teknolojisidir (Iqbal vd., 2019). Yüksek basınçlı işleme (HPP) işleminde, paketlenmiş gıdalara kısa bir süre için (birkaç saniyeden 20 dakikaya kadar), 0 °C ila 100 °C arasında çok yüksek

basınçların (100–1000 MPa) uygulanır. Bu teknoloji biyoaktif bileşenleri korur, antioksidan aktiviteyi stabilize eder. Böylece sağlık açısından önemli faydaları olan içeceklerin elde edilmesi, besinsel ve duyuşsal özelliklerin korunması ve raf ömrünün uzatılması sağlar (Andres vd., 2016). Ancak pahalı ekipmanlarla çalıştığı için gıda endüstrisinde etkili bir kullanım alanına sahip değildir (Sezer ve İnançlı, 2013).

Yüksek Basınçta Karbondioksit (HPCD): Hem sıvı hem de katı gıda ürünlerinde kalite enzimlerini ve mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek için kullanılan etkili bir termal olmayan gıda işleme yöntemidir (Iqbal et.al., 2019). Ancak HPCD tekniğinin gıda ürünlerinde yüksek basınçtan kaynaklanan dokusal değişiklikler nedeniyle gıda kalitesi üzerinde zararlı etkilere neden olduğu ve tüketici tarafından kabul edilebilirliğini azalttığı bildirilmiştir (Zhou vd., 2009).

Taze gıda ürünleri, gıda kaynaklı mikrobiyal yükü azaltmak için ultraviyole (UV) ışık kullanılarak işlenebilir. UV ışınları gıda ürünlerinin tat ve besin değerinin korunması için kullanışlı daha ekonomik ancak enzim aktivitesi üzerine sınırlı etkisi olan yöntemlerdir. Bu nedenle diğer yöntemlerle kombine kullanılması (ısı ve/veya basınç) enzim aktivitesi üzerine daha etkili olmaktadır (Rahman 2007; Yılmaz ve Elmacı, 2018).

1.8.2. Kimyasal Yöntemlerle Polifenol Oksidazın Kontrolü

Polifenol oksidazın kimyasal anti-browning ajanları ile inhibisyonu, enzimatik esmerleşmeyi önlemenin en etkili, kolay ve ekonomik yollarından biridir. Ancak gıdalarda kullanılan kimyasal ajanların insan sağlığına zarar vermemesi, alerjik olmaması ve gıdanın tat, koku, lezzet gibi yapısal parametreleri üzerinde olumsuz özellik göstermemesi gerekmektedir (Zhou vd., 2018).

Kimyasal anti-browning ajanları genellikle; indirgeyici ajanlar, asitleştirici ajanlar, şelatlayıcı ajanlar, rekabetçi veya rekabetçi olmayan inhibitör ve oksitleyici ajanlar olarak sınıflandırılır (McEvelly and Iyengar 1992).

Sülfidler ve kükürtdioksit düşük maliyetli, etkili ve pratik polifenol oksidaz inhibitörleridir. Ancak alerjik etkiye sebep oldukları için birçok ülkede yasaklanmışlardır (Sui vd., 2023). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), SO₂'nin gıda maddelerinin işlenmesinde kullanımının mümkün olduğu kadar sınırlandırılmasını, hatta tamamen bastırılma olasılığının düşünülmesini önermiştir (Queiroz, vd., 2008).

Askorbik asit (C vitamini) polifenol oksidazın reaksiyonu ile oluşan kinonları melanin oluşumuna sebep olan sekonder reaksiyonlara gitmeden önce indirger. Ortamın pH değerini düşürerek optimum pH sı 5-7,5 aralığında olan PFO'yu ikinci bir yolla inhibe eder (Guerrero-Beltrán vd., 2005). Polifenol oksidaz pH değişimlerine karşı hassas bir enzimdir ve optimum pH değeri nötral pH (5-7,5) civarındadır. Askorbik asit pH'nın düşmesine neden olarak, polifenol oksidazın üç boyutlu yapısının açılmasına ve katalitik aktivitenin azalmasına neden olur (Liao vd., 2021).

Sitrik asit, polifenol oksidazın aktif bölgesindeki histidin kalıntılarına karşı özgülüğü nedeniyle enzimi inhibe eder, pH değerini düşürür böylece aktif bölgede bakırın şelasyonunu kolaylaştırır ve enzimin konformasyonu artan pH ile kademeli olarak açılır (Yoruk and Marchall 2003; Liu vd., 2013).

L-sistein'in esmerleşmeyi önleyici ajan olarak etkisi çeşitli mekanizmalara bağlanmıştır. Bunlar renksiz katkı maddesi vermek üzere kinonlara karşı nükleofilik reaktivitesi, PFO'ya karşı inhibisyon etkisi ve *o*-kinonları polifenol öncüllerine indirgeme yeteneği şeklinde ifade edilmiştir (Ali vd., 2015).

Salisilik asit etkili bir esmerleşme ajanıdır ve enzim üzerindeki etkisini aktif bölgedeki anahtar rezidüle bağlanarak ve ortamın asitliğini düşürerek gösterir (Peng ve Jiang, 2006; Zhou vd., 2018). Salisilik asit ayrıca, PFO üzerinde rekabetçi inhibisyon sergileyerek, α -sarmalda azalma ve sekonder yapıda değişikliklere neden olduğu bildirilmektedir (Liao vd., 2021).

Malik asit, oksalik asit, asetik asit ve tartarik asit gibi diğer asitleştiriciler de PFO'nun inhibisyonu için geniş çapta araştırılmaktadır. Asitleyicilerin ve tampon sisteminin farklı konsantrasyonları ortamda farklı pH düşüşlerine neden olur. Orta derecede düşük pH (4,0 ila 6,0), PFO'nun sınırlı açılmasına neden olur, bu da enzim-substrat etkileşimini etkileyebilir ve dolayısıyla PFO'nun katalitik verimliliğini azaltabilir. Öte yandan, yüksek konsantrasyonlu asitleştiriciler çok düşük pH'lı ortamlara (pH<4,0) neden olur. Bu, önemli konformasyonel değişikliklerle açılmaya ve denatürasyona yol açarak çok düşük bir aktiviteye veya hiç aktivite görülmemesine neden olur. Ayrıca asit pH'nın ürettiği protonlar substratın ayrışmasına neden olur ve enzimin protonasyon durumunu değiştirir (Zhou vd., 2020).

1.9. Yonuz Erik (*Prunus divaricata* var)

Yabani meyveler, antioksidanlar ve fitokimyasalları yüksek oranda bulundurur, besin değeri açısından zengindir bu nedenle sağlıklı ve dengeli beslenme üzerine önemli ve olumlu etkileri vardır (Bvenura ve Sivakumar 2017). Ülkemizde birçok meyve türü yetişmektedir. Dünya üzerindeki 138 meyve türünden 75'i ülkemizde yetişirken; tür zenginliği yanında çeşit zenginliği de oldukça yüksektir (Demir, 2002). Ülkemizde birçok yabani meyve üreticiler tarafından bilinmekte ancak verimli olmayan topraklarda ve ekstrem koşullarda yetişebilen bu ürünler endüstriyel ölçekte üretilmemektedir (Artık ve Ekşi, 1996; Demir, 2002).

Yabani meyveler çoğunlukla ev ölçeğinde taze olarak tüketilmekte, bir kısımda endüstriyel ölçekte meyve suyu, reçel, marmelat ve çay gibi gıdalara da işlenmekte ve az bulunan vitamin ve mineraller açısından zengin bu gıdalar dış pazarlara gönderilmektedir (Demir, 2002). Yabani erik türlerinin (*Prunus* spp.) yüksek miktarda tanen bileşikleri içerdiği ve ayrıca aromatik ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Sezer vd., 2016). *Prunus* L. cinsine ait *Prunus divaricata* var, yüksek rakımlı bölgelerde yetişen yabani meyvelerden biridir. Yoğun bir aromaya sahiptir ve farklı yörelerde yöresel olarak ekşili erik, yunus erik, yonuz erik, alça, alsa olarak isimlendirilir.

Yonuz erik (*Prunus divaricata* var) sarı ve kırmızı renklerde sert ve acı-ekşi tada sahip olması ile taze tüketime çok uygun değildir. Yonuz erik (*Prunus divaricata* var) özellikle kış aylarında tıbbi olarak faydaları amacıyla; kurutularak yemeklere ekşi tat vermesi için kaynatılıp püre veya marmelat şeklinde veya pestili yapılarak değerlendirilmektedir. (Başkaya vd., 2016).



Şekil 1.5. Taze ve kurutulmuş Yonuz erik (*Prunus divaricata* var.).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yıldız vd., (2022) çalışmalarında polifenol oksidaz enzimini mürdüm eriğinden amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmışlardır. Polifenol oksidaz enzimi Sepharose 4B-L-Tyrosine-*p*-aminobenzoik ve Sepharose 6B-L-Tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jelleri kullanılarak sırası ile 93,88 kat ve 10,46 kat saflaştırılmıştır. Mürdüm eriği PFO'su için Sepharose 4B-L-Tyrosine-*p*-aminobenzoic asit afinite jelinin daha seçici olduğu belirlenmiştir. Enzimin molekül ağırlığı ve alt birimlerinin varlığı SDS-PAGE ve doğal PAGE ile kontrol edilmiş ve yaklaşık 50 kDa tek bir alt birim olduğu belirlenmiştir. Polifenol oksidaz enziminin katekol, 4-metil katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları varlığında kinetik karakterizasyonu yapılmış ve bu substratlar için optimum pH değerleri sırası ile 7.2, 4.5, 6.8 ve 8,5 olarak ve optimum sıcaklık değerleri sırası ile 25 °C, 10 °C, 5 °C ve 10 °C olarak bulunmuştur. Belirlenen substratlar için enzimin K_m ve V_{max} değerleri incelendiğinde en etkili substratı katekol olarak belirlenmiş, katekol için V_{max} ve K_m değerleri sırası ile 17.219,97 U/ml.dk ve 11,67 mM, olarak bulunmuştur.

Alıcı vd., (2016) borage (*Trachystemonorientalis* L.) bitkisinden polifenol oksidaz enzimini 3 fazlı ayırım saflaştırma metodunu kullanarak t-bütanol ve amonyum sülfat yardımı ile % 68,75 verimle 3,59 kat saflaştırmışlardır. Enzimin saflığı doğal jel elektroforez ve SDS-PAGE ile belirlemiştir. Doğal elektroforez ve SDS-PAGE ile iki bant gözlemlemiştir. Enzimin 30 kDa ve 80,6 kDa molekül ağırlığında olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH değerleri katekol 7.5, 4-metil katekol 5.0, pirogallol 7.5 ve kafeik asit substratları için 5.5 olarak elde edilmiştir. Optimum sıcaklık değerleri ise sırasıyla; 10 °C, 5 °C, 30 °C ve 20 °C olarak bulunmuştur. Kullanılan substratlar için V_{max} ve K_m değerleri tespit edilmiştir. K_{cat}/K_m değerlerinden enzim için en uygun substratın kafeik asit olduğu belirlenmiştir. Guaicol, galik asit ve L-tirozin substratları için aktivite göstermemiştir. Monofenolaz aktivitesi bulunmamaktadır fakat trifenolaz ve difenolaz aktivitesi olduğu tespit edilmiştir.

Aydın vd., (2015) Hemşin elmasından saflaştırmışlar PFO'yu; DE52-Selüloz iyon değişimi kolonu ve Sephadex G-25 kolonu kullanarak 78,5 kat saflaştırmışlardır. PFO'nun kinetik karakterizasyonu yapıldığında; optimum pH'sı 5.5 optimum sıcaklığı 30-40 °C, K_m değeri 3.40 mM, V_{max} değeri 333.3 EU/mL.dk olarak tespit edilmiştir.

Karabulut, (2017) Tortum elmasından PFO enzimini Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jeli kullanarak saflaştırmıştır. PFO'nun molekül kütlesi ve alt birimlerinin varlığı SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. Katekol ve 4-metil katekol substratı için optimum pH değeri sırasıyla 5.0 ve 5.5 olarak tespit edilmiştir. Katekol substratı için V_{max} değeri 20.83 $\mu\text{mol/L.dak}$, K_m değeri için 6.17 mM, 4-metil katekol için sırasıyla V_{max} ve K_m değerleri 4.16 mM, 32.26 $\mu\text{mol/L.dk}$ belirlenmiştir. IC_{50} değerleri ve K_i değerleri karşılaştırıldığında askorbik asitin en etkili inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

Kumar vd., (2008) tarafından polifenol oksidaz enzimi ile kiraz meyvesinden afinite kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak %8,3 verim ile 60 kat saflaştırılmış, termal stabilitesi ve kinetik parametreleri incelenmiştir. SDS-PAGE elektroforezi kullanılarak enzimin molekül ağırlığı hesaplandıktan sonra 38 kDa ve 52 kDa ağırlığına sahip iki bant göstermiştir. Doğal PAGE substrat boyaması ile enzim saflığının kontrolü; tek bant göstermiş olduğu için netleşmiştir. Enzimin optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak elde edilmiştir. L-Cysteine, 2- Mercapto ethanol, L-Ascorbate, Thiourea, Sodium metabisulphite, EDTA, Sodium azide, $CaCl_2$, sodium diethyl dithiocarbamate (SDDC), Sodium metabisulphite, L-sisteinin inhibisyon etkileri 1mM ve 10 Mm arasındaki konsantrasyonuna bakılmıştır, enzimi %60 değerinde thioürenin 1mM konsantrasyonunda inhibe ettiği ve 10mM konsantrasyonunda sodium diethyl dithiocarbamate ise tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir. K_m ve V_{max} değerlerinden anlaşıldığı üzere en etkili olan difenolik substratlarının enzimin katekol ve 4- metilkatekol olduğu görülmüştür.

Özkaya, (2018) çalışmalarında polifenoloksidaz enzimini, endemik *Salvia huberi* hedge bitkisinden $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve diyalizle kısmen saflaştırmıştır. Enzimin katalitik aktivitesi ve substrat spesifikliğı katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlenmiş ve V_{max}/K_m değerlerine göre en etkili substratı pirogallol olarak tespit edilmiş, bunu katekol ve 4-metil katekol substratlarının izlediğı gözlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için sırası ile 7,5, 5,0, ve 7,5 olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık değeri aynı substrat sırası ile 10 °C, 20 °C ve 35 °C olarak belirlenmiştir. Katekol ve pirogallol substratları için en etkili inhibitör askorbik asit, 4-metil katekol kullanıldığında en etkili inhibitör glutatyon olarak bulunmuştur.

Zhou vd., (2018) çalışmalarında armuttan polifenoloksidaz enzimini, ultrafiltrasyon, DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografisi ve sephadex G-25 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak % 0,2 verimle 32,93 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 44 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin kinetik karakterizasyonu çalışmalarında optimum pH değeri 5.5 ve optimum sıcaklığı 35 °C olarak bulunmuştur. PFO'nun inhibisyonu için askorbik asit, sitrik asit, kükürt dioksit, kojik asit ve tirol grubu içeren l-sistein, glutatyon ve peptitler kullanılmıştır. K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Çalışmada L-sisteinin armut suyunun işlenmesi sırasında enzimatik esmerleşme reaksiyonunu önlemek için uygun bir inhibitör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Derardja vd., (2017) latent formadaki (L-PaPFO) polifenoloksidaz enzimini kayısı (*Prunusarmenica*). Latent formadaki (L-PaPFO) polifenoloksidaz enzimini kayısıdan (*Prunusarmenica L.*) diyaliz, anyon değiştirici (Q-Sepharose FF) ve katyon değiştirici (MonoS 5/50 GL column) kullanılarak %51 verimle 23,2 kat saflaştırmışlardır. PFO'nun molekül kütlesi SDS-PAGE ile 63 kDa olarak bulunmuştur. PFO'nun monofenolik (fenolitiramin), difenolik (klorojenik asit, katekol, 4-metilkatekol, L-dopa, kaffeik asit, dopamin) trifenolik (pyrogallol) substratları varlığında aktivite tayinleri yapılarak en yüksek ilgisinin 4-metil katekol ($K_m= 2,0$ mM) ve klorojenik asit ($K_m= 2,7$ mM) substratları için olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklık çalışmasında 5-85 °C aralığında aktivitesini koruduğu, en yüksek aktivitesini 40 °C'de gösterdiği belirlenmiştir.

Öztürk vd., (2020) çay yapraklarından (*Camellia sinensis*) polifenoloksidaz enzimini afinite kromatografisi metodu ile saflaştırmışlar ve molekül kütlesini SDS-PAGE ile yaklaşık 50 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH, sıcaklık ve kinetik parametleri belirlenmiştir. K_m değerleri katekol ve 4-metil katekol substratı varlığında sırası ile 3.782 ve 3.881 mM olarak, V_{max} değerleri ise aynı sıra ile 1.676 ve 1.912 $\mu\text{mol/L/dk}$ olarak tespit edilmiştir. Enzimin sodyum metabisülfat, sodyum sülfat, askorbik asit, glutatyon, ditiyoeritriol için araştırılmış IC_{50} ve K_i değerleri tespit edilmiştir.

Ziyan ve Pekyardımcı., (2003) enginar bitkisinin gövde ve yaprağından PFO'yu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır. Optimum şartlarda katekol substratı 50mM olarak hesaplanmıştır. Altı farklı inhibitör kullanılarak yapılan çalışmada, enginar bitkisinin gövdesi ve yaprağını için en uygun inhibitörün tiyöüre ve sodyum azit olduğu görülmüştür.

Arslan vd., (2004) , polifenol oksidaz enzimini dut meyvesinden izole edilmiş, saflaştırma işlemini afinite kromatografisi ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Enzimin pirogallol, 4-metil katekol ve katekol substratları için yapılan optimum sıcaklık değeri $20\text{ }^\circ\text{C} - 45\text{ }^\circ\text{C}$, optimum pH değerleri 4,5- 8,0 farklılık gösterdiği belirtilmiştir.

Aydemir vd., (2003), çalışmalarında yer elmasından izole ettikleri PFO enziminin katekol ve L-DOPA substratları için katalitik aktivite gösterdiği ancak monofenolik bir substrat olan L-tirozin için aktivitesinin bulunmadığını gözlemlemişlerdir. Katekol substratı varlığında, K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 5,88 mM olarak ve 25,402 U/mg olarak hesaplanmıştır. Çalışmada en etkili olan inhibitörler ise tiyöürenin, potasyum siyanidve β -merkaptöetanol olarak belirlenmiştir.

Türkhan vd., (2018) çalışmasından polifenol oksidaz enzimini alıç meyvesinden aseton çöktürmesi işlemi uygulanarak karakterizasyon ve kısmi saflaştırma çalışması yapılmıştır. Polifenol oksidaz enzimi 3,58 kat, 139,5 verimle kısmi saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada enzimin optimum sıcaklık değeri $30\text{ }^\circ\text{C}$ olarak, optimum pH değeri ise 5,0 olarak elde edilmiştir. Katekol substratı kullanılarak V_{max} değeri 12.72 mM ve K_m değeri ve 5507 U/mL.dak belirlenmiştir. I_{50} değeri, sodyum metabisülfid, benzoik asit ve askorbik asit ile yapılmış olan inhibisyon çalışmasında sırasıyla 0,012 mM, 0,099 mM, 2,21 mM olarak tespit edilmiştir. Enzimin katekol substratına ilgisinin, substrat spesifikliğı çalışmasında; 4- metil katekol ve L-tirosin substratlarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Şakiroğlu vd., (2008) çalışmasında PFO'yu dereotundan izole etmiş ve kinetik parametreleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda K_m ve V_{max} değerleri hesaplamak için dopamin, katekol ve klorogenik asit substratları incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada substrat olarak katekol kullanılmıştır. İnhibitör olarak ise glutatyon, askorbik asit ve L-sistein klorür araştırılmıştır ve en etkili inhibitörünün L-sistein klorür olduğu belirlenmiştir.

Bravo ve Osorio (2016) yaptıkları bir çalışmada altın çilek meyvesinden (*Physalis peruviana* L.) polifenol oksidaz enzimini aseton çöktürme, %14 fosfat, %5 polietilen glikol 8000'den oluşan sulu iki fazlı sistemler kullanılarak (ATPS) yöntemi ile özüt hale getirilip saflaştırılmıştır. Yapılan incelemeler polifenol oksidaz enziminin en yüksek substrat afinitesi olarak 4-metil katekol, katekol ve klorojenik olduğu belirlenmiştir. Klorojenik asit ise enzim için en uygun substrat olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen K_m ve V_{max} değerleri içinsırasıyla $0,56 \pm 0,07$ mM, $53,15 \pm 2,03$ U/mL.dak olarak tespit edilmiştir. Enzim için en uygun sıcaklık değeri katekol baz alınarak 40 °C, optimum pH'sı 4-metilkatekol ve katekol için 5,5 ve klorojenik asit için 5,0, klorojenik asit için 20 °C ve 4-metil katekol için 25 °C olarak tespit edilmiştir. En güçlü inhibitör olarak L-sistein, askorbik asit ve kuersetin olarak belirtilmiştir. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak yapılan altın çilek meyvesinde polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlığı olarak tek bir bant olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığı ise ortama değeri 31 kDa olarak tespit edilmiştir.

Kolcuoğlu vd., (2018) çalışmalarında balmumsu mantardan bir polifenol oksidaz ailesinden bir difenolaz olan katekoloksidazı afinite kromatografisi ile saflaştırmış, en yüksek enzim aktivitesi, 4- metil katekol, DHPPA ve L-DOPA ile görülmüştür. Enzimin yaklaşık molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 58,1 kDa olarak belirlenmiş. Enzimin 4-metil katekol, DHPPA ve L- DOPA substratları için K_m değerleri belirlenmiş ve en iyi substratın 4-metil katekol olduğu görülmüştür. Enzimin üç farklı substrat için optimum pH, sıcaklık, stabil pH, termal kararlılık ve sodyum azit, sodyum metabisülfid, askorbik asit ve tiyoüre için K_i değerleri belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve organik solventlerin etkisi araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, ülkemizin birçok yerinde yabani olarak yetişen Yonuz erik (*Prunus divaricata* var) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Yonuz erik Amasya ili Merzifon ilçesinden temin edilmiş, deneysel çalışmalarda kullanılmaya kadar İğdır Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında -20 °C’de saklanmıştır.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Spektrofotometre	Agilent Cary 60- UV-Vis
Derin dondurucu (-20)	Arçelik
pH metre	Hanna
Otomatik pipetler	Axypet, Eppendorf
Vorteks	Wisemix Vm-10
Hassas terazi	Ohaus Starter 300
Elektroforez ünitesi	BioRad
Güç kaynağı	BioRad
Peristaltik pompa	BioRad
Saf su cihazı	GFL Typ 2001/4
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
UV-spektrofotometre küveti	1 cm ³ ve 3 cm ³
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	IKA-RH basic 2

3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması

1. 100 mM Katekol (pyrocatechol): 0.22 g katekol 20 mL saf su içerisinde çözüldü.
2. 100 mM 4-Metilkatekol: 0,248 gr tartıldı ve 10 mL saf su içerisinde çözüldü.
3. 100 mM DHPPA: 0,182 gr DHPPA 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
4. 100 mM Fenol: 0,094 gr fenol 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
5. 2,5 mM L-Tirozin: 0,0045 gr L- tirozin 10 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.
6. Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisi: 50 mM pH 5,0 CH₃COONa içinde %1 Polietilen glikol(PEG)-7000: 3,4 g CH₃COONa, 400 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH değeri CH₃COOH ile 5,0 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 500 mL'ye tamamlandı.
7. 10 mM MBTH: 0,011 g MBTH 5 ml saf su içerisinde çözüldü. Taze olarak hazırlandı.
8. 0,1 M (pH 10,0) NaHCO₃: 8,4 g NaHCO₃ 900 ml su içinde çözüldü. pH değeri 1 M'lık NaOH kullanılarak 10,0'a ayarlandı ve 1000 mL' ye saf su ile tamamlandı.
9. Afinite Kolonu Dengeleme ve Yıkama Çözeltisi (50 mM pH 5,0 CH₃COONa): 3,4 g CH₃COONa yaklaşık 400 ml suda çözüldü, CH₃COOH ile pH değeri 5,0'a ayarlandı 500 mL ye saf su ile tamamladı.
10. Afinite Kolonu Elüsyon Çözeltisi (50 mM pH:8,0 K₂HPO₄ / 1M NaCl): 5,85 g NaCl ve 6,2 gr K₂HPO₄ yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. pH değeri hidroklorik asit ile 8,0'e ayarlandı, saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
11. 0,2 M pH 8.8 NaHCO₃ Çözeltisi: 4,2 gr NaHCO₃ yaklaşık 200 ml suda çözüldü pH değeri NaOH kullanarak 8,8'e getirildi ve 250 mL'ye tamamlandı.
12. 1 mM Askorbik Asit: 35,44 mg askorbik asit 10 mL saf su içinde çözülerek hazırlandı.

13. 1 mM Na₂S₂O₅: 19 mg alınarak 10 mL saf suda çözüldü.
14. 100 mM Sitrik Asit: 0,42 g C₆H₈O₇ alınarak 20 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlandı.
15. 10 mM L-Sistein: 0,0121 gr L-sistein 10 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlandı.
16. 10 mM Kafeik Asit: 0,0180 gr kafeik asit 10 mL saf suda çözümlenerek hazırlandı.
17. 20 mM Tartarik Asit: 0,030 gr tartarik asit 10 mL saf suda çözümlenerek hazırlandı.
18. 20 mM Fumarik Asit: 0,0232 gr fumarik asit 10 mL saf suda çözümlenerek hazırlandı.
19. 20 mM Maleik Asit: 0,0268 gr maleik asit 10 mL saf suda çözümlenerek hazırlandı.
20. 1,5 M Tris-HCl Tamponu: 72,6 g Tris yaklaşık 300 ml saf su içinde çözünerek HCl ile 8,8'e pH'sı getirildi ve 400 mL'ye saf su ile tamamlandı.
21. 21.1 M Tris-HCl: 48,4 g Tris saf su içerisinde çözünerek HCl ile pH değeri 6,8'e ayarlandı ve saf suyla 400 mL'ye tamamlandı.
22. Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi (%10): 5 g SDS bir miktar suda çözüldü son hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.
23. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 2 g APS bir miktar su içinde çözüldü ve son hacim 20 mL'ye tamamlandı.
24. Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 0,4 g N,N'-metilen bisakrilamid ve 14,6 g akrilamid suda çözümlenerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
25. Yükleme Tamponu: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 400 µL %10 SDS, 60 µL β-merkaptoetanol, 250 µL %80 gliserol karıştırılarak hazırlandı.
26. Yürütme Tamponu: 1,5 g Glisin ve 7,2 g Tris bir miktar suda çözüldü ardından üzerine 10 mL % 10 SDS çözeltisi katıldı. 8,3'e pH ayarlandı ve

500 mL'ye tamamlandı.

27. Yükleme Tamponu: 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf su kullanılarak hazırlandı.
28. Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250 93,5 mL metanol ve 62,5 mL glasiyal asetik asit içinde çözüldü.
29. Destaining Çözeltisi: 800 mL CH₃OH, 200 mL glasiyal asetik asit ve 1200 mL saf su içinde çözüldü
30. Protein Tayini Çözeltisi: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 25 mL %98'lik etanol içinde çözüne kadar karıştırıldı, üzerine 150 mL %95'lik H₃PO₄ eklenerek ve saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Enzim Özütünün Hazırlanışı ve Soğuk Aseton Çöktürmesinin Yapılışı

Erik numunesinden 25 gr alınarak kabukları soyulup çekirdeği çıkarıldı, dondurma çözme yöntemi uygulanarak havanda ezildi. Ardından %1' lik PEG-7000 içeren 50 mM CH₃COONa (pH 5,0) tamponu eklendi (Aydemir, 2004). Numune dört katlı bezden süzüldü ve soğutmalı santrifüj kullanarak 4°C'de 9,500 rpm'de 40 dk santrifüjlendi. Süpernatantlar enzim özütü olarak kullanıldı. Süpernatanta aseton çöktürmesi işlemi uygulandı. Özüt üzerine hacmi kadar -20 °C'de tutulan soğuk aseton, denatürasyonu önlemek amacı ile buz banyosu kullanarak yavaşça katıldı ve 16 saat, +4 °C'de bırakıldı (Özen vd., 2004).

3.2.2. Aktivite Tayini

PFO aktivitesi tayini 4-metil katekol substratı için 496 nm'de diğer substratlar için 500 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans artışı ile belirlendi (Espin ve.ark., 1995). PFO aktivitesi belirlenirken, 100 µL enzim + 100 µL MBTH (10mM) + 20 µL DMF (orijinal şişeden) +100 µL substrat (100 mM) ve 680 µL tampon (50 mM fosfat pH: 6.0) çözeltisi eklenerek toplam hacmi 1000 µL tamamlanarak hazırlandı. Enzim içermeyen reaksiyon ortamı kontrol olarak kullanıldı (Kolcuoğlu, 2012).

Bir ünite PFO aktivitesi; optimum şartlarda, 1 mL reaksiyon ortamında 1 dk'da, 1µm substratı ürüne oksitleyen PFO miktarı olarak hesaplandı (Kolcuoğlu, 2012; Galeazzi vd., 1981).

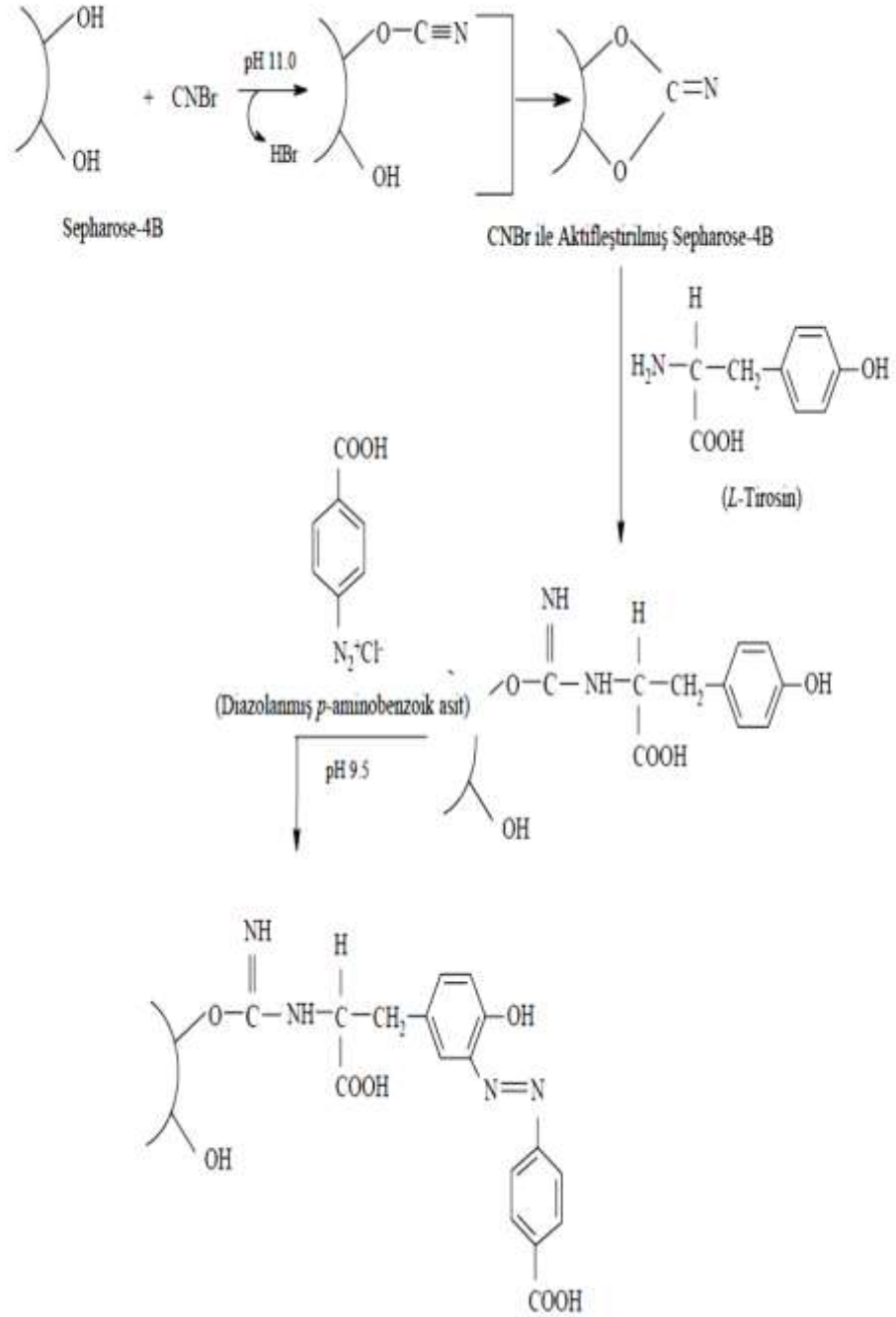
3.2.3. Afinite Kromatografisi

Yonuz erikten PFO enziminin saflaştırılması afinite kromatografisi metodu ile Arslan vd., (2004) tarafından geliştirilmiş olan jel sentezleme yöntemine göre yapıldı. CNBr ile aktiveleştirilen Sepharose-4B matriksi, uzantı kolu olarak L-tirozinle kovalent olarak bağlandı. Sepharose-4B-L-Tirozin p-amino benzoik jeli ise kullanılan metoda uygun bir şekilde kolon dolgusu olarak uygulandı.

3.2.4. Afinite Jelinin Sentezi

CNBr ile aktiveleştirilmiş 4,0 gr Sepharose-4B bir behere alınarak 10 ml saf su eklendi. Reaksiyon karışımının pH değeri 2M NaOH kullanılarak hızlı bir şekilde 11,0'a çıkarıldı. Karışım buz parçaları ile soğutuldu ve buchner hunisi yardımıyla süzgeç kağıdından geçirildi. Kalıntı, 0.1 M pH'sı 10.0 soğutulmuş NaHCO₃ tamponu kullanarak yıkandı ve süzüldü, ardından karışıma 10 mg L-tirozin bulunduran 0.1 M konsantrasyonda ve pH değeri 10.0 olan soğuk NaHCO₃ tamponu 20 mL'sine ilave edildi ve 90 dk sürekli olarak yavaş yavaş karıştırıldı. Ardından 4 °C'de 16 s bekletildi. Bu süre sonunda mavi banttın süzüldü ve süspansiyona, 280 nm'de absorbanans göstermediği duruma kadar saf su eklenerek yıkandı. Bu şekilde kalıntı L-tirozin uzaklaştırıldı.

Mavi bantta kalan kısma, 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu katıldı ve aynı tampondan 40 mL kullanarak alındı. 10 mL 1 M HCl buz banyosunda soğutulduktan sonra içerisine 25 mg p-aminobenzoik asit eklenerek çözdürüldü ve buz banyosuna bırakıldı. 5 mL saf su içerisinde çözülen p-aminobenzoik asit çözeltisi 75 mg NaNO₂ içerisine yavaş yavaş eklendi. Buz banyosunda 10 dk bekletilmiş karışıma 40 mL sepharose-4B-L-tirosin süspansiyonu ve 2 M NaOH eklendi, pH değeri 9,5'e çıkarıldı ve sabitlendi. Karışım 3 s boyunca 25°C'de karıştırıldı. Ardından mavi banta alınarak 1 lt saf su ile yıkandı. Bu işlemin ardından 200 mL 0.01 M pH 6.0 Na₂HPO₄ tamponuyla yıkanarak aynı tamponda dolaba kaldırıldı (Arslan vd., 2004). Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları şekilde gösterilmiştir.



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

3.2.5. Enzim Ekstraktının Afinite Kolona Yüklmesi ve Elüsyonu

Boyutu 1×15 cm olan cam kolona sentezlenen afinite jeli dikkatlice paketlenildi. Kolon 50 mM pH 5.0 asetat tamponu ile 280 nm’ de absorbens gözlenmeyinceye kadar yıkandı. Ardından enzim özütü eklendi ve safsızlıkları uzaklaştırmak için aynı tampon ile dengelendi. Bu şekilde polifenol oksidaz enzimi büyük oranda afinite jeline tutundu ve tutunamayan bütün safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Jelde kalan enzimler pH değeri 8,0 olan 1 M NaCl içeren fosfat tamponu ile 1 mL halinde ayrı ayrı tüplere alındı. Enzim eluatı bulunan her tüpte 280 nm’de protein tayini yapıldı ve 496 nm’de 4-metil katekol substratı ile aktivite tayini gerçekleştirildi.

3.2.6. Kalitatif Protein Tayini

Warburg metodu; proteinlerin yapısal elemanlarında fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerin 280 nm’ de absorbens göstermesi esasına dayanır (Warburg ve Christian, 1941). Bu yöntem kromatografi işlemi sonucu ortaya çıkan eşit hacimdeki elüatlarda yapıldı. UV-VİS-Spektrofotometre cihazında elüatların 280 nm’de absorbensları okundu. Absorbans gösteren elüatlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

3.2.7. Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı hesaplanırken Bradford yöntemi esas alındı (Bradford, 1976). 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi standart protein olarak kullanıldı. BSA çözeltisinden tüplere 10-100 µL olacak şekilde eklendi ve hacim 0,1 mL’ye kadar saf su eklendi ve ardından Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile son hacim 5 mL olacak şekilde ayarlandı. Tüpler vortex ile karıştırıldı. 10 dakika boyunca bekletildi ve sonra absorbens değerleri köre karşı 595 nm’de okundu. BSA bulunmayan tüp kör olarak kullanıldı. Absorbans değerleri standart grafik haline getirildi.

Ham özüt ve afinite kromatografisinden elde edilen saf enzim çözeltisinden 100 µL alındı ve üzerine 4900 mL ise reaktifi konularak vortex ile iyice karıştırılıp, absorbens değeri 595 nm’ ölçüldü ve protein miktarını belirlemek için standart grafikten yararlanıldı. Protein konsantrasyonu belirlenen enzim özütü ve saf enzim elüatının spesifik aktivitesi hesaplanarak, enzimin kaç kat saflaşmış olduğu hazırlanan saflaştırma tablosu yardımı ile tespit edildi.

3.2.8. SDS Jel Elektrofrezisi

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE), ayırma jeli % 10'lik ve yükleme jeli % 5'lik olarak yapıldı. Hazırlanan jel donduktan sonra yükleme tankına yerleştirildi ve sonrasında SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Standart olarak kullandığımız protein ve enzim örnekleri üzerine 50 µg yürütme boyası karıştırıldı. Örnekler 5 dakika boyunca 95 °C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklara yüklenildi. Yükleme bittikten sonra jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 120 dakika 25 mA'de yürütüldü. Jelin sonuna geldiğinde elektrik akımı kesildi ve jel camlardan dikkatlice çıkarıldı ve hazırlanmış olan boya çözeltisinde hafif olacak şekilde çalkalanarak 2 saat boyunca boyanma işlemi uygulandı. Protein bantları ortaya çıkarmak için boya uzaklaştırma çözeltisi kullanılarak 2 saat bekletildi. Ortaya çıkan bantlar kaydedildi.

3.2.9. Kinetik Çalışmalar

PFO'nun kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla monofenolik ve difenolik substratlar varlığında aktivite tayinleri yapılarak en etkili substratları belirlendi. En iyi aktivite gösteren katekol ve 4-metil katekol ve DHPPA substratlarının her biri için optimum pH ve optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Polifenol oksidazın inhibisyon çalışması 4-metil katekol substratı varlığında sekiz farklı inhibitör (askorbik asit, sitrik asit, L-sistein, sodyum metabisülfid, kafeik asit, maleik asit, tartarik asit, fumarik asit) kullanılarak yürütüldü. Her bir inhibitör için enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değeri hesaplandı.

3.2.9.1. PFO Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimin optimum pH değerini belirlemek amacıyla 50 mM glisin-HCl (pH 2,0-3,0), 50 mM sodyum asetat (pH 4,0-5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0-7,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tamponları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Katekol ve 4-metil katekol ve DHPPA substratlarının her biri için %bağıl aktivite-pH grafikleri çizildi ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri ise optimum pH olarak değerlendirildi (Kolcuoğlu, 2012).

3.2.9.2. PFO Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

PFO enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla katekol, 4-metil katekol ve DHPPA substratları kullanılarak 0-90 °C aralığında 10°C' lik artışlarla 10 dk inkübe edilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar %bağıl aktivite-sıcaklık olarak gösterildi (Türkhan vd., 2018).

3.2.9.3. PFO Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Polifenol oksidaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyon etkisini belirlemek için son konsantrasyonu 0,125-10 mM arasında değişen katekol, 4-metil katekol, ve DHPPA substratları varlığında optimum koşullarda PFO aktivitesi belirlendi. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini ifade etmektedir. K_m değeri ne kadar küçük ise enzimin substrata olan ilgisi o kadar büyüktür (Türkhan vd., 2018). Elde edilen sonuçlara göre K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver Burk grafiklerinden hesapladı (Lineweaver ve Burk, 1934). Substrat spesifikliğı çalışması V_{max}/K_m değerlerinin hesaplanması ile tespit edildi.

3.2.9.4. PFO Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

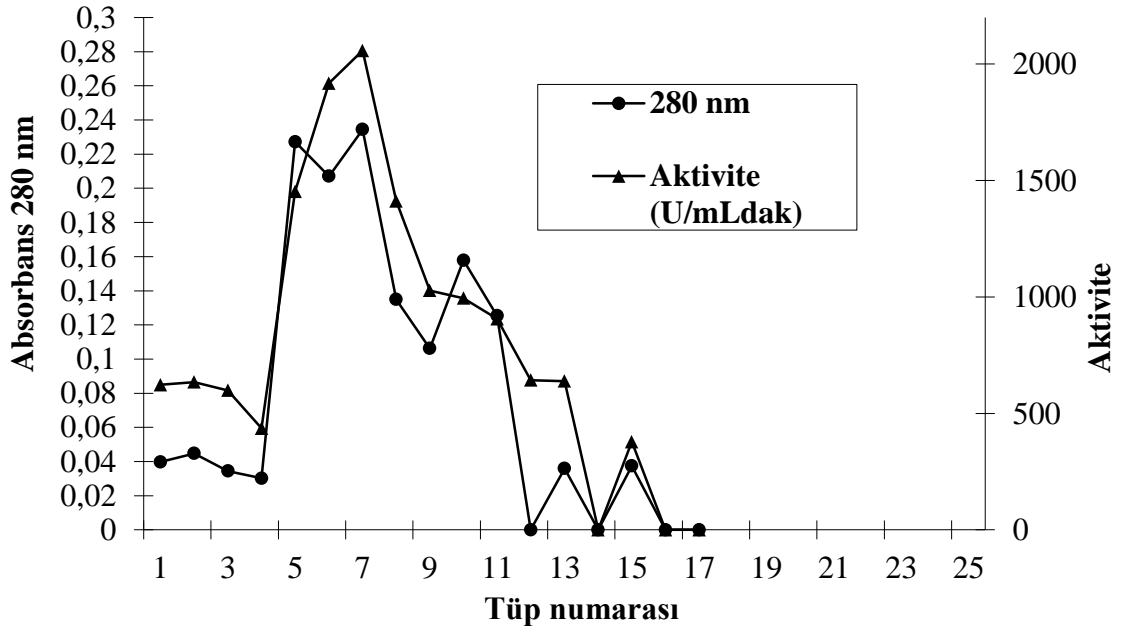
Polifenol oksidaz enzim aktivitesinin inhibitörlerle etkileşimini görebilmek için askorbik asit, kafeik asit, sitrik asit, sodyum metabisülfat, maleik asit, fumarik asit, tartarik asit ve L-sistein kullanılarak IC_{50} değeri hesaplandı. İnhibitör eklenmeyen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için %kalan aktivite grafiğı çizildi ve % 50 aktivitenin korunduğı değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu, IC_{50} değeri olarak belirlendi (Colak vd., 2007).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. PFO'nun Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Afinite kromatografisi, saflaştırma adımlarını kısaltan, yüksek saflaştırma katsayısı sağlayan, kullanışlı, tek adımda saflaştırma sağlayan güçlü bir kromatografik metottur (Urh vd., 2009). Çalışmamızda polifenol oksidaz enzimi Yonuz erikten (*Prunus divaricata* var) afinite kromatografisi metodu ile Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak saflaştırıldı. Afinite jeli Arslan vd., (2004) metoduna göre bölüm 3.2.4. de belirtildiği şekilde sentezlendi.

Kolondan enzim elüatları 2'şer mL olacak şekilde toplandı. Toplanan elüatlara spektrofotometrik olarak 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde 4-metil katekol substratı varlığında 496 nm'de aktivite tayini yapıldı. En yüksek PFO aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve sonraki çalışmalar için saklandı (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Afinite kromatografisi ile Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin Aktivite- Absorbans-tüp sayısı grafiği

Ham enzim özütü, aseton çöktürmesi ve saf enzim elüatında aktivite tayini, bölüm 3.2.2.'de ve Bradford yöntemi ile protein tayinleri bölüm 3.2.7'de belirtildiği gibi yapılarak saflaştırma tablosu hazırlandı (Bradford,1976) (Çizelge 4.1.). Çalışmamızda polifenol oksidaz enzimin Yonuz erikten Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak %5,97 verimle 12,80 kat saflaştırıldı.

Çizelge 4.1.Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite U/mg protein	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Özüt	100	2068	206800	0,22	21,9	9442,92	100	1
Aseton Çöktürmesi	30	1667	50010	0,15	4,36	11480,71	24,18	1,22
Afinite Kromatografisi	6	2058	12348	0,014	0,084	147000	5,97	12,80

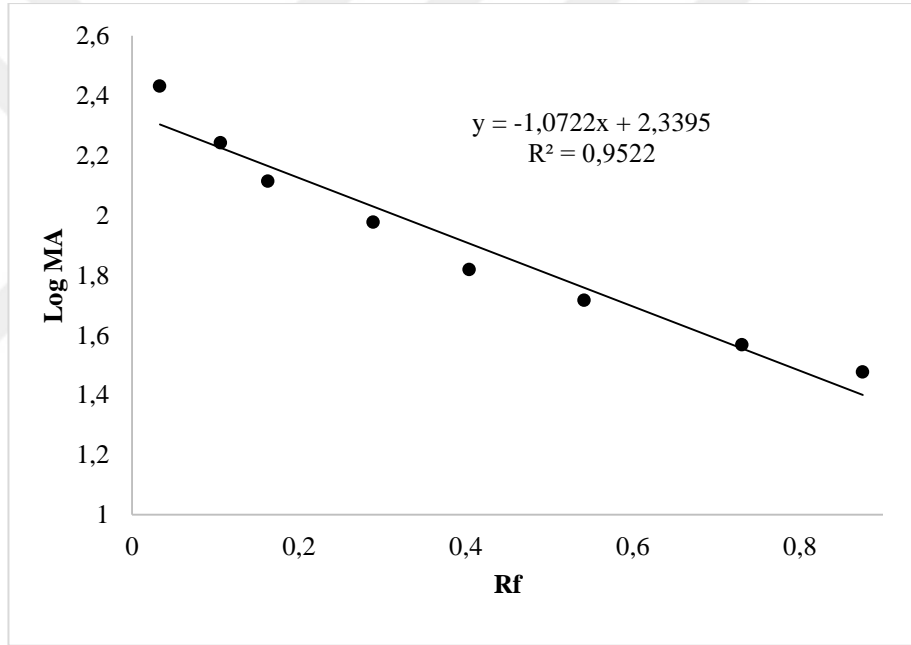
Benzer çalışmalarda polifenol oksidaz enzimi mürdüm eriğinden (*Prunus insititia*) amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ardından Sepharose-4B-L-Tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak %15,04 verimle 93,88 kat ve Sepharose-6B-L-Tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak %1,79 verimle 10, 46 kat saflaştırılmıştır. Mürdüm eriği polifenol oksidazının Sepharose-4B-L-Tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeline karşı daha seçici olduğu belirlenmiştir (Yıldız vd., 2022). Aynı afinite jeli kullanılarak polifenol oksidaz enzimi Isparta ilinde yetiştirilen yerel elma çeşidi olan Arap kızı (*Malus domestica*) elmasından %17,25 verimle 13.00 kat (Millioğlu, 2019), dut meyvesinden (*Morus alba* L.) 74,20 kat (Arslan vd., 2004), *Lactarius piperatus* L. mantarından 13,9 kat (Öz vd., 2013), Yaban armudundan (*Pyrus elaeagrifolia*) 31,50 kat (Yerlitürk vd., 2008) saflaştırılmıştır.

Polifenol oksidaz enziminin erikler izole edildiği diğer çalışmalarda farklı saflaştırma yöntemleri kullanılmıştır. PFO Vinete românești (*Prunus domestica*) çeşidi, erikten amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değiştirme kromatografisi kullanılarak % 3.04'lük verimle 32.81 kat saflaştırıldı (Ionita

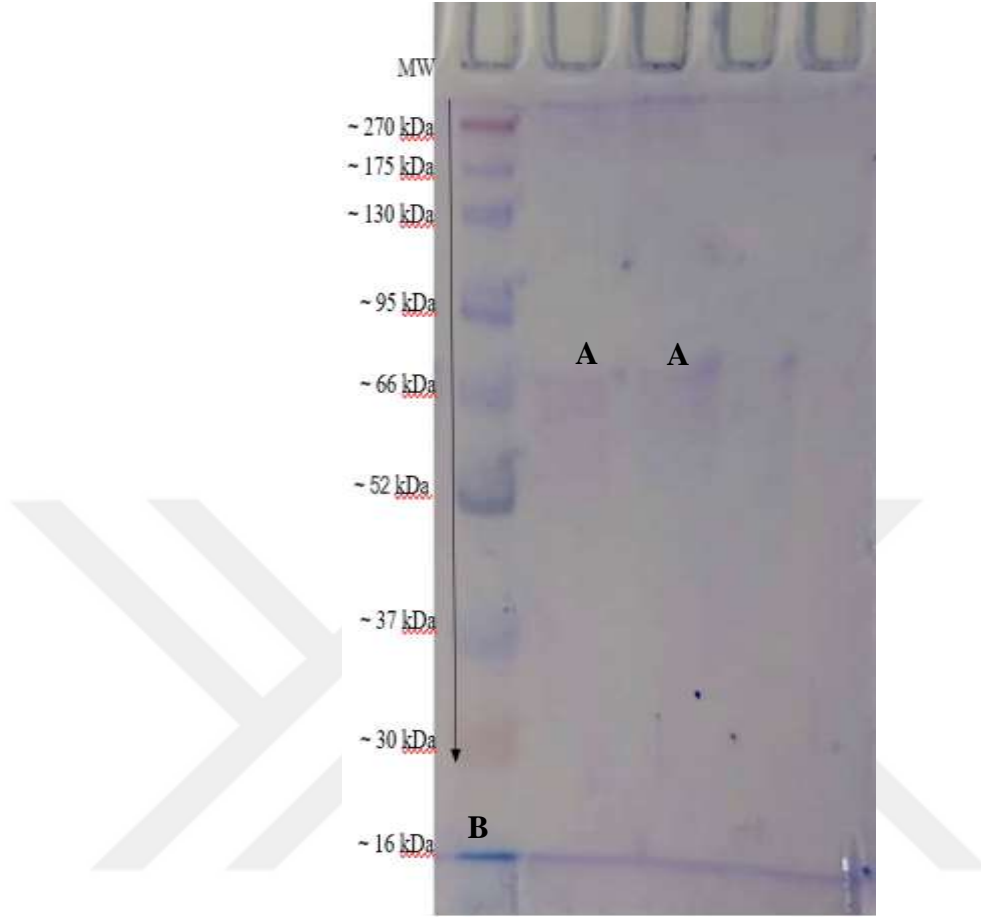
vd., 2017). PFO enzimi Stanley (*Prunus domestica* L.) çeşidi eriklerden sırası ile amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak %21,6 verimle 36.3 kat saflaştırılmıştır (Siddiq vd., 1992).

4.2. SDS-Polakrilamid jel elektroforezi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan polifenol oksidazın saflığının kontrolü SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirildi. (Laemli, 1970). Standart proteinler kullanılarak hazırlanan logMA-Rf grafiğinden faydalanarak enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 83,06 kDa olarak belirlendi (Şekil 4.2.).



Şekil4.2. Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart grafik



Şekil 4.3. Yonuz erikten saflaştırılan PFO enziminin SDS-PAGE fotoğrafı, A: Saf enzim elüatı, B: Protein standartı

Literatürde polifenol oksidaz enziminin birçok bitkisel dokuda, farklı molekül ağırlıklarda ve farklı molekül yapısında olduğu görülmektedir (Çiğdem ve Güller, 2022). Benzer çalışmalarda SDS-PAGE yöntemi kullanılarak; Posof Badele (*Malus domestica* L) elmasından saflaştırılan polifenol oksidazın molekül ağırlığı 36, 4 kDa (Çiğdem ve Güller, 2022), Kırmızı kışmış (*Vitis vinifera* L.) üzümünden saflaştırılan PFO için molekül ağırlığı 38,1 olarak (Kaya ve Bağcı, 2021), Miskali (*Vitis vinifera* L.) üzümünden elde edilen PFO enziminin molekül ağırlığı 68,55 kDa olarak (Beder, 2022), Vinete românesti (*Prunus domestica* L) eriğinden saflaştırılan PFO enziminin molekül ağırlığı 65kDa (Ionite vd., 2017), Avokadodan saflaştırılan PFO enziminin SDS-PAGE ile 35 kDa ve 50 kDa büyüklüğünde iki izoenzimi belirlenmiştir (Moeini Alishah vd., 2023). Borage (*Trachystemonorientalis* L.) bitkisinden saflaştırılan PFO enziminin molekül ağırlığı 80 kDa olarak belirlenmiştir (Alıcı ve Arabacı, 2016).

4.3. Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Karakterizasyonu

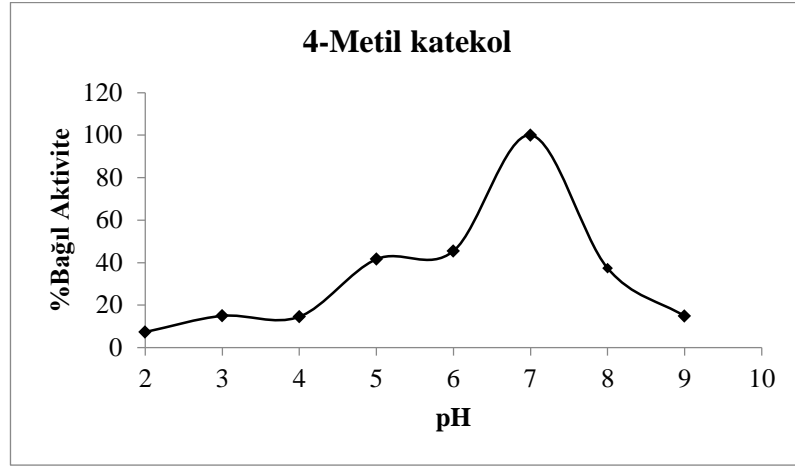
Yonuz erikten saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin monofenolik ve difenolik substratlar varlığında aktivite tayini yapıldı. En iyi aktiviteyi 4-metil katekol substratı varlığında gösterdiği belirlendi. DHPPA ve Katekol substratları varlığında aktivite oldukça yüksekti. Fenol ve L-tirozin substratları için çok daha düşük aktivite gösterdi. Bu durumda enzimin difenolaz aktvitesinin baskın olduğu belirlendi (Çizelge 4.2). Daha sonra yapılan karakterizasyon çalışmalarında substrat olarak 4-metil katekol kullanıldı.

Çizelge 4.2. Yonuz erik polifenol oksidazının substrat ilgisi

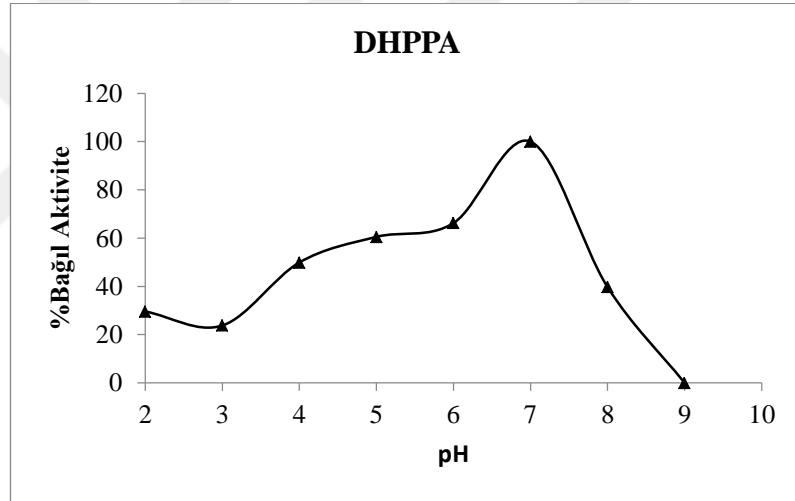
Substrat	Konsantrasyon (mM)	%Bağıl Aktivite
4-Metil Katekol	100	100
DHPPA	100	92,17
Katekol	100	78,58
Fenol	100	12,97
L-Tirozin	2,5	7,88

4.3.1. Optimum pH

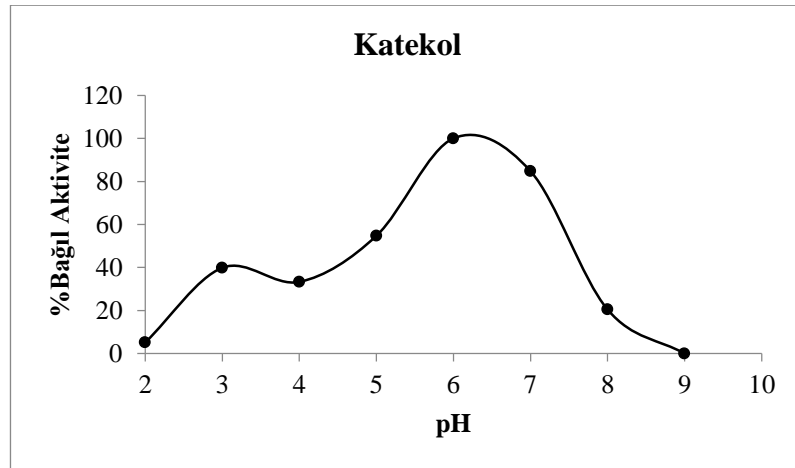
Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi pH 2,0-9,0 aralığında uygun tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla 50 mM glisin-HCl (pH 2,0-3,0), 50 mM sodyum asetat (pH 4,0-5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0-7,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tampon sistemleri varlığında, 4- metil katekol, katekol ve DHPPA substratları varlığında aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar %bağıl aktivite-pH grafikleri şeklinde sunuldu. Enzimin optimum pH değeri 4- metil katekol ve DHPPA substratları varlığında 7,0 ve katekol substratı varlığında 6,0 olarak belirlendi. Her üç substrat varlığında da asidik ve alkali koşullarda enzim aktivesini büyük oranda kaybetti.



Şekil 4.4. 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



Şekil 4.5. DHPPA substratı için optimum pH grafiği



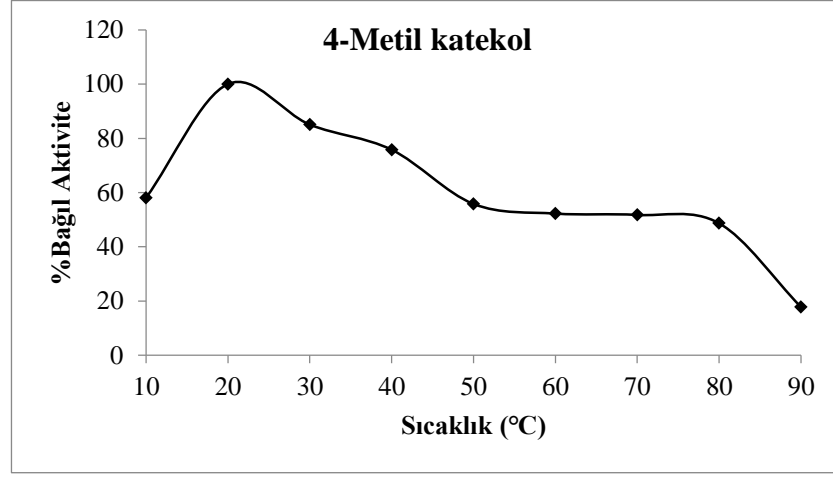
Şekil 4.6. Katekol substratı için optimum pH grafiği

pH aktif bölgedeki amino asitlerin iyonlaşma durumunu, bağlanma kuvvetini ve afiniteyi etkilediği için önemli bir parametredir (Benaceur vd., 2020). Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi pH'ya oldukça bağlıdır. Birçok çalışmada asidik ve alkali koşullarda enzim aktivitesinin önemli ölçüde kaybolduğu bilinmektedir. Asidik pH değerlerinde enzimin aktif bölgesinde bakırın etkinliği azalırken, pH 8,0 değerinin üzerinde, alkali koşullarda enzim konformasyonel değişikliklere uğrayarak hızla inaktif form kazanır (Kumar vd., 2008).

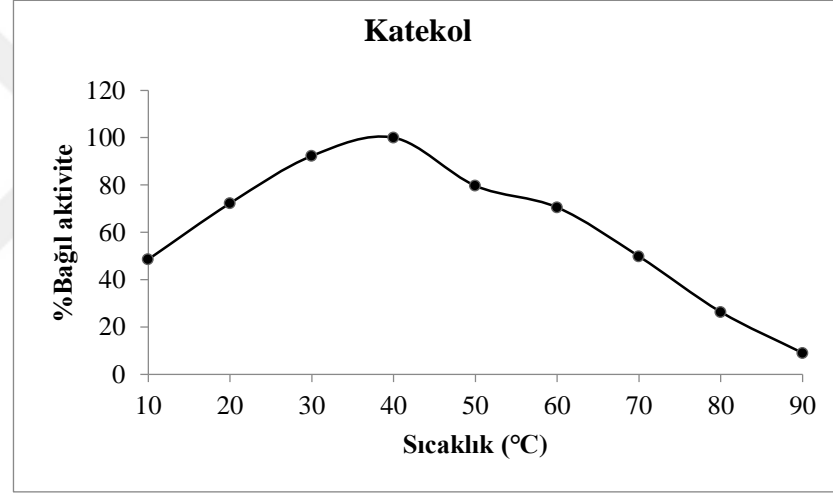
Truf (*Terfezia arenaria*) mantarından saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin optimum pH değeri 4-metil katekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol substratları kullanılarak sırası ile 4,0, 6,0, 6,5, ve 7,0 olarak belirlenmiş ve meyve ve sebzelerden elde edilen polifenol oksidazın optimum pH değerinin enzim kaynağına ve kullanılan substrata göre değiştiği bildirilmiştir (Benaceur vd., 2020). Yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Laccaria laccata* 'dan elde edilen polifenol oksidaz enzimi için 4-metil katekol, L-DOPA ve DHPPA substratları varlığında optimum pH değeri 4-metil katekol için 5,0 ve L-DOPA ve DHPPA substratları için 7,0 olarak belirlenmiştir. Farklı substratlar varlığında asidik ve nötral optimum pH değerlerinin katekolaz aktivitesine işaret ettiği bildirilmiştir (Kolcuoğlu vd., 2018). Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) polifenol oksidazının yedi farklı substrat için optimum pH değerleri, piragallol için 8,0, 4-metil katekol ve katekol substratları için 7,0, D-tirozin için 5,2, kafeik asit için 5,4, L-Dopa için 6,6, ferulik asit için 5,6 olarak belirlenmiştir. Enzimin nötral pH değerlerine yakın aralıklarda en aktif olduğu, pH 5,0 değerinin altında ve 8,5 değerinin üzerinde stabil olmadığı bildirilmiştir (Kumar vd., 2008). Sonuçlar çalışmamızla benzerdir.

4.3.2. Optimum Sıcaklık

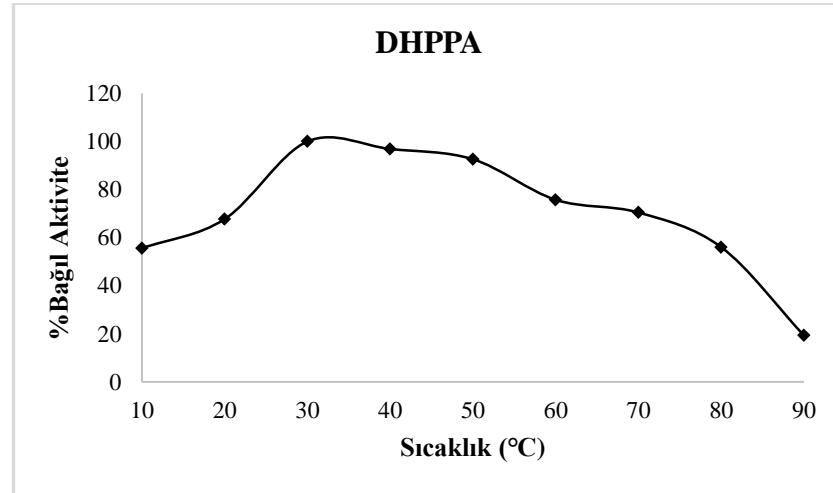
Yonuz erikten saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek için 10-90 °C sıcaklık aralığında her 10 °C'de katekol, 4-metil katekol ve DHPPA substratları kullanılarak aktivite tayini yapıldı (Bölüm 3.2.9.b.) Her bir sıcaklık değerinde enzim 10 dk inkübe edildi. Sonuçlar %bağıl aktivite-sıcaklık grafikleri şeklinde sunuldu (Şekil 4.7.-4.9). Enzimin en aktivite gösterdiği sıcaklık değeri, optimum sıcaklık 4-metil katekol, katekol ve DHPPA substratları varlığında 20 °C, 40 °C ve 30 °C olarak belirlendi. Enzim 20 °C ile 60 °C aralığında aktivitesini % 50 'den fazla oranda korudu.



Şekil 4.7. 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.8. Katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği

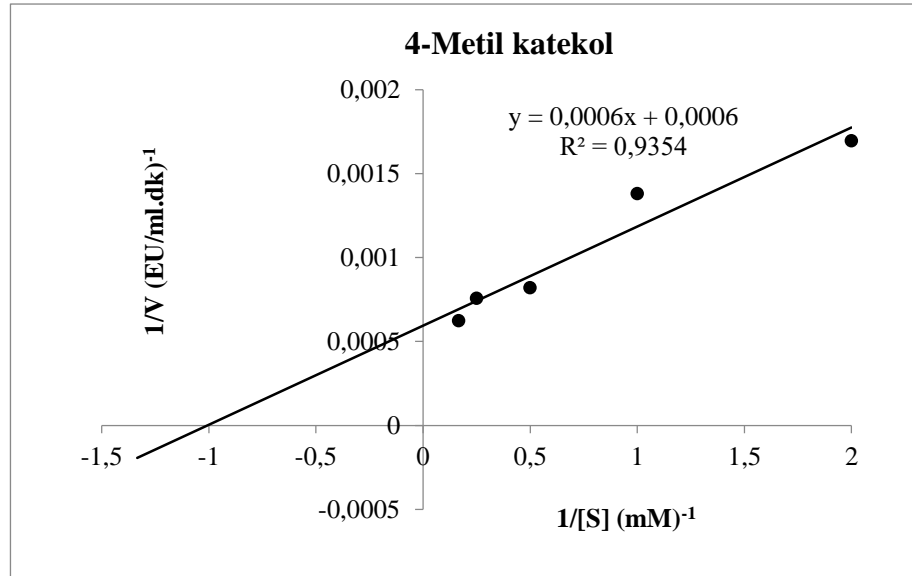


Şekil 4.9. DHPPA substratı için optimum sıcaklık grafiği

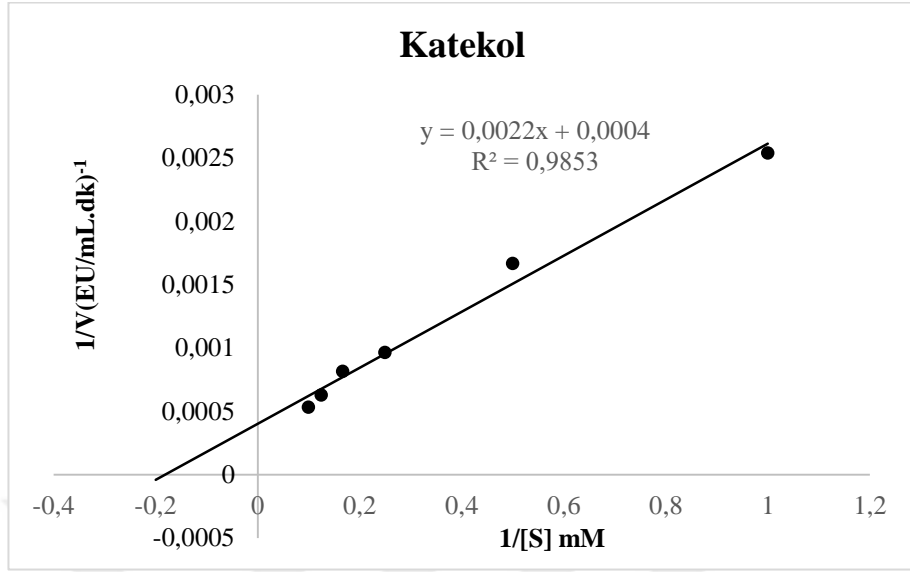
Benzer çalışmalarda, görev eriği polifenol oksidazı için optimum sıcaklık değeri, 4-metil katekol ve katekol substratları varlığında sırası ile 40 °C ve 30 °C, hidrokafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında ise 60 °C (Pakyıldız, 2016), badem çağlardan 4-metil katekol varlığında optimum sıcaklık değeri 35 °C (Güngör, 2008), İzmir üzümünden katekol için 25 °C (Önez, 2016), murt meyvesinden kateşin için 30 °C (Çınar, 2023), Nevşehir patatesinden katekol, gallik asit, pirogallol substratları için 20 °C olarak belirlenmiştir (Tozak, 2013).

4.3.3. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

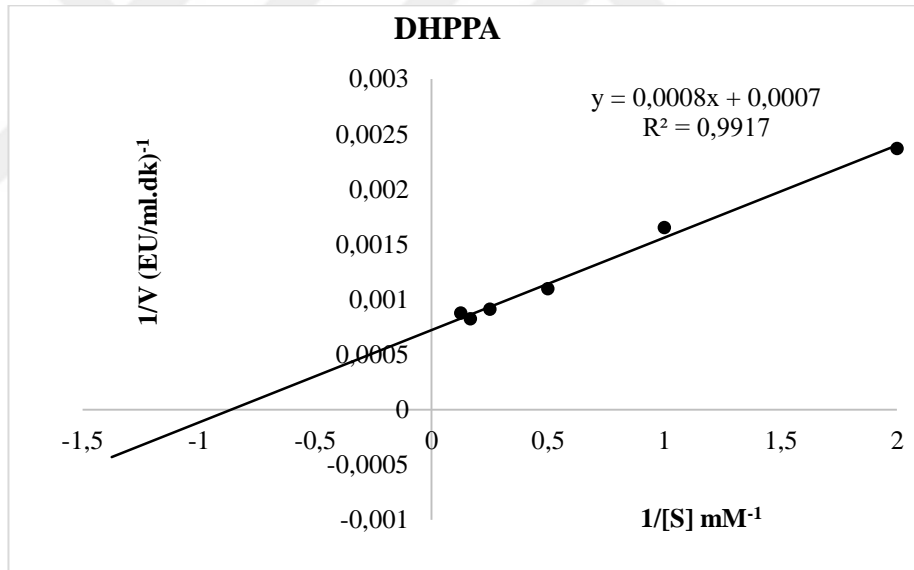
Yonuz erikten saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin katekol, 4-metil katekol ve DHPPA substratları varlığında K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden belirlendi. 4-metil katekol ve DHPPA substratlarının son konsantrasyonu 0,5-10 mM aralığında ve katekol için 1,0-10 mM aralığında olacak şekilde farklı substrat konsantrasyonlarında ve optimum koşullarda elde edilen enzim aktivite değerleri yardımı ile Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10.-4.12., Çizelge 4.3.). Enzimin ilgisinin en yüksek olduğu substrat, en düşük K_m ve en yüksek V_{max} değerine sahip olan (V_{max}/K_m değeri en büyük olan) 4-metil katekol substratı olarak belirlendi, bunu DHPPA ve katekol substratları izledi. Sonuçlar K_m , V_{max} ve V_{max}/K_m olarak Çizelge 4.3. de verildi.



Şekil 4.10. 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk Grafiği



Sekil 4.11. Katekol substratı için Lineweaver-Burk Grafiği



Sekil 4.12. DHPPA substratı için Lineweaver-Burk Grafiği

Çizelge 4.3. Yonuz erik polifenol oksidazının kinetik özellikleri

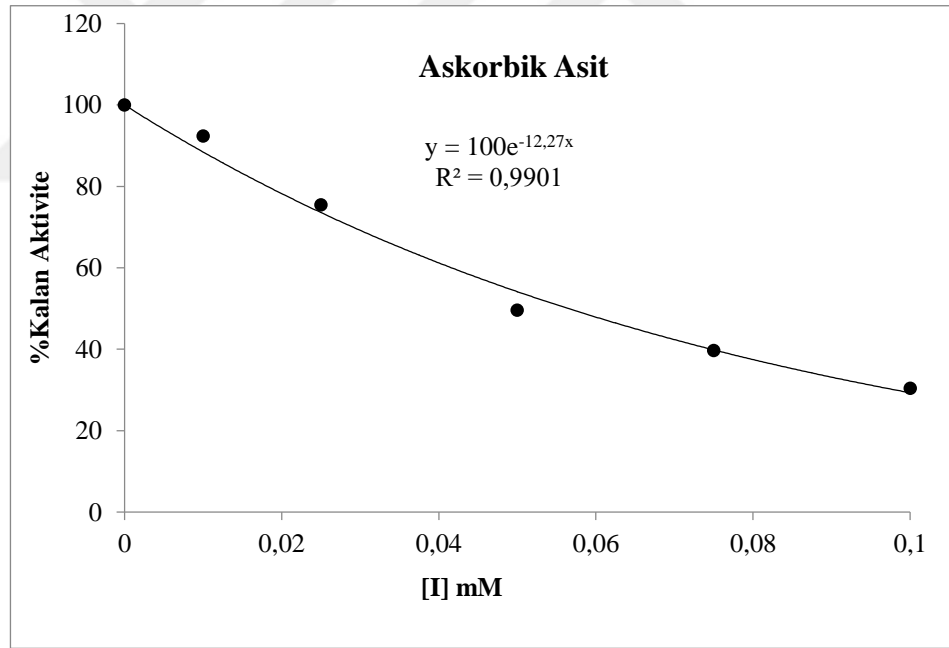
Substrat	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	K_m (mM)	V_{max} (EU/mL.min)	V_{max}/K_m (EU/mL/mM)
4-Metil Katekol	7,0	20	1,00	1666,67	1666,67
Katekol	6,0	40	5,53	2500,00	452,08
DHPPA	7,0	30	1,14	1428,57	1253,13

Yıldız vd., (2022) Damson plum (*Prunus insititia*)’da saflaştırdıkları polifenol oksidaz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerini sırası ile katekol için 11,67 mM; 17219, 97 EU/ml.dk, 4- metil katekol için 5,00 mM; 7309,72 EU/mL.dk., piragallol için 3,74 mM ve 12580,12 EU/mL.dk., ve kafeik asit için 6,25 mM ve 12100,41 EU/mL.dK., olarak belirlemişlerdir. Ionita vd., (2017) Vinete românești (*P. domestica*) eriklerden saflaştırdıkları polifenol oksidaz için substrat spesifikliğı çalışmasında monofenolik ve difenolik substratlar varlığında aktivite tayinleri yapılmış ve K_m ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Enzimin monofenolik sunstratlara karşı aktivitesi gözlenmezken difenolik substratlardan katekol, 4-metil katekol, L-Dopa, klorojenik asit, kateşin için aktivite göstermiştir. PFO enzimi etkili substratı katekol (K_m : 26,3 mM; V_{max} : 1193,4 OD/min), ardından 4-metil katekol (K_m ; 15.5 ± 2.85 mM V_{max} ;792.7 OD/min) olarak belirlenmiş ve enzimin o-difenolaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Yomra elmasından elde edilen polifenol oksidaz için 4-metil katekol, katekol, L-Dopa, MHPPA ve L-tirozin substratları kullanılarak K_m , V_{max} ve V_{max}/K_m değerleri belirlenmiş ve enzimin en etkili substratının en yüksek V_{max}/K_m değerine sahip katekol olduğu ($2,7 \text{ dak}^{-1}$), bunu 4-metil katekol ($2,5 \text{ dak}^{-1}$) substratının izlediğı bildirilmiştir (Can, 2010). Yaban mersini (*Myrtus communis* L.)’den saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini katekol substratı varlığında sırası ile 3,34 mM ve 4,21 U/mL.dk. olarak belirlemişlerdir (Çınar ve Aksay, 2022). Yenilebilir yabancı bir mantar olan balmumsu mantardan saflaştırılan polifol oksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 4-metil katekol için 0,25 mM ve 2500 U/mg protein, DHPPA için 0,83 mM ve 1666 U/mg protein L-Dopa için 0,40 mM ve 5000 EU/mg protein olarak belirlenmiş. Aynı

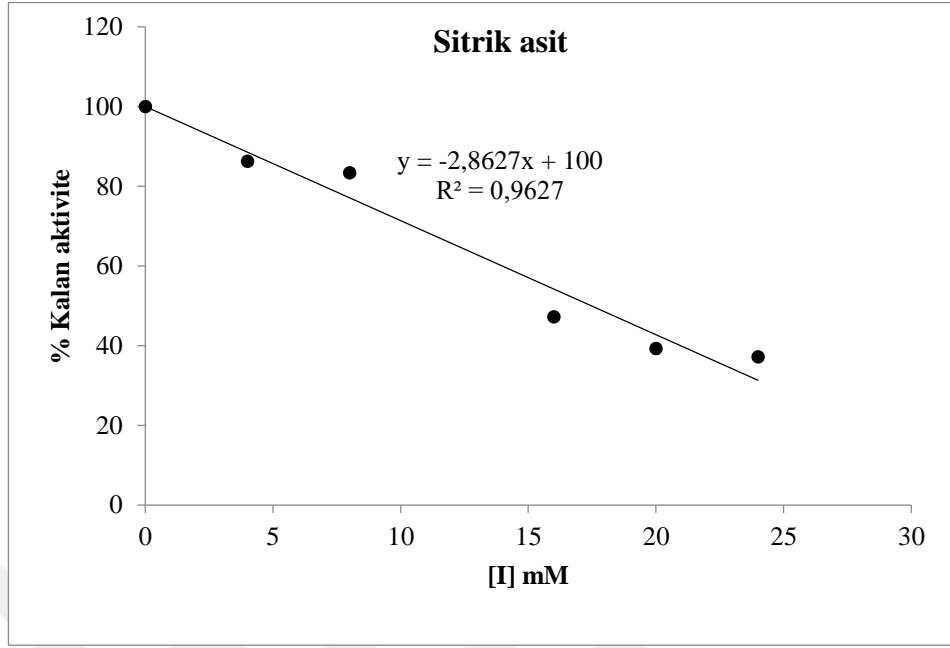
substratlar için V_{max}/K_m değerleri ise sırası ile 10000, 2007 ve 5000 olarak belirlenmiştir. Enzimin 4- metil katekol substratı varlığında en düşük K_m ve en yüksek V_{max} değerine sahip olduğu V_{max}/K_m değerinden belirlenmiştir (Kolcuoğlu vd., 2018).

4.3.4. İnhibitör Etkisi

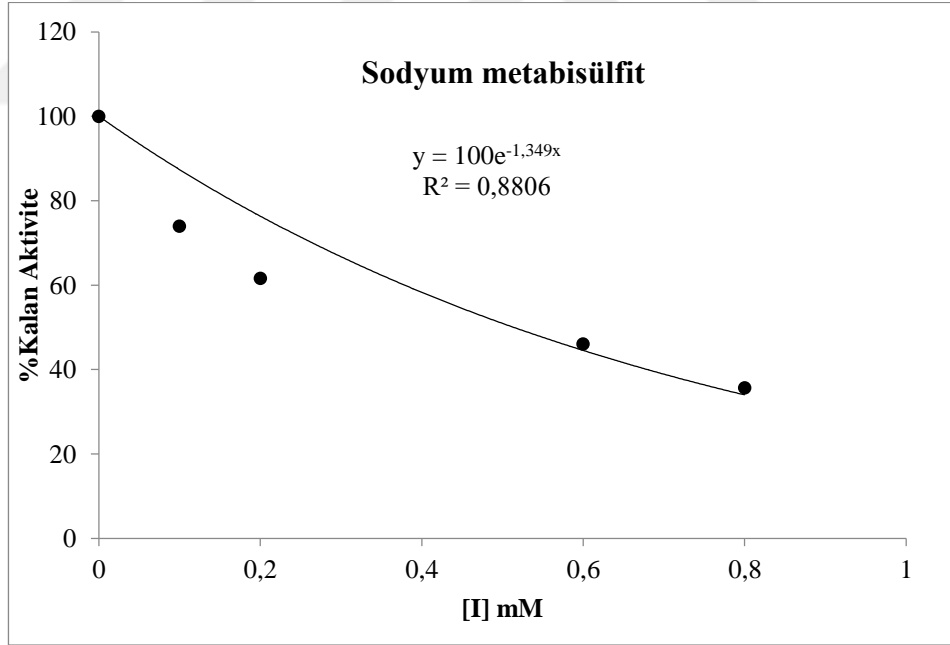
Yonuz erikten saflaştırılan polifenol oksidaz enzim aktivitesinin inhibisyonu PFO'nun yaygın kullanılan inhibitörleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla askorbik asit, sitrik asit, sodyum metabisüfit, L-sistein, kafeik asit, fumarik asit, maleik asit ve tartarik asit için PFO aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri 3.2.9.ç. de anlatıldığı şekilde %kalan aktivite-inhibitör konsantrasyonu grafiklerinden belirlenmiştir. İnhibitörsüz enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Yonuz erik PFO'sunu inhibisyon çalışmaları 4- metil katekol substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13-4.19)(Çizelge 4.4.).



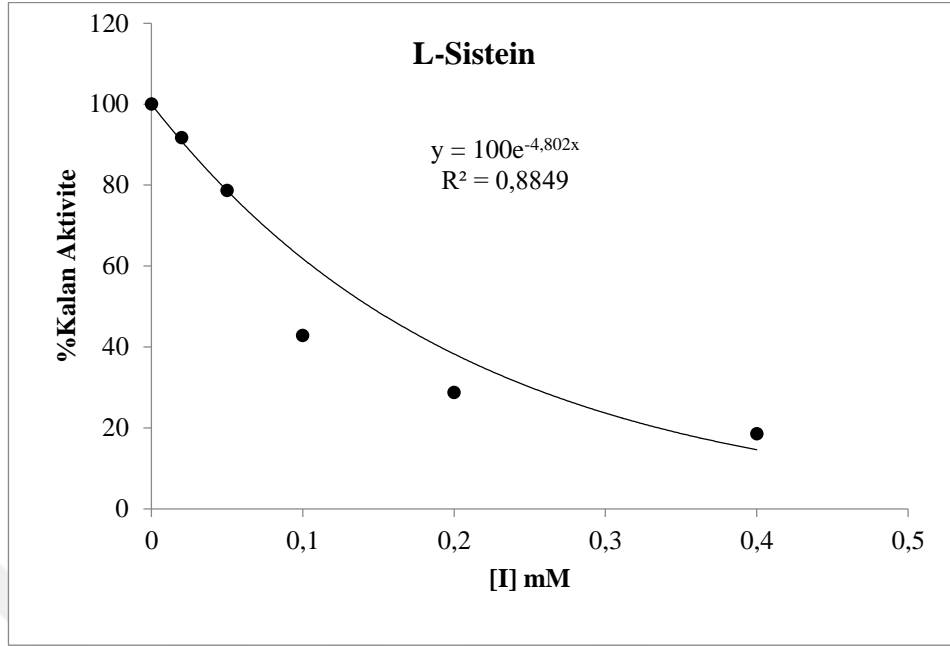
Şekil 4.13. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine askorbik asitin inhibisyon etkisi.



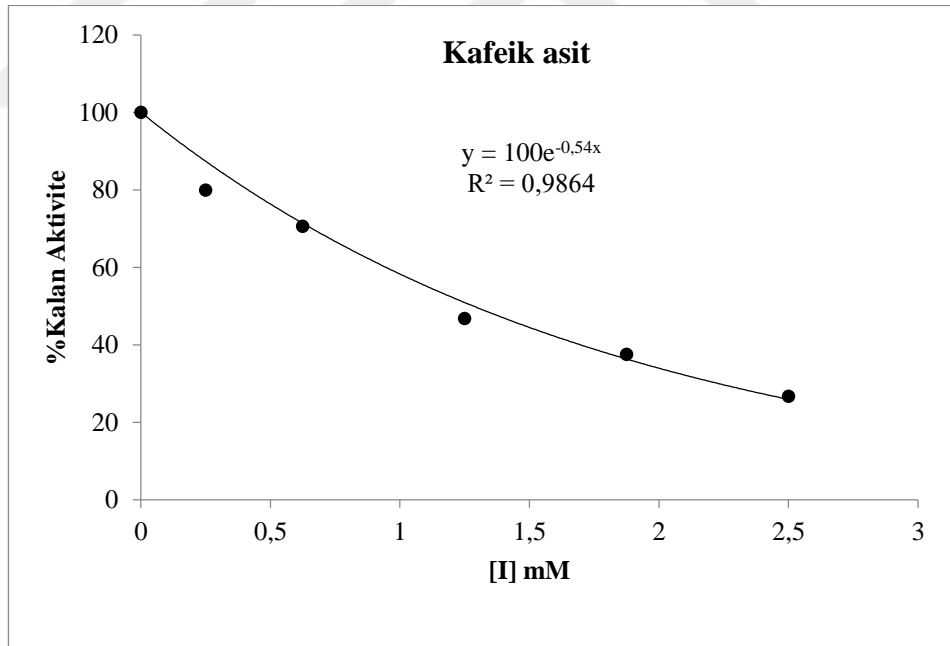
Şekil 4.14. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine sitrik asitin inhibisyon etkisi



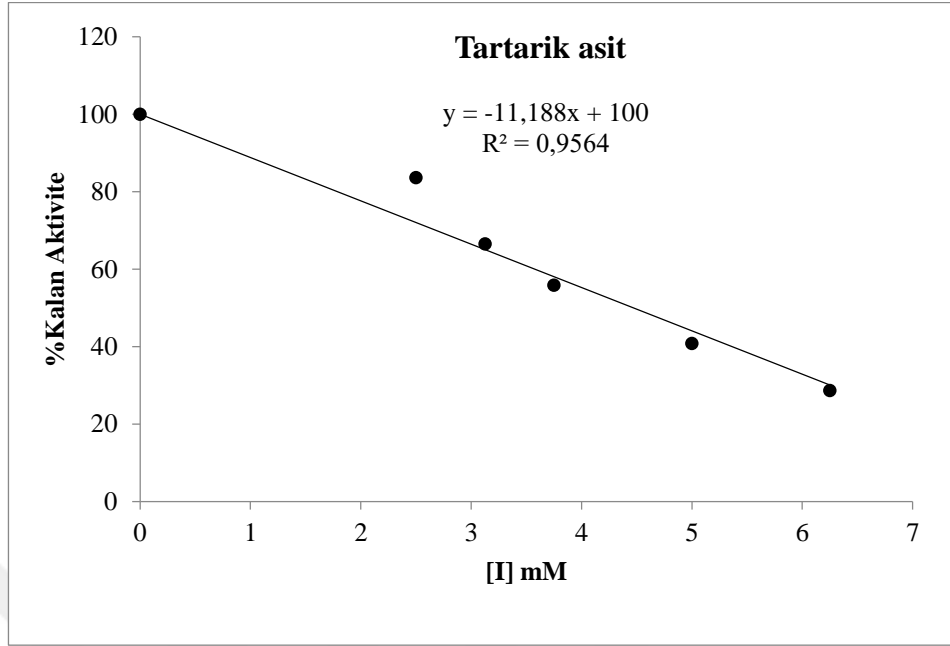
Şekil 4.15. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine sodyum metabisülfidin inhibisyon etkisi



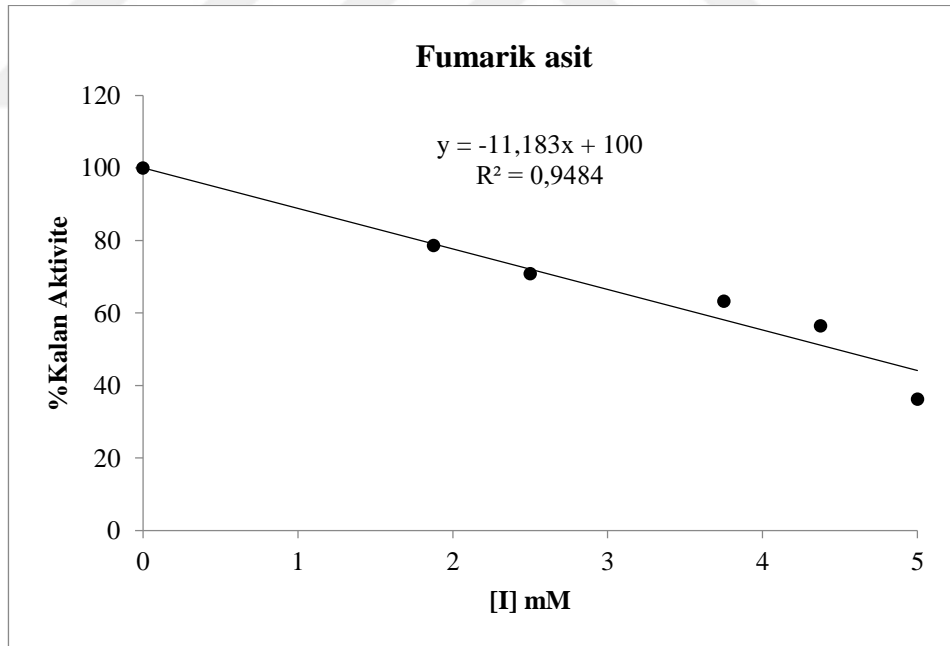
Şekil 4.16. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine L-sisteinin inhibisyon etkisi



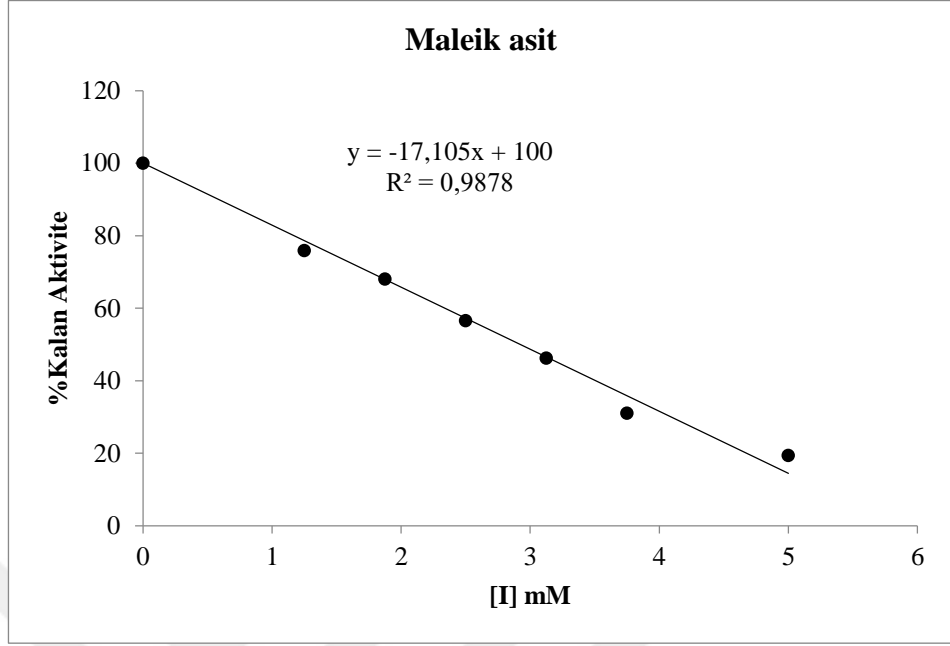
Şekil 4.17. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine kafeik asitin inhibisyon etkisi



Şekil 4.18. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine tartarik asitin inhibisyon etkisi



Şekil 4.19. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine tartarik asitin inhibisyon etkisi.



Şekil 4.20. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine maleik asitin inhibisyon etkisi

Çizelge 4.4. Yonuz erik PFO aktivitesi üzerine inhibitörle etkisi ile elde edilen IC_{50} değerleri

İnhibitör	IC_{50} (mM)
Askorbik Asit	0,0564
Sitrik Asit	17,465
Sodyum Metabisülfid	0,514
L-sistein	0,144
Kafeik Asit	1,283
Tartarik Asit	4,469
Fumarik Asit	4,472
Maleik Asit	2,923

Yonuz erikten elde edilen polifenol oksidaz enzimi için kullanılan inhibitörlerin IC₅₀ değerlerine bakıldığında en etkili inhibitörün askorbik asit (IC₅₀: 0,0564 mM) olduğu söylenebilir. En düşük inhibisyon etkisi sitrik asit (IC₅₀: 17,465 mM) ile gözlenmiştir. Askorbik asit polifenol oksidaz enziminin en iyi bilinen en etkili inhibitörlerinden biridir.

Çalışmamıza benzer şekilde; Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) saflaştırılan polifenol oksidazın inhibisyon çalışmalarında IC₅₀ değerleri askorbik asit, benzoik asit, L-sistein ve sodyum metabisülfid inhibitörleri için sırası ile 0,00654 mM, 5,370 mM, 0,078 mM ve 0,390 mM olarak belirlenmiştir. Enzimin etkili inhibitörünün askorbik asit olduğu bildirilmiştir (Çiğdem ve Güller, 2022). Çay yapraklarından (*Camellia sinensis*) saflaştırılan polifenol oksidazın katekol substratı varlığında sodyum sülfid, sodyum metabisülfid, askorbik asit, glutatyon ve ditiyoeritriol inhibitörleri kullanılarak belirlenen IC₅₀ değerleri sırası ile 21,65 µM, 23,90 µM, 69,31 µM, 99,08 µM, 99,02 µM olarak belirlenmiştir. Enzimin en etkili substratının sodyum metabisülfid olduğu bildirilmiştir (Öztürk vd., 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Yonuz erikten (*Prunus divaricata* var) polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak enzimin saflığına bakıldı. Katekol, 4-metil katekol ve DHPPA substratları varlığında Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanarak bulundu. Enzimin optimum pH, sıcaklık değerleri belirlendi. Sitrik asit, kafeik asit, askorbik asit, L-sistein, salisilik asit, maleik asit, sodyum metabisülfid, tartarik asit kimyasalları kullanılarak inhibisyon etkileri incelendi ve enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri belirlendi.

Polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu esmerleşme olayı sebze ve meyvelerde hem ekonomik hem de besin değeri açısından kayıplara neden olmaktadır. Esmerleşme olayının önüne geçmek için polifenol oksidaz enziminin aktivitesi kontrol altına alınmalıdır. Bu nedenle polifenol oksidaz enziminin aktivitesine etki eden değişkenleri bilmek önemlidir. Bu sayede meyve ve sebzelerde oluşan kayıplar en aza indirilebilir ve ekonomik kayıplarında önüne geçilebilir.

KAYNAKÇA

- Andrés, V., Villanueva, M. J., & Tenorio, M. D., (2016). The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. *Food chemistry*, 192, 328-335.
- Ali, H. M., El-Gizawy, A. M., El-Bassiouny, R. E., Saleh, M. A., (2015). Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PFO-catechol-cysteine reaction products. *Journal of food science and technology*, 52, 3651-3659.
- Alici, E. H., Arabaci, G., (2016). Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1051-1056.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S., Ozensoy, O., (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food chemistry*, 88(3), 479-484.
- Artık, N., & Ekşi, A. (1996). Bazı Yabancı Meyvelerin (Kuşburnu, Yemişen, Alaç, Yaban Mersini, Kızılcık) Kimyasal Bileşimi Üzerine Araştırma. *Gıda Sanayii*, 44, 21-22.
- Aydemir, T., Kavrayan, D., Çınar, S., (2003). Isolation and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, Konya, 21, 115-125.
- Aydemir, T., 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87, 59–67, DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.017.
- Aydin, B., Gulcin, I., & Alwasel, S. H., (2015). Purification and characterization of polyphenol oxidase from Hemşin apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, 18(12), 2735-2745.

- Başkaya Sezer, D., Erdoğan Tokatlı, K., Demirdöven, A., (2016). Çakal Eriği ve Yonuz Eriği Marmelatları. Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University. *Gaziosmanpasa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(1).
- Beder, F., 2022. *Polifenol Oksidaz Enziminin Miskali Üzümünden (Vitis vinifera L.) Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Gıda Katkı Maddelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması*. Iğdır Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Y.Lisans tezi. Iğdır.
- Benaceur, F., Chaibi, R., Berrabah, F., Neifar, A., Leboukh, M., Benaceur, K., Gargouri, A. (2020). Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from truffles (*Terfezia arenaria*). *International journal of biological macromolecules*, 145, 885-893.
- Bvenura, C., Sivakumar, D., (2017). The role of wild fruits and vegetables in delivering a balanced and healthy diet. *Food Research International*, 99, 15-30.
- Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brandelli, A., & Lopes, CH., 2005. Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 29(6), 624-637.
- Brunelle, JL ve Green, R. (2014). Tek boyutlu SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (1D SDS-PAGE). Enzimolojideki Yöntemlerde (Cilt 541, s. 151-159). *Akademik Basın*.
- Bravo, K., Osorio, E., (2016). Characterization of polyphenol oxidase from cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chemistry*, 197, 185–190.
- Can, Z., (2010). *Yomra Elmasından (Malus sylverstris) elde edilen polifenol oksidazın monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin incelenmesi*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana bilim Dalı Y.Lisans Tezi. Trabzon.

- Chu, H. L., Yeh, D. B., & Shaw, J. F. (1993). Production of L-DOPA by banana leaf polyphenol oxidase. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 34, 57-60.
- Colak, A., Sahin, E., Yildirim, M., Sesli, E., (2007). Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon. *Food Chemistry*, 103(4), 1426-1433.
- Çınar, F., & Aksay, S. (2022). Purification and characterization of polyphenol oxidase from myrtle berries (*Myrtus communis* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(3), 2282-2291.
- Çınar, F. (2023). *Murt (Myrtus Communis L.) meyvesinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Syf 26.
- Çiğdem, A., & Güller, U., 2022. Purification and characterization of catechol oxidase from Posof Badele apple (*Malus domestica* L): in vitro and in silico studies. *International Journal of Food Engineering*, 18(7), 513-524.
- Demir, H. (2002). *Bazı yabancı meyve türlerinin besin değerlerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma*. *Bahçe*, 31(1). Syf. 35
- Derardja, A. E., Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., Rompel, A., (2017). Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8203-8212.
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., (1995). A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 43, 2807–2812.
- de Faria, R. O., Rotuno Moure, V., Lopes de Almeida Amazonas, M. A., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2007). The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food technology and Biotechnology*, 45(3), 287-294.
- Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, P.A., Varon, R., Garcia-Canovas, F., 2000. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5865-5878

- Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. J. (1981). Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). *Journal of Food Science*, 46, 1404–1406.
- González-Cebrino, F., Durán, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., Ramírez, R., (2013). Changes after high-pressure processing on physicochemical parameters, bioactive compounds, and polyphenol oxidase activity of red flesh and peel plum purée. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 34-41.
- Guerrero-Beltran, J. A., Swanson, B. G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Inhibition of polyphenol oxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 38(6), 625-630.
- Güngör, K. (2008). *Çağla badem (Prunus Dulcis) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu* (Doctoral dissertation, Sakarya Üniversitesi (Turkey)). Syf. 57.
- Iqbal, A., Murtaza, A., Hu, W., Ahmad, I., Ahmed, A., & Xu, X., (2019). Activation and inactivation mechanisms of polyphenol oxidase during thermal and non-thermal methods of food processing. *Food and Bioprocess Processing*, 117, 170-182.
- Ioniță, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stănciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G., & Râpeanu, G., 2017. Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56, 177-185.
- Kanteev, M., Goldfeder, M., Fishman, A., (2015). Structure–function correlations in tyrosinases. *Protein Science*, 24(9), 1360-1369.
- Karabulut, Ş., (2017) *Tortum elmasından (Malus sylvestris) polifenol oksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi*. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum

- Kaya, E. D., & Bağci, O., 2021. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from Kirmizi Kismis grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13627.
- Kolcuoğlu, Y. (2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilent*a). *Process Biochemistry*, 47, 2449–2454.
- Kolcuoğlu, Y., Kuyumcu, I., Colak, A., (2018). A catecholase from *Laccaria laccata* a wild edible mushroom and its catalytic efficiency in organic media. *Journal of Food Biochemistry*, 42, e12605. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12605>.
- Kumar, V. A., Mohan, T. K., & Murugan, K., (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110(2), 328-333.
- Kuyumcu, İ., 2014. *Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan Lactarius eucalypt'ı O. K. Mill& R. N. Hilton'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 87.
- Liao, T., Zhou, L., Liu, J., Zou, L., Dai, T., Liu, W., (2021). Inhibitory mechanism of salicylic acid on polyphenol oxidase: A cooperation between acidification and binding effects. *Food Chemistry*, 348, 129100.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–666.
- Liu, W., Zou, L., Liu, P., Zhang, Z., Liu, C., & Liang, R., (2013). The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation of mushroom polyphenoloxidase. *Food Chemistry*, 140, 289–295.
- Martinez, M., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8)
- Matheis, G., & Whitaker, J. R., (1984). Peroxidase-catalyzed cross linking of proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 3, 35-48.

- McEvelly A.J., Iyengar R., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3), 253-273
- Millioğlu, Ö., (2019). *Arap Kızı Yerel Elma Çeşidinde Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Killerle İmmobilizasyonu ve İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi*. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Tarımla Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Isparta.
- Min, K., Park, K., Park, D. H., & Yoo, Y. J., (2015). Overview on the biotechnological production of L-DOPA. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(2), 575-584.
- Moeini Alishah, M., Yıldız, S., Bilen, Ç., Karakuş, E., (2023). Purification and characterization of avocado (*Persea americana*) polyphenol oxidase by affinity chromatography. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53(1), 40-53.f
- Mesquita, V.L.V., & Queiroz, C., (2013). Enzymatic browning. Chapter X. *Biochemistry of foods*, 387-418.
- Nawaz, A., Shafi, T., Khaliq, A., Mukhtar, H., ul Haq, I. (2017). Tyrosinase: sources, structure and applications. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 3(5), 142-148.
- Núñez-Delgado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M., (2005). Polyphenol oxidase from Dominga table grape. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 6087-6093.
- Önez, Z. (2006). *Üzümünden (vitis vinifera L.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü). Syf. 59.
- Öz, F., Çolak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N., Sesli, E., (2013). Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 36-44.
- Özel, A., 2008. *Boletus Erythropus Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi*. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 110.

- Özen, A., Colak, A., Dincer, B., Güner, S. (2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., *Ebenaceae*). *Food Chemistry*, 85, 431–437.
- Özkaya, P., (2018). *Endemik Salvia Huberi HEDGE türünün polifenol oksidaz aktivitesi*. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir.
- Öztaş, D. (2007). *Tirosinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı* (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 11-14). Syf. 38.
- Öztürk, C., Aksoy, M., Küfrelioğlu, Ö. İ., (2020). Purification of tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 31–38.
- Pakyıldız, S., (2016). *Gövem Eriği (Prunus Spinosa L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Rize. Syf. 37.
- Panadare, D., & Rathod, V. K., (2018). Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 431-437.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları. *Gıda*, 17: 181.
- Peng, L., Jiang, Y. (2006). Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. *Food Chemistry*, 94(4), 535-540.
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29-36.
- Rahman M.S., 2007. *Handbook of Food Preservation*. Second Edition, CRC Press.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V. L., (2008). Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24(4), 361-375.

- Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R., López-Gómez, A., Marín-Iniesta, F., (2016). *Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate Saccharomyces cerevisiae in natural orange and pomegranate juices*. *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie)*, 73, 140-146.
- Saranya, G., Jiby, M. V., Jayakumar, K. S., Pillai, P. P., Jayabaskaran, C., (2020). L-DOPA synthesis in *Mucuna pruriens* (L.) DC. is regulated by polyphenol oxidase and not CYP 450/tyrosine hydroxylase: an analysis of metabolic pathway using biochemical and molecular markers. *Phytochemistry*, 178, 112467.
- Sezer, E., İnançlı, L., 2013. Gıda Sanayinde Yüksek Basınç Uygulamalarındaki Besin Kayıpları. *KSÜ Doğa Bil. Dergisi*, 16,4, 2013.
- Sharma, K., Bari S.S., Singh H.P., (2009). Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 253–258.
- Siddiq, M., Sinha, N. K., Cash, J. N., (1992). Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. *Journal of Food Science*, 57(5), 1177-1179.
- Steffens, J. C., Harel, E., Hunt, M. D., (1994). Polyphenol oxidase. *Genetic engineering of plant secondary metabolism*, 275-312.
- Sui, X., Meng, Z., Dong, T., Fan, X., & Wang, Q., (2023). Enzymatic browning and polyphenol oxidase control strategies. *Current Opinion in Biotechnology*, 81, 102921.
- Şakiroğlu, H., Öztürk, A.E., Pepe, A.E. Erat, M., (2008). Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from dill (*Anethum Graveolens*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(3), 380-385.
- Türkhan, A., Kaya, E.D., Yılmaz, İ., (2018). Alıç (*Crataegus Monogyna*) meyvesinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22,3:1048-1054.
- Türkhan, A. (2018). *Ağşeftali'sinden (Prunus persica L.) polifenol oksidazın saflaştırılması, immobilizasyonu ve karakterizasyonu*. Syf. 81.

- Tozak, K. Ö. (2013). *Nevşehir patatesinden (Solanum Tuberosum L.) polifenol oksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılarak kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi* (Master's thesis, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü). Syf. 46.
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology*, 463, 417-438.
- Yerlitürk, F. Ü., Arslan, O., Sinan, S., Gencer, N., & Güler, Ö. Ö., (2008). Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Pyrus elaeagrifoli*). *Journal of Food Biochemistry*, 32(3), 368-383.
- Yıldız, S., Bilen, Ç., & Karakuş, E., (2022). Purification of *damson plum* polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of metal effects on enzyme activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(9), 1019-1034.
- Yılmaz, L., Elmacı, Y., (2018). Polifenol oksidaz Enzimi İnaktivasyon Yöntemleri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(3:333-345).
- Yoruk, R., & Marshall, MR., (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Wang, H, Li, S., Li, J., Zhong, L., Cheng, H., Ma, Q., (2020). Immobilized polyphenol oxidase: Preparation, optimization and oxidation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 160 (2020) 233–244.
- Warburg, O., Christian, W., (1941). Isolierung und kristallisation des garungsfermente enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310, 384–421.
- Whitaker, JR., (1995). *Polyphenol* oxidase. In Food enzymes: structure and mechanism 271-307. Boston, MA: Springer US.
- Zhou, L., Zhang, Y., Hu, X., Liao, X., He, J., (2009). Comparison of the inactivation kinetics of pectin methylesterases from carrot and peach by high-pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 115(2), 449-455.

- Zhou, X., Xiao, Y., Meng, X., Liu, B., (2018). Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by L-cysteine. *Food Chemistry*, 266, 1–8.
- Zhou, L., Liao, T., Liu, W., Zou, L., Liu, C., Terefe, N. S., (2020). Inhibitory effects of organic acids on polyphenol oxidase: From model systems to food systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(21), 3594-3621.
- Ziyan, E., Pekyardımcı, Ş., (2003). Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27(2), 217-226.

