

**DONDURULARAK MUHAFAZA EDİLEN BAZI
SEBZELERDE PEROKSİDAZ VE LİPOKSİGENAZ
ENZİMLERİNİN PİGMENT KO-OKSİDASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

131049

**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF PEROXIDASE
AND LIPOXYGENASE ON PIGMENT CO-OXIDATION IN
SOME FROZEN VEGETABLES**

ARDA SERPEN

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

2003

131049
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Jale ACAR

Üye

.....
Prof. Dr. Nevzat ARTIK

Üye
(Danışman)

.....
Doç. Dr. Vural GÖKMEN

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof. Dr. Seyfi KULAKSIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

.....
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

DONDURULARAK MUHAFAZA EDİLEN BAZI SEBZELERDE PEROKSİDAZ VE LİPOKSİGENAZ ENZİMLERİNİN PİGMENT KO-OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Arda Serpen

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada, bezelye ve havuç örnekleri indikatör olarak lipoksigenaz (LOX) ve peroksidaz (POD) enzimlerinin seçildiği iki farklı durum için haşlanmış ve -18°C 'de 12 ay depolanmıştır. Depolama boyunca haşlanmış ve haşlanmamış bezelye örneklerinin klorofil içerikleri, havuç örneklerinin ise β -karoten içeriklerindeki değişim incelenmiştir.

Haşlanmamış bezelyelerdeki klorofil a / klorofil b miktarları -18°C 'de 12 ay sonunda sırasıyla %42.86 / %21.46 oranında azalmıştır. İndikatör olarak LOX ve POD enzimleri seçilerek haşlanmış bezelyelerin klorofil a ve klorofil b miktarları 12 ay sonunda ise sırasıyla %61.02 / 48.76 ve %48.62 / %38.21 oranında azalmıştır. Depolama boyunca bezelyelerde klorofil a ve klorofil b azalışı 1. derece kinetik modele uygun seyretmiştir.

Haşlanmamış havuçlardaki β -karoten miktarı -18°C 'de 12 ay depolama sonunda %24.50 oranında, indikatör olarak POD seçilerek haşlanmış havuçlarda ise %9.00 oranında azalmıştır. Havuçlarda ölçülebilir düzeyde LOX aktivitesi saptanamamıştır. Depolama boyunca havuçlarda β -karoten azalışı 1. derece kinetik modele uygun seyretmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise bezelye ve havuçlardan elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılarak, model ortamda LOX ve POD enzimlerinin β -karoten ve klorofil a ve b pigmentlerinin ko-oksidadasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. LOX katalizörlüğünde gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında β -karoten konsantrasyonu arttıkça, linoleik asitten konjuge dien oluşum hızının ve β -karoten ko-oksidadasyon hızının azaldığı gözlenmiştir. Eşit konsantrasyonda linoleik asit ve β -karoten olan durumda ise konjuge dien oluşumu ve β -karoten ko-oksidadasyonunun tamamen durduğu gözlenmiştir. Klorofillerin etkisi β -karotene kıyasla daha sınırlı düzeyde gerçekleşmiştir. Model ortamda linoleik asite eşit konsantrasyonda pigment varlığında LOX enziminin linoleik asit

hidroperoksidasyon aktivitesi β -karoten, klorofil a ve klorofil b için sırasıyla %100, %14.8 ve %23.6 oranında engellenmiştir. Kinetik değerlendirmeler β -karoten ve klorofillerin LOX enzimi için rekabetçi olmayan inhibitör olarak davrandığını göstermiştir. β -karoten, klorofil a ve klorofil b için K_i değerleri sırasıyla 0.25 μ M, 11.6 μ M ve 6.6 μ M olarak belirlenmiştir.

Model ortamda POD enziminin β -karoten oksidasyonu üzerine etki etmediği, ancak klorofillerin belli oranda oksidasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ortamda 1.56 μ M klorofil a ve klorofil b olan durumda POD etkisiyle guayakol oksidasyonunun sırasıyla %13.6 ve % 8.4 oranında azaldığı belirlenmiştir. 5 dakikalık reaksiyon sonunda klorofil a ve klorofil b miktarlarındaki azalma ise %12.5 ve %5.1 olarak gerçekleşmiştir.



Anahtar Kelimeler: Pigment ko-oksidasyonu, dondurulmuş sebze, peroksidaz, lipoksigenaz, inhibisyon

Danışman : Doç. Dr. Vural GÖKMEN, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF PEROXIDASE AND LIPOXYGENASE ON PIGMENT CO-OXIDATION IN SOME FROZEN VEGETABLES

Arda Serpen

Hacettepe University, Food Engineering Section

ABSTRACT

In this study, peas and carrots were blanched in hot water at two different time and temperature combinations using lipoxygenase (LOX) and peroxidase (POD) as the indicator enzyme separately. Unblanched and blanched samples were then stored at -18°C for 12 months. The changes of chlorophyll contents in peas and β -carotene contents in carrots were determined for blanched and unblanched samples through storage.

The chlorophyll a and chlorophyll b contents of unblanched peas decreased at a ratio of %42.86 and %21.46 respectively at the end of 12 months of storage at -18°C . Chlorophyll a and chlorophyll b contents of blanched peas decreased at a ratio of %61.02 and % 48.76 using LOX as the indicator enzyme and those of %48.62 and %38.21 using POD as the indicator enzyme, respectively. The chlorophyll degradation followed first order reaction kinetics pattern for both blanched and unblanched peas during frozen storage.

The β -carotene contents of unblanched and blanched carrots using POD as the indicator enzyme decreased at a ratio of %24.50 and %9.00 respectively at the end of 12 months of storage at -18°C . Similarly, the β -carotene degradation followed first order reaction kinetics pattern for both blanched and unblanched carrots during frozen storage.

The effects of LOX and POD enzymes into the co-oxidation of β -carotene and chlorophylls were also studied in model systems using the raw enzyme extracts appropriately obtained from vegetables. In LOX catalyzed model reaction medium, both the conjugated dien formation rates from linoleic acids and co-oxidation rates of β -carotene decreased as the β -carotene concentration increased. In the case of the equal β -carotene and linoleic acid concentration, β -carotene co-oxidation and conjugated dien formation were completely eliminated. Chlorophylls had only a limited effect when compared to β -carotene. When the concentrations of linoleic acid and pigments were equal in the model system, the hydroperoxidation activity of LOX enzymes were hindered by β -carotene, chlorophyll a and chlorophyll b at a

ratio of %100, %14.8 and %23.6 respectively. Kinetic evaluations have shown that β -carotene and chlorophylls were acted as a non-competitive inhibitors for LOX enzyme. K_i constants for β -carotene, chlorophyll a and chlorophyll b were estimated as 0.25 μ M, 11.6 μ M and 6.6 μ M respectively.

POD enzymes had no effect on the oxidation of β -carotene, but caused to co-oxidation of chlorophylls in model systems. The guaiacol oxidation rates catalyzed by POD were decreased at a ratio of 13.6% and 8.4% when 1.56 μ M of chlorophyll a and chlorophyll b were introduced into the reaction medium. The chlorophyll a and chlorophyll b concentrations decreased 12.5% and 5.1% respectively in 5 min of reaction.



Keywords: Pigment co-oxidation, frozen vegetable, peroxidase, lipoxygenase, inhibition

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Vural GÖKMEN, Hacettepe University, Department of Food Engineering, Food Engineering Section

TEŞEKKÜR

Tezimin bütün aşamalarındaki değerli yardım ve katkılarından dolayı danışmanım Sayın Doç. Dr. Vural GÖKMEN'e,

Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Savaş Bahçeci ile diğer tüm uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

TOGTAG 2633 no'lu "Dondurulmuş Bezelye, Havuç ve Fasulyelerde Lipoksigenaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Neden Olduğu Sorunlar" konulu proje kapsamında sağlanan maddi katkılardan dolayı TÜBİTAK'a,

Her zaman yanımda olduklarını hissettiğim ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Arda SERPEN



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. Metot.....	29
3.2.1. Haşlama.....	29
3.2.2. Dondurulmuş Halde Depolama Sırasında Bezelye ve Havuçların Pigment içeriklerinde Meydana Gelen Değişimlerin Belirlenmesi ..	30
3.2.2.1. Standart Pigment Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
3.2.2.1.1. Standart Klorofil a ve b Çözeltilerinin Hazırlanması	30
3.2.2.1.2. Standart Feofitin a ve b Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
3.2.2.1.3. Standart β -Karoten Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
3.2.3.2. Klorofiller ve Karotenoidlerin Ekstraksiyonu.....	30
3.2.3.3. HPLC ile Klorofiller ve Karotenoidlerin Analizi.....	31
3.2.3. Bezelye ve Havuç LOX ve POD Enzimlerinin Model Reaksiyon Sistemlerinde β -Karoten ve Klorofillerin Ko-Oksidasyonu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	32
3.2.3.1. Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması	32
3.2.3.2. Stok Substrat ve Pigment Çözeltilerinin Hazırlanması	32
3.2.3.2.1. Linoleik Asit Stok Çözeltisinin Hazırlanması	32
3.2.3.2.2. Guayakol Stok Çözeltisinin Hazırlanması	32
3.2.3.2.3. Hidrojen Peroksit Stok Çözeltisinin Hazırlanması	32
3.2.3.2.4. β -Karoten Stok Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.2.3.2.5. Klorofil a ve b Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	33

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
3.2.3.3. LOX Enziminin β -Karoten ve Klorofillerin Ko-Oksidasyonu Üzerine Etkisi.....	33
3.2.3.4. POD Enziminin β -Karoten ve Klorofillerin Ko-Oksidasyonu Üzerine Etkisi	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Dondurulmuş Halde Depolama Sırasında Bezelye ve Havuçların Pigment İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler.....	36
4.1.1. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Bezelye Örneklerinin Klorofil İçeriklerindeki Değişim.....	36
4.1.2. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Havuç Örneklerinin β -Karoten İçeriklerindeki Değişim	38
4.2.Dondurulmuş Halde Depolama (-18°C) Boyunca Klorofil ve β -Karoten Değişimlerin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması.....	40
4.2.1. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Bezelye Örneklerinin Klorofil Değişimlerinin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması.....	40
4.2.2. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Havuç Örneklerinin β -Karoten Değişimlerinin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması.....	45
4.3. Model Ortamda LOX Enziminin β -Karoten Üzerine Etkisi.....	48
4.4. Model Ortamda LOX Enziminin Klorofil a ve b Üzerine Etkisi.....	55
4.5. Pigmentlerin LOX Enzimi Üzerine İnhibe Edici Etkisinin Kinetik İncelenmesi	60
4.6. Model Ortamda POD Enziminin β -Karoten Üzerine Etkisi.....	66
4.7. Model Ortamda POD Enziminin Klorofil a ve b Üzerine Etkisi.....	68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
6. KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	84

YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BC	β -Karoten
BC•	β -Karoten Radikali
Chl a	Klorofil a
Chl b	Klorofil b
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HP	Hidrojen Peroksit
LH	Linoleik Asit
L•	Linoleil Radikali
LOO•	Linoleil Peroksi Radikali
LOOH	Linoleik Asit Hidroperoksiti
LOX	Lipoksigenaz
POD	Peroksidaz
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Şekil 2.1. Klorofil yapısında meydana gelen değişimler	8
Şekil 2.2. Bitkilerde yaygın olarak bulunan bazı karoten ve ksantofillerin yapısı (a) β -karoten, (b) α -karoten, (c) β -kriptoksantin, (d) lutein, (e) lutein-5,6-epoksit, (f) neoksantin, (g) likopen	12
Şekil 2.3. Peroksidaz katalizörlüğünde, hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu	19
Şekil 2.4. Lipoksigenaz katalizörlüğünde, <i>cis</i> , <i>cis</i> -1, 4 – pentadien birimi içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu	25
Şekil 2.5. Linoleik ve linolenik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucu oluşan ana ürünler	26
Şekil 4.1. Haşlanmamış ve haşlanmış (indikatör LOX ve indikatör POD) bezelyelerin dondurulmuş halde depolanması boyunca klorofil a ve klorofil b içeriklerindeki değişim	37
Şekil 4.2. Haşlanmamış ve haşlanmış (indikatör POD) havuçların dondurulmuş halde depolanması boyunca β -karoten içeriklerindeki değişim.....	39
Şekil 4.3. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX ve POD indikatör) bezelyelerin 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda klorofil kromatogramları (665 nm), (b) Klorofil b spektrumu, (c) Klorofil a spektrumu, (d) Feofitin a spektrumu	41
Şekil 4.4. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX ve POD indikatör) bezelyelerin 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda karotenoid kromatogramları (450 nm), (b) Neoksantin spektrumu, (c) Lutein spektrumu, (d) Lutein-5,6-epoksit spektrumu.....	44
Şekil 4.5. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (POD indikatör) havuçların 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda β -karoten kromatogramları, (b) β -karoten spektrumu	46
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (β -karoten= 0.39–25 μ M; linoleik asit= 25 μ M).	49
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyonu sırasında β -karoten ko-oksidasyonu üzerine etkisi (β -karoten = 0.39–25 μ M; linoleik asit= 25 μ M).....	49
Şekil 4.8. Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, linoleik asitin (LH) hidroperoksitlere dönüşümü ve β -karotenin ko-oksidasyonu..	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
Şekil 4.9. LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin hidroperoksidasyon reaksiyonuna β -karotenin etkisi ve β -karotenin ko-oksidasyonu	53
Şekil 4.10. Değişen konsantrasyonlarda [β -karoten/Linoleik asit] oranlarının LOX enziminin inhibisyonu üzerine etkisi	55
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a'nın (Chl a), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (Klorofil a = 0.39-25 μ M; Linoleik asit = 25 μ M) ..	56
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda klorofil b'nin (Chl b), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (Klorofil b = 0.39-25 μ M; Linoleik asit = 25 μ M) ..	56
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a (Chl a) ve klorofil b'nin (Chl b), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit hidroperoksidasyonu sırasında klorofil a ve klorofil b ko-oksidasyonu üzerine etkileri (Linoleik asit= 25 μ M)	58
Şekil 4.14. Artan konsantrasyonlarda [Klorofil/ Linoleik asit] oranlarının LOX enziminin inhibisyonu üzerine etkisi (Linoleik asit= 25 μ M; Klorofil a ve b= 0.39-25 μ M)	59
Şekil 4.15. Bezelye LOX enziminin β -karoten (BC) , klorofil a (Chl a) ve klorofil b (Chl b) varlığında Michealis-Menten grafikleri	61
Şekil 4.16. β -Karoten, klorofil a ve klorofil b varlığında bezelye LOX enzimine ait Lineweaver-Burk grafikleri	63
Şekil 4.17. Rekabetçi olmayan (non-competitive) inhibisyon modeli	64
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), POD enzim aktivitesi üzerine etkisi. (β -karoten= 6.25-25 μ M; Hidrojen peroksit (HP)= 12.5 μ M; Guayakol= 25 μ M)	66
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonda β -karotenin POD katalizörlüğünde, hidrojen peroksit oksidasyonu esnasında ko-oksidasyonu (β -karoten = 6.25-25 μ M; Hidrojen peroksit (HP)= 25 μ M)	68
Şekil 4.20. Klorofil pigmentlerinin, POD enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında tetraguayakokinon oluşumu üzerine etkisi	69
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a'nın, POD enzimi katalizörlüğünde, hidrojen peroksitin oksidasyonu sırasında, klorofil a ko-oksidasyonu üzerine etkisi	70
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda klorofil b'nin, POD enzimi katalizörlüğünde, hidrojen peroksitin oksidasyonu sırasında, klorofil b ko-oksidasyonu üzerine etkisi	70
Şekil 4.23. Klorofil pigmentleri varlığında POD enziminin aktivitesindeki değişim	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

		<u>sayfa</u>
Çizelge 4.1.	Haşlanmamış ve farklı koşullarda haşlanmış bezelye ve havuçların klorofil ve β -karoten bileşenlerinin -18°C 'de depolama sırasında kayıp hız sabiti ve yarılanma süresi değerleri	40
Çizelge 4.2.	Bezelye ve havuçların bazı bileşenlerinin dondurulmuş halde depolanması başlangıcındaki ve sonundaki miktarları	47
Çizelge 4.3.	Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda β -karoten ve sabit konsantrasyonda linoleik asit ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri	50
Çizelge 4.4.	Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda klorofil a (Chl a), klorofil b (Chl b) ve sabit konsantrasyonda linoleik asit ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri	59
Çizelge 4.5.	Bezelye LOX enzimine ait kinetik parametreler ve bu parametreler üzerine β -karoten, klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin etkisi	65

1.GİRİŞ

Sebzeler yüksek oranda içerdikleri su ve fizyolojik yapıları nedeniyle, kısa sürede besin değerlerini ve niteliklerini kaybederek bozulmaktadır. Nitekim sebzelerin dayanıklı hale getirilmesindeki amaç, uygulanan muhafaza yöntemiyle uzun raf ömrüne sahip olmalarını ve beslenme değeri, renk, aroma, tat, koku ve fiziksel yapısına ait duyu niteliklerinin, kısaca kalitesinin en az düzeyde etkilenmesini sağlamaktır. Bu amaçla sebzelerin dondurularak muhafazası uygulanan en etkili muhafaza yöntemlerinin başında gelmektedir. Sebzelerin dondurulması ile su aktivitesi değeri oldukça düşürülmekte ve depolama sıcaklığının da -18°C ve altında tutulması ile birlikte mikrobiyolojik bozulmalara bağlı kalite kayıplarının önüne geçilmektedir. Nitekim düşük depolama sıcaklıklarında mikrobiyolojik faaliyetler durdurulsa bile, sebzelerin yapısında doğal olarak bulunan enzimlerin gerçekleştirdiği biyokimyasal reaksiyonlar düşük hızlarda da olsa devam etmekte ve fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olarak kalite kayıplarına yol açmaktadır.

Dondurularak muhafaza edilen sebzelere, enzimlerin neden olduğu kalite kayıplarını engellemek amacıyla haşlama işlemi uygulanmaktadır. Sebzelerde, donmuş depolama boyunca kaliteyi korumak ve stabil bir ürün elde etmek amacıyla uygulanan haşlama işleminin yetersiz veya aşırı uygulanması durumunda çeşitli olumsuzluklar ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda haşlama işleminin optimizasyonu, dondurularak muhafaza edilen sebzeler için en kritik basamağı oluşturmaktadır.

Peroksidaz enzimi, sebzelerde ısıya karşı en dirençli enzim olarak kabul edilmekte ve haşlama işleminin yeterliliği açısından indikatör enzim olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bununla birlikte tüketicinin ürünü yargılamasındaki en önemli parametrelerin başında ürünün görselliği gelmekte ve beklenen rengin dışındaki renkler ürün kalitesi hakkında şüphe doğurmaktadır. Haşlanmamış sebzelerde meydana gelen renk kayıpları ve kötü tat-koku oluşumundan lipoksigenaz enzimi sorumlu tutulmaktadır. Bu bağlamda son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, dondurularak muhafaza edilecek sebzelere uygulanan haşlama işleminin yeterliliği

açısından indikatör olarak peroksidaz yerine lipoksigenaz enziminin kullanılmasıyla hem enerji tasarrufu sağlanacağı, hem de besinsel ve duyusal kalitenin ürüne daha az ısı yüklenmesi nedeniyle daha iyi korunabileceği ileri sürölmektedir.

Dondurularak muhafaza edilen sebzelerde dondurulmuş halde depolama boyunca, indikatör olarak peroksidaz ve lipoksigenaz kullanılan durumların hangisinde, ürün renginin daha iyi korunduğunun belirlenmesi proses optimizasyonu açısından önem kazanmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz çalışmanın ilk kısmında, indikatör olarak lipoksigenaz ve peroksidaz enzimlerinin seçildiği iki farklı durum için, materyal olarak seçilen bezelye ve havuç örnekleri haşlanmış ve –18°C’de 12 ay boyunca depolanması sırasında bezelye örneklerinin klorofil ve ksantofil pigmentlerindeki, havuç örneklerinin ise β-karoten pigmentindeki değişimler incelenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise bezelye ve havuçlardan elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılarak, model ortamda LOX ve POD enzimlerinin β-karoten ve klorofil türevlerinin ko-oksidasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gıdaların dayanıklı hale getirilmesinde uygulanan bütün yöntemlerin amacı, mikrobiyolojik ve enzimatik değişimleri önlemek veya sınırlandırmaktır. Mikrobiyolojik yolla bozulmalar, gıdaların fiziksel, kimyasal ve duyuşal niteliklerinde temelden değişmelere neden olmakta ve hatta gıda insan sağılığını tehdit edici bir nitelik kazanabilmektedir. Buna karşın mikrobiyolojik olmayan bozulmalar, özellikle enzimlerin faaliyetine ve çeşitli kimyasal reaksiyonlara bağılı olarak gelişmekte, gıdanın fiziksel, kimyasal ve duyuşal niteliklerinin bozulmasına, kalitenin azalmasına neden olmaktadır (Cemeroğlu ve ark., 2001).

Gıdaların mikrobiyolojik ve enzimatik yollardan bozulmalarını engellemek amacıyla çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik muhafaza yöntemleri kullanılmaktadır. Gıdaların dondurularak muhafazası, uzun depolama süresi boyunca kalitenin yüksek oranda korunduğı fiziksel muhafaza yöntemlerinin başında gelmektedir. Dondurma işleminin ile birlikte özellikle meyve ve sebzelerin içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan su molekülleri buz kristallerine dönüşerek su aktivitesi değeri düşmektedir. Böylece uygulanan düşük depolama sıcaklıkları ve düşük su aktivitesi nedeniyle mikrobiyal gelişimler durdurulmakta ve biyokimyasal tepkime hızları sınırlandırılmaktadır (Pala, 1983; Cano, 1996).

Dondurularak muhafaza edilecek meyve ve sebzeler, yıkama, ayıklama ve hammaddenin çeşidine göre de kabuk soyma, dilimleme gibi ön işlemler uygulanmaktadır. Hammadde ve hammaddeye uygulanan ön işlemler dondurulmuş meyve ve sebzelerde, son ürün kalitesini etkileyen önemli faktörlerdendir (Park, 1987; Luh, 1997; Howard et al., 1999).

Dondurularak muhafaza edilecek sebzelerde, dondurma işlemi öncesi uygulanan en önemli işlem, haşlamadır. Sebzelerin yapılarında bulunan doğal enzimler işleme ve depolama sırasında üründe meydana gelen istenmeyen tat, koku, renk ve besinsel değere sahip bileşenlerin kaybindan sorumludurlar (Eriksson, 1975; Favell, 1998; Negi and Roy, 2000). Nitekim -18°C ve daha düşük depolama sıcaklıklarında, mikrobiyolojik faaliyetlerden kaynaklanan bozulmalar söz konusu

olmamakla birlikte meyve ve sebzelerin bozulmasına neden olan enzimatik ve kimyasal faaliyetler düşük reaksiyon hızlarında dahi devam etmektedir. Bu sebepten dolayı sebzelerde meydana gelen enzimatik reaksiyonları engellemek amacıyla dondurma işlemi öncesi haşlama işlemi uygulanmaktadır (Cano, 1996; Acar ve Cemeroğlu, 1998).

Sebzelerin haşlanması yaygın olarak belli sıcaklık ve sürelerde sıcak suya daldırılması veya doymuş sıcak buhardan geçirilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir (Poulsen, 1986; Fellows, 2000).

Dondurularak muhafaza edilecek sebzelerde kaliteyi korumak amacıyla uygulanan haşlama işlemi bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Haşlama işleminin avantajları, enzimlerin inaktivasyonu sayesinde yapı, renk ve aromanın stabilizasyonu, besinsel kalitenin korunması, mikrobiyal yükün azaltılması, dokulardaki gazın uzaklaştırılması, ham tat ve kokunun giderilmesi şeklinde özetlenebilmektedir. Bunun yanında haşlama işleminin dezavantajları ise, ısı işleminden kaynaklanan renk ve aroma kayıpları, yapıda meydana gelen bozulmalar, besinsel kalite kayıpları, özellikle sıcak suda haşlama yöntemiyle meydana gelen suda çözünür maddelerin kayıpları ve ayrıca fazla miktarda su ve enerji gereksinimine ihtiyaç duyulması şeklinde özetlenebilmektedir (Williams et al., 1986; Negi and Roy, 2000).

Haşlama işlemiyle sebze dokularına uygulanan ısı, hücre yapısında fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Sebzelere uygulanan ısıl işlemin en önemli etkisi protein denaturasyonudur. Böylece sebzenin işlenmesi ve donmuş depolanması boyunca kalite kayıplarına neden olan enzimlerin inaktivasyonu da sağlanmış olmaktadır. Fakat haşlama işlemiyle gerçekleşen protein denaturasyonunun yanında sebze hücrelerinde bir takım istenmeyen değişiklikler de meydana gelmektedir. Isı etkisi ile stoplazmik membranların değişikliklere uğraması, geçirgenliklerinin artmasına neden olmaktadır (Cano, 1996).

Özellikle yeşil fasulyelerde hücre duvarının yapısında bulunan pektik maddelerin çözünürlük kazanması sebzenin yumuşamasına sebep olmaktadır (Brown, 1967).

Isı etkisi ile birlikte hücre duvarının yapısında meydana gelen değişimler, suda çözünen madde kayıplarını da beraberinde getirmektedir. Haşlama işlemi sırasında hem ısı etkisiyle hem de çözünerek haşlama suyuna geçme yoluyla karbonhidrat, vitamin, mineral, ve şeker miktarlarında azalmalar meydana gelmektedir. Besinsel değere sahip askorbik asit hem sudaki çözünürlüğünün yüksek olması, hem de ısıya ve oksidasyona karşı oldukça hassas olması nedeniyle dondurularak muhafaza edilen sebzelerde, uygulanan işlemlerin yeterliliğinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Haşlama, soğutma ve dondurma işlemleri amacıyla kullanılan yöntemler askorbik asit kaybını etkileyen önemli faktörlerdir (Selman, 1994; Cano, 1996; Lee and Kader, 2000).

Yüksek sıcaklıkta kısa süre haşlama ile gerçekleşen askorbik asit kayıpları, düşük sıcaklık uzun süre haşlama işlemine göre daha düşük olmaktadır (Abdel-Kader, 1991). Ayrıca dondurularak muhafaza edilecek olan sebzenin yapısı, şekli ve haşlama öncesi uygulanan kesme, dilimleme gibi ön işlemler askorbik asit kaybını etkileyen diğer faktörlerdir (Zhuang and Barth, 1996). Örneğin küp şeklinde kesilmiş havuçların yüzey alanı arttığından çözünerek suya geçme, oksidasyon ve ısı etkisi ile meydana gelebilecek askorbik asit kayıpları da artmaktadır (Selman, 1994).

Buna karşın haşlanmamış ürünlerde donmuş depolama boyunca meydana gelen askorbik asit kayıpları, haşlanmış ürünlere göre daha fazla gerçekleşmektedir (Müftügil ve Yiğit, 1984; Favell, 1998). Nitekim haşlama işlemiyle birlikte askorbik asit oksidasyonuna sebep olan askorbik asit oksidaz, peroksidaz (Robinson, 1991a) ve lipoksigenaz (Roy and Kulkarni, 1996) enzimlerinin inaktivasyonun sağlanması ile birlikte, donmuş depolama boyunca askorbik asit kayıp hızı azalmakta ve ürün stabilizasyonu sağlanmaktadır.

Bununla birlikte, ısı etkisi ile sebzelerde meydana gelen olumsuz etkileri en alt seviyede tutmak amacıyla haşlama işlemi sonunda suratli bir soğutmanın yapılması gerekmektedir. Böylece ısı etkisi ile gerçekleşen renk, yapı, aroma ve besinsel madde kayıpları minimize edilerek, dondurulmuş halde depolama boyunca daha stabil bir ürün eldesi mümkün olmaktadır (Cano, 1996).

Sebze ürünlerinde renk, kalite kriterlerinin başında gelmektedir. Dondurularak muhafaza edilen haşlanmış ve haşlanmamış sebzelerin renginde, işleme ve depolama süresi boyunca değişiklikler meydana gelmektedir (Müftügil ve Yiğit, 1984; Lee, 1986; Williams et al., 1986; Calligaris et al., 2002; Park, 1987). Tüketici açısından gıdalarda bulunan çeşitli bileşenlerin fonksiyonel aktivitelerini bilmek ürünü tercih ederken önemli bir parametre oluşturmaktadır. Klorofiller ürünün olgunluğu ve ürüne uygulanan teknolojik işlemler hakkında indikatör olarak rol oynamaktadırlar.

Tüketicinin ürünü yargılamasındaki en önemli parametrelerin başında ürünün görseiliği gelmektedir. Örneğin ıspanak, bezelye ve fasulye gibi taze sebzelerden beklenen renk tipik klorofil rengi olan parlak yeşil veya fermentasyona maruz bırakılmış ürünlerden beklenen renk ise tipik feofitin ve feoforbid rengi olan zeytin yeşilidir. Tüketici açısından beklenen rengin dışındaki renkler ürün kalitesi hakkında şüphe doğurmaktadır.

Kimyasal olarak klorofiller porfirin gruptan türemiş yapılardır. Porfirinlerin en önemli özellikleri metal iyonlarıyla kelat oluşturma eğilimlerinin yüksek olmasıdır. Klorofillerde kompleks oluşturan metal iyonu magnezyumdur (Şekil 2.1). Klorofiller propionik asit zincirlerinin modifiye formu olan siklik β -ketoester (V nolu halka) ve ayrıca IV nolu halkadaki propionik asit zincirinin 20 karbonlu diterpen alkol olan fitol birimiyle esterleşmesinden oluşmuş yapılardır (Hendry, 1996).

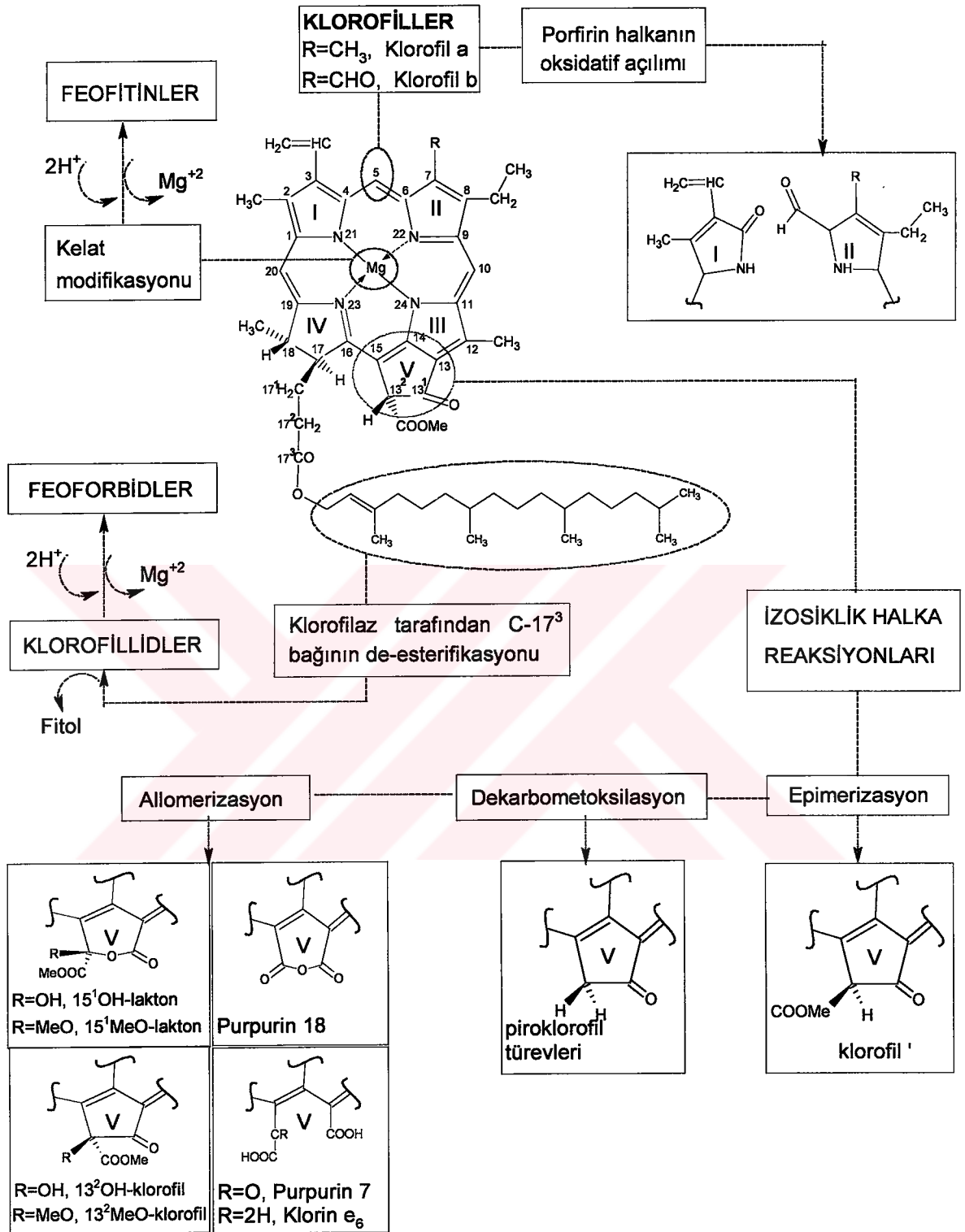
Klorofilin yapısında bulunan 10 tane konjuge bağ, kromofor özellik kazandırmakta ve görünür bölgede ışık absorplamasını sağlayarak klorofile yeşil renk vermektedir. Klorofil a ve klorofil b arasındaki farklılık, 7 numaralı karbon atomunda klorofil a'nın metil grubu, klorofil b'nin ise formil grubu içermesinden kaynaklanmaktadır. Klorofil pigmentleri gelişmiş bitkilerde, stoplazmada kendi membranları olan plastidler içerisinde karotenoidlerle birlikte bulunmaktadır. Klorofilin yapısındaki lipofilik karakterdeki fitol grubu, klorofilin lipoprotein yapıdaki kloroplast membrana bağlanmasını, ayrıca yapıdaki porfirin halka ise proteinlerle kovalent olmayan bağlar kurmasını sağlamaktadır (Minguez-Mosquera et al., 2002a).

Klorofiller, kloroplast içerisinde kararlı bir yapıya sahiptirler, fakat kloroplast herhangi bir nedenden dolayı zarar gördüğünde, oldukça kararsız hale dönüşmektedir. Bu durumda pH, sıcaklık, enzim, oksijen, ve ışık gibi faktörler klorofilin yapısında önemli değişimlere sebep olmaktadır (Schwartz and Lorenzo, 1990; Cano, 1996; Heaton and Marangoni, 1996; Chen and Liu, 1998; Thron, 2001).

Klorofilin yapısında kelat modifikasyonu, fitol grubunun de-esterifikasyonu, izosiklik halka reaksiyonları ve porfirin halka oksidasyonları adı altında 4 ana değişim gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (Minguez-Mosquera et al., 2002a).

Klorofilin yapısından Mg iyonunun, iki tane hidrojen atomuyla yer değiştirmesine feofitinizasyon denilmektedir (Şekil 2.1). Klorofilin kromofor yapısında değişiklik gerçekleştiği için, oluşan feofitinlerin rengi klorofilden farklı olmaktadır. Feofitinizasyon sonucunda, mavi-yeşil renge sahip klorofil a molekülünden, gri renkli feofitin a , sarı-yeşil renge sahip klorofil b molekülünden ise , kahverengi renkli feofitin b oluşmaktadır. Kimyasal olarak feofitin oluşumu asidik ortamlarda gerçekleşmektedir (Minguez-Mosquera, 2002a). Klorofiller bitki hücrelerinde kloroplast içerisindeki lipoprotein yapıdaki membranlara bağlı bulunduklarından dolayı, asit etkisinden korunabilmektedir. Ancak herhangi bir ısıtma işlemi ile kloroplast yapısı zarar görüp, lipoproteinler koagüle olunca, klorofilleri koruma etkisi kaybolmaktadır. İşte bu nedenle sebzelerin haşlanması sırasında, yeşil renk hızla kaybolmakta ve bu kayıp pH düştükçe artmaktadır (Schwartz and Lorenzo, 1990).

Yapılan bazı çalışmalarda feofitin oluşumunu engellemek amacıyla ısıtma işlemi ve depolama süresi boyunca pH'nın yüksek değerlerde tutularak sebzelerde yeşil rengin korunması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sebzelerin işlenmesi aşamasında yararlı olmuş fakat depolama sırasında klorofilin feofitine dönüşümü oldukça hızlı gerçekleşmiştir (Malecki, 1964). Isıtma işlemi ve depolama boyunca klorofillerden feofitin oluşumu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda klorofil a'nın klorofil b'ye göre 2.5-10 kat arasında daha hızlı bozulduğu belirlenmiştir (Minguez-Mosquera et al., 2002a, Schwartz and Lorenzo, 1990; Canjura et al., 1991).



Şekil 2.1. Klorofil yapısında meydana gelen değişimler (Minguez-Mosquera et al., 2002a)

Haşlama işlemi için kullanılan sıcaklık ve süre normları yeşil sebzelerin işlenmesi ve dondurulmuş halde depolanması sırasında içerdikleri klorofilin bozulma hızını etkilemektedir. Haşlama şekli de klorofil yıkımı konusunda önemli bir parametredir. Şayet sıcak su ile haşlama gerçekleştiriliyorsa aynı enzim inaktivasyonunu sağlayan yüksek sıcaklıktaki kısa süreli bir haşlama, klorofil kaybının azaltılması açısından düşük sıcaklıktaki uzun süreli haşlamaya kıyasla daha iyi sonuçlar vermektedir (Cano, 1996). Bunun yanında brüksel lahanasının haşanmasında aynı enzim inaktivasyonunun sağlanması için buharla yapılan haşlamada daha uzun süreye ihtiyaç olduğundan, klorofil kaybı sıcak su ile yapılan haşlamada daha az olarak tespit edilmiştir (Dietrich and Neumann, 1965). Ayrıca yapılan araştırmalarda, haşlamanın başlangıcında klorofil a, klorofil b'ye göre daha duyarlı görülmekte, haşlama süresinin uzamasıyla klorofil b yıkım hızının daha fazla olduğu görülmektedir (Katsaboxakis, 1984). Bununla birlikte, uzun süreli haşlama işlemi uygulanan durumlarda daha belirgin kloroplast yıkımı gerçekleşmekte, böylece kloroplast içinde bulunan klorofillerin ısıya karşı duyarlılıkları artmaktadır. Uzun süre haşlama işlemleri donmuş depolama boyunca klorofil bozulma hızını arttırmaktadır (Cano, 1996).

Haşlama işlemi ile birlikte sebzelerde bir miktar klorofil kayıpları görülmekle birlikte haşlanmamış sebzelerde donmuş depolama boyunca haşlanmış sebzelerle göre daha fazla renk kayıpları gerçekleşmektedir. Walker (1964) haşlama süresiyle, -10°C'de donmuş depolama boyunca yeşil fasulyelerdeki klorofil değişimi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla gerçekleştirdiği çalışmada, haşlanmamış fasulyelerin 20 günlük depolama süresi sonunda klorofil içeriğinin %45 oranında azaldığını, buna karşın 2 dakika haşlanmış fasulyelerde aynı depolama süresi sonunda klorofil içeriğinde %2 'lik bir azalma gerçekleştiğini belirtmiştir.

Klorofilin yapısında meydana gelen ikinci önemli değişiklik C-17³ bağının de-esterifikasyonu sonucu fitol grubunun yapıdan ayrılmasıdır. Bu reaksiyon endojen bir enzim olan klorofilaz enzimi (E.C.3.1.1.14) tarafından katalizlenmektedir (Gossauer and Engel, 1996). Klorofilaz enzimi hem klorofilin, hem de feofitin de-esterifikasyon reaksiyonunu katalizleyebilmektedir. Klorofilin de-esterifikasyonu sonucu oluşan ürün klorofillid, feofitin de-esterifikasyonu

sonucu oluşan ürün ise feoforbid'dir. Yapıdan fitol grubunun ayrılmasıyla porfirin halkanın kromofor yapısında herhangi bir değişiklik meydana gelmediği için renk korunmakta ve yapı polar bir nitelik kazanmaktadır (Hendry, 1996).

Klorofilin yapısında meydana gelen üçüncü önemli değişiklik izosiklik halka (V numaralı halka) reaksiyonlarıdır. Özellikle 100°C'nin altında uygulanan kısa süreli haşlama işlemi C-13² epimerlerinin (epimerizasyon reaksiyonları) oluşumuna sebep olmaktadır. Daha uzun süreli ısı işlem uygulamaları ise feofitin ve feofitin epimerleri oluşumuna neden olmaktadır. Konserveye işlenecek sebzelere uygulanan haşlama ve sterilizasyon işlemi ile C-13² numaralı karbon atomunda dekarbometoksilasyon reaksiyonu gerçekleşmekte ve pirofeofitin gibi klorofil türevleri oluşmaktadır (Canjura et al., 1991; Schwartz and Lorenzo, 1991; Teng, 1999). Klorofil yapısındaki izosiklik halkanın oksidasyonu sonucunda allomerizasyon reaksiyonları gerçekleşmekte ve bunun sonucunda purpurin türevleri, klorin türevleri, lakton türevleri ve okside olmuş klorofil türevleri oluşmaktadır. Klorofilin yapısında meydana gelen bu tür değişimler klorofil yıkımını hızlandırmaktadır (Minguez-Mosquera et al., 2002a).

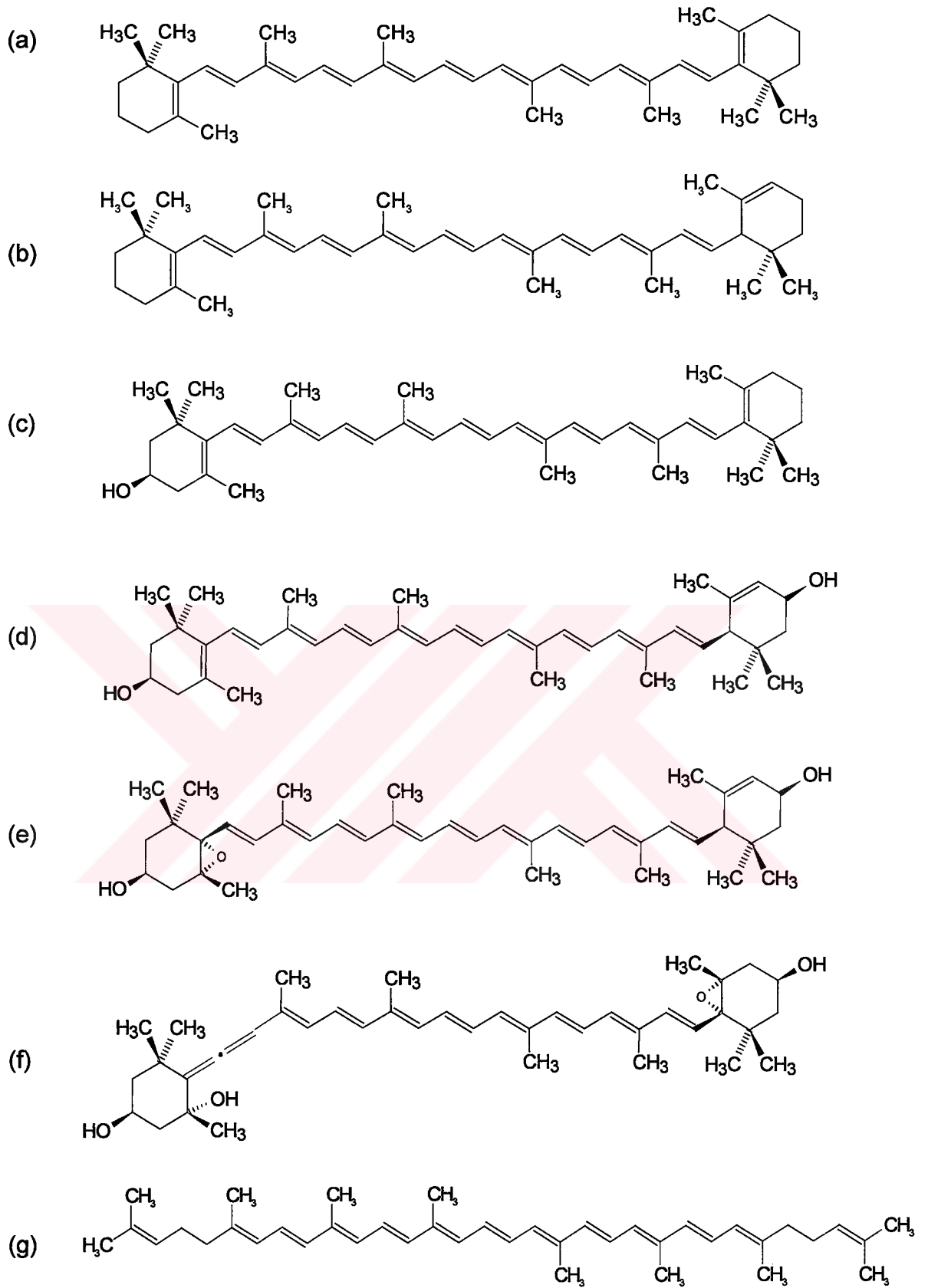
Klorofil yapısında meydana gelen bir diğer değişiklik ise oksidatif reaksiyonlar sonucu porfirin halkanın bozulmasıdır. Böylece yapı kromofor özelliğini kaybederek renksizleşmektedir (Şekil 2.1). Halka açılımı 5 numaralı karbon atomundan başlamaktadır ve oluşan ürünler görünür bölgede ışık absorplamamaktadır. Dioksigenaz enzimlerinin (lipoksigenaz, peroksidaz ve klorofil oksidaz) oksidatif reaksiyonlar sonucunda porfirin halkanın açılmasında ve bunun sonucunda klorofilin renksiz ürünlere parçalanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Minguez-Mosquera et al., 2002a).

Yeşil sebzelerdeki renk değişiklikleri büyük ölçüde klorofilde meydana gelen değişikliklerle ilişkilidir. Sebzelerin yeşil rengini, sadece klorofilin feofitinlere dönüşümü etkilememekle birlikte, uzun süreli depolama sonucunda hem klorofil hem de feofitinlerde azalmalar meydana gelmektedir. Yağ peroksitlerinin artışı ile ilişkili mekanizmalar klorofil bozulmasını etkileyen önemli etkenlerdir (Cano, 1996).

Bununla birlikte haşlama, özellikle dondurularak muhafaza edilecek sebzelerde klorofilin korunması açısından son derece önemli bir işlemdir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Haşlanmamış, yetersiz haşlanmış veya aşırı haşlanmış sebzelerin dondurularak muhafazasında, klorofil enzimatik veya kimyasal olarak feofitinlere, klorofillidlere ve feoforbidlere dönüşerek önemli ölçüde bozulmaktadır (Schwartz and Lorenzo, 1990).

Klorofil haricinde sebze dokularında bulunan, çiğ veya işlenmiş ürünlerin renklerinden sorumlu diğer pigmentler içinde antosiyanidinler ve karotenoidler yer alır. Sebzeler, yapılarında fazla miktarda antosiyanin içermediklerinden dolayı, antosiyanin degradasyonu renk açısından birinci derecede önem teşkil etmemektedir (Cano, 1996).

Karotenoidler bir çok meyve ve sebzenin yapısında bulunan, sarı ile kırmızı arasında değişen renklere sahip pigmentlerdir. Domates ve havuç gibi sebzeler yüksek oranda karotenoid içermektedir (Desobry et al., 1988; Calligaris et al., 2002). Karotenoidlerin temel yapısı, 8 tane izopren birimin ard arda bağlanmasıyla oluşan, birbirine simetrik iki tane 20 karbonlu birimden meydana gelmektedir (Ege, 1994). Bütün karotenoidler 40 karbonlu iskelet yapısının değişik varyasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır. Sadece karbon ve hidrojen atomundan meydana gelmiş karotenoidlere karoten, yapısında hidroksi, epoksi ve keto gibi oksijen grupları içeren karotenoidlere ise ksantofil (ksantin) denilmektedir (Oliver and Palou, 2000). Şekil 2.2'de bitkilerde yaygın olarak bulunan bazı karoten ve ksantofillerin yapısı verilmektedir.



Şekil 2.2. Bitkilerde yaygın olarak bulunan bazı karoten ve ksantofillerin yapısı. (a) β -karoten, (b) α -karoten, (c) β -kriptoksantin, (d) lutein , (e) lutein-5,6-epoksit (f) neoksantin, (g) likopen (Goodwin, 1980).

Karotenoidlerin karakteristik özelliği, uzun konjuge polien zincir boyunca tek ve çift bağların sürekli olarak yer değiştirmesidir. Bu olgu, yapısındaki π -elektronlarının, polien zincir boyunca sürekli delokalize olması sonucu konjuge bir sistem oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Bu özellik karotenoidlerin moleküler yapısını, kimyasal aktivitesini, ışığı absorblama özelliklerini ve böylece rengini belirlemektedir (Britton, 1995).

Karotenoidlerin polien zincirindeki her bir çift bağ, *cis* ve *trans* geometrik izomerleri olmak üzere iki farklı konfigürasyonda bulunabilmektedir. Yapıda *cis* formda bir çift bağın bulunması, ardışık durumdaki hidrojen atomları ve/veya metil grupları arasında büyük bir sterik engelleme yaratmakta, bu da termodinamik açıdan karotenoidlerin *cis* izomerlerinin *trans* formlarına göre daha az kararlı olmasına sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı doğada bulunan bütün karotenoidler çoğunlukla all-*trans* formunda bulunmaktadır (Britton, 1995).

Karotenoidler beslenme fizyolojisi açısından önemli bir yere sahiptir. Bunun nedeni bazı karotenoidlerin provitamin A aktivitesine sahip olmalarıdır. Karotenoidlerin provitamin A aktivitesi gösterebilmesi için yapılarında en az bir tane keto, hidroksi veya epoksi grup içermeyen β -halkası bulunması gerekmektedir. Karotenoidler içerisinde en yüksek provitamin A aktivitesi gösteren molekül β -karoten'dir (Minguez-Mosquera et al., 2002b). Teorik olarak bir birim β -karoten molekülünden, 2 birim vitamin A elde edilmesi gerekmektedir. Fakat metabolik süreç sonunda bu oranın 6 birim β -karotenden, 1 birim retinol (vitamin A) elde edilecek şekilde gerçekleştiği belirtilmiştir (Desobry et al., 1998). β -Karoten dışında, α -karoten, γ -karoten, β -kriptoksantin, β -apo-8-karotenal ve bunların yapı izomerleri, yapılarında bir tane β -halkası içerdiklerinden dolayı potansiyel A vitamini aktivitesine sahip diğer bazı karotenoidlerdir (Minguez-Mosquera et al., 2002b).

Karotenler birçok meyve ve sebzede bulunmaktadır. Simon (1990), yaptığı çalışmada taze meyve ve sebzelerde en çok karotenin havuçlarda olduğunu tespit etmiştir. Havuçlarda 6 çeşit karoten türü bulunmaktadır. Bunlar α -, β -, γ -, ζ -karoten, likopen, ve β -zeakarotendir. Havuçlarda en çok β -karoten, yaklaşık olarak yarısı

kadar da α -karoten bulunmaktadır. Karotenlerin miktarı ve çeşidi havucun genotipine, elde edildiği yere ve elde olunduğu yıla göre değişmektedir. Heinonen (1990), 19 ayrı havuç çeşidi ile yaptığı çalışmada ortalama β -karoten miktarının 1.2 –2.3 mg /100g havuç olduğunu saptamıştır.

Bununla birlikte, Peto ve ark. (1981) tarafından, meyve ve sebzelerle alınan β -karotenin, bazı kanser çeşitlerine karşı koruyucu etki gösterdiğinin belirtilmesinden sonra, karotenoidler potansiyel antioksidan madde olarak geniş bir çalışma alanı kazanmışlardır. Daha sonraları yapılan epidemiyolojik çalışmalarda besinlerle alınan karotenoidlerin cilt kanseri, (Mathews-Roth and Krinsky, 1987; Greenberg et al., 1990,) akciğer kanseri, (Omenn et al., 1996) kalp damar hastalıkları (Morris et al., 1994) ve katarakt (Knekt et al., 1992) gibi hastalıklara yakalanma riskini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur.

β -Karoten ve diğer karotenoidlerin bir başka önemli özelliği ise elektronca zengin konjuge bağ yapıları sayesinde, uyarılmış formdaki oksijen molekülünü (singlet oksijen, $^1O_2^*$) sönmülendirerek tekrar doğal formdaki oksijen molekülüne (triplet oksijen, 3O_2) dönüştürmeleridir. Singlet formdaki oksijen molekülü son derece reaktif yapıdadır ve kimyasal reaksiyonlar sonucunda oksidatif hasarlara yol açmaktadır. β -Karoten uyarılmış oksijen molekülündeki fazla enerjiyi bünyesine alarak, yapısındaki uzun polien zincir boyunca moleküler titreşim sayesinde ortama ısı şeklinde aktarmakta ve bu etki neticesinde β -karoten molekülünün yapısında hiç bir değişiklik meydana gelmeden uyarılmış formdaki oksijen molekülü ($^1O_2^*$) tekrar doğal formdaki oksijen molekülüne (3O_2) dönüşmektedir (Krinsky, 1994; Britton, 1995; Edge et al., 1997). β -Karotenin bu özelliği sayesinde, klorofil pigmenti tarafından üretilen reaktif formdaki oksijen moleküllerinin sönmülendirilmesi sonucunda gerek klorofil pigmentinin yapısında, gerekse lipidlerin yapısında meydana gelebilecek oksidatif hasarların önlenmesi gerçekleşmektedir (Chen and Liu, 1998; Rontani, 2001).

Klorofil ışık varlığında uyarılmış oksijen üretmekte ve uyarılmış oksijenler (singlet) normal oksijene (triple) göre, linoleik asit oksidasyonunu 1450 kat daha hızlı gerçekleştirmektedir. Yapılan bir çalışmada, yüksek oranda linoleik asit içeren

içeren soya fasulyesi yağında, ışık ve klorofil varlığında linoleik asit oksidasyonunun çok hızlı gerçekleştiği, aynı ortamda β -karotenin bulunması durumunda ise oksidasyonun çok yavaş gerçekleştiği belirtilmiştir (Lee and Min, 1988).

Ayrıca yapılan çalışmalarda β -karotenin değişik ortamlarda aktif radikal türleriyle reaksiyona girdiği ve bu reaksiyonlar esnasında antioksidan davranış gösterdiği belirtilmiş (Benzei, 2000; Mortensen et al., 2001; Polyakov et al., 2001; Young and Lowe, 2001) ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunu yavaşlattığı görüşü ortaya çıkmıştır (Burton and Ingold, 1984; Burton, 1989; Edge et al., 1997; Woodall et al., 1997a).

Biyolojik sistemlerde karotenoidler, proteinler ya da lipoproteinler ile kompleks oluşturacak şekilde bulunurlar. Bitkilerde β -karoten, kloroplast içerisinde klorofiller ile birlikte ve hidrofobik bir yapıya sahip olduğundan dolayı, lipoprotein yapıda olan biyolojik membranların lipid içeren kısmı içinde bulunurlar (Britton, 1996; Young and Lowe 2001).

β -Karotenin antioksidan özellik göstermesi için lipidlerin ya da diğer hücre bileşenlerinin yıkımına yol açan oksidasyon reaksiyonlarını önlemesi ya da yavaşlatması gerekmektedir. β -Karoten okside edici türlerle ya da serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir (Woodall et al., 1997b). Yapılan birçok çalışmada β -karotenin, organik çözeltilerde serbest radikallerle başlatılan lipid peroksidasyon reaksiyonları esnasında koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Conn et al., 1991; Jialal et al., 1991; Kennedy and Liebler, 1992).

β -Karoten, sadece karbon ve hidrojenle oluştuğu için hidrofobik karaktere sahiptir. Suda çözünmeyen β -karoten tetrahidrofuran, diklormetan, benzen, toluen ve kloroform gibi apolar çözücülerde ve yağ çözücülerde çözünmektedir (Craft, 1992). Domates ve havuç gibi yüksek oranda karotenoid içeren sebzelerde karotenoid yıkımı hem renk açısından olumsuzluklara, hem de besinsel değer açısından kayıplara yol açmaktadır. Karotenlerin sudaki çözünürlükleri az

olduğundan haşlama sırasında gerçekleşen kayıplar azdır (Desobry et al., 1998; Calligaris et al. 2002). Karotenoidler asidik ortamlarda ve haşlama amaçlı uygulanan ısı işlemi ile nispeten az oranlarda yıkıma uğramaktadır. Karotenoidler ısıya karşı dirençlidirler ve genellikle yüksek sıcaklık uygulamalarında karotenoid izomerlerinin oluşumu gerçekleşmektedir (Khachik et al., 1986). Buna karşın karotenoidler ışığa karşı duyarlı olduklarından dolayı izomerizasyon reaksiyonları ışık etkisi ile de görülmektedir (Pesek and Warthesen, 1988)

Konserveye işlenecek gıdalarda, uygulanan 100°C'nin üzerindeki sterilizasyon işlemlerinde ve dondurularak muhafaza edilecek sebzelere uygulanan uzun süreli haşlama işleminin etkisi ile β -karoten, *all-trans* formundan, *15-cis*, *13-cis* ve *9-cis*- β -karoten formlarına dönüşmektedir. Aynı zamanda karotene zengin havuç ve domates gibi sebzelerde uygulanan işlemler esnasında ışığa maruz kaldığı durumlarda izomerizasyon reaksiyonları görülmektedir. Böylece β -karoten molekülünün provitamin A aktivitesi azalmakta ve renginde de bir miktar değişim meydana gelmektedir (Nyambaka and Ryley, 1996; Howard et al., 1999).

Bununla birlikte β -karoten pigmentinin yıkımından sorumlu esas reaksiyon oksijen varlığında gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarıdır. β -karoten molekülünün yapısındaki uzun hidrokarbon zinciri boyunca bulunan konjuge çift bağlar, oksidatif etkileşimlere karşı duyarlıdır (Goodwin, 1980; Britton, 1996).

Karotenoidlerin kimyasal olarak oksidasyonu, yağ asitlerinin, demir ve bakır gibi ağır metaller ya da ışık varlığında oto-katalitik olarak, başlangıç, ilerleme ve bitiş şeklinde gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları esnasında oluşan serbest radikallerle tepkimesi sonucu olduğu düşünülmektedir (Goldman et al., 1983; Howard et al., 1999).

Bununla birlikte enzimatik reaksiyonlar sonucunda da karotenoidlerin oksidasyonu gerçekleşmektedir. Özellikle lipoksigenaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen lipidlerin hidroperoksidasyon reaksiyonları esnasında β -karoten okside olarak yıkıma uğramakta ve renk kayıplarına neden olmaktadır (Ikediobi and Snyder,

1977; Hildebrand and Hymowitz, 1982; Jaren-Galan and Minguéz-Mosquera, 1997; Aziz et al., 1999).

Haşlanmamış sebzelerde meydana gelebilecek kalite kayıpları, istenmeyen flavor oluşumu, yapısal değişiklikler, renk değişiklikleri ve besleyici değeri olan bileşiklerin değişimi şeklinde gruplandırılabilir. Nitekim dondurularak muhafaza edilecek sebzelerde meydana gelen kalite kayıplarına sebze dokularında aktif halde bulunan enzimlerin etkisi çok fazladır. Lipoksigenaz, lipaz ve proteazlar istenmeyen flavor oluşumundan, pektik enzimler ve selüloz yapısal değişikliklerden, polifenoloksidaz, klorofilaz, lipoksigenaz ve peroksidaz (düşük oranda) renk değişikliklerinden, askorbik asit oksidaz ve tiaminaz ise besleyici değeri olan bileşiklerin değişiminden sorumlu enzim gruplarıdır. (Williams et al., 1986; Barrett and Theerakulkait, 1995; Anthon and Barrett, 2002)

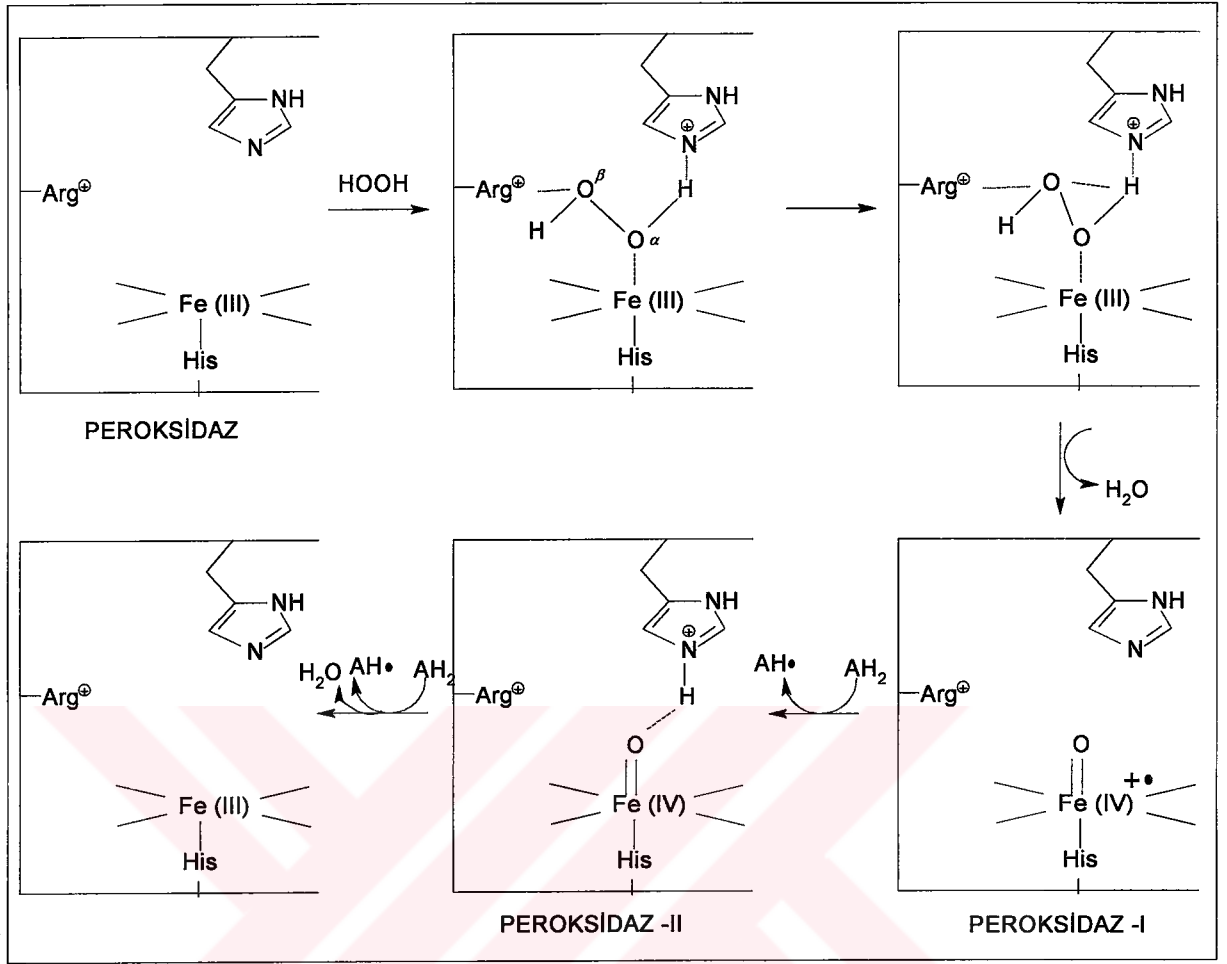
Isı etkisi ile enzim inaktivasyonunu sağlamak ve böylelikle çiğ sebzenin işlenmesi ve dondurulmuş halde depolanması boyunca enzimlerin neden olduğu kalite kayıplarının önlenmesi amacıyla gerçekleştirilen haşlama işleminin yetersiz veya gereğinden fazla uygulanması, bir takım olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir (Bahçeci, 2003). Dondurularak muhafaza edilecek sebzeye yetersiz haşlama işlemi uygulandığı takdirde istenen enzim inaktivasyonun elde edilememesinin yanında, ısı etkisi ile bozulan hücre dokusu nedeniyle, enzim ile substratının teması geçmesi sağlanmaktadır. Bu sebepten dolayı yetersiz haşlama işlemi görmüş sebzelerde renk, aroma ve flavor haşlanmamış sebzelerle nispeten daha çok bozulmaktadır. Aşırı haşlanmış üründe ise, ısı etkisi ile yapının bozulması, renk kayıpları, besinsel değere sahip maddelerde azalmalar ve pişmiş tat oluşumu gerçekleşmektedir (Cohen, 1995; Bahçeci, 2003).

Haşlama işleminin avantajlarını en üst düzeyde sağlamak, buna karşın dezavantajlarını en alt seviyede tutmak amacıyla, uygun sıcaklık-süre normlarının belirlenmesi dondurularak muhafaza edilen sebzelerin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Dondurularak muhafaza edilen sebzelerde kalite kaybının büyük bir bölümü enzimatik reaksiyonlar sonucu gerçekleştiğine göre haşlama işleminin

yeterliliği indikatör olarak seçilen enzimin inaktivasyonunun sağlandığı normlar olarak belirlenmelidir (Williams et al., 1986; Barrett and Theerakulkait, 1995).

Sebzelerde kalite kaybına neden olan spesifik bir enzim grubu yoktur. Buna karşın peroksidaz enzimi sebzelerde ısıya karşı en dirençli enzim olarak bilinmekte ve genellikle peroksidaz enziminin inaktivasyonu haşlama işleminin yeterliliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Williams et al., 1986; Güneş ve Bayındırlı, 1993; Barrett and Theerakulkait, 1995). Böylece peroksidaz inaktivasyonun sağlandığı durumda diğerkalite kayıplarına yol açan enzimlerin inaktivasyonu gerçekleştiğı için depolama boyunca stabil bir ürün elde edileceğı düşünölmektedir (Burnette, 1977) .

Oksidoreduktazlar grubu altında incelenen peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimi, birçok farklı reaksiyonu katalizleyebilme özelliğine sahip olduğu için, diğerk enzimlerden farklı bir yere sahiptir. Peroksidazlar, peroksidatif, oksidatif ve hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizlerler (Robinson, 1991a; Wong, 1995a). Peroksidazlar enzimatik reaksiyonları esnasında hem yükseltgeyici hem de indirgeyici substratları kullanırlar. Yükseltgeyici substratlar genellikle peroksitler yada peroksiasitlerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen peroksidazlar farklı yükseltgeyici substratları kullanabilmektedir. Örneğinyabani turplardan elde edilen peroksidazlar sadece hidrojen peroksit, metil-hidrojen peroksit ve etil hidrojen peroksitleri kullanabilmektedir (Burnette, 1977). Peroksidaz enzimleri peroksidatif reaksiyonların katalizörlüğü sırasında çok sayıda indirgeyici substrat yani hidrojen donör substrat kullanabilmektedir. Peroksidaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Peroksidaz katalizörlüğünde, hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu (Wong, 1995a)

Şekil 2.3' de görüldüğü gibi peroksidaz, enzimatik reaksiyonun ilk aşamasında hidrojen peroksidin yapısındaki oksijen bağının (O-O) heterolitik olarak kırılmasını gerçekleştirmektedir. Bu aşamada hidrojen peroksit, enzimin yapısındaki iki elektronu yapısına alarak su molekülüne dönüşmekte ve peroksidaz enzimi ise O=Fe(IV)-porfirin- π -katyon yapısındaki demir-okso formuna yükseltgenmektedir (Peroksidaz -I). Reaksiyonun ikinci aşamasında ise yükseltgenmiş formdaki enzimin (Peroksidaz-I), hidrojen donör substrat tarafından (AH₂) önce Peroksidaz-II formuna, daha sonra da doğal formu olan Peroksidaz formuna indirgenmesi gerçekleşmektedir (Wong, 1995a).

Hidrojen donör substratlar tarafından peroksidaz enziminin indirgenmesi aşamasında oluşan serbest radikaller, kendi aralarında enzimatik olmayan yollarla birleşerek dimer yada polimer formlarını oluşturmaktadırlar. Örneğin peroksidaz enziminin fenolik yapıdaki hidrojen donör substratı olan guayakol molekülü, reaksiyon esnasında okside olarak guayakol radikaline dönüşmekte ve guayakol radikallerinin kendi aralarında polimerleşmesi sonucunda da renkli yapıdaki tetraguayakokinon bileşikleri oluşmaktadır (Robinson, 1991a). Guayakol moleküllerinin enzimatik reaksiyon sonucunda renkli yapıdaki tetraguayakokinonlara dönüşmesi, peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bir çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Baardseth and Slinde, 1983; Hemeda and Klein, 1991; Güneş ve Bayındırlı, 1993; Yemenicioğlu et al., 1998).

Hücre içerisinde stoplazmada çözünür formda, hücre duvarlarına ve kloroplast membranına bağlı olarak bulunan peroksidaz enziminin meyve ve sebzelerin yapısında bulunan bir çok fenolik madde ve besleyici değere sahip bileşikler substrat olarak kullanabilmesi, serbest radikallerinde içinde bulunduğu, çok geniş aralıkta ürün oluşmasına sebep olmaktadır (Robinson, 1991b).

Ham ve haşlanmamış sebzelerde istenmeyen flavor ve renk oluşumu ile peroksidaz aktivitesi arasındaki ilişki hala tam olarak netlik kazanmamıştır. Bitki dokularında bulunan birçok fenolik bileşiğin oksidasyonu, çok düşük miktarlarda hidrojen peroksit varlığında bile peroksidaz tarafından katalizlenebilmektedir. Peroksidaz enzimi farklı oksidasyon formlarında bulunabildiğinden, en az üç farklı tipte oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyebilmektedir. Ayrıca bütün bitki dokuları, askorbik asit peroksidaz gibi substrat–spesifik peroksidazları içerebilmektedir. Peroksidaz enziminin çok fazla miktarda bileşiğin oksidasyonunu gerçekleştirebilmesi ve bunun sonucunda da çok geniş perspektifte ürün oluşturması nedeniyle, bitkilerin hasat edildikten sonraki renk, aroma ve yapısal değişimlerinden sorumlu olabileceği fakat kesin bir ilişki kurulmasının ise zor olabileceği düşünülmektedir (Robinson, 1991a; Burnette, 1977).

Wagenknecht ve Lee (1958), bezelyelerde istenmeyen flavor gelişimi ile peroksidaz aktivitesi arasında ilişki olduğunu ve bezelye salamurasına peroksidaz eklendiği durumda istenmeyen-flavor gelişiminin gerçekleştiğini belirtmiştir. Sessa ve Anderson (1981), peroksidaz enziminin düşük sıcaklık (-18°C) ve nem seviyelerinde, meyve ve sebzelerdeki fonolik bileşikler üzerine oksidatif etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin meyve ve sebzelerin yapısında meydana gelen bozulmalar üzerinde etkili olduğunu belirtmiştir.

Peroksidaz enzimin aynı zamanda klorofil oksidasyonuna böylece yeşil sebzelerde renk kayıplarına da neden olabileceği belirtilmiştir. Klorofilaz ve klorofil oksidaz enzimlerinin, klorofil degradasyonu katalizlediği bilinse de, peroksidaz enziminin yeşil sebze ve meyveler olgunluğa eriştikçe meydana gelen renk kayıplarından önemli ölçüde sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nitekim bitki olgunluğa eriştikçe doku ve yapraklardaki peroksidaz aktivitesi ile hidrojen peroksit miktarı artmakta ve klorofil yıkımı artarak yeşil renk azalmaktadır (Matile et al., 1987).

Peroksidaz enziminin bitki hücrelerinde yaygın olarak dağılması, özellikle kloroplast membranlarında bulunması, bitki olgunluğa erişince, kloroplast içerisindeki klorofil-protein kompleksinin yıkımı sonucu klorofillerin serbest hale geçmesi ve bu esnada peroksidaz enziminin klorofil yıkımından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Martinez et al., 2001). Aynı etki bitkinin haşlanması sırasında da görülebileceğinden peroksidaz inaktivasyonun sağlanmadığı bir haşlama işlemi klorofil yıkımına sebep olabilmektedir.

Nitekim çileklerden elde edilen peroksidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda klorofil yıkımının yavaş da olsa gerçekleştiği ve bu etkinin ortamda bulunan çeşitli fenolik maddelerle hızlandığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada peroksidaz enziminin β -karoten üzerine etki etmediği ve klorofil- β -karoten model ortamının klorofil yıkım hızını arttırmadığı tespit edilmiştir (Martinez et al., 2001). Brokoli peroksidazı ile yapılan çalışmada ise peroksidaz enziminin klorofil yıkımını katalizlediği, bu enzimin inaktive edildiği durumda klorofil yıkımının azaldığı belirtilmiştir (Funamoto et al., 2002).

Dondurularak muhafaza edilecek sebzelerde, haşlama işleminin yeterliliği açısından indikatör olarak peroksidaz enziminin kullanılmasının bir takım olumsuz tarafları mevcuttur. Genel olarak peroksidaz enziminin tamamen inaktivasyonu için uygulanan ısı işlem, kalite kayıplarından sorumlu daha düşük ısı dirence sahip enzim gruplarının inaktivasyonu için gerekli ısı işleminden daha fazla olmaktadır (Halpin and Lee, 1987). Bu durumda uygulanan haşlama işlemi ile birlikte sebze meydana gelen yapısal bozulmalar renk, flavor ve besinsel değere sahip madde kayıpları ile gerekli duyulan enerji ihtiyacı da artmaktadır (Barrett and Theerakulkait, 1995).

Bötcher (1975), peroksidaz enziminin tamamen inaktivasyonu için uygulanan ısı işlemin sebzelerde fazla miktarda kalite kayıplarına yol açtığını ve aşırı haşlama göstergesi olduğunu, buna karşın haşlama işleminin zararlarının azaltılması ve kalitenin korunması açısından sebzelerde kalıntı peroksidaz aktivitesinin %1-10 düzeyinde olması gerektiğini belirtmiştir.

Ayrıca farklı sebze kaynaklarından elde edilen peroksidaz enzimleri farklı ısı direnç göstermektedir. Bunun yanında aynı sebze türü içinde farklı ısı dirence sahip izoenzimler bulunabildiğinden dolayı, haşlama işlemi ile peroksidaz enziminin tamamen inaktive olmadığı durumlarda, daha sonradan reaktivasyon gözlenebilmektedir (Williams et al, 1986; Lee et al., 1988; Halpin et al., 1989; Adams et al., 1996).

Bununla birlikte gıdalarda meydana gelen lipid oksidasyonu, kaliteyi etkileyen ana unsurların başında gelmektedir. Lipid oksidasyonu, gıdalarda aroma, tat, koku, flavor, renk ve besinsel kalite değişimlerinde önemli rol oynamaktadır. Çoklu doymamış yağların oksidasyonu ile oluşan ürünlerle birlikte gıdalarda renk, tat, koku, flavor gibi önemli kalite kriterlerinde kayıplar meydana gelmektedir. Lipid oksidasyonu esnasında oluşan radikal türleri gıdalarda protein, pigment, vitamin ve karbonhidrat gibi bileşenlerle etkileşime girmekte ve bu bileşenlerin yapılarında değişikliklere sebep olmaktadır (Whitaker, 1991).

Gıdalarda çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen enzim lipoksigenazdır. Yapılan araştırmalarda dondurulmuş sebzelerde depolama boyunca istenmeyen flavor gelişiminden, klorofil ve β -karoten pigmentlerinin yıkımından lipoksigenaz enzimi sorumlu olduğu bildirilmektedir (Sheu and Chen, 1991; Barrett and Theerakulkait, 1995; Williams et al., 1986).

1928 yılında Haas ve Bohn, soya fasulyesi ekstraktının, ekmekçilikte kullanılan, buğday unundan elde edilen hamurun sarı rengini açtığını, bu etkinin soya fasulyesinde bulunan ve karoten oksidaz olarak adlandırdıkları enzim tarafından gerçekleştirildiğini belirtmiştir (Wolf, 1975). Daha sonra, yapılan çalışmalarda karoten yıkımının lipid oksidasyonun bir sonucu olarak gerçekleştiği ve bu etkinin lipoksigenaz enzimi tarafından gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Whitaker, 1991).

Lipoksigenaz (EC 1.13.11.12.) oksidoreduktaz enzim grubunun bir üyesi olup, *cis,cis*-1,4-pentadien birimi içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin; *cis,trans*-dienoik-monohidroperoksitlere oksidasyonunu katalizleyen, dioksigenaz sınıfındaki enzimlerdendir (O'Connor and O'Brien, 1991). Lipoksigenaz enziminin substratını bitkilerde baskın olarak bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik ve linolenik asit oluşturmaktadır (Gardner, 1991). Lipoksigenaz doğada geniş bir dağılım göstermekte ve özellikle gelişmiş bitki ve hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Whitaker, 1991). Çoğu bitki kaynağında farklı izoenzimler şeklinde bulunmaktadır. Bu izoenzimler optimum pH, substrat spesifikliğı, son ürün, ısı direnç ve ko-oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme eğilimi açısından farklılık göstermektedirler (Robinson et al., 1995; Shibata and Axelrod, 1995; Prigge et al., 1997).

Bitki kökenli lipoksigenazlar iki ana sınıf altında incelenmektedir. Bunlardan ilki, nispeten az sayıda bitkide bulunan, pH 9 civarında optimum aktivite gösteren ve ko-oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme eğilimi daha az olan Tip-1 lipoksigenazlardır. İkincisi ise, bitkilerde çok yaygın olarak bulunan, pH 6.5 civarında optimum aktivite gösteren ve ko-oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme eğilimi daha fazla olan Tip-2 lipoksigenazlardır (O'Connor and O'Brien, 1991).

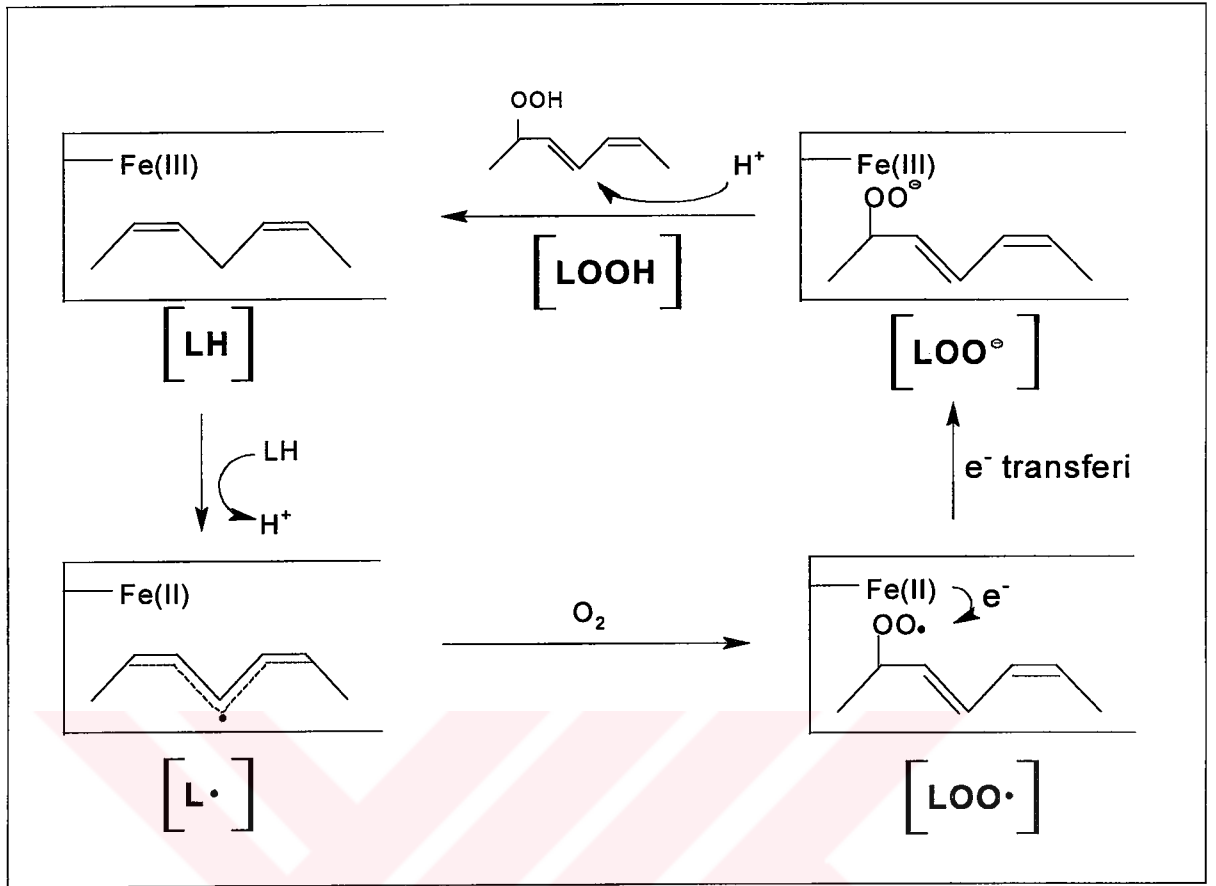
Lipoksigenaz izoenzimlerinin molekül ağırlığı 95-100 kDa arasında değişmekte ve her enzim yapısında bir adet hem formda olmayan demir atomu içermektedir (Shibata and Axelrod, 1995; Wu, 1996; Prigge et al., 1997). Yapıdaki demir atomunun enzime çok sıkı bir şekilde bağlı olduğu ve sadece 4,5-dihidroksi-m-benzendisulfonik asit gibi kuvvetli Fe (II) kelat yapıcı bileşiklerle yapıdan uzaklaştırılabileceği, Fe (III) kelat yapıcı bileşiklerin ise enzimdeki demir molekülünü yapıdan ayıramadığı belirtilmiştir. (Wong, 1995b).

Lipoksigenaz enzimleri bitki hücrelerinde hem organallerde, hem de sitoplazma içerisinde bulunmaktadır (O'Connor and O'Brien, 1991). Ayrıca immünofloresans etiketleme çalışmalarının sonucunda, soya fasulyesindeki lipoksigenaz enzimlerinin hücre içerisinde rastgele dağıldığı gösterilmiştir (Vernooy-Gerritsen et al., 1984).

Lipoksigenazın gıdalardaki önemi, kötü tat ve aroma oluşumu ile renk bozulumu üzerinde etkin rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanında, lipoksigenaz enzimi gıda endüstrisinde buğday ununun ağartılması amacıyla, ekmek yapımında kullanım alanına sahiptir (Ikediobi and Snyder, 1977; Borrelli et al., 1999).

Lipoksigenaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen dioksijenasyon reaksiyonlarında kabul gören en önemli mekanizma radikal mekanizmasıdır. Lipoksigenaz hem aerobik, hem de anaerobik şartlarda linoleik asit oksidasyonunu gerçekleştirebilmektedir. *cis,cis*-1,4-pentadien birimi içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda lipoksigenaz enziminin içerdiği demir atomunun yükseltgenmiş [Fe (II)] ve indirgenmiş [Fe (III)] formları rol oynamaktadır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için enzimin yükseltgenmiş [Fe (III)] formda olması gerekmektedir (Whitaker, 1991; Robinson et al., 1995; Wong, 1995b; Prigge et al., 1997).

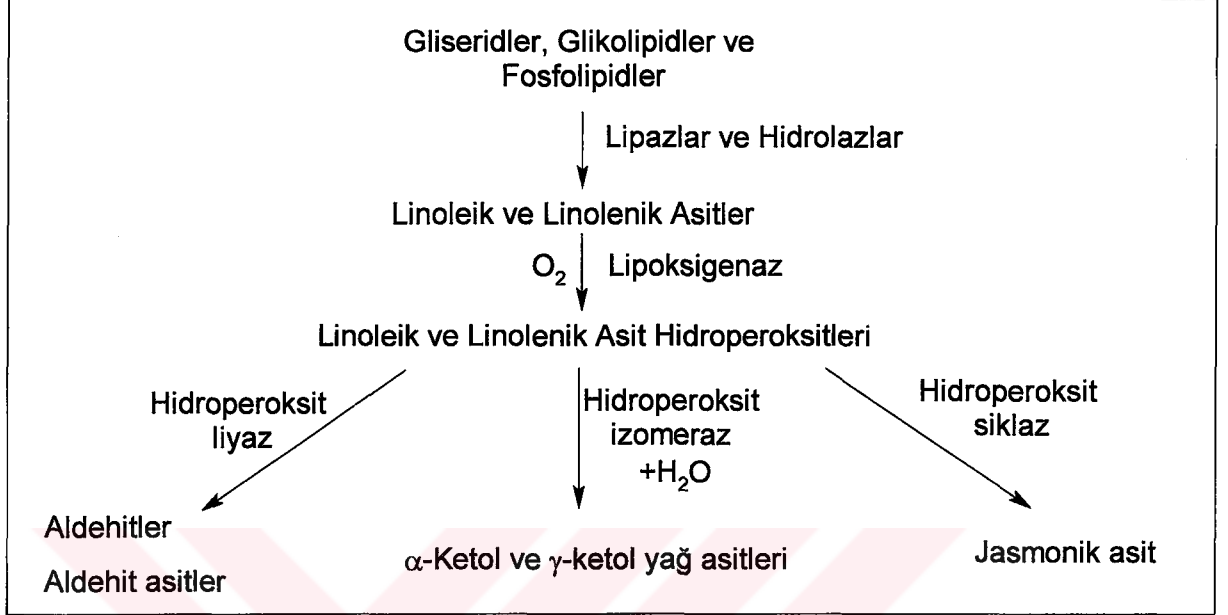
Aerobik koşullarda lipoksigenaz katalizörlüğünde, *cis,cis*-1,4-pentadien birimi içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Lipoksigenaz katalizörlüğünde, *cis,cis*-1,4-pentadien birimi içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu (Gardner, 1991)

Aerobik koşullarda aktif formdaki lipoksigenaz [Fe(III)], 1,4-pentadien yapısındaki substrattan bir elektron transfer ederek, substrat yapısındaki 11 numarılı karbon atomuna ait hidrojenin ayrılmasına sebep olmaktadır. Böylece substrat (LH) okside olarak pentadienil radikali oluşmakta (L•) ve enzim de indirgenmiş (inaktif) form olan [Fe(II)] formuna dönüşmektedir. Daha sonra oksijen molekülü stereospesifik olarak 9 veya 13 numarılı karbon atomuna bağlanmakta ve böylece peroksi radikali oluşmaktadır (LOO•). Peroksi radikali oluşuktan sonra enzim [Fe(II)], elektron transferini gerçekleştirerek peroksi anyonunu oluşturmakta (LOO⁻), ve aynı zamanda aktif formuna [Fe (III)] dönüşmektedir. En son olarak peroksi anyonu proton alarak yağ asidi hidroperoksitini (LOOH) oluşturmaktadır (Gardner, 1991; Wong, 1995b). Aerobik koşullarda, pentadienil (L•) ve peroksi (LOO•) radikallerinin oluşumu EPR çalışmalarıyla doğrulanmıştır (Nelson et al., 1990).

Lipoksigenaz aktivitesi sonucunda meydana gelen hidroperoksitler, farklı enzim grupları sayesinde uçucu özelliğe sahip çok çeşitli ürünlere parçalanmaktadır. Şekil 2.5'de 1-4 pentadien yapıya sahip linoleik ve linolenik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucu oluşan ana ürünler görülmektedir.



Şekil 2.5. Linoleik ve linolenik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucu oluşan ana ürünler (Whitaker, 1991)

Lipoksigenaz aktivitesi sonucunda meydana gelen hidroperoksitlerin, farklı enzim grupları tarafından parçalanması sonucunda oluşan aldehitler ve aldehit asitleri, ketoller ve ketol yağ asitleri karakteristik aroma bileşenleridir. Çoğu uçucu özelliğe sahip olan bu karbonil bileşikleri içerisinde özellikle hekzenalin istenmeyen flavor oluşumu açısından önem taşıdığı belirtilmektedir (Eriksson, 1975; Gardner, 1975; Wolf, 1975; Grosch et al., 1976).

Lipoksigenaz karotenoidlerin ve klorofilin oksidasyonunu radikal mekanizması yoluyla, çoklu doymamış yağ asitleri varlığında katalizlemektedir. Lipoksigenaz çoklu doymamış yağ asidi olmadan pigmentleri okside edememektedir. Bu sebepten dolayı lipoksigenaz varlığında gerçekleşen hidroperoksidasyon reaksiyonları esnasında karotenoidler ve klorofiller yıkıma uğradıkları için bu tip reaksiyonlara pigment ko-oksidasyon reaksiyonları denilmektedir.

Literatürde karotenoidlerin ko-oksidasyonu, lipoksigenaz katalizörlüğünde gerçekleşen çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşan radikaller ile β -karotenin etkileşimi sonucu meydana geldiği belirtilmektedir (Ikediobi and Snyder, 1977; Hildebrand and Hymowitz, 1982; Robinson et al., 1995; Aziz et al., 1999; Calligaris et al, 2002).

Karotenoidlerin enzim-pentadienil radikal kompleksine (E-L•) yada ortama salınan pentadienil radikaline (L•) etki ettiği ve ko-oksidasyon esnasında karotenoidin yapısından hidrojen atomu ayrılmasının gerçekleştiği belirtilmektedir (Robinson et al., 1995). Bu esnada kararlı bir rezonans yapıya sahip karotenoid radikali oluşmakta oluşan karotenoid radikali de oksijenle birleşmekte ve karbonil bileşiklerini oluşturmaktadır. Yapısına oksijen alan karotenoid yıkıma uğramakta ve bozulmaktadır (Klein et al.,1984).

Diğer bir öngörülen mekanizmada enzim peroksi radikal kompleksinin (E-LOO•) yada peroksi radikalının (LOO•) ortama salınması ve karotenoidlerle reaksiyona girerek yapılarından hidrojen atomu ayrılmasına sebep olmaktadır. Böylece yağ asidi hidroperoksiti (LOOH) oluşmakta ve daha sonra yapısına oksijen alan karotenoidler yıkıma uğrayarak bozulmaktadır (Robinson et al., 1995; Wu et al., 1999).

Bazı araştırmacılar sebzelerde donmuş depolama esnasında meydana gelen renk kayıplarından ve istenmeyen flavor oluşumundan lipoksigenaz enziminin sorumlu olduğunu ve bu sebepten dolayı peroksidaz inaktivasyonu için uygulanan bir haşlama işlemine gerek olmadığını belirtmişlerdir (Williams et al, 1986; Sheu and Chen, 1991; Barrett and Theerakulkait, 1995) .

Sheu ve Chen (1991), lipoksigenaz ve peroksidaz enzimlerinin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla haşlama işlemi uygulanan yeşil fasulyelerdeki, donmuş depolama boyunca meydana gelen yeşil renk değişimlerini incelediklerinde her iki durumda da yaklaşık olarak aynı oranda ve düşük düzeyde renk kayıplarının gerçekleştiğini buna karşın haşlanmamış fasulyelerde ise donmuş depolama boyunca yüksek oranda yeşil renk kaybının gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Williams ve ark. (1986), haşlanmış bezelyeler üzerine saflaştırılmış lipoksigenaz, peroksidaz, katalaz ve lipaz enzimlerinin farklı kombinasyonlarda ilave edilmesi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarda, sadece lipoksigenaz enziminin bulunduğu kombinasyonda bezelyenin duyusal niteliklerinin önemli ölçüde etkilendiğini buna karşın, peroksidaz, katalaz ve lipaz enzimlerinin bulunduğu kombinasyonlarda bezelyenin duyusal niteliklerinde önemli oranda değişiklik gerçekleşmediğini belirtmişlerdir.

Calligaris ve ark. (2002), domates pürelerinde haşlama indikatörü olarak lipoksigenaz kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada, donmuş depolama boyunca renk değişimini incelemiş ve rengin haşlanmamış ürüne göre oldukça iyi korunduğunu belirtmiştir. Ayrıca iki farklı depolama sıcaklığı (-18°C ve -7°C) ile gerçekleştirdiği denemelerde haşlanmamış ürünlerde depolama sıcaklığının renk değişimini etkilendiği ve düşük sıcaklıkta depolanan örneklerin renginin daha iyi korunduğunu, buna karşın indikatör olarak lipoksigenaz enziminin kullanıldığı haşlanmış örneklerde her iki depolama sıcaklığında da rengin oldukça iyi korunduğunu belirtmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan bezelye ve havuçlar Ankara piyasasından temin edilmiştir. Bezelyeler kavuzlarından çıkarılarak tane halinde, havuçlar ise kabukları soyulduktan sonra 5 mm boyutlarında küpler halinde kesilerek denemelerde kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden linoleik asit, klorofil a ve klorofil b, Sigma Chemical Co. (St. Louis, ABD), diğerk tüm kimyasal maddeler ise Merck (Darmstat, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

3.2. Metot

Deneyssel çalışmaların birinci aşamasında indikatör olarak ayrı ayrı lipoksigenaz (LOX) ve peroksidaz (POD) enzimleri seçilerek haşlanmış ve haşlanmamış bezelye ve havuçlarda -18°C'de dondurulmuş halde depolama boyunca meydana gelen pigment değişimleri belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise bezelye ve havuçlardan elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılarak, model reaksiyon sistemleri içerisinde LOX ve POD enzimlerinin ̢-karoten ve klorofillerin ko-oksidasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

3.2.1. Haşlama

Dondurulmuş halde depolanan bezelye ve havuç rnekleri >% 90 LOX (LOX indikatör) ve >% 90 POD (POD indikatör) inaktivasyonu sağlanan iki farklı sıcaklık-süre kombinasyonu uygulanarak sıcak su içerisinde haşlanmıştır. Bu amaçla, bezelyelerde LOX inaktivasyonu için 70°C'de 4 dak, POD inaktivasyonu için ise 80°C'de 2 dak haşlama, havuçlarda ise POD inaktivasyonu için 80°C'de 1.5 dak haşlama uygulanmıştır. Havuçlarda ölçülebilir düzeyde LOX aktivitesi saptanamamıştır (Bahçeci, 2003). Bu normlara göre haşlanan sebzeler Beko BK 7971 DF derin dondurucuda -24°C'de hızlı dondurulduktan sonra -18°C'de 12 ay boyunca muhafaza edilmiştir. Depolama boyunca haşlanmış ve haşlanmamış örneklerde klorofiller ve karotenoidlerin değişimleri belirlenmiştir.

3.2.2. Dondurulmuş Halde Depolama Sırasında Bezelye ve Havuçların Pigment İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimlerin Belirlenmesi

3.2.2.1. Standart Pigment Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.2.1.1. Standart Klorofil a ve b Çözeltilerinin Hazırlanması

Klorofil a ve b stok çözeltileri 1 mg saf klorofil 250 µl metanolde çözülerek hazırlanmış ve -24°C'de muhafaza edilmiştir. Standart çalışma çözeltileri stok çözeltiden 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.2.1.2. Standart Feofitin a ve b Çözeltilerinin Hazırlanması

Feofitin a ve b çözeltilerini hazırlamak için 900 µl klorofil a ve b çözeltileri üzerine 50 µl 0.1 N HCl ilave edilmiş ve yaklaşık 30 saniye hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra oluşan feofitin çözeltileri 50 µl 0.1 N NaOH ilave edilerek stabilize edilmiştir.

3.2.2.1.3. Standart β-Karoten Çözeltilerinin Hazırlanması

Stok β-karoten çözeltisi 100 mg saf satandard 100 ml BHT ile stabilize edilmiş tetrahidrofuran içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. β-Karoten çalışma standartları stok çözeltiden 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde BHT ile stabilize edilmiş tetrahidrofuran ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.2.2. Klorofiller ve Karotenoidlerin Ekstraksiyonu

Homojenizatör kabı içerisine yaklaşık 5 gram kabaca parçalanmış bezelye örnekleri, 0.1 g CaCO₃, 1 ml %1 BHT çözeltisi ve 25 ml metanol konulup orta hızda 2 dakika boyunca homojenize/ekstrakte edilmiştir. Homojenize/ekstrakte edilen örnek +4°C'de ve karanlık bir ortamda siyah bant filtre kağıdından filtre edilmiştir. Filtre kağıdı ve üzerindeki kalıntı 25 ml metanol ile tekrar homojenize edilip filtre kağıdından filtre edilmiş ve filtratlar birleştirilmiştir. Bu işlem son kalıntı renksiz oluncaya kadar tekrarlanmıştır. Bu amaçla 1 gram bezelye için 10 ml metanol yeterli olmaktadır (Gökmen et al., 2002a).

Havuçtan β -karoten ekstraksiyonunda yukarıda açıklanan işlemler sırasında metanol yerine BHT ile stabilize edilmiş tetrahidrofuran kullanılmıştır. Klorofiller çözüldüğü çözücüye bağlı olarak düşük sıcaklıklarda bile yavaş da olsa yapısal değişikliklere uğrayabildiklerinden, -18°C 'de saklanan örneklerin HPLC analizleri 1 hafta içerisinde tamamlanmıştır (Gökmen et al., 2002a).

3.2.2.3. HPLC ile Klorofiller ve Karotenoidlerin Analizi

Klorofiller ve karotenoidlerin analizlerinde Varian 9010 gradient pompa, Rheodyne 7125 altı yollu manuel enjeksiyon bloğu ve Hewlett-Packard 1040A Photo Diode Array dedektörden oluşan bir HPLC cihazı kullanılmıştır. Kromatografik seperasyon MikroPak C8 (5 μm) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlar HP ChemStation (rev. A05.01) yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Klorofiller ve karotenoidlerin C8 kolonda seperasyonu için metanol:su karışımından oluşan bir mobil faz sistemi kullanılmıştır. Elusyon oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 0.75 ml/dak olarak ayarlanmıştır.

Elusyon programı şöyledir:

t, dak	Metanol %	Su %
0	90	10
5	90	10
10	95	5
15	95	5
20	90	10

Kromatogramlar aynı anda 432, 450, 470, 652 ve 666 nm dalga boylarında kaydedilmiştir. Ayrıca pik spektrumları 400-700 nm aralığında doğrulama amaçlı olarak kaydedilmiştir.

3.2.3. Bezelye ve Havuç LOX ve POD Enzimlerinin Model Reaksiyon Sistemlerinde β -Karoten ve Klorofillerin Ko-Oksidasyonu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Belli miktardaki sebze örneği saf su (+4°C) ile birlikte (10 g bezelye/50 ml saf su; 20 g havuç/30 ml saf su) Virtis homojenizatör kullanılarak 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenat 3 kat kaba filtre bezinden filtre edildikten sonra +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (25000 g). Elde edilen berrak süpernetant model reaksiyon sistemlerinde LOX ve POD enzimlerinin β -karoten ve klorofillerin ko-oksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesinde ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

3.2.3.2. Stok Substrat ve Pigment Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.3.2.1. Linoleik Asit Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Stok linoleik asit (substrat) çözeltisi, 2 μ l linoleik asit (>%99 saflıkta), 2 μ l Tween 20 ve 8.4 ml deiyonize su karıştırılarak bir vial içerisinde hazırlanmıştır. Sudaki çözünürlüğü az olan linoleik asit 130 μ l, 0.1 N NaOH eklenmesiyle sabunlaştırılarak optik berraklığa sahip linoleik asit stok çözeltisi elde edilmiştir. Stok substrat çözeltisi içerisindeki linoleik asit konsantrasyonu 750 μ M'dir.

3.2.3.2.2. Guayakol Stok Çözeltisinin Hazırlanması

50 μ l guayakol 15 ml %50'lik etanolde çözündürülerek hazırlanmıştır. Stok guayakol çözeltisinin konsantrasyonu 30 mM dır.

3.2.3.2.3. Hidrojen Peroksit Stok Çözeltisinin Hazırlanması

3 μ l hidrojen peroksit 32.6 ml deiyonize suda çözündürülerek hazırlanmıştır. Stok hidrojen peroksit çözeltisinin konsantrasyonu 3 mM dır.

3.2.3.2.4. β -Karoten Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg β -karoten (>%99 saflıkta) ve 100 μ l Tween 80 ışık geçirmeyen vial içerisinde 1 ml diklormetan ile çözündürülmüştür. Daha sonra β -karoten çözeltisi azot atmosferi altında kurutularak üzerine 9.95 ml EDTA çözeltisi (0.67 mM) ilave edilmiştir (Aziz et al., 1999; Pastore et al., 2000). Optik berraklığa sahip stok β -karoten çözeltisinin konsantrasyonu 187.5 μ M'dır.

3.2.3.2.5. Klorofil a ve b Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Klorofil a stok çözeltisi 0.4 mg klorofil a'nın , 9.95 ml metanolde çözündürülmesi, stok klorofil b çözeltisi ise 0.4 mg klorofil b'nin, 9.8 ml metanolde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır. Optik berraklığa sahip klorofil a ve klorofil b stok çözeltilerinin konsantrasyonu 45 μ M'dır.

3.2.3.3. LOX Enziminin β -Karoten ve Klorofillerin Ko-Oksidasyonu Üzerine Etkisi

Bezelye LOX enziminin pigment ko-oksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı oranlarda linoleik asit ve pigment içeren reaksiyon karışımları kullanılmıştır. LOX enziminin birincil aktivitesi linoleik asitin hidroperoksidasyonu olup, bu aktivite 1,4-pentadien yapının konjuge dien yapıya dönüşerek 234 nm'de absorbansın artması prensibinden yararlanılarak izlenmiştir. Bu amaçla, Gökmen ve ark. (2002b) tarafından açıklanan modifiye edilmiş yöntemden yararlanılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu 2101 PC model tarayıcı spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LOX enziminin pigment ko-oksidasyonu üzerine etkisi ise β -karoten için 460 nm, klorofil a için 670 nm ve klorofil b için 640 nm'de absorbans azalışları olarak izlenmiştir.

Model ortamda reaksiyon karışımı içerisindeki linoleik asit konsantrasyonu 25 μ M olarak sabit tutulmuş, pigment konsantrasyonları ise 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ve 1:64 pigment:linoleik asit oranlarını elde etmek üzere 0-25 μ M arasında değiştirilmiştir. Bezelye LOX enziminin optimum pH değeri 6 olarak belirlendiğinden, reaksiyon ortamı M/15 fosfat tamponu ile tamponlanmıştır.

Reaksiyonlar 100 µl ham enzim ekstraktı ilavesi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş, zaman-absorbans verileri Curve Expert ver 1.3 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre, herbir veri seti için üssel ilişki fonksiyonu belirlenmiş ve bu fonksiyonun t=0 anındaki türevi alınarak başlangıç reaksiyon hızları hesaplanmıştır.

β-Karoten ve klorofil pigmentlerinin bezelye LOX enzimi üzerine inhibe edici etkisi, farklı pigment konsantrasyonlarında kinetik yaklaşımla belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı substrat konsantrasyonlarında (0-100 µM linoleik asit) reaksiyon hızları ölçülmüş ve kinetik parametreler (K_m ve V_{max}) belirlenmiştir. Daha sonra aynı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri (0-100 µM) üzerine belli konsantrasyonda pigment (1.56 µM) ilave edilmiş ve böylelikle değişen LOX kinetik parametreleri yeniden belirlenerek β-karoten, klorofil a ve klorofil b için K_i değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.4. POD Enziminin β-Karoten ve Klorofillerin Ko-oksidasyonu Üzerine Etkisi

POD enziminin pigment ko-oksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı oranlarda hidrojen peroksit, guayakol ve pigment içeren reaksiyon karışımları kullanılmıştır. POD enzim aktivitesi, hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında hidrojen donör substrat olarak kullanılan guayakolün, tetraguayakokinonlara dönüşümü ile gerçekleşen 420 nm'deki absorbans artışının izlenmesi prensibinden yararlanılarak belirlenmiştir (Yemenicioğlu ve Cemeroğlu, 1998).

Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu 2101 PC model tarayıcı spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LOX enziminin pigment ko-oksidasyonu üzerine etkisi ise β-karoten için 460 nm, klorofil a için 670 nm ve klorofil b için 640 nm'de absorbans azalışları olarak izlenmiştir

β-Karoten varlığında POD aktivitesinin incelenmesi amacıyla model ortam reaksiyon karışımı içerisindeki hidrojen peroksit ve guayakol konsantrasyonları 25 µM olarak sabit tutulmuş, β-karoten konsantrasyonları ise 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 β-karoten:hidrojen peroksit oranlarını elde etmek üzere 0-25 µM arasında

değiştirilmiştir. β -Karoten ko-oksidasyonunu incelemek amacıyla, hidrojen donör molekül olan guayakolün kullanılmadığı durumda, hidrojen peroksit konsantrasyonu 25 μ M olarak sabit tutulmuş, β -karoten konsantrasyonları ise 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 β -karoten:hidrojen peroksit oranlarını elde etmek üzere 0-25 μ M arasında değiştirilmiştir.

Klorofil a ve b varlığında POD aktivitesinin incelenmesi amacıyla, model ortam reaksiyon karışımı 25 μ M hidrojen peroksit, 1 mM guayakol ve 1.56 μ M klorofil a ve b olacak şekilde hazırlanmıştır. Hidrojen donör molekül olan guayakolün kullanılmadığı durumda klorofil a ve klorofil b ko-oksidasyonunu incelemek amacıyla model ortam reaksiyon karışımı 100 μ M hidrojen peroksit ile 1.56, 3.12 ve 4.68 μ M klorofil a ve klorofil b içerecek şekilde hazırlanmıştır.

POD enziminin optimum pH değeri 6 olarak belirlendiğinden, reaksiyon ortamı belirtilen konsantrasyonlarda pigment, hidrojen peroksit ve guayakol ilave edildikten sonra M/15 fosfat tamponu ile 2.9 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyonlar 100 μ l ham enzim ekstraktı ilavesi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Zaman-absorbans verileri Curve Expert ver. 1.3 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre, herbir veri seti için üssel ilişki fonksiyonu belirlenmiş ve bu fonksiyonun $t=0$ anındaki türevi alınarak başlangıç reaksiyon hızları hesaplanmıştır.

Klorofil a ve klorofil b varlığında POD enzim aktivitesindeki değişim kinetik yaklaşımla değerlendirilmiştir. Bu amaçla guayakol konsantrasyonu sabit tutulmuş (1 mM), farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında (0-200 μ M) reaksiyon hızları ölçülmüştür. Daha sonra ise, aynı konsantrasyonlardaki hidrojen peroksit (0-200 μ M) ve guayakol (1 mM) üzerine belli konsantrasyonda klorofil a ve klorofil b (1.56 μ M) ilave edilmiş ve böylelikle POD aktivitesinin ne şekilde değiştiği ortaya konulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Dondurulmuş Halde Depolama Sırasında Bezelye ve Havuçların Pigment İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler

4.1.1. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Bezelye Örneklerinin Klorofil İçeriklerindeki Değişim

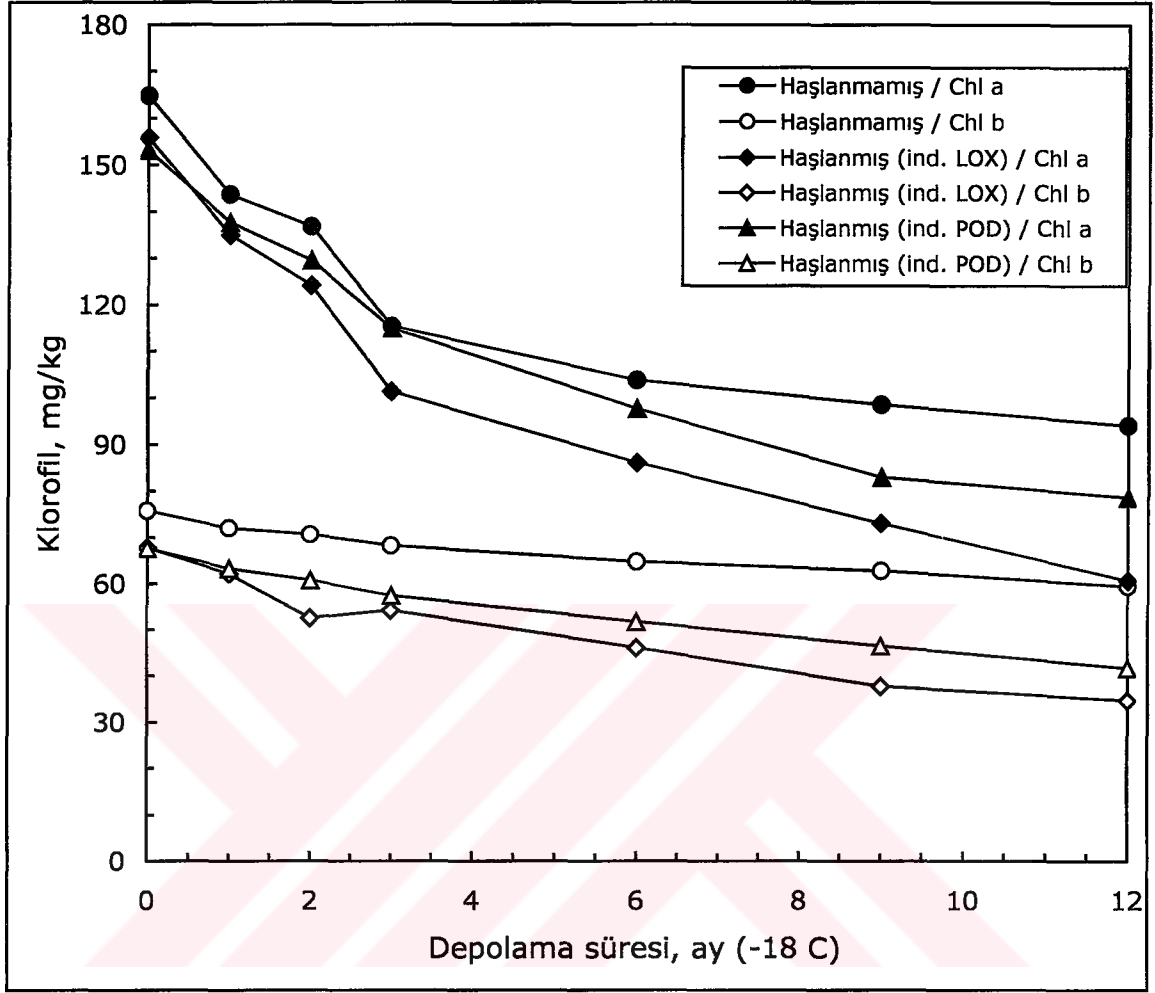
Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX indikatör ve POD indikatör) bezelyelerin -18°C 'de depolama boyunca klorofil a ve klorofil b miktarındaki değişim Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

Haşlanmamış bezelyelerde başlangıç klorofil a / klorofil b miktarları (a: 164.77 mg/kg, b: 75.83 mg/kg) -18°C 'de 6 ay sonunda sırasıyla %37.00 / %14.50, 12 ay sonunda %42.86 / %21.46 oranında azalmıştır. İndikatör olarak LOX ve POD enzimleri seçilerek haşlanmış bezelyelerin klorofil a ve klorofil b miktarları 6 ay sonunda sırasıyla %44.75 / %32.00 ve %36.25 / %23.50, 12 ay sonunda ise sırasıyla %61.02 / 48.76 ve %48.62 / %38.21 oranında azalmıştır (Şeki 4.1).

Depolama boyunca bezelyelerde klorofil a ve klorofil b azalışı 1. derece kinetik modele uygun seyretmiştir. Buna göre dondurulmuş halde depolanan haşlanmamış bezelyelerin klorofil a ve klorofil b kayıp hız sabitleri (k) sırasıyla 0.0495 ay^{-1} ve 0.0189 ay^{-1} , yarılanma süreleri ($t_{1/2}$) ise sırasıyla 14.01 ay ve 36.76 ay olarak hesaplanmıştır. İndikatör olarak LOX ve POD enzimleri seçilerek haşlanmış bezelyelerin klorofil a ve klorofil b kayıp hız sabitleri (k) sırasıyla 0.0830 ay^{-1} / 0.0571 ay^{-1} ve 0.0607 ay^{-1} / 0.0396 ay^{-1} , yarılanma süreleri ($t_{1/2}$) ise sırasıyla 8.35 ay / 12.14 ay ve 11.42 ay / 17.50 ay olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Bezelyelerde dondurulmuş halde depolama sırasında klorofil a, klorofil b'ye göre daha hızlı azalmıştır. Klorofil a kayıp hızı, klorofil b kayıp hızına göre haşlanmamış bezelyelerde 2.62 kat, LOX ve POD indikatör seçilerek haşlanmış bezelyelerde ise sırasıyla 1.45 ve 1.53 kat daha hızlı gerçekleşmiştir. Literatürde, çeşitli sebzelerin haşlanması, sterilizasyonu, aseptik şartlarda depolanması ve dondurularak muhafazası esnasında, genel olarak klorofil a kaybının klorofil b kaybına göre

2 –10 kat daha hızlı gerçekleştiği belirtilmektedir (Buckle and Edwards, 1970; Canjura et al., 1991; Schwartz and Lorenzo, 1991; Teng and Chen, 1999).



Şekil 4.1. Haşlanmamış ve haşlanmış (indikatör LOX ve indikatör POD) bezelyelerin dondurulmuş halde depolanması boyunca klorofil a (Chl a) ve klorofil b (Chl b) içeriklerindeki değişim

Genel olarak bezelyelerde haşlama ile dondurulmuş halde depolama sırasında klorofil a ve klorofil b kayıp hızında bir artış meydana gelmiştir. Kayıp hızı LOX indikatör seçilen durumda, POD indikatör seçilen duruma göre klorofil a için 1.37 kat, klorofil b için ise 1.44 kat daha yüksek bulunmuştur. Buna göre dondurma işlemi öncesi LOX indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama, klorofil kaybını artırması açısından yetersiz bulunmuştur. Buna karşılık, POD indikatör seçilerek

gerçekleştirilen haşlama ile klorofil a ve klorofil b için -18°C 'de sırasıyla 11.42 ve 17.50 ay gibi uzun ve yeterli bir yarılanma zamanı gözlenmiştir.

Askorbik asit dondurulmuş halde depolanan sebzelerin en önemli bileşenlerinden biridir. Bahçeci (2003) haşlanmamış bezelyelerin -18°C 'de dondurulmuş halde depolanması sırasında yarılanma süresinin 3.30 ay olduğunu, bu sürenin LOX indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama ile 3.87 kat, POD indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama ile ise 5.76 kat artırılabilirdiğini bildirmiştir. Araştırmacı dondurulmuş halde depolama boyunca bezelye POD ve LOX enzimlerinde reaktivasyon gözlememiştir.

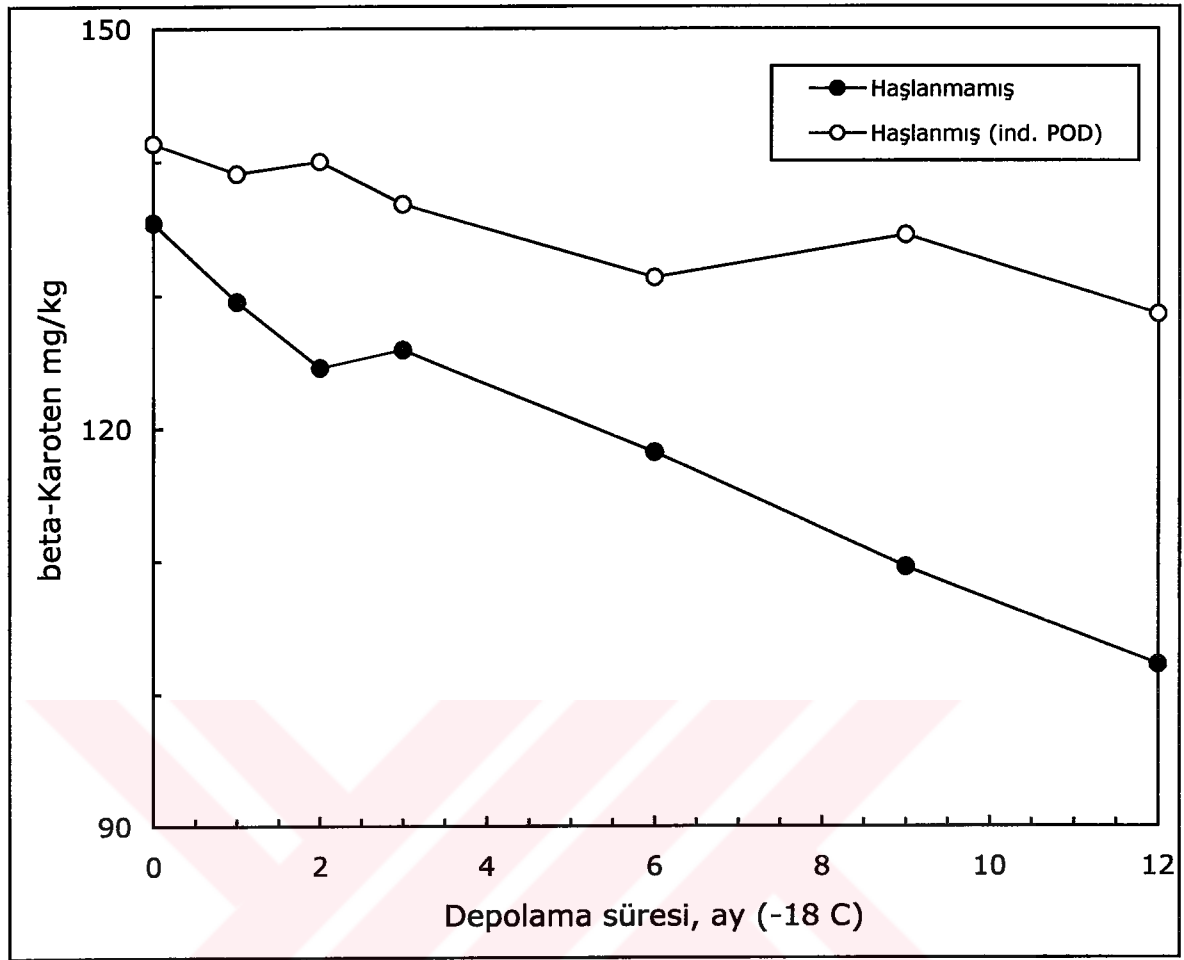
4.1.2. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Havuç Örneklerinin β -Karoten İçeriklerindeki Değişim

Haşlanmamış ve haşlanmış (POD indikatör) havuçların -18°C 'de depolama boyunca β -karoten miktarındaki değişim Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

Haşlanmamış havuçların başlangıç β -karoten miktarları (135.45 mg/kg) -18°C 'de 6 ay sonunda %12.75, 12 ay sonunda %24.50 oranında azalmıştır. İndikatör olarak POD enzimi seçilerek haşlanmış havuçların β -karoten miktarları 6 ay sonunda %7.07, 12 sonunda ise %9.00 oranında azalmıştır (Şekil 4.2).

Depolama boyunca havuçlarda β -karoten azalışı 1. derece kinetik modele uygun seyretmiştir. Buna göre dondurulmuş halde depolanan haşlanmamış havuçların β -karoten kayıp hız sabiti (k) 0.0219 ay^{-1} , yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ise 31.65 ay olarak hesaplanmıştır. İndikatör olarak POD enzimi seçilerek haşlanmış havuçların β -karoten kayıp hız sabiti (k) 0.0072 ay^{-1} , yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ise 96.90 ay olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Havuçlarda POD indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama ile dondurulmuş halde depolama sırasında β -karoten kayıp hızında 3.04 katlık önemli bir azalış meydana gelmiştir. Buna bağlı olarak β -karoten yarılanma süresi de 3.06 kat uzatılmıştır.



Şekil 4.2. Haşlanmamış ve haşlanmış (indikatör POD) havuçların dondurulmuş halde depolanması boyunca β -karoten içeriklerindeki değişim

Bahçeci (2003), havuçlarda POD enzimi indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama işlemi ile dondurulmuş halde depolama sırasında askorbik asit kayıp hızının 1.92 kat yavaşlatılabildiğini bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca depolama boyunca havuç POD enziminde reaktivasyon gözlenmediğini belirtmiştir.

Haşlanmamış ve farklı koşullarda haşlanmış bezelye ve havuçların klorofil ve β -karoten bileşenlerinin -18°C 'de depolama sırasında kayıp hız sabiti ve yarılanma süresi değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Haşlanmamış ve farklı koşullarda haşlanmış bezelye ve havuçların klorofil ve β -karoten bileşenlerinin -18°C 'de depolama sırasında kayıp hız sabiti ve yarılanma süresi değerleri

Bileşen Adı	Hız sabiti (k),			Yarılanma süresi			Model ($C=C_0 \cdot e^{-kt}$) regresyon		
	1/ay			$(t_{1/2})^d$, ay			sabit (r)		
	UB ^a	LOX ^b	POD ^c	UB ^a	LOX ^b	POD ^c	UB ^a	LOX ^b	POD ^c
BEZELYE									
Klorofil a	0.0495	0.0830	0.0607	14.01	8.35	11.42	0.926	0.977	0.981
Klorofil b	0.0189	0.0571	0.0396	36.76	12.14	17.50	0.977	0.975	0.995
HAVUÇ									
β -Karoten	0.0219		0.0072	31.65		96.90	0.989		0.913

^a Haşlanmamış

^b Sıcak suda haşlanmış (LOX indikatör)

^c Sıcak suda haşlanmış (POD indikatör)

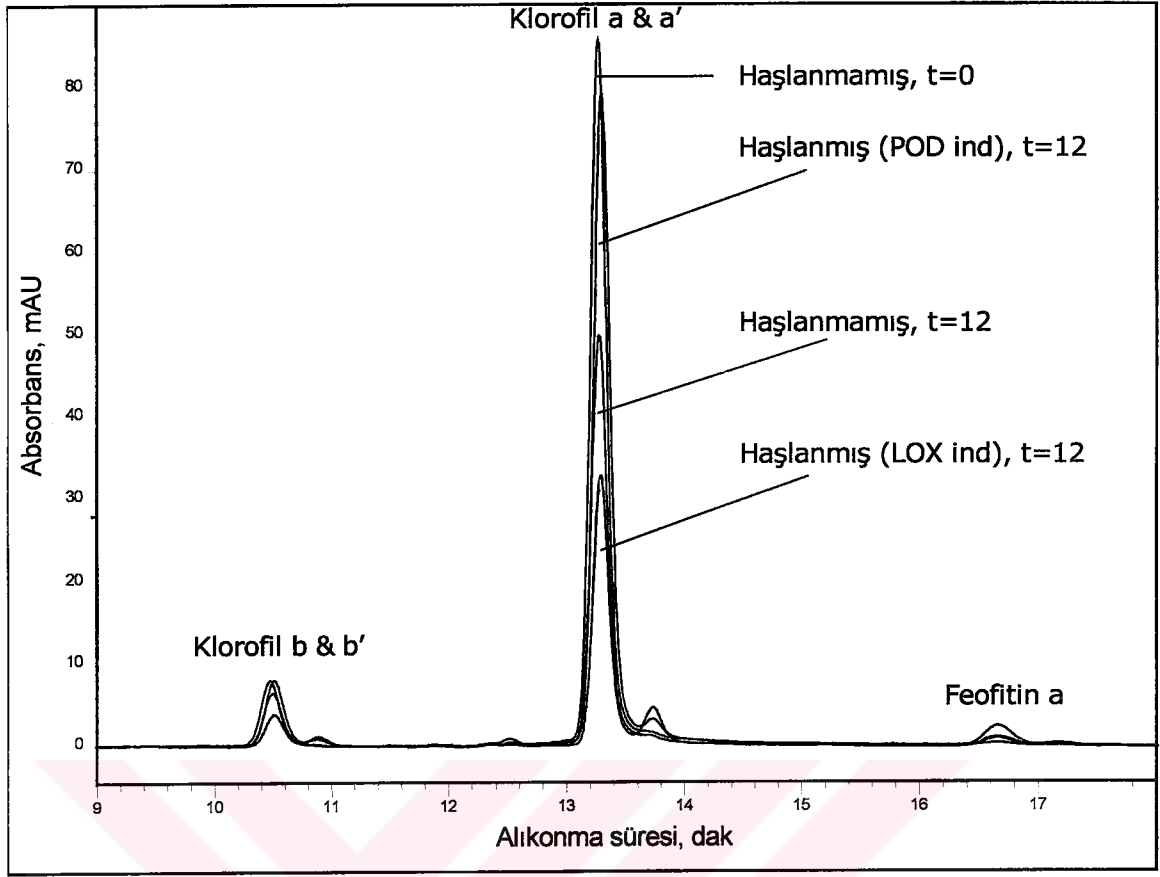
^d $t_{1/2}=0.693/k$

4.2. Dondurulmuş Halde Depolama (-18°C) Boyunca Pigment Değişimlerin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması

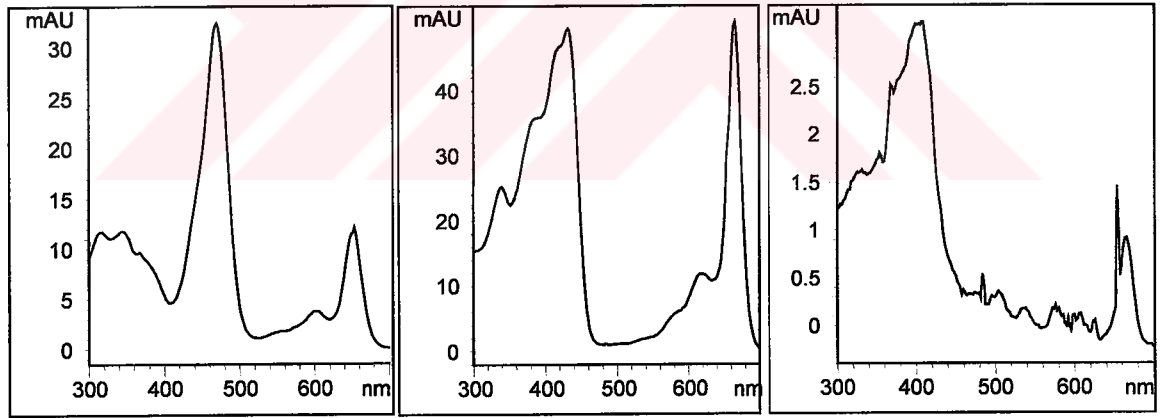
4.2.1. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Bezelye Örneklerinin Klorofil ve Ksantofil Değişimlerinin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması

Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX indikatör ve POD indikatör) bezelyelerin 12 aylık dondurulmuş halde depolanması sonunda klorofil içeriklerini gösteren kromatogramlar Şekil 4.3'de verilmektedir.

Taze bezelyelerde 164.77 mg/kg klorofil a ve 75.83 mg/kg klorofil b saptanmıştır. LOX enzimi indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama ile klorofil a ve klorofil b sırasıyla %2.17 ve %5.84 oranlarında a' ve b' epimerlerine dönüşmüştür. Ancak klorofil a ve klorofil b epimerleri de oluştukları klorofil ile aynı renge sahip olduklarından (Minguez-Mosquera et al., 2003a), haşlama sonucunda bezelyelerde renk kaybı meydana gelmemiştir.



(a)



(b)

(c)

(d)

Şekil 4.3. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX ve POD indikatör) bezelyelerin 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda klorofil kromatogramları (665 nm), (b) Klorofil b spektrumu, (c) Klorofil a spektrumu, (d) Feofitin a spektrumu

Haşlamada POD enzimi indikatör seçildiğinde ise klorofil a ve klorofil b sırasıyla %2.80 ve %6.72 oranlarında a' ve b' epimerlerine dönüşmüştür. Hem LOX hem de POD indikatör olan durumda haşlama işlemi ile birlikte klorofil a'nın a' epimerine dönüşüm oranı, klorofil b'nin b' epimerine dönüşüm oranından daha düşük seviyede gerçekleşmiştir. Sebzelere uygulanan haşlama gibi bir ılımlı ısı işlem sonucunda klorofillerde epimerizasyon reaksiyonları görülmekte ve artan sıcaklık ve süre normlarıyla birlikte oluşan klorofil epimerleri miktarı da artmaktadır (Schwartz and Lorenzo, 1990). Nitekim Teng ve Chen (1999) ıspanak yapraklarından elde ettikleri klorofil ekstraktları ile yaptıkları çalışmada kaynar suda 6 dakika haşlama sonucunda klorofil a'nın %19 ve klorofil b'nin %22 oranında klorofil epimerlerine dönüştüklerini bu oranın haşlama süresinin 9 dakikaya çıktığı durumda ise klorofil a için %27, klorofil b için ise %30 olarak gerçekleştiğini belirtmiştir. Konserve üretiminde, haşlama işlemine göre daha yüksek sıcaklık süre normlarında uygulanan sterilizasyon işlemi ile daha çok dekarbometoksilasyon reaksiyonları sonucunda piroklorofil türevleri oluşmaktadır (Khachik, et al. 1986; Schwartz, 1990; Canjura et al., 1991). Bizim çalışmamız da haşlama amacıyla uyguladığımız ısı işlem normları, sterilizasyon amacıyla uygulanan ısı işlem normlarına göre daha düşük seviyede olduğu için hem POD, hem de LOX indikatör olduğu durumda piroklorofil türevleri oluşumu gözlenmemiştir.

Bezelyelerde haşlama sonucu oluşan a' ve b' epimerlerinin doğrulaması alıkonma zamanı ve spektral özelliklerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Klorofil epimerleri, karşılık gelen klorofil türevlerinden daha apolar olduklarından, C8 kolonda karşılık gelen klorofil türevine göre daha uzun alıkonmuşlardır (Watanabe et al, 1984; Teng and Chen, 1999; Gökmen et al., 2002a).

Daha önce de değinildiği gibi, bezelyelerde klorofil a parçalanması, klorofil b parçalanmasından daha büyük bir hızla gerçekleşmiştir. Depolama başlangıcında LOX ve POD enzimleri indikatör seçilerek haşlanmış bezelyelerde sırasıyla 1.32 mg/kg ve 2.13 mg/kg feofitin a oluşumu tespit edilmiştir. 12 ay depolama sonunda ise LOX ve POD enzimleri indikatör seçilerek haşlanmış bezelyelerde feofitin a oluşumu sırasıyla 8.62 mg/kg ve 8.35 mg/kg oranında artmıştır. Feofitin oluşumu klorofil merkezindeki Mg atomunun H atomu ile yer değiştirmesi sonucu

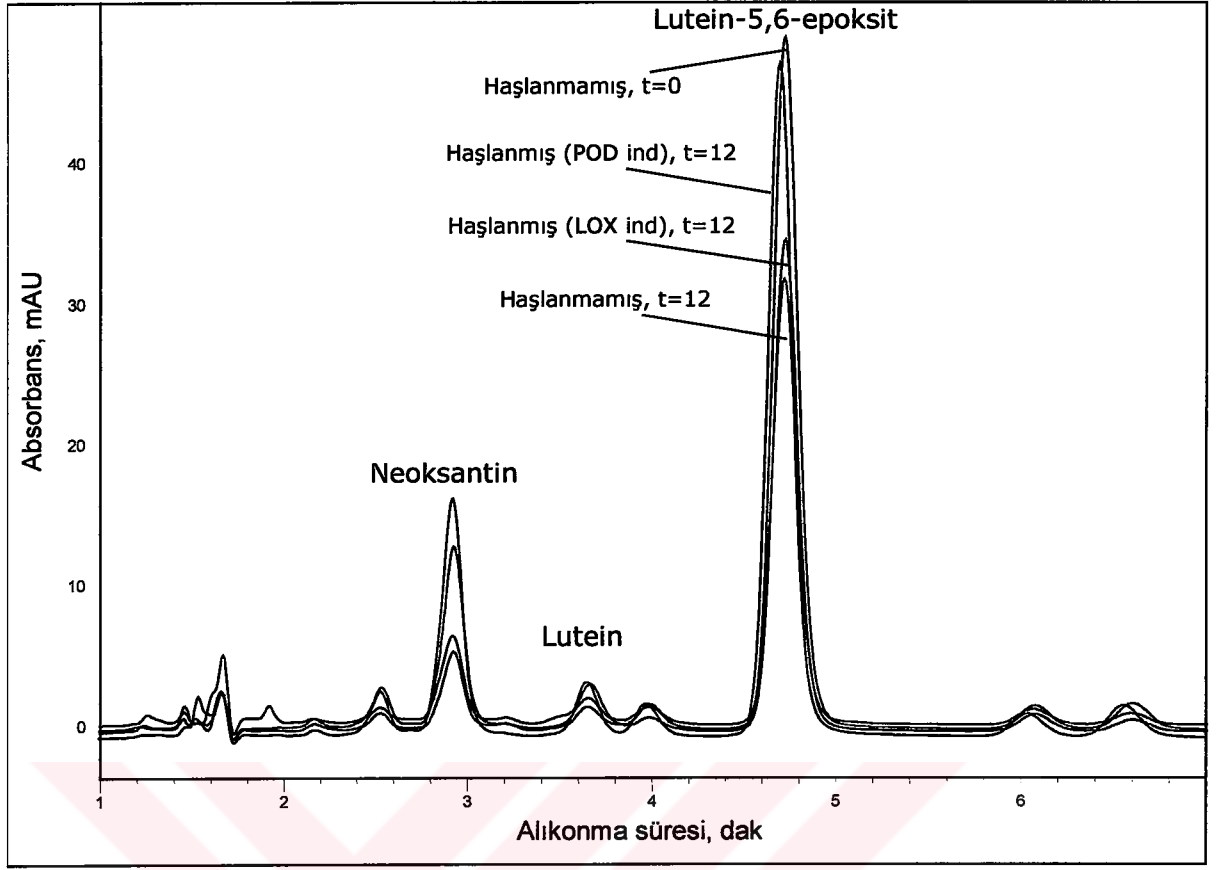
gerçekleşmekte ve bunun sonucu ürün rengi parlak yeşilden mat zeytin yeşiline dönüşmektedir. Suda haşlanıp dondurulmuş sebzelerde doku ve hücre duvarı zedelenmesi sonucu hücre dışına sızan stoplazma asitleri, klorofillerin feofitinlere dönüşümünü hızlandırmaktadır (Cano, 1996; Minguez-Mosquera et al. 2003a).

Bezelyelerdeki feofitinlerin doğrulanması alıkonma zamanı ve spektral özelliklerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Feofitinlerin spektral özellikleri oluştukları klorofile benzerken (Şekil 4.3c ve 4.3d), oluştukları klorofilden daha apolar olmaları C8 kolonda daha uzun süre alıkonmalarına neden olmaktadır (Schwartz et al., 1981; Teng and Chen, 1999; Gökmen et al., 2002a).

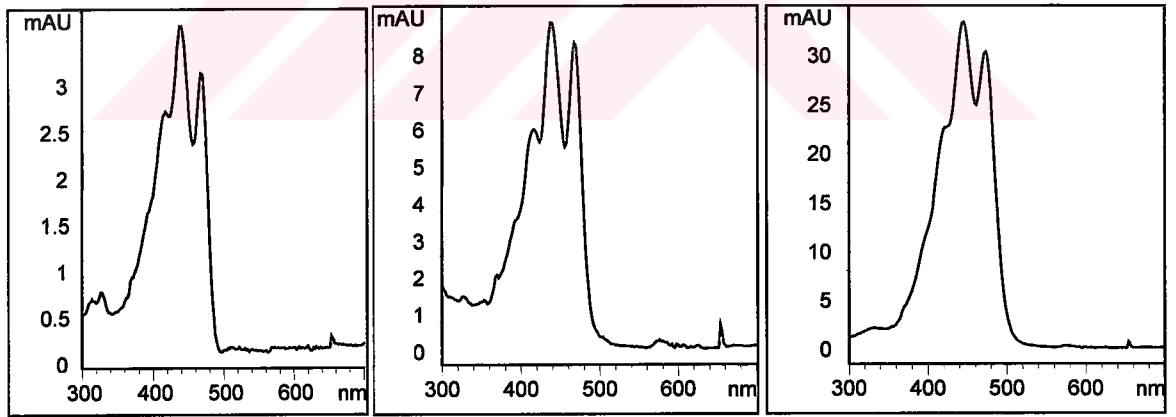
Bezelyelerde varlığı tanımlanabilen sarı renkli karotenoidler (ksantinler) neoksantin, lutein ve lutein-5,6-epoksit'dir. Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX indikatör ve POD indikatör) bezelyelerde 12 ay depolama sonucunda ksantinlerin kromatogramları Şekil 4.4'de gösterilmektedir.

Bezelyelerdeki ksantinlerin doğrulanması spektral özelliklerinden (Şekil 4.4b, 4.4c, 4.4d) yararlanılarak gerçekleştirilmiştir (Braumann and Grimme, 1979; Gökmen et al., 2002a). Haşlanmamış bezelyelerde 12 ay dondurulmuş halde depolama sonunda neoksantin %60.24, lutein %50.87, lutein-5,6-epoksit %32.22 oranında azalmıştır. LOX indikatör seçilerek haşlanmış bezelyelerde neoksantin, lutein ve lutein-5,6-epoksit miktarlarındaki azalma oranı sırasıyla %57.53, %38.80 ve %21.66 olarak belirlenmiştir. POD indikatör seçilerek haşlanmış bezelyelerde neoksantin, lutein ve lutein-5,6-epoksit miktarlarındaki azalma oranı ise sırasıyla %45.19, %32.09 ve %20.34 olarak belirlenmiştir.

Görüldüğü gibi hem LOX, hem de POD indikatör seçildiği durumda bezelyelerin dondurulmuş halde depolanması sırasında ksantinlerinin oksidasyon sonucu kaybında belli bir azalma meydana gelmiştir. Ksantinlerin depolama sırasında stabil kalmaları açısından POD indikatör seçilerek haşlamanın en etkili olduğu belirlenmiştir.



(a)



(b)

(c)

(d)

Şekil 4.4. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (LOX ve POD indikatör) bezelyelerin 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda karotenoid kromatogramları (450 nm), (b) Neoksantin spektrumu, (c) Lutein spektrumu, (d) Lutein-5,6-epoksit spektrumu

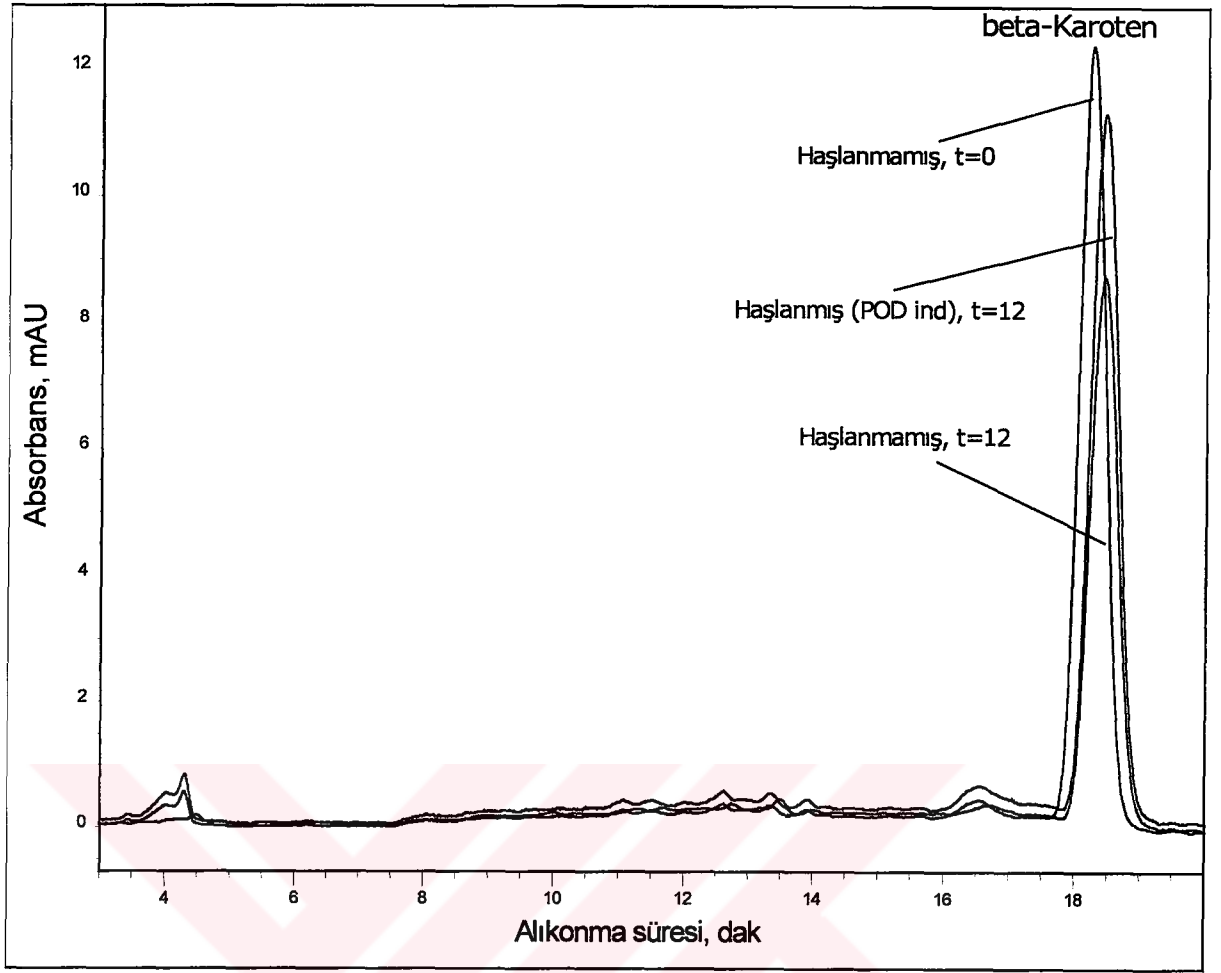
4.2.2. Dondurulmuş Halde Depolama Boyunca Havuç Örneklerinin β -Karoten Değişimlerinin Kromatografik/Spektral Olarak Doğrulanması

Haşlanmamış ve haşlanmış (POD indikatör) havuçların 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda elde edilen β -karoten kromatogramları Şekil 4.5'de gösterilmektedir. Donmuş depolama sonunda haşlanmamış havuçlarda β -karoten miktarındaki azalma %24.50 iken POD indikatör seçilerek haşlanmış havuçlarda β -karoten miktarındaki azalma ise %9.00 olarak gerçekleşmiştir.

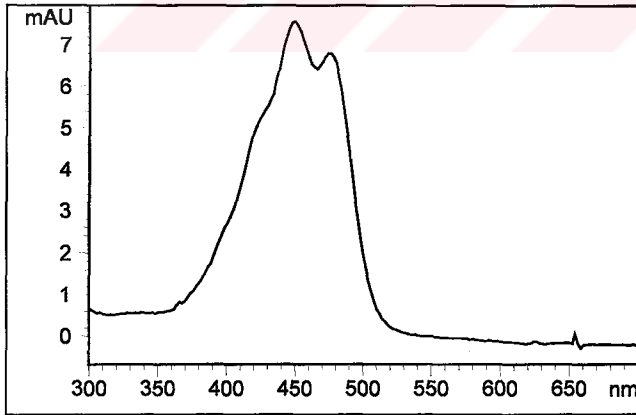
Haşlama işlemi ile birlikte havuç örneklerinde β -karoten miktarında %4.36'lık bir artış gerçekleşmiştir. Granado ve ark. (1992) ıspanak, havuç, domates, patates kırmızı biberin de içinde bulunduğu 18 farklı sebze ile gerçekleştirdiği çalışmada, sebzelerin kaynar suda 10 ile 35 dakika haşlanmaları sonucunda β -karoten miktarlarında haşlanmamış örneklerle göre artış meydana geldiğini belirtmiştir.

Haşlanmamış havuçlarda donmuş depolama sırasında β -karoten'in oldukça stabil olduğu gözlenmiştir. Bu stabilite POD indikatör seçilerek gerçekleştirilen haşlama ile daha da yükseltilmiştir. Havuçlarda β -karoten stabilitesinin yüksek olmasının, havuçlarda ölçülebilir düzeyde LOX aktivitesi bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çeşitli literatür çalışmalarında da havuçlarda LOX aktivitesinin bulunmadığı ve bunun sebebinin antioksidan özelliğe sahip β -karoten gibi karotenoidlerin havuçlarda yüksek oranda bulunmasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. (Güneş ve Bayındırlı, 1993; Morales-Blances et al., 2002). Calligaris ve ark. (2002), indikatör olarak LOX enzimi kullanılarak haşlanmış domates pürelerinin renginin, -18°C 'de 150 günlük depolama sonucunda haşlanmadan depolanan örneklerle göre çok daha iyi korunduğunu belirtmiştir.

Bezelye ve havuçların bazı bileşenlerinin dondurulmuş halde depolanması başlangıcındaki ve sonundaki miktarları Çizelge 4.2'de verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.5. (a) Haşlanmamış ve haşlanmış (POD indikatör) havuçların 12 ay dondurulmuş halde depolanması sonunda β -karoten kromatogramları, (b) β -karoten spektrumu

Çizelge 4.2. Bezelye ve havuçların bazı bileşenlerinin dondurulmuş halde depolanması başlangıcındaki ve sonundaki miktarları

Bileşen	UB ^a			LOX ^b			POD ^c		
	t=0 ay	t=12 ay	Fark, %	t=0 ay	t=12 ay	Fark, %	t=0 ay	t=12 ay	Fark, %
BEZELYE									
Klorofil a, mg/kg	164.77	94.15	42.86	155.89	60.76	61.02	153.19	78.71	48.62
Klorofil b, mg/kg	75.83	59.55	21.46	67.77	34.73	48.76	67.61	41.77	38.21
Feofitin a, mg/kg	0.00	0.00		1.32	8.62		2.13	8.35	
Feofitin b, mg/kg	0.00	0.00		0.00	0.00		0.00	0.00	
Neoksantin, mAU.s	140.60	55.90	60.24	117.50	49.90	57.53	108.00	59.20	45.19
Lutein, mAU.s	34.40	16.90	50.87	29.90	18.30	38.80	29.60	20.10	32.09
Lutein-5,6-epoksit, mAU.s	464.30	314.70	32.22	440.90	345.40	21.66	488.20	388.90	20.34
HAVUÇ									
β -Karoten, mg/kg	135.45	102.27	24.50				141.36	128.64	9.00

^a Haşlanmamış

^b Sıcak suda haşlanmış (LOX indikatör)

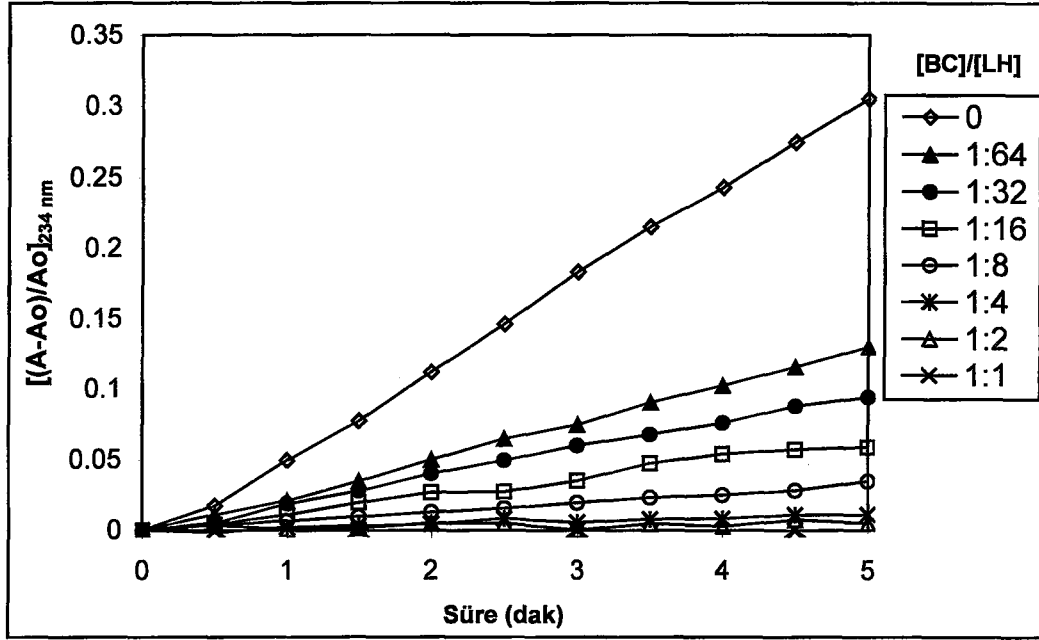
^c Sıcak suda haşlanmış (POD indikatör)

4.3. Model Ortamda LOX Enziminin β -Karoten Üzerine Etkisi

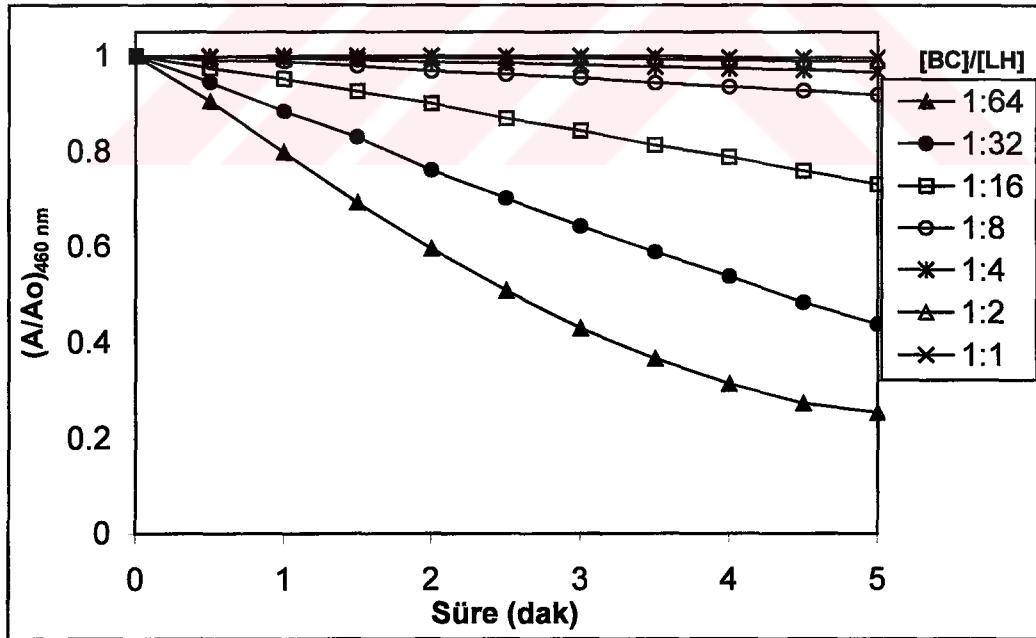
LOX enziminin birincil aktivitesi, 1,4-pentadien yapıya sahip çoklu doymamış yağ asitlerini, konjuge dien formları olan yağ asidi hidroperoksitlerine dönüştürmektir. İkincil aktivitesi ise çoklu doymamış yağ asidinin hidroperoksidasyon reaksiyonları esnasında pigment ko-oksidasyonlarını gerçekleştirmesidir.

Bu çalışmada bezelye LOX enziminin birincil aktivitesi üzerine β -karotenin etkisi araştırılmış, bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin hidroperoksidasyon reaksiyonlarında β -karotenin etkisi model ortamda incelenmiştir. Sabit konsantrasyonlarda (25 μ M) linoleik asitin, LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidroperoksidasyon reaksiyonlarına, farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (0.39-25 μ M) etkisi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin konjuge dien formuna dönüşümü 234 nm'de absorbanı artışı olarak gözlenmektedir. Model reaksiyon ortamında β -karoten konsantrasyonu arttıkça, linoleik asitin konjuge dien formuna dönüşüm hızı azalmış, eşit konsantrasyonda linoleik asit ve β -karoten olduğu durumda ise konjuge dien oluşumu tamamen durmuştur.

Bezelye LOX enziminin β -karoten ko-oksidasyonu üzerine etkisi (ikincil aktivite) 460 nm'de β -karoten renginin açılması şeklinde izlenmektedir. Buna göre sabit linoleik asit (25 μ M) içeren reaksiyon ortamlarında farklı β -karoten konsantrasyonlarının (0.39 – 25 μ M) ko-oksidasyon üzerine etkisi Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, model reaksiyon ortamında β -karoten konsantrasyonu arttıkça, β -karotenin ko-oksidasyon hızı azalmıştır. Eşit konsantrasyonda β -karoten ve linoleik asit içeren durumda ise β -karoten konsantrasyonunda bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (β -karoten= 0.39–25 μM ; linoleik asit= 25 μM)



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyonu sırasında β -karoten ko-oksidasyonu üzerine etkisi (β -karoten= 0.39–25 μM ; linoleik asit= 25 μM)

Elde edilen verilere göre model ortam reaksiyonlarında artan miktarlardaki β -karoten, yağ asidi hidroperoksitlerinin oluşum hızını azaltmış, buna karşın artan miktarlardaki β -karotenin bozulma hızı ise yavaşlamıştır. [BC]:[LH]=1 olan reaksiyon koşulunda, β -karoten hidroperoksidasyon reaksiyonunu durdurmuş ve aynı zamanda β -karoten konsantrasyonunda bir azalma gerçekleşmemiştir. Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda β -karoten (0.39 – 25 μ M) ve sabit konsantrasyonda linoleik asit (25 μ M) ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda β -karoten ve sabit konsantrasyonda linoleik asit ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri

[β -Karoten]/[Linoleik asit] (μ M/ μ M)	Konjuge dien oluşum hızı (dak ⁻¹)	β -Karoten ko-oksidasyon hızı (dak ⁻¹)
0	0.075	
1:64	0.028	0.29
1:32	0.021	0.16
1:16	0.014	0.063
1:8	0.0083	0.017
1:4	0.0031	0.0071
1:2	0.0018	0.0019
1:1	0	0

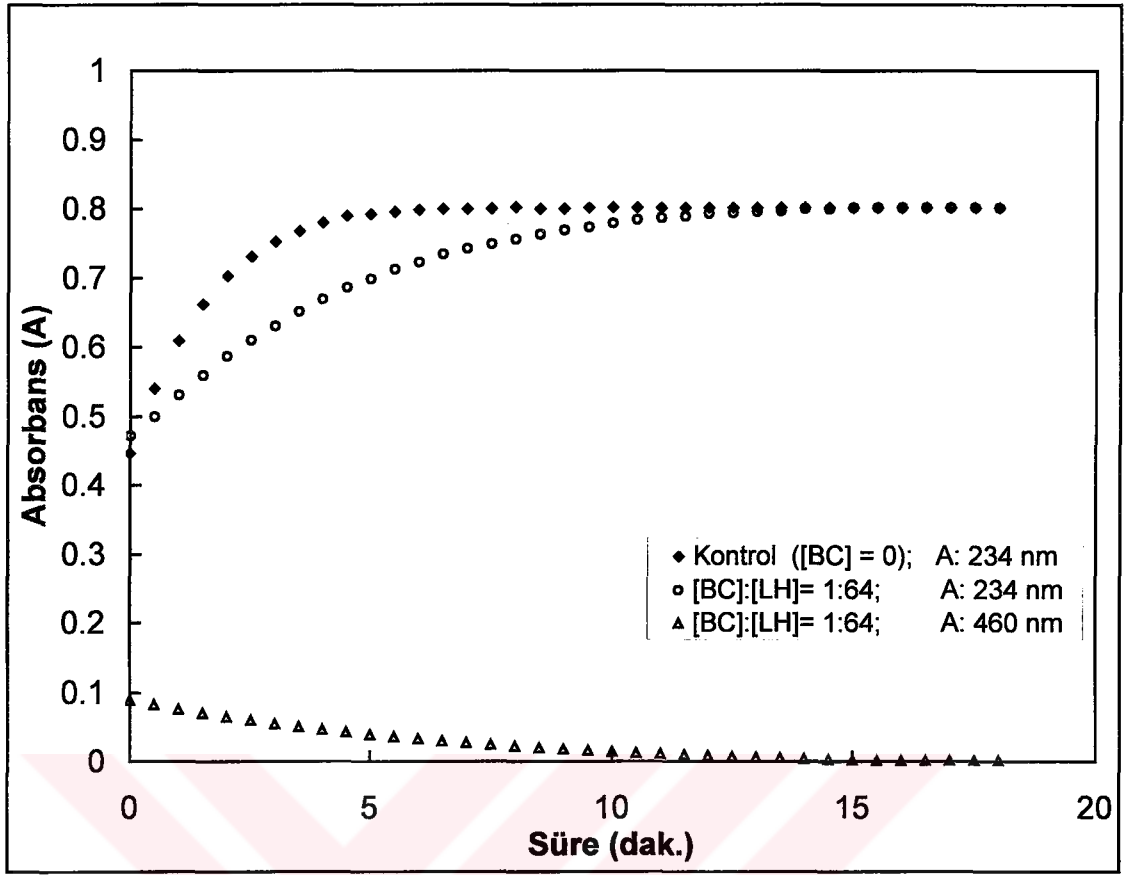
Çeşitli araştırmalarda patates (Aziz et al., 1999), bezelye (Yoon and Klein, 1979; Reynolds and Klein, 1982), soya fasulyesi (Ikediobi and Snyder, 1977; Hildebrand and Hymowitz, 1982;), buğday (Wallace and Wheeler, 1975; Borelli et al., 1999; Pastore et al., 2000), zeytin (Jaren-Galan et al., 1999) ve biber (Kanner, 1978; Jaren-Galan and Minguez-Mosquera, 1999) gibi bitkilerden ekstrakte edilen LOX enziminin β -karoten ko-oksidasyonunu gerçekleştirdiğini belirtilmiştir. Ayrıca

Pastore et al (2000), buğday lipoksigenazı ile gerçekleştirdiği çalışmada β -karotenin hidroperoksidasyon oluşum hızını azalttığını belirtmiştir.

Şekil 4.8'de Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, linoleik asitin ($50 \mu\text{M}$) hidroperoksitlere dönüşümü ve bu reaksiyon boyunca β -karotenin ($0.78 \mu\text{M}$) ko-oksidasyonu görülmektedir. Şekil 4.8'den de görüldüğü gibi bezelye LOX enziminin katalizörlüğünde kontrol reaksiyonunda $50 \mu\text{M}$ linoleik asitten, linoleik asit hidroperoksitleri oluşumu gerçekleşmektedir. Model reaksiyon ortamında, $0.78 \mu\text{M}$ β -karoten bulunduğu durumda ise aynı miktar linoleik asitten ($50 \mu\text{M}$) aynı miktar linoleik asit hidroperoksitlerinin oluştuğu, ancak bu oluşumun kontrol reaksiyonuna göre daha yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Reaksiyon boyunca β -karoten ko-oksidasyonu gerçekleşmiş ve reaksiyon sonucunda ortamdaki β -karoten tamamen okside olmuştur.

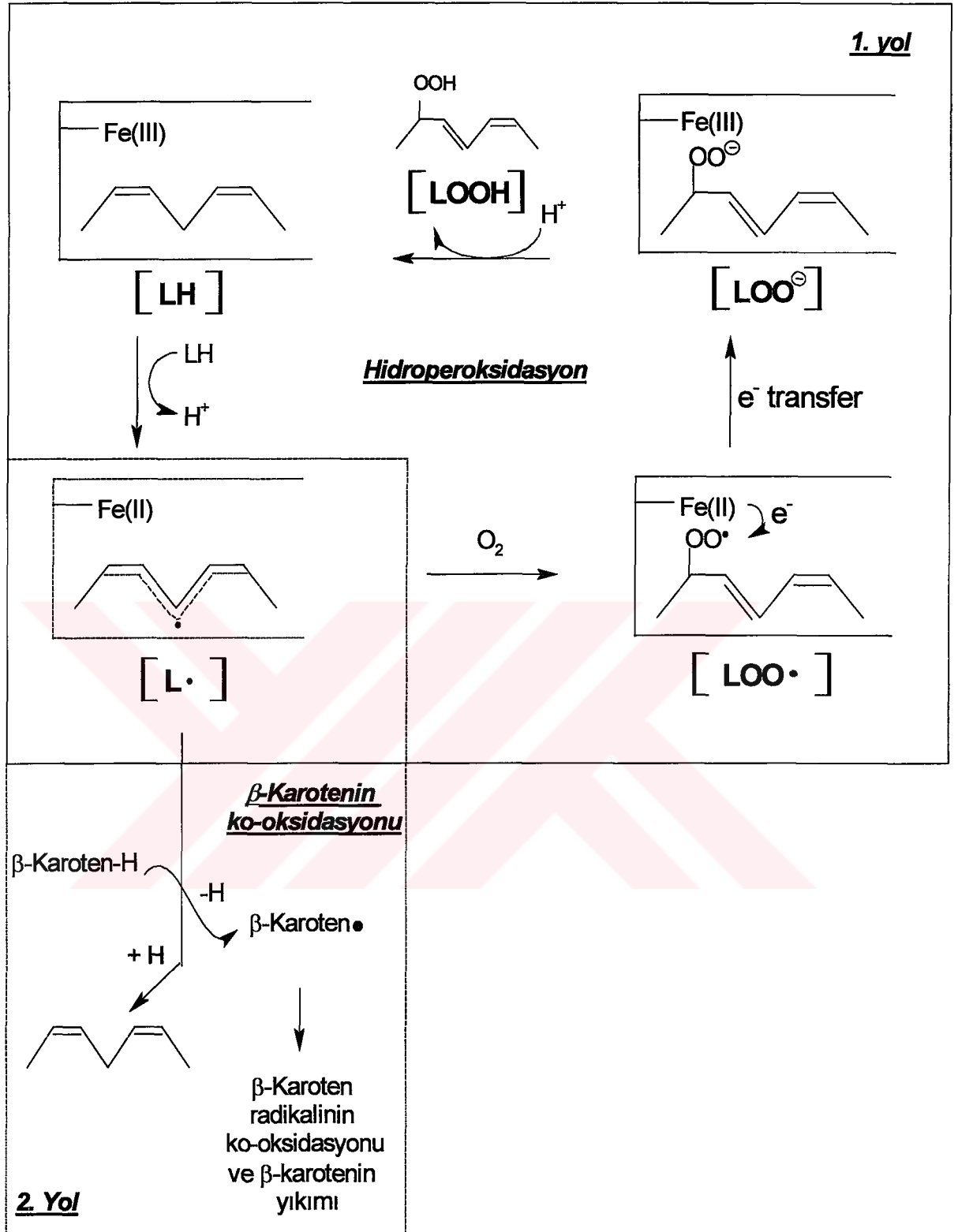
β -karoten tamamen okside olduktan sonra ($t > 20'$) ortama başlangıçtaki kadar linoleik asit ($50 \mu\text{M}$) tekrar ilave edildiğinde, reaksiyon hızındaki yavaşlama etkisinin aynen devam ettiği gözlenmiştir. Bu durumun, β -karoten etkisiyle ortama ilave edilen LOX enziminin bir kısmının inaktive olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

LOX katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin hidroperoksidasyon reaksiyonuna β -karotenin etkisi ve β -karotenin ko-oksidasyonu Şekil 4.9'da şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre, β -karoten, reaksiyon başlangıcında oluşan linoleil radikali ($\text{L}\bullet$) ile reaksiyona girerek konjuge dien oluşumunu ($\text{LOO}\bullet$) engellediği ve bu etkinin linoleil radikale β -karoten molekülü tarafından hidrojen transferi şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Böylelikle linoleil radikali başlangıç formuna (LH) dönerken, bir hidrojen atomunu kaybeden β -karoten molekülü β -karoten radikale ($\beta\text{-karoten}\bullet$) dönüşmektedir. Bu sırada LOX enzimi doğal çevrimini tamamlayamadan Fe (II) formunda kalarak inaktive olmaktadır (Şekil 4.9). İnaktive olan enzim miktarı ise reaksiyon ortamında bulunan β -karoten miktarına bağlıdır.



Şekil 4.8. Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, linoleik asitin (LH) hidroperoksitlere dönüşümü ve β -karotenin (BC) ko-oksidasyonu

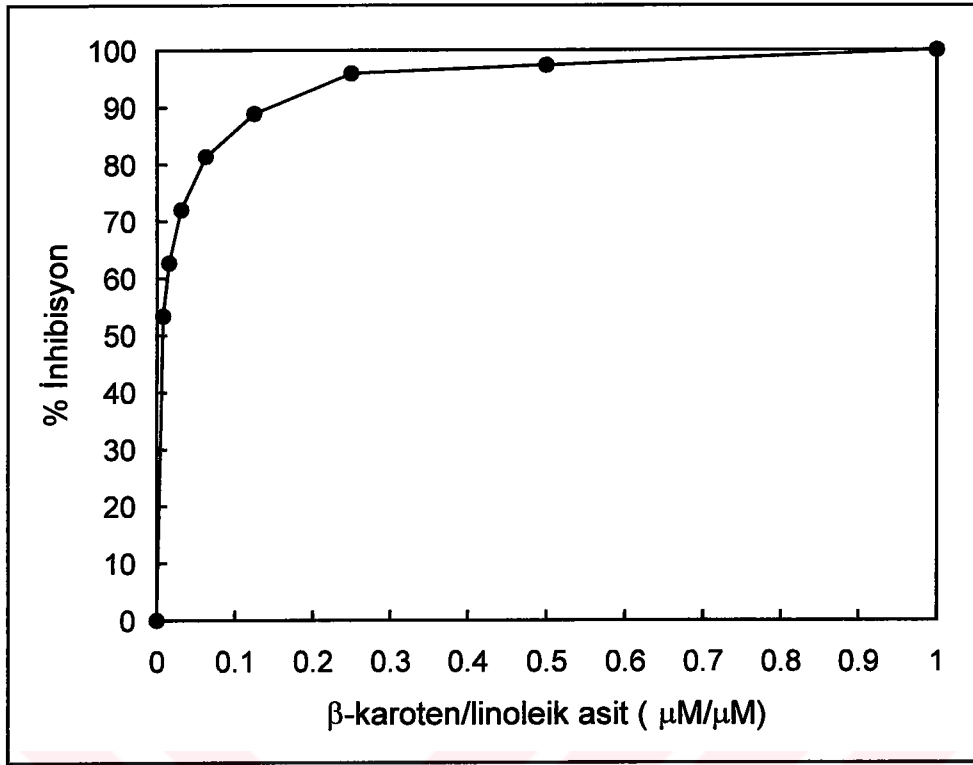
Bazı araştırmacılar β -karotenin, hidrojen transferi yolu ile linoleil peroksi radikalini ($\text{LOO}\bullet$) söndürdüğünü ve bunun sonucunda oluşan β -karoten radikalinin oksidasyonunun gerçekleştiğini ileri sürmektedir (Wu et al., 1999). Eğer bu doğru olsaydı, $[\beta\text{-karoten}]/[\text{linoleik asit}]$ oranının 1:1 olduğu koşulda bile ortamda LOOH birikimi olup, 234 nm'de absorbans artışı kaydedilmesi gerekirdi. Oysa bu çalışmada, 1:1 $[\beta\text{-karoten}]/[\text{linoleik asit}]$ oranında reaksiyon karışımında gerek konjuge dien oluşumu ve gerekse β -karoten ko-oksidasyonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.9. LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asitin hidroperoksidasyon reaksiyonuna β-karotenin etkisi ve β-karotenin ko-oksidasyonu

Ortamdaki β -karoten konsantrasyonu arttıkça, reaksiyon Şekil 4.9'da gösterildiği gibi ağırlıklı olarak 2. yol üzerinden gerçekleşmekte ve böylece ortamdaki inaktive olmuş LOX enzim miktarı artmaktadır. Bunun sonucunda ortamdaki aktif formdaki enzimlerin birim zamanda gerçekleştirdiği 1.yol reaksiyonları azalmakta ve bu nedenle konjuge dien oluşum hızları düşmektedir (Şekil 4.6). Bu sırada oluşan β -karoten radikali konsantrasyonu da artmaktadır. Ancak eşleşmemiş elektron polien zincir boyunca sürekli delokalize olarak radikalın kararlı bir yapı sergilemesini ve bu sayede rengini korumasını sağlamaktadır (Woodall et al, 1997). β -Karoten radikalının oksidasyon hızı ortamdaki reaktif oksijen türlerinin miktarına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Nitekim β -karoten konsantrasyonu azaldıkça reaksiyon ağırlıklı olarak 1.yol üzerinden gerçekleştiğinden, ortamdaki reaktif linoleil peroksi radikalleri ($\text{LOO}\bullet$) konsantrasyonu artışına bağlı olarak daha hızlı bir β -karoten ko-oksidasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.7).

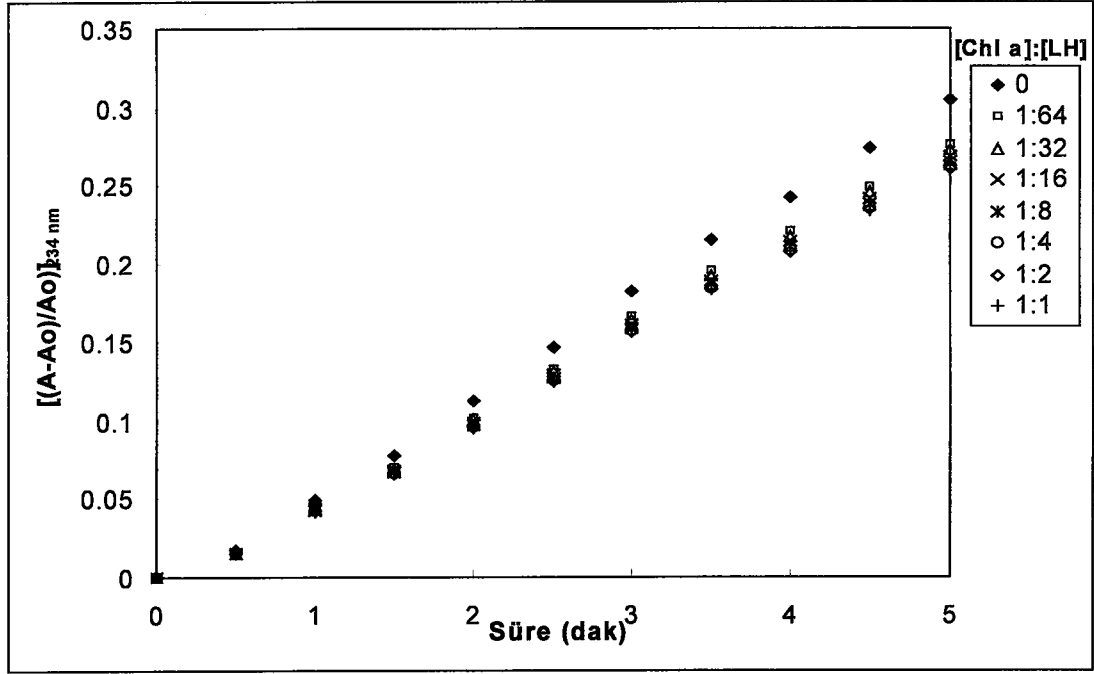
Elde edilen bulgular doğrultusunda, LOX enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen linoleik asit oksidasyon reaksiyonunun, ortamda β -karoten bulunması halinde inhibe olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.10'da farklı β -karoten konsantrasyonlarında bezelye LOX enziminin % inhibisyon eğrisi gösterilmektedir. Şekil 4.10'da açıkça görüldüğü gibi, ortamda linoleik asite göre 64 kat daha az β -karoten olduğu durumda bile %62'lik inhibisyon gerçekleşmektedir. β -karoten konsantrasyonu arttıkça, LOX inhibisyonu da artmıştır. Ortamdaki β -karoten konsantrasyonu linoleik asit konsantrasyonuna eşit olduğunda LOX enzimi %100 inhibe olmuştur.



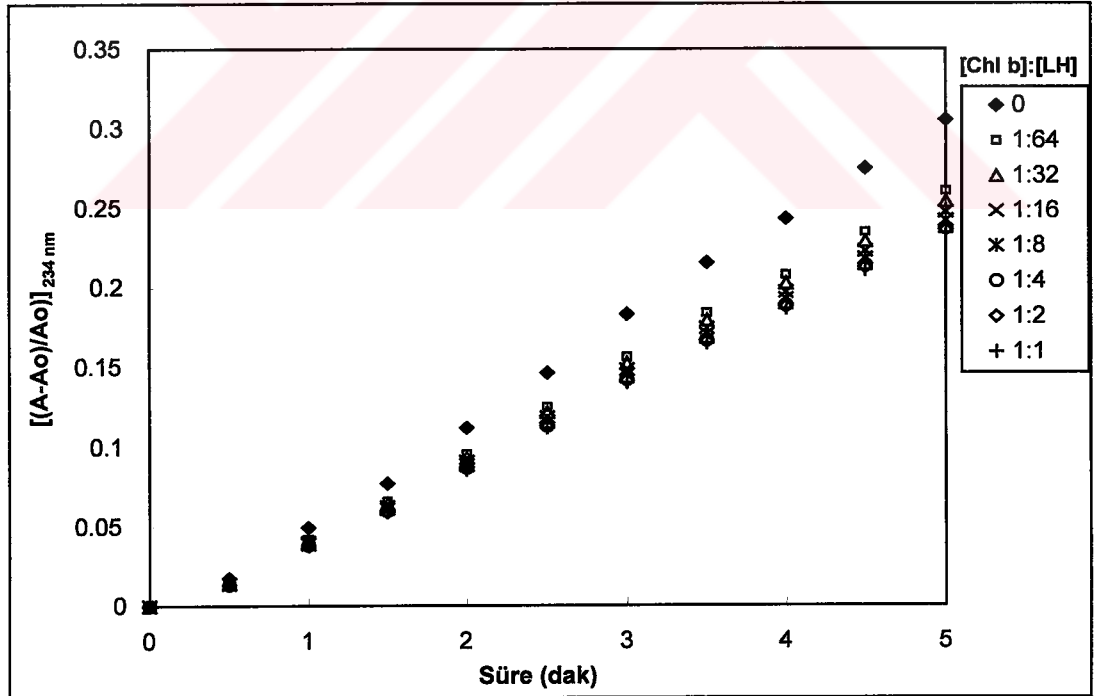
Şekil 4.10. Değişen konsantrasyonlarda [β-karoten/linoleik asit] oranlarının (0.0156-1) LOX enziminin inhibisyonu üzerine etkisi.

4.4. Model Ortamda LOX Enziminin Klorofil a ve Klorofil b Üzerine Etkisi

Model ortam çalışmalarının ilk aşamasında LOX enziminin birincil aktivitesi üzerine klorofil a ve klorofil b'nin etkisi incelenmiştir. Sabit konsantrasyonlarda (25 μM) linoleik asitin LOX enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen hidroperoksidasyon reaksiyonlarına, farklı konsantrasyonlardaki klorofil a ve klorofil b'nin (0.39-25 μM) etkileri sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a'nın (Chl a), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (Klorofil a = 0.39-25µM; Linoleik asit = 25µM)



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda klorofil b'nin (Chl b), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit (LH) hidroperoksidasyon hızları üzerine etkisi (Klorofil b = 0.39-25µM; Linoleik asit = 25µM)

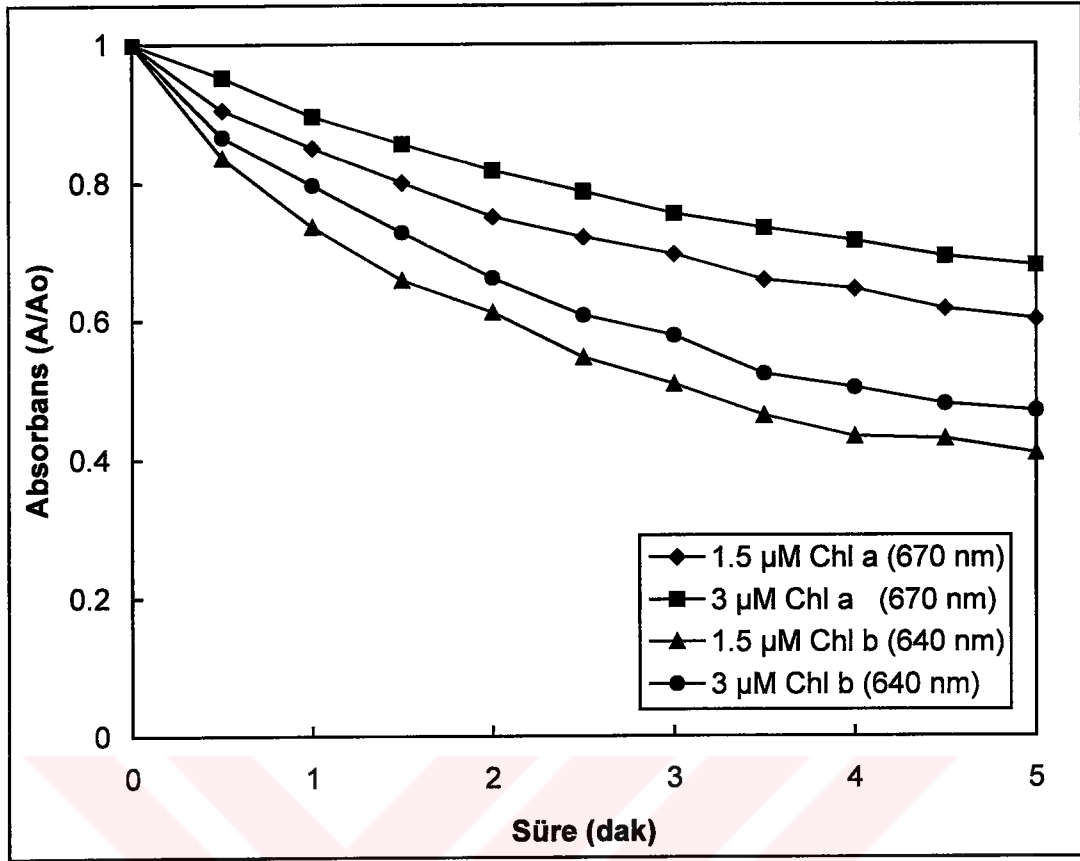
Şekillerden de görüldüğü gibi, hem klorofil a, hem de klorofil b, LOX etkisiyle linoleik asitten konjuge dien oluşum hızını belli oranda azaltmıştır. Eşit konsantrasyonda linoleik asit ve klorofil bulunan reaksiyon koşullarında konjuge dien oluşum hızı kontrol reaksiyonuna göre, klorofil a için %12, klorofil b için ise %19 oranında azalmıştır. Daha önce de değinildiği gibi, aynı koşullarda β -karoten ilave edildiğinde linoleik asitten konjuge dien oluşumunun tamamen engellendiği gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, LOX enziminin katalizlediği reaksiyon koşullarında β -karotenin, klorofillere göre çok daha yüksek oranlarda konjuge dien oluşumunu engellediği ve inhibitör olarak davrandığı anlaşılmıştır. Ayrıca klorofillerin kendi aralarında yapılan değerlendirmede ise klorofil b'nin, konjuge dien oluşumunu engellemede klorofil a'ya göre daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Model ortam çalışmalarının ikinci aşamasında ise, LOX enziminin klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin ko-oksidasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Şekil 4.13'de farklı konsantrasyonlarda klorofil a ve klorofil b'nin (1.5 μ M ve 3 μ M) LOX enzimi etkisiyle ortaya çıkan oksidasyonu gösterilmiştir.

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi, model reaksiyon ortamında klorofil a ve b konsantrasyonu arttıkça, ko-oksidasyon hızı azalmıştır. β -karoten ile elde edilen sonuçlarda da aynı etki gözlenmiştir. Klorofillerin kendi aralarında değerlendirmesi yapıldığında, klorofil b'nin klorofil a'ya göre daha hızlı ko-okside olduğu gözlenmiştir.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da soya fasulyesi (Hilderbrand and Hymowitz, 1982), bezelye (Reynolds and Klein, 1982; Yoon and Klein, 1979) gibi sebzelerden ekstrakte edilen LOX enziminin klorofil ko-oksidasyonunu gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Ayrıca Yoon ve Klein (1979), klorofilin hidroperoksit oluşum hızını azalttığını ve iki farklı bezelye LOX izoenziminden sadece birinin klorofil ko-oksidasyonunu gerçekleştirdiğini belirtmiştir.



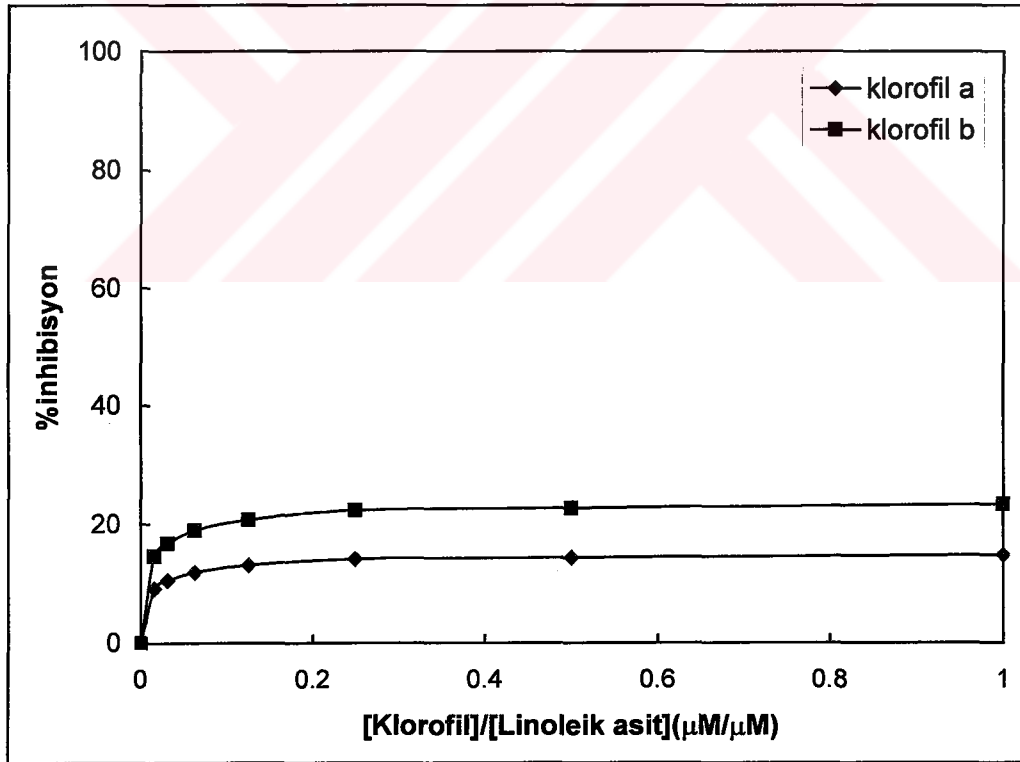
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a (Chl a) ve klorofil b'nin (Chl b), bezelye LOX katalizörlüğünde, linoleik asit hidroperoksidasyonu sırasında klorofil a ve klorofil b ko-oksidasyonu üzerine etkileri (Linoleik asit= 25 µM)

Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda klorofil pigmentleri (0.39 –25 µM) ve sabit konsantrasyonda linoleik asit (25 µM) ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar klorofil a ve klorofil b'nin de β-karoten gibi LOX enzimini inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.14'de farklı klorofil a ve klorofil b konsantrasyonlarında bezelye LOX enziminin %inhibisyon eğrisi gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Bezelye LOX enzimi katalizörlüğünde, farklı konsantrasyonlarda klorofil a (Chl a), klorofil b (Chl b) ve sabit konsantrasyonda linoleik asit ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidroperoksidasyon ve ko-oksidasyon hız sabitleri.

[Klorofil]/[LH] ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$)		Konjuge dien oluşum hızı (dak^{-1})		Klorofil ko-oksidasyon hızı (dak^{-1})	
Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b
0	0	0.0752	0.0752	-	-
1:64	1:64	0.0681	0.0641	-	-
1:32	1:32	0.0671	0.0624	-	-
1:16	1:16	0.0660	0.0608	0.0978	0.180
1:8	1:8	0.0652	0.0594	0.0783	0.154
1:4	1:4	0.0644	0.0582	-	-
1:2	1:2	0.0641	0.0578	-	-
1:1	1:1	0.0639	0.0575	-	-

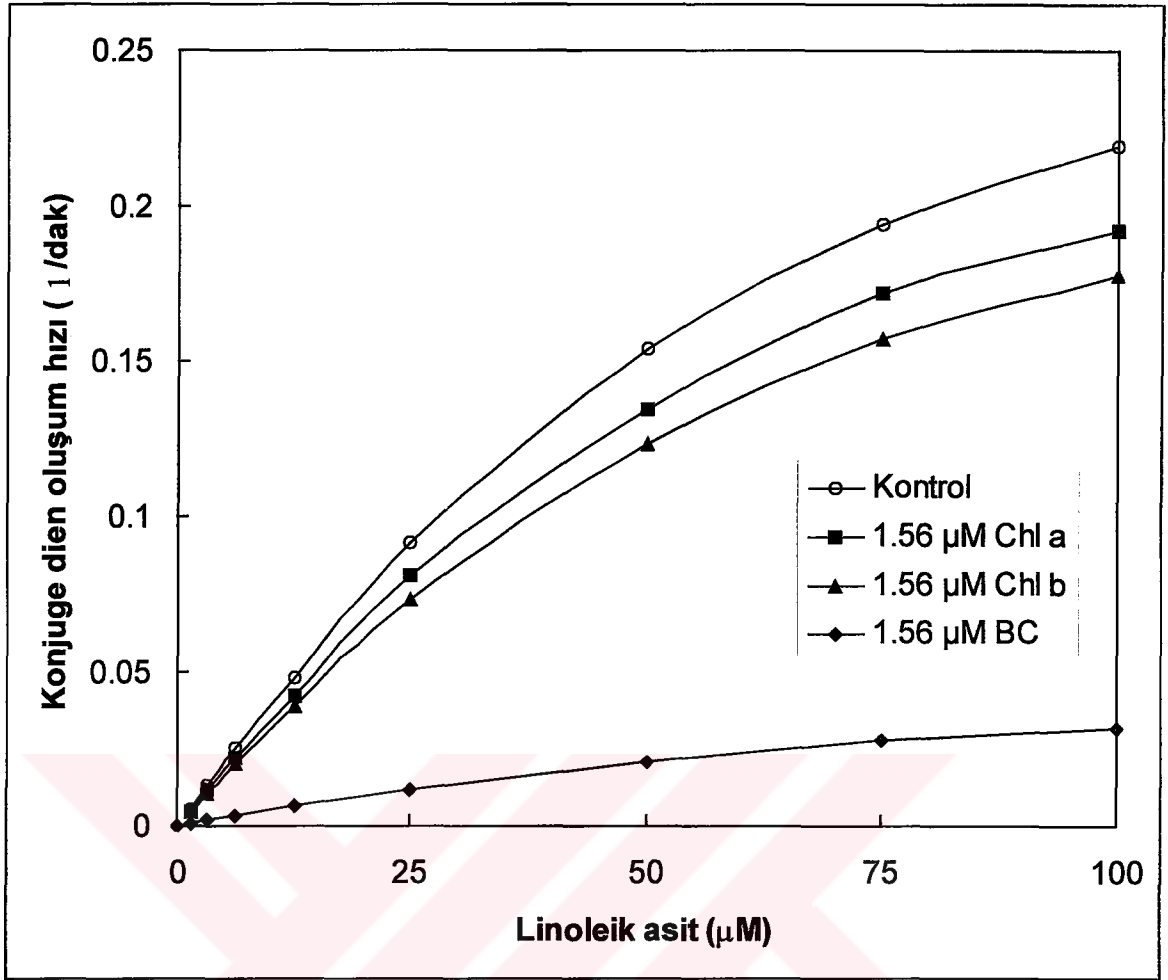


Şekil 4.14. Artan konsantrasyonlarda [Klorofil/ Linoleik asit] oranlarının LOX enziminin inhibisyonu üzerine etkisi (Linoleik asit= 25 μM ; Klorofil a ve b= 0.39-25 μM)

Şekil 4.14'den de görüldüğü gibi, klorofil a ve b konsantrasyonlarının linoleik asit konsantrasyonuna göre 64 kat az olduğu reaksiyon koşulunda klorofil a %9.2, klorofil b %14.6 oranında enzim inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Bu etki β -karoten ile kıyaslandığında oldukça düşük bir seviyede kalmaktadır (Şekil 4.10). Klorofil a ve klorofil b'nin linoleik asit konsantrasyonu ile aynı olduğu durumda ise klorofil a %14.8, klorofil b % 23.6 oranında enzim inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Aynı koşullarda β -karotenin %100'lük enzim inhibisyonu gerçekleştirdiği gözlenmiştir.

4.5. Pigmentlerin LOX Enzimi Üzerine İnhibe Edici Etkisinin Kinetik İncelenmesi

β -Karoten ve klorofil pigmentlerinin bezelye LOX enzimi üzerine inhibe edici etkisi ve inhibisyon tipi kinetik yaklaşımla incelenmiştir. Bu amaçla, 1.56 μ M β -karoten, klorofil a veya klorofil b varlığında, substrat konsantrasyonuna karşı (0-100 μ M linoleik asit) reaksiyon hızı (konjuge dien oluşum hızı) grafiğe geçirilmiştir. Kontrol (inhibitör olmayan durum) ile kıyaslandığında β -karoten ve klorofillerin LOX enzimi üzerine inhibisyon etkisi Şekil 4.15'de verilen Michaelis-Menten grafiklerinden de açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.15. Bezelye LOX enziminin β -karoten (BC) , klorofil a (Chl a) ve klorofil b (Chl b) varlığında Michaelis-Menten grafikleri.

β -Karoten ve klorofillerin etkisi ile gerçekleşen LOX inhibisyonunun tipini belirlemek amacıyla Eşitlik 1'de verilen Michaelis-Menten hız ifadesinin doğrusallaştırılmış formu olan Lineweaver-Burk eşitliği (Eşitlik 2) kullanılmıştır (Silverman, 2002).

Michaelis-Menten hız eşitliği:

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Michaelis-Menten hız eşitliğinin doğrusal formu, Lineweaver-Burk eşitliği:

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

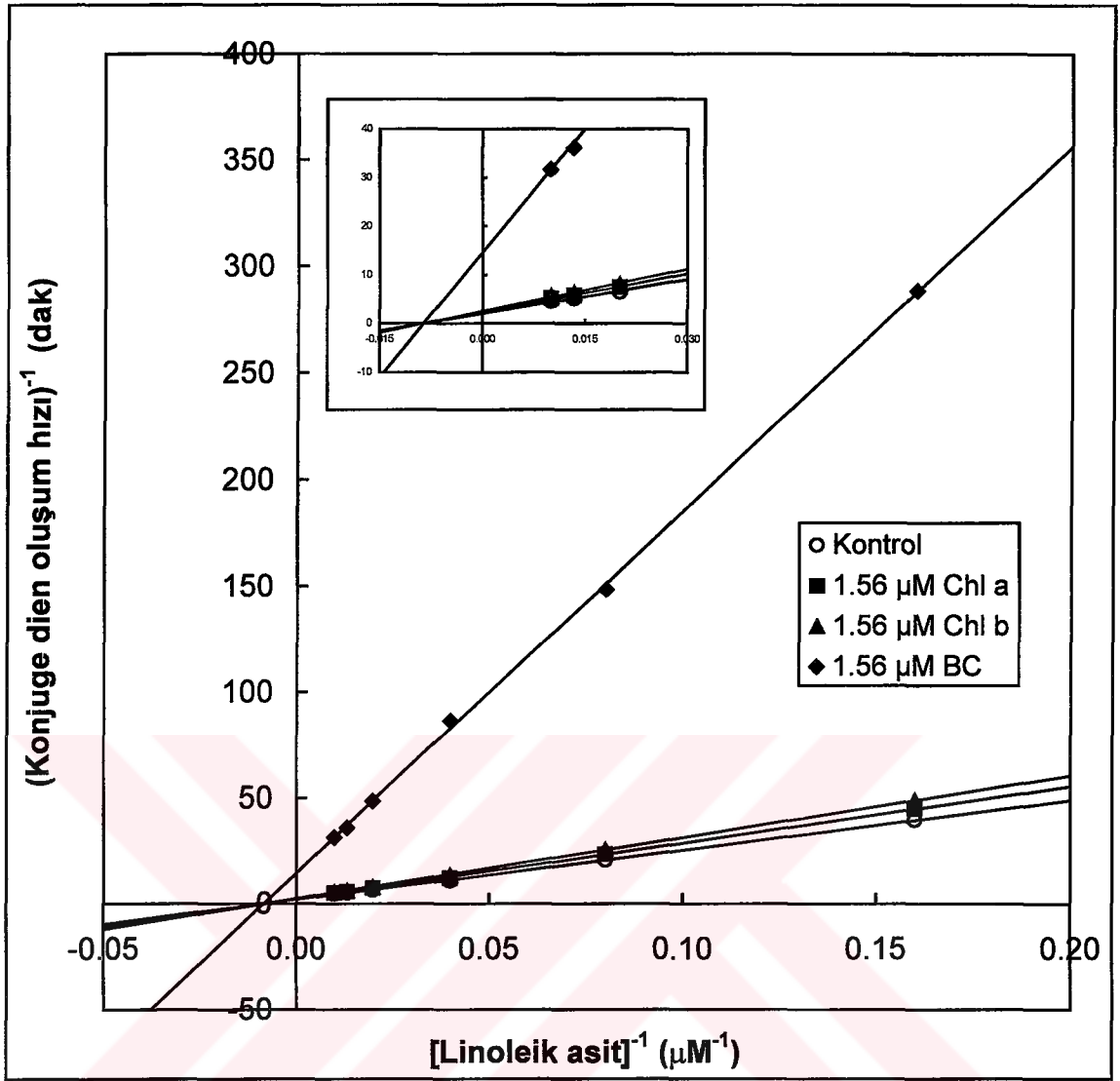
Burada ;

V_m = Maksimum hız (1/dak)

K_m = Maksimum hızın yarısına ulaşmak için gerekli linoleik asit konsantrasyonu (μM)

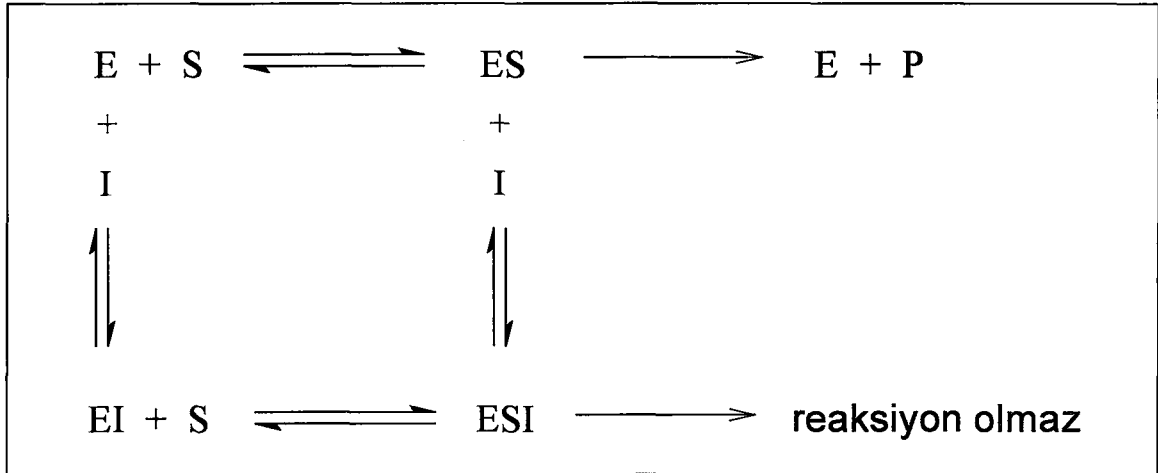
$[S]$ = Linoleik asit konsantrasyonu (μM)

β -karoten, klorofil a ve klorofil b varlığında elde edilen kinetik veri Michaelis-Menten modelinin doğrusallaştırılmış formu olan Lineweaver-Burk modeline göre ele alınıp, 1/linoleik asit konsantrasyonuna karşı 1/konjuge dien oluşum hızı grafikleri çizildiğinde elde edilen eğrilerin y-eksenini kestiği noktaların değiştiği, ancak x-eksenini kestiği noktaların aynı olduğu görülmektedir (Şekil 4.16). Bu durum, inhibitör (β -karoten, klorofil a ve klorofil b) varlığında bezelye LOX enzimi için V_m değerlerinin azaldığını, buna karşılık K_m değerlerinin değişmediğini göstermektedir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.16. β -Karoten, klorofil a ve klorofil b varlığında bezelye LOX enzimine ait Lineweaver-Burk grafikleri

Bezelye LOX enziminde görülen bu davranış, β -karoten, klorofil a ve klorofil b varlığında gözlenen inhibisyonun rekabetçi olmayan (non-competetive) inhibisyon modeline uyduğunu göstermektedir. Şekil 4.17'de rekabetçi olmayan inhibisyonun reaksiyon mekanizması şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.17. Rekabetçi olmayan (non-competitive) inhibisyon modeli (Silverman, 2002)

Rekabetçi olmayan enzim inhibisyon modelinde inhibitör madde, enzim veya enzim substrat kompleksine etki ederek ürün oluşumunu engellemektedir. Ortama ilave edilen inhibitör konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak enzim inhibisyonu gerçekleşmekte, ortamda bulunan inhibe olmamış enzim miktarına bağlı olarak ise ürün oluşmaktadır. Bundan dolayı enzim kinetiğine ait parametrelerden K_m değeri değişmezken V_m değeri azalmaktadır (Silverman, 2002).

Rekabetçi olmayan enzim inhibisyon modelinde Michaelis-Menten hız eşitliği, Eşitlik 3 'deki gibi ifade edilmektedir (Silverman, 2002):

$$V = \left(\frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \right) \left(\frac{1}{1 + [I]/K_i} \right) \quad (3)$$

Eşitlik 3 doğrusallaştırıldığında ise Eşitlik 4 elde edilmektedir (Silverman, 2002).

$$\frac{1}{V} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{V_m} \quad (4)$$

Eşitlik 3 ve 4'de gösterilen $[I]$ inhibitör konsantrasyonunu, K_i inhibitör dissosiasyon sabitini belirtmektedir. K_i değeri düştükçe inhibitörün etkinliğinin arttığı anlaşılmaktadır. Bezelye LOX enzimi için saptanan V_m , K_m ve K_i değerleri Çizelge 4.5'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Bezelye LOX enzimine ait kinetik parametreler ve bu parametreler üzerine β -karoten, klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin etkisi.

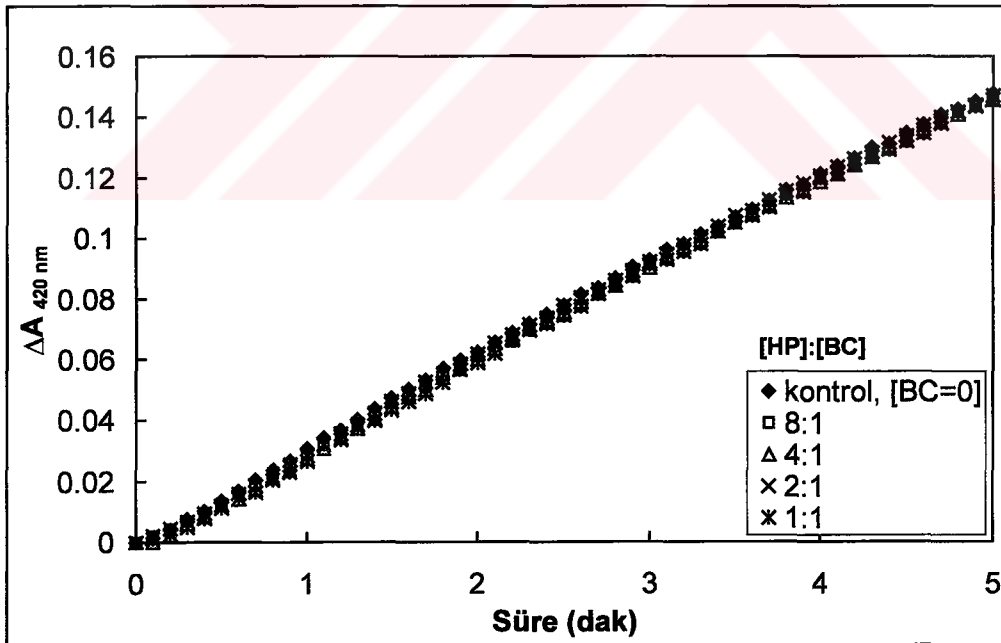
Pigment (1.56 μM)	V_m (1/dak)	K_m (μM)	K_i (μM)	R^2
Kontrol	0.505	118.74		0.9972
β -Karoten	0.069	118.43	0.25	0.9964
Klorofil a	0.444	118.37	11.7	0.9993
Klorofil b	0.409	118.94	6.6	0.9983

Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi ortamda bulunan 1.56 μ M konsantrasyonundaki pigmentler bezelye LOX enzimine ait kinetik parametrelerden V_m değerini azaltırken, K_m değerini etkilememiştir. V_m değerini β -karoten %86, klorofil a %12 ve klorofil b ise %19 oranında azaltmıştır. β -karoten için K_i değeri 0.25 μ M, klorofil a için 11.7 μ M ve klorofil b için 6.6 μ M olarak hesaplanmıştır. K_i değeri inhibisyonun bir ölçüsüdür. K_i değerinin sıfıra yaklaşması, gerçekleşen enzim inhibisyonunun çok kuvvetli olduğu anlamına gelmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, pigmentlerin LOX enzimi üzerine inhibe edici etkisi β -karoten >> klorofil b > klorofil a şeklinde gerçekleşmektedir.

4.6. Model Ortamda POD Enziminin β -Karoten Üzerine Etkisi

POD enzimi ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında hidrojen peroksit oksidasyonun spektrofotometrik olarak izlenmesi amacıyla hidrojen donör substrat olarak guayakol kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyon sunucunda guayakol radikallerinin birleşmesiyle oluşan tetraguayakokinonlar 400-700 nm gibi geniş bir dalga boyu aralığında absorbans vermektedirler ve maksimum absorbans ise 420 nm dalga boyunda gerçekleşmektedir.

Model ortam reaksiyonlarının ilk aşamasında POD enziminin aktivitesi üzerine β -karotenin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarında, hidrojen peroksit ve guayakol konsantrasyonu sabit tutulmuş (25 μ M), artan konsantrasyonlarda β -karotenin (3.12-25 μ M) POD enzim aktivitesi üzerinine etkisi incelenmiştir. Şekil 4.18'de artan konsantrasyonlarda β -karotenin POD enziminin aktivitesi üzerine etkisi gösterilmiştir.



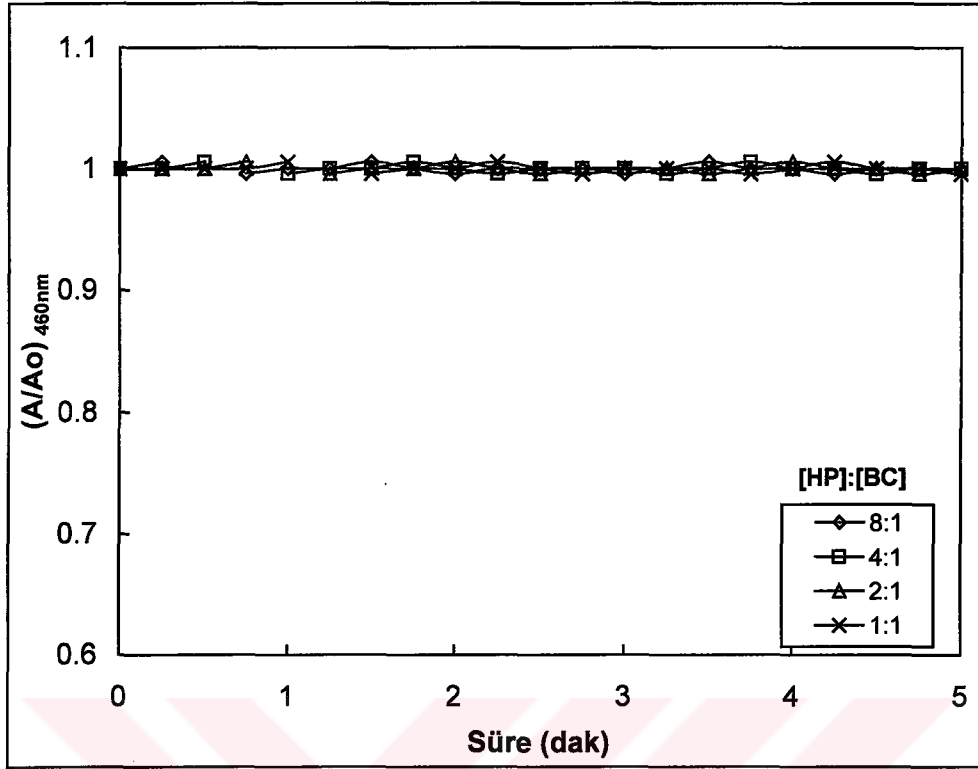
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC), POD enzim aktivitesi üzerinine etkisi. (β -karoten= 3.12-25 μ M; Hidrojen peroksit (HP)= 25 μ M; Guayakol= 25 μ M)

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi artan konsantrasyonlarda β -karoten, POD enziminin aktivitesi üzerine herhangi bir etki göstermemiştir. Hidrojen donör olarak davranan guayakol, enzim bünyesinde bulunan oksijen atomuna hidrojen transferlerini gerçekleştirmekte ve oluşan guayakol radikalleride birleşerek tetraguayakokinonları oluşturmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre β -karotenin oluşan guayakol radikalleriyle tepkimeye girmedığı, oluşan guayakol radikallerinin kendi aralarındaki etkileşimlerle tetraguayakokinonlara dönüştüğü anlaşılmaktadır.

Sabit hidrojen peroksit ve guayakol konsantrasyonlarında (25 μ M) POD enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları esnasında β -karotenin konsantrasyonundaki değişim spektrofotometrik engellemelerden dolayı izlenememiştir. POD etkisi ile oluşan tetraguayakokinonlar, β -karotenin maksimum absorpsiyon gösterdiği 460 nm'de absorpsiyon artışına neden olduğundan reaksiyon karışımı içerisindeki β -karotenin 460 nm'de değişiminin izlenmesi mümkün olmamıştır.

Model ortam reaksiyonlarının ikinci aşamasında POD enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen, hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında hidrojen donör molekül olan guayakolun kullanılmadığı durumda β -karotende meydana gelebilecek değişim incelenmiştir. Bu amaçla hidrojen peroksit konsantrasyonu sabit tutulmuş (25 μ M), artan konsantrasyonlardaki β -karotenin (3.12-25 μ M) reaksiyon süresince değişimi 460 nm'de izlenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi POD enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyon reaksiyonu esnasında β -karoten konsantrasyonunda herhangi bir değişim gerçekleşmemiştir. β -karoten hidrojen donör olarak davranmamış, yani hidrojen transferlerini gerçekleştirememiş ve bu sebepten dolayı ko-oksidasyonu gerçekleştirmemiştir.

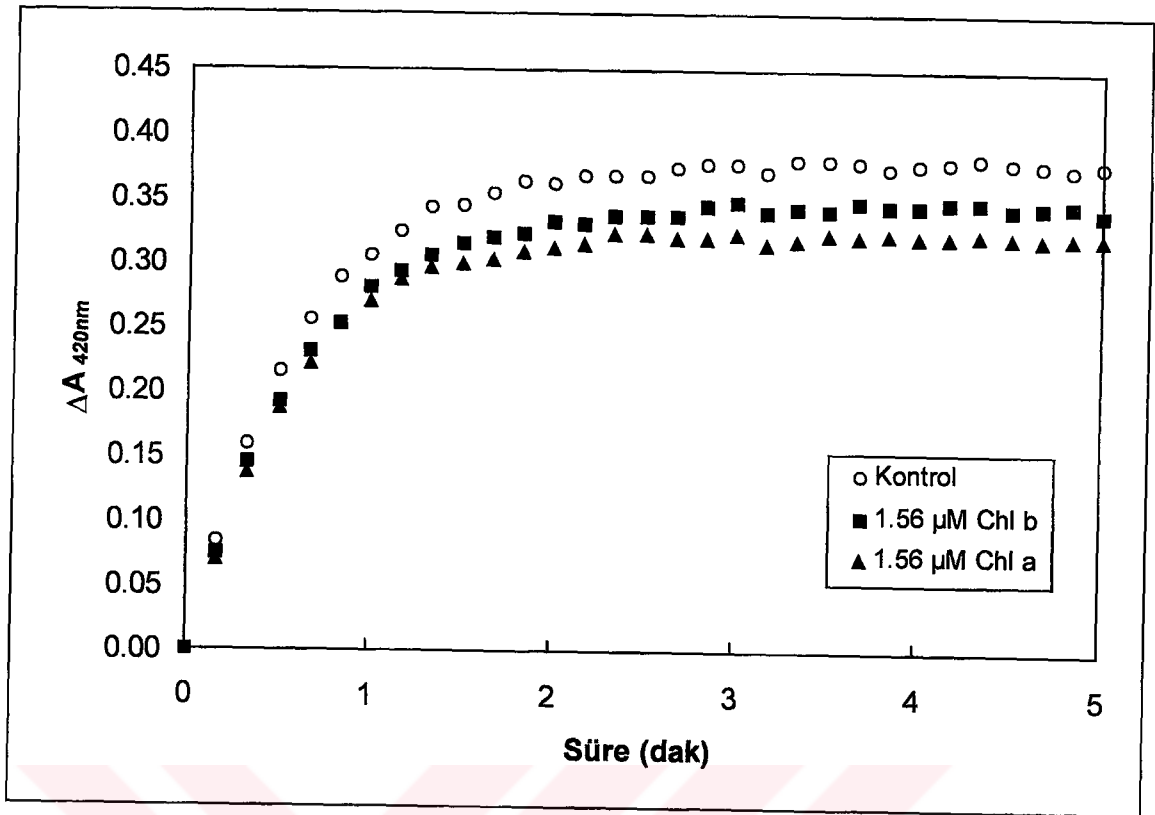
Kanner ve Mendel, (1977), yüksek oranda peroksidaz aktivitesi içeren kırmızı biber ekstraktı ile gerçekleştirdiği çalışmada karoten ağarmasının gerçekleştiğini belirtmiştir. Bu çalışmada ise peroksidaz aktivitesine bağlı olarak β -karoten kaybı gözlenmemiştir.



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda β -karotenin (BC) POD katalizörlüğünde, hidrojen peroksit oksidasyonu esnasında ko-oksidasyonu (β -karoten= $3.12\text{-}25\ \mu\text{M}$; Hidrojen peroksit (HP)= $25\ \mu\text{M}$)

4.7. Model Ortamda POD Enziminin Klorofil a ve b Üzerine Etkisi

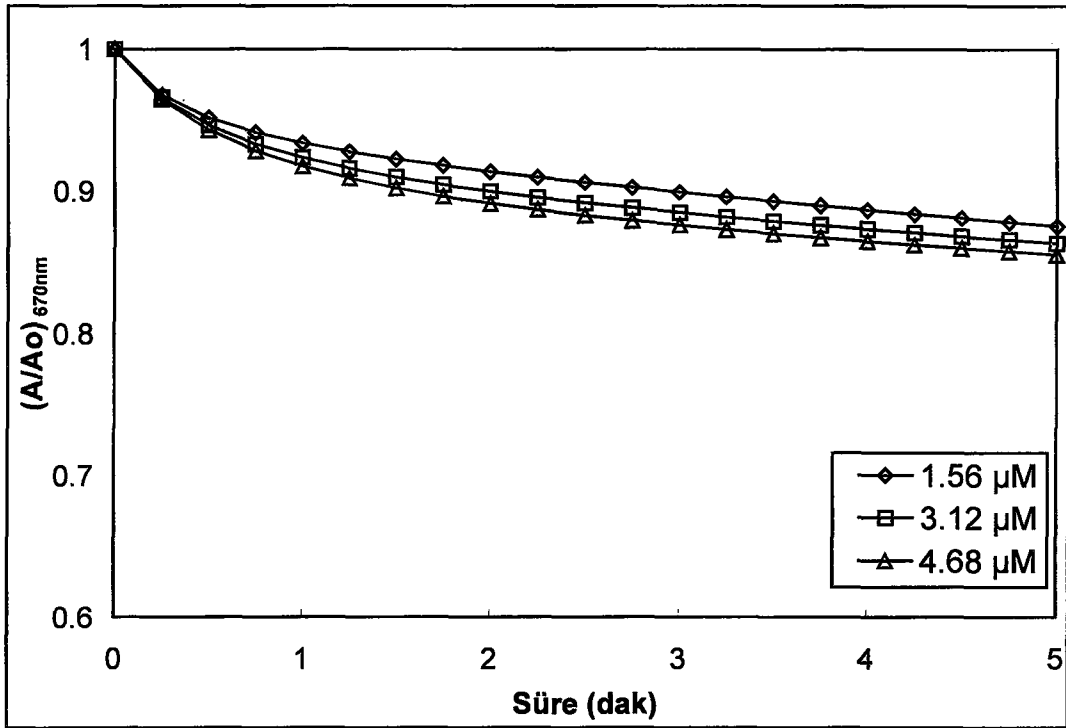
Klorofil pigmentleri ile gerçekleştirilen model ortam reaksiyonlarının ilk aşamasında POD enziminin aktivitesi üzerine klorofil a ve klorofil b'nin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla model reaksiyon ortamı, klorofil a ve klorofil b konsantrasyonu $1.56\ \mu\text{M}$, hidrojen peroksit konsantrasyonu $25\ \mu\text{M}$ ve guayakol konsantrasyonu $1\ \text{mM}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi klorofil pigmentleri, POD enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında oluşan tetraguayakokinon oluşum hızını ve miktarını azaltmıştır. $1.56\ \mu\text{M}$ klorofil a tetraguayakokinon oluşum hızını %13.6, $1.56\ \mu\text{M}$ klorofil b ise %8.4 oranında azaltmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, klorofil pigmentleri guayakol ile birlikte hidrojen donör olarak davrandığı, bu nedenle kontrol reaksiyonuna göre daha az miktarda tetraguayakokinon oluştuğu düşünülmektedir.



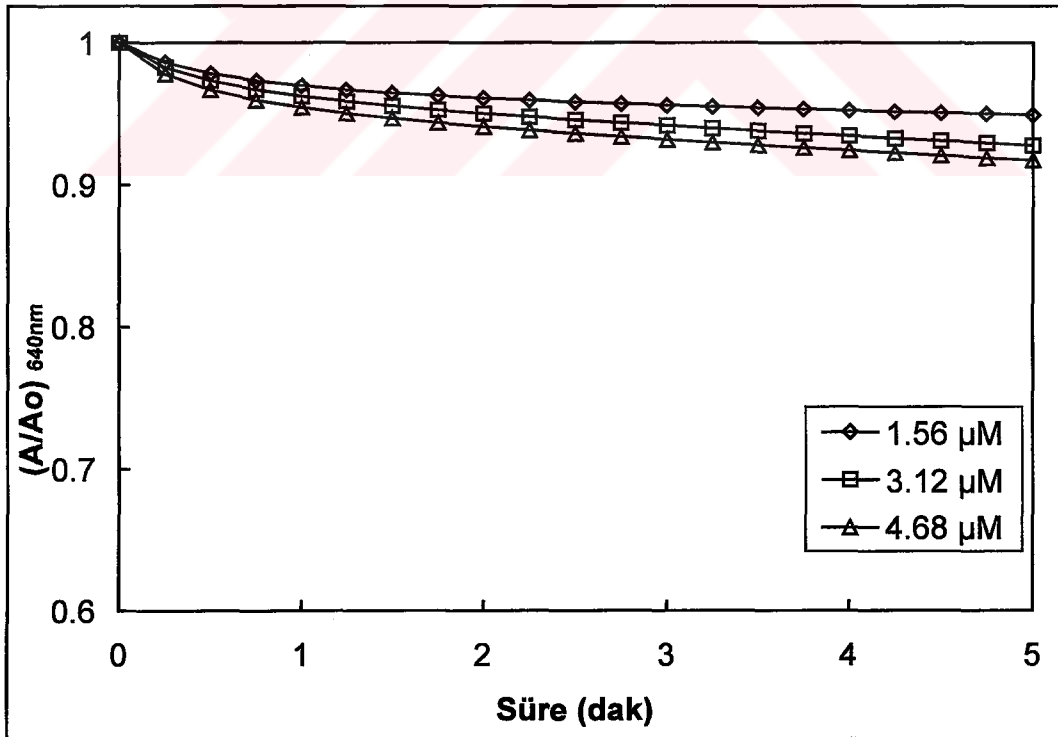
Şekil 4.20. Klorofil pigmentlerinin, POD enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında tetraguayakokinon oluşumu üzerine etkisi

β -Karoten ile gerçekleştirilen denemelerde olduğu gibi, aynı reaksiyon koşullarında klorofil a ve klorofil b'nin konsantrasyonlarındaki değişimler de spektrofotometrik engellemelerden dolayı izlenememiştir.

Model ortam reaksiyonlarının ikinci aşamasında POD enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen, hidrojen peroksitin oksidasyonu esnasında hidrojen donör molekül olan guayakolun kullanılmadığı durumda, klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin konsantrasyonlarında meydana gelebilecek değişim incelenmiştir. Bu amaçla hidrojen peroksit konsantrasyonu sabit tutulmuş ($100 \mu\text{M}$), artan konsantrasyonlardaki klorofil a ve klorofil b'nin ($1.56 - 4.68 \mu\text{M}$) reaksiyon süresince değişimi sırasıyla 670 ve 640 nm 'de izlenmiştir.



Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda klorofil a'nın, POD enzimi katalizörlüğünde, hidrojen peroksitin oksidasyonu sırasında, klorofil a ko-oksidasyonu üzerine etkisi



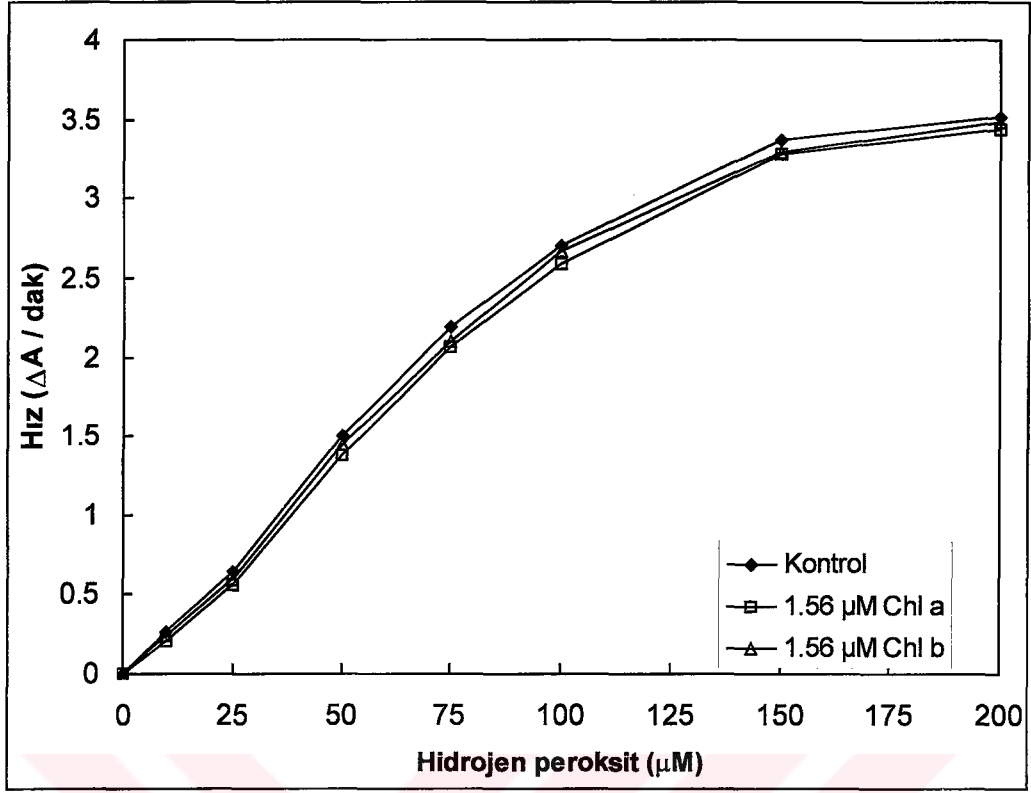
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda klorofil b'nin, POD enzimi katalizörlüğünde, hidrojen peroksitin oksidasyonu sırasında, klorofil b ko-oksidasyonu üzerine etkisi

Şekil 4.21 ve 4.22’de görüldüğü gibi, POD enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksitin oksidasyon reaksiyonu esnasında klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin konsantrasyonları azalmıştır. Buna göre hem klorofil a ve hem de klorofil b moleküllerinin POD reaksiyon mekanizması içerisinde sınırlı düzeyde de olsa hidrojen donör olarak davranabildiği, yani Enzim-Oksijen kompleksine hidrojen transferi gerçekleştirdiği ve bu sırada kendilerinin okside olarak renklerinin açıldığı görülmüştür. Her iki pigment kıyaslandığında, klorofil a’nın klorofil b’ye göre daha hızlı okside olduğu belirlenmiştir. Nitekim 5 dakika reaksiyon sonunda 1.56 µM klorofil a ve b sırasıyla % 12.5 ve % 5.1 oranında POD aktivitesine paralel olarak okside olmuştur.

Martinez ve ark. (2001), çilek peroksidazı ile gerçekleştirdikleri çalışmada klorofil pigmentlerinin peroksidaz aktivitesine paralel olarak okside olduğunu ve klorofil a’nın klorofil b’ye göre daha hızlı okside olduğunu belirtmiştir.

Klorofil a ve klorofil b varlığında POD enzim aktivitesindeki değişim kinetik yaklaşımla değerlendirilmiştir. Buna göre, sabit klorofil (1.56 µM) ve guayakol (1 µM) konsantrasyonunda, artan hidrojen peroksit karşılık reaksiyon hızı (tetraguayakokinon oluşumu) grafiğe geçirilmiş ve Michaelis-Menten grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.23).

Şekil 4.23’de görüldüğü gibi, klorofil varlığında, POD etkisi ile tetraguayakokinon oluşum hızı oldukça sınırlı oranda azalmıştır. Ancak tetraguayakokinon hızındaki bu azalışın herhangi bir şekilde POD enziminin inhibisyonu sonucu değil, hidrojen donör olarak guayakol ve klorofil moleküllerinin rekabetinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.23. Klorofil pigmentleri varlığında POD enziminin aktivitesindeki değişim

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Haşlama sırasında seçilen indikatör enzime göre uygulanan ısı işlem normları, sebzelerin donmuş halde depolanmaları sırasında duyusal kalitenin korunması açısından önemli farklılık göstermektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular bezelyelerde LOX enziminin indikatör olarak kullanılması halinde klorofillerden kaynaklanan yeşil rengin stabilitesinin düştüğünü ortaya koymaktadır. Ayrıca bezelyelerde tespit edilen bazı ksantinlerin de depolama boyunca okside oldukları görülmektedir. Buna karşılık POD indikatör seçilerek haşlanan bezelyelerde donmuş depolama boyunca klorofil ve ksantinlerin stabilitesi yükselmektedir.

Havuçlarda ölçülebilir düzeyde bir LOX aktivitesi saptanmazken, POD aktivitesi de bezelyelere kıyasla daha düşük bulunmuştur. Havuçların donmuş halde depolama boyunca β -karoten bileşimi bakımından stabil olduğu, bu stabilitenin POD indikatör seçilerek haşlama ile daha da artırılabilceği anlaşılmaktadır.

Model ortamda gerçekleştirilen denemelerde elde edilen sonuçlar sebzelerin bileşiminde doğal olarak bulunan LOX ve POD enzimlerinin klorofiller ve β -karoten oksidasyonu üzerine etkili oldukları görülmektedir. Bezelye LOX enzimi hem β -karoten, hem de klorofillerin ko-oksidasyonunu katalizlemektedir. Ancak bu etki β -karoten ve klorofillerin varlığında LOX enziminin linoleik asit hidroperoksidasyon aktivitesinin inhibisyonu şeklinde gerçekleşmektedir. LOX inhibisyon etkisi büyükten küçüğe doğru β -karoten >> klorofil b > klorofil a şeklindedir. β -karoten çok düşük konsantrasyonlarda bile yüksek oranda LOX inhibisyonuna neden olmaktadır. β -karotenin POD aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı, buna karşılık POD etkisiyle klorofillerin renginde açılma meydana geldiği görülmektedir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde, özellikle yüksek LOX ve POD aktivitesine sahip yeşil renkli sebzelerde dondurulmuş halde depolanmaları sırasında duyusal kalitenin korunması açısından haşlamanın büyük önem taşıdığını ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Kader, Z.M., 1991. A Study of the Apparent Diffusion Coefficients for Ascorbic Acid Losses from Peas During Blanching in Water. *Food Chemistry*, 40, 137-145.
- Acar, J., Cemeroğlu, B., 1998. Meyve ve Sebze Teknolojisi. Cilt II. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Yayın No : 43, 406s.
- Adams, J.B., Harvey, A., Dempsey, C.E., 1996. Regenerated and Denaturated Peroxidase as Potential Lipid Oxidation Catalysts. *Food Chemistry*, 57(4), 505-514.
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2002. Kinetic Parameters for the Thermal Inactivation of Quality-Related Enzymes in Carrots and Potatoes. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 4119-4125.
- Aziz, S., Wu, Z., Robinson, D.S., 1999. Potato Lipoxygenase Catalysed Co-Oxidation of β -Carotene. *Food Chemistry*, 64, 227-230.
- Baardseth, P., Slinde, E., 1983. Peroxidase, Catalase and Palmitoyl-CaA Hydrolase activity in Blanched Carrot Cubes After Storage at -20°C . *Journal of the Science Food and Agriculture*. 34, 1257-1262.
- Bahçeci, K.S., 2003. Dondurularak Muhafaza Edilen Bazı Sebzelerde Peroksidaz ve Lipoksigenaz Enzimlerinin Termal İnaktivasyon ve Reaktivasyon Koşullarının Belirlenmesi. Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 91s.
- Barrett, D.M., Theerakulkait, C., 1995. Quality Indicators in Blanched, Frozen, Stored Vegetables. *Food Technology*, 49, 62, 64-65.
- Benzei I.F.F., 2000. Evolution of Antioxidant Defence Mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39, 53-61.
- Borrelli, G.M., Troccoli, A., Fonzo, N.D., Fares, C., 1999. Durum Wheat Lipoxygenase Activity and Other Quality Parameters that Affect Pasta Color. *Cereal Chemistry*, 76(3), 335-340.
- Böttcher, H., 1975. Enzyme Activity and Quality of Frozen Vegetables 1. Remaining Residual Activity of Peroxidase. *Nahrung*, 19, 173.
- Braumann, T., Grimme, L.H., 1979. Single Step Separation and Identification of Photosynthetic Pigments by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 170, 264-268.
- Britton, G., 1995. Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Britton, G., 1996. Carotenoids *in* Natural Food Colorants, Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. (eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, 348p.
- Bryant J.D., McCord, J.D., Unlu, L.K., Erdman, J.W., 1992. Isolation and Partial Characterization of α - and β -Carotene-Containing Carotenprotein from Carrot (*Daucus carota* L.) Root Chromoplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 545-549.
- Brown, M.S., 1967. Texture of Frozen Vegetables: Effects of Freezing Rate on Green Beans. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 18, 77-81.
- Buckle, K.A., Edwrds, R.A., 1970. Chlorophyll Degradation and Lipid Oxidation in Frozen Unblanched Peas. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 21, 307-312.
- Burnette, F.S., 1977. Peroxidase and Its Relationship to Food Flavor and Quality : A Review. *Journal of Food Science*, 42, 1-6.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1984. β -Carotene: An Unusual Type of Lipid Antioxidant. *Science*, 244, 569-573.
- Burton, G.W., 1989. Antioxidant Action of Carotenoids. *Journal of Nutrition*, 119, 109-111.
- Calligaris, S., Falcone, P., Anese, M., 2002. Color Changes of Tomato Purees During Storage at Freezing Temperatures. *Journal of Food Science*, 67(6), 2432-2435.
- Canjura, F.L., Schwartz, S.J., Nunes, R.V., 1991. Degradation Kinetics of Chlorophylls and Chlorophyllides. *Journal of Food Science*, 56(6), 1639-1643.
- Cano, M.P., 1996. Vegetables *in* Freezing Effects on Food Quality. Jeremiah, L.E. (ed.), Marcel Dekker, New York, 520 p.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Sanem Mat., Ankara, 512s
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları. Cilt I. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 24, 328s.
- Chen, B.H., Liu, M.H., 1998. Relationship Between Chlorophyll a and β -Carotene in a Lipid Containing Model System During Illumination. *Food Chemistry*, 63(2), 207-213.
- Conn, P.F., Lambert, C., Land, E.J., Schalch, W., Truscott, T.G., 1992. Carotene and Oxygen Radical Interactions. *Free Radical Researchs and Communications*, 16, 401-408.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Craft, N.E., 1992. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β -Carotene in Organic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 431-434.
- Desobry, S.A., Netto, F.M., Labuza, T.P., 1998. Preservation of β -Carotene from Carrots. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 381-396.
- Dietrich, W.C., Neumann, H.J., 1965. Blanching Brussels Sprouts. *Food Technology*, 19, 1174-1177.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants-A Review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41, 189-200.
- Ege, S., 1994. *Organic Chemistry*. Third Edition, D.C. Heath and Company, Lexington, 1398p.
- Eriksson, C., 1975. Aroma Compounds Derived from Oxidized Lipids. Some Biochemical and Analytical Aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23(2), 126-128.
- Favell, D.J., 1998. A Comparison of the Vitamin C Content of Fresh and Frozen Vegetables. *Food Chemistry*, 62(1), 59-64.
- Fellows, P.J., 2000. *Blanching in Food Processing Technology: Principles and Practice*. Second Edition, Fellows, P. (ed.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, 608p.
- Funamoto, Y., Yamauchi, N., Shigenaga, T., Shigyo, M., 2002. Effects of Heat Treatment on Chlorophyll Degrading Enzymes in Stored Broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24, 163-170.
- Ganguly, J., Sastry, P.S., 1985. Mechanism of Conversion of β -Carotene into Vitamin A: Central Cleavage Versus Random Cleavage. *World Review of Nutritional Diet*, 45, 198-220.
- Gardner, H.W., 1975. Decomposition of Linoleic Acid Hydroperoxides. Enzymic Reactions Compared with Nonenzymic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23(2), 129-135.
- Gardner, H.W., 1991. Recent Investigations into the Lipoxygenase Pathway of Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084, 221-239.
- Goldman, M., Hover, B., Saguy, I., 1983. Decoloration of Beta-Carotene in Model System Simulating Dehydrated Foods. Mechanism and Kinetic Principles. *Journal of Food Science*, 48, 751-754.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Goodwin, T.W., 1980. Nature and Properties in The Biochemistry of the Carotenoids. Goodwin, T.W. (ed.), Volume I, Chapman and Hall, London, 377p.
- Gossauer, A., Engel, N., 1996. Chlorophyll Catabolism- Structures, Mechanisms, Conversions. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 32, 141-151.
- Gökmen, V., Bahçeci, S., Acar, J., 2002a. A Liquid Chromatographic Method for the Determination of Chlorophylls, Carotenoids and Their Derivatives in Fresh and Processed Vegetables. Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques, 25(8), 1213-1225.
- Gökmen, V., Bahçeci, S., Acar, J., 2002b. Characterization of Crude Lipoxygenase Extract from Green Pea Using a Modified Spectrophotometric Method. European Food Research and Technology, 215, 42-45.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Rojas-Hidalgo, E., 1992. Carotenoid Composition in Raw and Cooked spanish Vegetables. Journal of Food and Agricultural Chemistry, 40, 2135-2140.
- Greenberg, E.R., Baron, J.A., Stuket, T.A., Stevens, M.M., Mandel, J.S., Spencer, S.K., Elias, P.M., Lowe, N., Nierenberg, D.W., Bayrd, G., Vance, J.C., Freeman, D.H., Clendenning, J.W.E., Kwan, T., The Skin Cancer Prevention Study Group, 1990. A Clinical Trial of β -Carotene to Prevent Basal-cell and Squamous Cell Cancers of Skin. New England Journal of Medicine, 323, 789-795.
- Grosch, W., Laskawy, G., Weber, F., 1976. formation of Volatile Carbonyl Comounds and Cooxidation of β -Carotene by Lipoxygenase from Wheat, Potato, Flax and Beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24(3), 456-459.
- Güneş, B., Bayındırlı, A., 1993. Peroxidase and Lipoxygenase Inactivation During Blanching of Green Beans, Green Peas and Carrots. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 26, 406-410.
- Halpin, B.E., Lee, C.Y., 1987. Effect of Blanching on Enzyme Activity and Quality Changes in Green Peas. Journal of Food Science, 52(4), 1002-1005.
- Halpin, B.E., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). Journal of Food Science, 54(3), 644-649.
- Heaton, J.W., Marangoni, A.G., 1996. Chlorophyll Degradation in Processed Foods and Senescent Plant Tissues. Trends in Food Science and Technology, 7, 8-15.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Heinonen, M.I., 1990. Carotenoid and Provitamin-A Activity of Carrot Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 609-612.
- Hemeda, H.M., Klein, B.P., 1991. Inactivation and Regeneration of Peroxidase Activity in Vegetable Extracts Treated with Antioxidants. *Journal of Food Science*, 56(1), 68-71.
- Hendry, G.A.F., 1996. Chlorophylls and Chlorophyll Derivatives *in* Natural Food Colorants, Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. (eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, 348p.
- Hildebrand, D.F., Hymowitz, T., 1982. Carotene and Chlorophyll Bleaching by Soybeans with and without Seed Lipxygenase-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 705-708.
- Howard, L.A., Wong, A.D., Perry, A.K. and Klein, B.P., 1999. β -Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables. *Journal of Food Science*, 64(5), 929-936.
- Ikedobi, C.O., Snyder, H.E., 1977. Co-oxidation of β -Carotene by an Isoenzyme of Soybean Lipxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 124-127.
- Jaren-Galan, M., Minguez-Mosquera, M.I., 1997. β -Carotene and Capsanthin Co-Oxidation by Lipxygenase. Kinetic and Thermodynamic Aspects of Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4814-4820.
- Jialal, I., Norkus, E.P., Cristol, L., Grundy, S.M., 1991. β -Carotene Inhibits the Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1086, 134-138.
- Kanner, J., Mendel, H., 1977. Carotene Oxidizing Factors in Red Pepper Fruits: Peroxidase Activity. *Journal of Food Science*, 42(6), 1549-1551.
- Katsaboxakis, K.S., 1984. The Influence of the Degree of Blanching on the Quality of Frozen Vegetables *in* Thermal Processing and Quality of Foods, Zeuthen, P., Cheftel, J.C., Ericksson, C., Jul, M., Leniger, H., Linko, P., Varela, G., Vods, G. (eds), Elsevier Applied Science Publish, London, 559p.
- Kennedy, T.A., Liebler, D.C., 1992. Peroxyl Radical Scavenging by β -Carotene in Lipid Bilayers. *Journal of Biology and Chemistry*, 267, 4658-4663.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Whittaker, N.F., 1986. Separation, Identification, and Quantification of the Major Carotenoid and Chlorophyll Constituents in Extracts of Several Green Vegetables by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 603-616.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Klein, B.P., Grossman, S., King, D., Cohen, B.S., Pinsky, A., 1984. Pigment Bleaching, Carbonyl Production and Antioxidant Effects During the Anaerobic Lipxygenase Reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 793, 72-79.
- Knekt, P., Heliovara, M. Rissanen, A., 1992. Serum Antioxidant Vitamins and Risk of Cataract. *British Medical Journal*, 305, 1392-1394.
- Krinsky, N.I., 1994. The Biological Properties of Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
- Lee, C.Y., 1986. Changes in Carotenoid Content of Carrots During Growth and Post-Harvest Storage. *Food Chemistry*, 20, 285-293.
- Lee, C.Y., Smith, N.L., Hawbecker, D.E., 1988. Enzyme Activity and Quality of Frozen Green Beans as Affected by Blanching and Storage. *Journal of Food Quality*, 11, 279-287.
- Lee, E.C., Min, B.D., 1988. Quenching Mechanism of β -Carotene on the Chlorophyll Sensitized Photooxidation of Soybean Oil. *Journal of Food Science*, 53(6), 1894-1895.
- Lee, S.K., Kader, A.A., 2000. Preharvest and Postharvest Factors Influencing Vitamin C Content of Horticultural Crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Luh, B.S., 1997. Principles and Applications of Vegetable Processing *in* Processing Vegetables. Smith, D.S., Cash, J.N., Nip, W., Hui, Y.H. (eds.), Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, 434 p.
- Malecki, G.J., 1964. Retains Vegetable Green. *Food Engineering*, 37(6), 93-97.
- Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R., Anon, M.C., 2001. Characterization of Peroxidase-Mediated Chlorophyll Bleaching in Strawberry Fruit. *Phytochemistry*, 58, 379-387.
- Mathews-Roth, M.M., Krinsky, N.I., 1987. Carotenoids Affect Development of UV-B Induced Skin Cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 46, 507-509.
- Matile, P., Ginsburg, S., Schellenberg, M., Thomas, H., 1987. Catabolites of Chlorophyll in senescent Leaves. *Journal of Plant Physiology*, 129, 219-228.
- Minguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Jaren-Galan, M., 2002a. Chlorophylls *in* Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, Hurst, W.J. (ed.), CRC Press LLC, Florida, 416p.
- Minguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Jaren-Galan, M., 2002b. Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods *in* Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, Hurst, W.J. (ed.), CRC Press LLC, Florida, 416p.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Morales- Blances, E.F., Chandia, V.E., Cisneros-Zevallos, L., 2002. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. *Journal of Food Science*, 67(1), 146-154.
- Morris, D.L., Kritchevsky, S.B., Davis, C.E., 1994. Serum Carotenoids and Coronary Heart Disease. *Journal of American Medical Association*, 272, 1439-1441.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G., 2001. The Interactions of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 13-19.
- Müftügil, N., Yiğit, V., 1984. Haşlanarak ve Haşlanmadan Dondurulan Bazı Sebzelerdeki Kalite Değişimleri. *Gıda*, 6(6), 357-362.
- Negi, P.S., Roy, S.K., 2000. Effect of Blanching and Drying Methods on β -Carotene, Ascorbic Acid and Chlorophyll Retention of Leafy Vegetables. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33, 295-298.
- Nelson, M.J., Seitz, S.P., Cowling, R.A., 1990. Enzyme-bound pentadienyl and peroxy radicals in purple lipoxygenase. *Biochemistry*, 29, 6887-6903.
- Nyambaka, H., Ryley, J., 1996. An Isocratic Reversed-Phase HPLC Separation of the Stereoisomers of the Provitamin A Carotenoids (α - and β -Carotene) in Dark Green Vegetables. *Food Chemistry*, 55, 63-72.
- O'Connor, T.P., O'Brien, N.M., 1991. Significance of Lipoxygenase in Fruits and Vegetables in Food Enzymology, Volume I. Fox, P.F. (ed.), Elsevier Science Publishers Ltd., 636 p.
- Oliver, J., Palou, A., 2000. Chromatographic Determination Of Carotenoids in Foods. *Journal of Chromatography A*, 881, 543-555.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, J.S., Hammar, S., 1996. Effects of a Combination of β -Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.
- Pala, M., 1983. Meyve ve Sebzelerin Dondurularak Muhafazası. *Gıda*, 8(3), 131-137.
- Park, Y.W., 1987. Effect of Freezing, Thawing, Drying and Cooking on Carotene Retention in Carrots, Broccoli and Spinach. *Journal of Food Science*, 52(4), 1022-1025.
- Pesek, C.A., Warthesen, J.J., 1988. Characterization of the Photodegradation of β -Carotene in Aqueous model system. *Journal of Food Science*, 53(5), 1517-1520.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D., Sporn, M.B., 1981. Can Dietary beta-Carotene Materially Reduce Human Cancer Rates? *Nature*, 290, 201-208.
- Polyakov, N.E., Kruppa, A.I., Leshina, T.V., Konovalova, T.A., Kispert, L.D., 2001. Carotenoids as Antioxidants: Spin Trapping EPR and Optical Study. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 43-52.
- Poulsen, K.P., 1986. Optimizing of Vegetable Blanching. *Food Technology*, 6, 122-129.
- Prigge, S.S., Boyington, J.C., Faig, M., Doctor, K.S., Gaffney, B.J., Amzel, L.M., 1997. Structure and Mechanism of Lipoxygenases. *Biochimie*, 79, 629-636.
- Robinson, D.S., 1991a. Peroxidases and Catalases in Foods *in* *Oxidative Enzymes in Foods*, Robinson, D.S., Eskin, N.A.M. (eds.), Elsevier Applied Science, London, 314p.
- Robinson, D.S., 1991b. Peroxidases and Their Significance in Fruits and Vegetables *in* *Fruits and Vegetables in Food Enzymology*, Volume I. Fox, P.F. (ed.), Elsevier Science Publishers Ltd., 636 p.
- Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C., Casey, R., 1995. Lipoxygenase and the Quality of Foods. *Food Chemistry*, 54, 33-43.
- Rontani, J.F., 2001. Visible Light- Dependent Degredation of Lipidic Phytoplanktonic Components During Senescence: A Review. *Photochemistry*, 58, 187-202.
- Roy, P., Kulkarni, A.P., 1996. Oxidation of Ascorbic Acid by Lipoxygenase: Effect of Selected Chemicals. *Food Chemical Toxicology*, 34, 563-570.
- Schwartz, S.J., Woo, S.L., Elbe, J.H., 1981. High-Performance Liquid Chromatography of Chlorophylls and Their Derivatives in Fresh and Processed Spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(3), 533-535.
- Schwartz, S.J., Lorenzo, T.V., 1990. Chlorophylls in Foods. *Food Science and Nutrition*, 29(1), 1-17.
- Schwartz, S.J., Lorenzo, T.V., 1991. Chlorophyll Stability During Continuous Aseptic Processing and Storage. *Journal of Food Science*, 56, 1059-1062.
- Selman, J.D., 1994. Vitamin Retention During Blanching of Vegetables. *Food Chemistry*, 49, 137-147.
- Sessa, D.J., Anderson, R.L., 1981. Soybean Peroxidases : Purification and Some Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 960-965.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Sheu, S.C., Chen, A.O., 1991. Lipoxygenase as Blanching Index for Frozen Vegetable Soybeans. *Journal of Food Science*, 56(2), 448-451.
- Shibata, D., Axelrod, B., 1995, Plant Lipoxygenase. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, 12, 213-228.
- Simon, P.W., 1990. Carrots and Other Horticultural Crops as a Source of Provitamin A Carotenes. *Horticultural Science*, 25, 1495-1499.
- Teng, S.S., Chen, B.H., 1999. Formation of Pyrochlorophylls and Their Derivatives in Spinach Leaves During Heating. *Food Chemistry*, 65, 367-373.
- Thron, M., Eichner, K., Ziegler, G. 2001. The Influence of Light of Different Wavelengths on Chlorophyll Containing Foods. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 34, 542-548.
- Vernooy-Gerritsen, M., Bos, A.L.M., Velding, G.A., wliegenthart, J.F.G., 1984. Intracellular Localization of Lipoxygenase-1 and -2 in Germinating Soybean Seeds by Indirect Labeling with Protein A—Colloidal gold Complexes. *Plant Physiology*, 76, 1070-1079.
- Wagenknecht, A.C., Lee, F.A., 1958, Enzyme Action and Off-Flavor in Frozen Peas. *Food Research*, 23, 25-31.
- Walker, G.C., 1964. Color Deterioration in Frozen Green Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, 29, 383-389.
- Watanabe, T., Hongu, A., Honda, K., Nakazato, M., Konno, M., Saitoh, S., 1984. Preparation of Chlorophylls and Pheophytins by Isocratic Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 56(2), 251-256.
- Whitaker, J.R., 1991. Lipoxygenases in *Oxidative Enzymes in Foods*, Robinson, D.S., Eskin, N.A.M. (eds.), Elsevier Applied Science, London, 314p.
- Williams, D.C., Lim, M.H., Chen, A.O., Pangborn, R.M., Whitaker, J.R., 1986. Blanching of Vegetables for Freezing – Which Indicator Enzyme to Choose. *Food Technology*, 40, 130-140.
- Wolf, W.J., 1975. Lipoxygenase and Flavor of Soybean Protein product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 136-141.
- Wong, D.S., 1995a. Horseradish Peroxidase in *Food Enzymes*, Wong, D.S. (ed.), Chapman and Hall, New York, 390p.
- Wong, D.S., 1995b. Lipoxygenase in *Food Enzymes*, Wong, D.S. (ed.), Chapman and Hall, New York, 390p.

6. KAYNAKLAR (devam)

- Woodall, A.A., Britton, G., Jackson, M.J., 1997a. Carotenoids and Protection of Phospholipids in Solution or in Liposomes Against Oxidation by Peroxyl Radicals: Relationship Between Carotenoid Structure and Protective Ability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 575-586.
- Woodall, A.A., Lee, S.W.M., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G., 1997b. Oxidation of Carotenoids by Free Radicals: Relationship Between Structure and Reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 33-42.
- Wu, Z., Robinson, D.S., Huges, R.K., Casey, R., Hardy, D. West, S.I. 1999. Co-Oxidation of β -Carotene Catalyzed by Soybean and Recombinant Pea Lipoxygenases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4899-4906.
- Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B., 1998. Uygulamada İndikatör Olarak Kullanılan Bazı Enzimlerin Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Gıda Teknolojisi*, 3(8), 66-71.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 1998. Thermal Stabilities of Peroxidases from Fresh Pinto Beans. *Journal of Food Science*, 63(6), 987-990.
- Young, A.J., Lowe, G.M., 2001. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20-27.
- Zhuang, H., Barth, M.M., 1996. Packaging Design Affects Antioxidant Vitamin Retention and Quality of Broccoli Florets During Postharvest Storage. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 141-150.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Arda SERPEN

Doğum Yeri : Kayseri

Doğum Yılı : 1978

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1992-1995 Ataköy Lisesi – İstanbul

Lisans : 1995-2000 Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü - Ankara

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2000 - Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniv. Gıda Müh. Bölümü