T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBER TOHUMLARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN TESPİTİ

Canan GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

ARALIK 2015

TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışma konumun belirlenmesi, planlanması ve tez haline getirilmesinde en büyük paya sahip olan; danışman hocam **Sayın Doç. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN' e** en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ders ve deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen **Sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN 'e**, Arş**. Gör. Dr. Fatma MATPAN BEKLER'e ve Dr. Ömer ACER 'e** çok teşekkür ederim.

Ayrıca desteklerini ve arkadaşlıklarını sunan sevgili arkadaşlarım Nurten **ASLAN, Yusuf GÜLER, Jale BİÇGİN** ve eğitimim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve hep destekçim olan biricik babam **Mehmet Şah GÜLER' e**, tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

Her zaman bana çalışma azmi veren biricik eşim **Nurettin AFŞİN 'e** de sonsuz teşekkürler.

Canan GÜLER

İÇİNDEKİLER **Sayfa**

TEŞEKKÜR…… I

İÇİNDEKİLER……..... II

ÖZET……..... IV

ABSTRACT……..... VI

ÇİZELGE LİSTESİ……..... VIII

ŞEKİL LİSTESİ……..... IX

KISALTMA VE SİMGELER…… .X

1. GİRİŞ…….1

1.1. Enzimler…….....… .1

1.1.2 Polifenoloksidaz yapısı ve önemi……...… .1

1.1.3. Oksidoredüktazlar……..……..…… 5

1.1.4. Polifenoloksidazın Substratları……...……...…5

1.1.5. Aktivatörleri …….……... 6

1.1.6. Enzim Kinetiği…….…….....… 6

1.1.7. İnhibisyon……..…….....…… 8

1.2. Biberin Anavatanı ve Önemi……..…..……...….. 9

1.2.1. Biberlerin Sınıflandırılması…….……..…….... 10

1.2.2. Dünya ve Türkiye'de Biber Üretimi ve İhracatı…….…….…… 11

1.2.3. Biberde Tohumluk ve Ticari Çeşit Durumu……...…..……...…13

1.3. Yapılan Çalışmalar…….……..…...…..…..…. 14

2. MATERYAL ve METOT……..……..……..... 17

2.1. Materyal…….…….…….…..….. 17

2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler……..…….……...……...….17

2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar…… 18

2.4. Ham Ekstratların Hazırlanışı…… 18

2.5. Polifenoloksidazın Saflaştırılması…… 19

2.6. Ultrafiltrasyon …… 20

2.7. Jel Fitrasyon Kromotografisi…… 20

2.8. Nativ PAGE ile Elektroforetik Analiz…… 21

2.9. Enzimin Moleküler Ağırlığının Hesaplanması…… 22

2.10. Spektrofotometrik Ölçümler…… 22

2.11. Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi…… 22

2.12. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi…… 22

2.13. Termal İnaktivasyon…… 22

2.14. İnhibisyon…… 22

2.15. Protein İçeriği…… 23

2.16. PFO Enziminin Vm ve Km Değerlerinin Tayini…… 23

2.17. Karbonhidratların etkisi…… 23

3. BULGULAR VE TARTIŞMA…… 24

3.1. Enzimin Saflaştırılması …… 24

3.2. Substrat Spesifikliği…… 25

3.3. Optimum pH ve Optimum Sıcaklık…… 27

3.4. Termal inaktivasyon…… 31

3.5. Polifenoloksidazın inhibisyonu…… 31

3.6. Polifenoloksidaz enziminin aktivasyonu…… 32

4. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 34

5. KAYNAKLAR…… 35

6. ÖZGEÇMİŞ……42

ÖZET

BİBER TOHUMLARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Canan GÜLER

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Doç.Dr. Reyhan GÜL GÜVEN)

Diyarbakır, 2015

Enzimler canlı organizmalar için yürüyen reaksiyonlarda düzenleyici görev aldıklarından, yüksek ve büyük bir seçicilikle katalizlediklerinden bazen istenmeyen durumlarda organizmaya negatif etki ederek bozukluklara sebep olmaktadırlar. Bu sebeplerin ortadan kaldırılması ancak o enzimleri karakterize ederek mekanizmalarını belirlemek ve onlara uygun inhibitörlerin belirlenmesi ile mümkün olmaktadır. Son yıllarda in vitro çalışmalarda enzimlerden yararlanma çalışmaları hızla artmaktadır. Günümüzde yapı ve mekanizması bilinen birçok enzim tıp, biyoteknoloji, gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimatik esmerleşme tarım sektörünü, hem ürünlerin bozulması hem de ekonomik açıdan olumsuz yönde etkilemektedir Bu yüzden bu esmerleşmeye sebep olan enzimler üzerinde yapılan çalışmalar bu alanda yarar sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin güneydoğu bölgesinde yetiştirilen yeşil top biber tohumunda saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Bu amaçla biber tohumundan izole edilen enzim daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri, optimum pH ve sıcaklık, sıcaklık inaktivasyonu, inhibitör ve karbonhidratların etkisi ve native jel elektroforezi ile yapılmıştır.

Elde edilen bulgulardan; denenen substratlardan enzim ilgisinin en yüksek olduğu substratın 4-metilkatekol olduğu, termal stabilitesinin yüksek olduğu, sodyum azidin % 64,4 EDTA'nın etki etmediği, SDS'nin % 36,6 ve askorbik asidin ise % 65,7 oranında enzimi inhibe

ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca etkisi araştırılan karbonhidratlardan ribozun enzimi % 34 oranında aktif ettiği, glikozun ve sukrozun ise enzimi inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Enzimin moleküler ağırlığının kDa. olduğu tespit edilmiştir. 4-metilkatekol subsratı kullanıldığında PFO enziminin uygun değer sıcaklığı 40^{O} C, katekol kullanıldığında ise optimum sıcaklık 30ºC olarak tespit edilmiş, optimum pH değerleri ise katekol ve 4-metilkatekol substratları kullanılarak sırasıyla 7 ve 5 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca PFO'nın substrat spesifikliği ve ısı inaktivasyonu incelenmiştir. PPO enziminin uygun değer pH ve sıcaklıkta katekol ve 4-metil katekol substratları için Km ve Vmax değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur. Vmax/ Km değerlerine göre PPO enzimi için en uygun substratın 4-metilkatekol olduğu bulunmuştur. Ayrıca 4-metilkatekol kullanıldığında artan inaktivasyon süresine paralel olarak PFO aktivitesinin bariz bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Biber tohumları, polifenol oksidaz saflaştırılması; substrat spesifikliği; inhibisyon; aktivasyon

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM PEPPER SEED

CANAN GÜLER

Dicle University, Institute of Science, Department of Biology

(MASTER. Thesis / Supervisor: Doç.Dr. REYHAN GÜL GÜVEN)

Diyarbakır 2015

Enzymes, because of taking the duty of regulation at reactions for living organisms and catalysing with high-level and large-scale selectivity, sometimes cause distruptions by affecting the organisms negatively in undesirable situations. To prevent these, it will be only possible that the enzymes should be characterised by identifying the mechanisms and identifiying their appropriate inhibitors. In recent years, beneficial studies on enzymes have increased in vitro. Novadays, a lot of enzymes known for their structures and mechanisms are used different areas such as medical science, biotechnology and nutrition. Enzymatic browning affects the agriculture negatively not only by deteriozing the yield but also economically. So, the studies on these enzymes which cause browning will provide benefit in that area.

The aim of this study is to refine and characterise the PPO enzyme in the seed of green pepper grown in The Southeastern Anatolia. For this purpose, the enzyme insulated from the seed of pepper was partially purified later with ammonium sulfate sedimentation, dialysis, ultrafiltration and gel filtration chromatography. Features of enzyme, including optimum pH and temperature, temperature stability, the effects of inhibitors and carbonhydrates were determined.

The results obtained showed that among the tested substrates, 4-methylcatechol had the highest relation with the enzyme which displayed a higher thermal stability, and sodium azide, EDTA, SDS and asorbic acid inhibited the enzyme by 64,4%, 60,10%, 36,6% and 65,7%, respectively. In addition, among the carbonhydrates investigated, ribose has activated the enzyme at %34, glucose and sucrose have inhibited the enzyme. Using 4-methylcatechol as substrate the optimum temperature of PFO enzyme was found as 40’C, when catechol used the optimum temperature was found as 30’C. The optimum pH values were 5.0 and 7.0 in turn by using catechol and 4-methylcatechol substrates, respectively.

Besides these, PPO’s specificity and the temperature stability were studied. Km and Vmax values for PPO enzyme at optimum pH and temperature for catechol and 4-methylcatechol have been found by the Linewear-Burk Approach. According to Vmax/Km values, the most appropriate substrate was 4-methylcatechol. In addition, it has been observed that when the temperature inactivation time increases the PFO activity decreases dramatically in parallel.

Key words: Pepper seed, polyphenol oxidase purification, substrate specifity, inhibition, activation.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	2007 yılı Dünya ve diğer ülkelerin biber üretimi…….	12
Çizelge 1.2.	2004-2008 yılları Türkiye biber üretimi……	13
Çizelge 2.1.	Kullanılan cihazlar……	18
Çizelge 3.1.	Polifenol aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş veriler…….	27
Çizelge 3.2.	İnhibitörlerin Polifenol Oksidaz Enzimine Etkileri ……	32
Çizelge 3.3.	Karbonhidratların Polifenol Oksidaz Enzimine Etkileri	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No **Sayfa**

Şekil 1.1. Polifenol oksidaz enziminin substratla reaksiyonu……..……. 2

Şekil 1.2. Esmerleşmiş meyve…… 4

Şekil 1.3. Polifenol oksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı……... 5

Şekil 1.4. Michaelis-Menten grafiği…… 7

Şekil 1.5. Deneyde kullanılan biberler…….. 11

Şekil 2.1. Biber tohumları…… 17

Şekil 2.2. Diyaliz edilen enzim çözeltileri…….. 19

Şekil 2.3. Ultrafiltrasyon düzeneği…….. 20

Şekil 2.4. Kuvartz küvetteki ölçümler…… 21

Şekil 3.1. Fraksiyonlara karşı absorbans ve PFO aktiviteleri…… 24

Şekil 3.2. Katekol aktivitesi…… 26

Şekil 3.3. Metilkatekol aktivitesi …….. 26

Şekil 3.4. Katekol ortamında optimum pH…….. 28

Şekil 3.5. 4-Metil katekol ortamında optimum pH…..…….. 29

Şekil 3.6. Metil katekol ortamında optimum sıcaklık…...……. 29

Şekil 3.7. Katekol ortamında optimum sıcaklık…… 30

Şekil 3.8. Termal inaktivasyon…… 31

KISALTMA VE SİMGELER

APS :	Amonyum Persülfat
BSA :	Bovine Serum Albümin
DOPA :	Dihidroksi Fenil Alanin
EDTA :	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ND-PAGE :	Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
PAGE :	Poliakrilamid Jel Elektroforez
PPO :	Polifenol Oksidaz
SDS :	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE :	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TEMED :	Tetra Etil Metilen Diamin
Km:	Michaelis-Menten sabiti
Vmaks:	Maksimum Hız

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozomlar) küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil ederler. (Nelson ve Cox, 2005

Organizmadaki organik maddelerin yapımı, yıkımı, solunum ve kas hareketleri gibi olaylar enzimlerin yardımıyla gerçekleşir. Enzimlerin diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlüğü vardır. Bunlardan birisi de belirli kimyasal reaksiyonlara karsı spesifik olmalarıdır. Biyokimyasal katalizörler olan enzimler, reaksiyon hızını 1020 kat kadar arttırırken, diğer katalizörler 102-103 kat kadar arttırabilmektedir.

Enzimler gıda ve kimya endüstrisinde; tıp, eczacılık, ziraat, gibi alanlarda teşhis, tedavi ve biyolojik savaş gibi amaçlarla kullanılırlar. (Park ve Hoffmann, 1993)

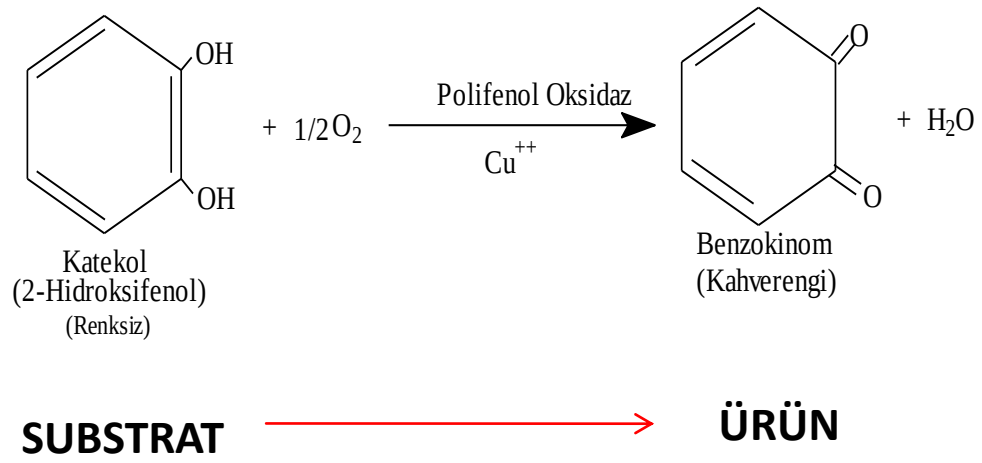
1.1.2 Polifenoloksidaz Yapısı ve Önemi

Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişmeleri ortaya çıkmaktadır. Bu renk değişmelerine "esmerleşme" denir. Birçok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişmeleri belli bir seviyeye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Enzimatik esmerleşme denilen bu reaksiyon, hem polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi ve fenolik madde miktarı ile ilgilidir. Bu renk değişimleri ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve besin değerini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi amacı ile PPO enziminin özellikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir (Önez, 2006).

Gıda sektörü genellikle bu istenilmeyen durumları ortadan kaldırmak için, PFO enziminin inhibisyonu üzerinde çalışmaktadır. Ancak çay, kahve, kakao kuru üzüm, kuru erik, kuru incir gibi ürünlerin görünüm ve lezzet bakımından istenilen duruma gelebilmesi için tirozinaz enziminin aktif olması gereklidir. Bu gibi durumlarda ise

yukarıdaki işlemden farklı olarak enzimin inhibe olmaması gereklidir (Marshall ve ark.2000).

Polifenoloksidaz (E.C.1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksidoredüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir (Turan, 2005) Bitki ve mantarlardaki geniş substrat spesifikligine bağlı olarak tirozinaz, fenolaz, katekoloksidaz, katekolaz, monofenol oksidaz, *o*-difenoloksidaz ve ortofenolaz gibi isimlerle de bilinmektedir (Öztan, 2007). PFO enzimi oligomerik yapıya sahip bir enzimdir. Bu yapıyı oluşturan alt birimlerin sayısı enzim kaynağına göre farklılık gösterir. Tirozinazın molekül kütlesi 30000 D dolaylarında olan ve her biri birer bakır atomu içeren özdeş 4 alt kısımdan oluştuğu ileri sürülmektedir. (Dec ve Bollog,1995).



Şekil 1.1. Polifenol oksidaz enziminin substratla reaksiyonu

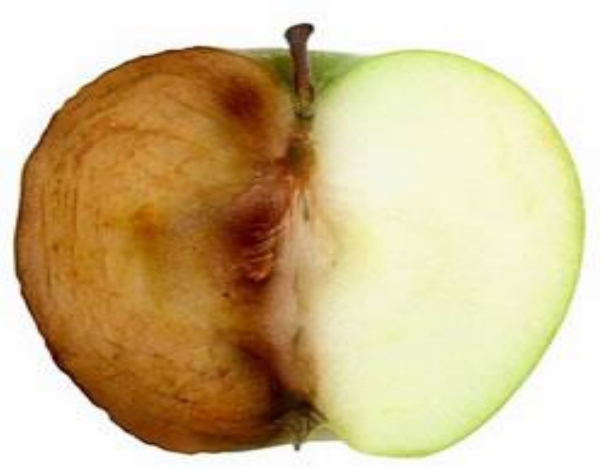
Polifenol oksidaz enzimleri iki tür reaksiyonu katalizler. Bunlardan birincisi moleküler oksijen kullanarak monofenolik bileşiklerin difenollere hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi) ve ikincisi o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) dur. Oluşan o-kinonlar sulu ortamda, kararma reaksiyonlarına yol açan koyu renkli polimerik maddelere dönüşürler. Meydana gelen kinonlar koyu renkli pigmentlere kondenze olabileceği gibi bazı proteinlerin yapısına da bağlanabilir.

(Bais ve ark. 2002) Son yıllarda kimyacılar ve besin teknologlarının bu enzime olan ilgileri artmış ve çeşitli kaynaklardan enzimin izolosyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. (Ziyan, 1998).

Polifenol oksidaz bitkiler, bakteriler ve memeliler dâhil olmak üzere çok geniş bir canlı gruplarında bulunmaktadır. (Yahşi ve ark. 2005). Polifenoloksidaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. PFO ilk kez Schoenbein tarafından 1856 yılında yemeklik mantarda bulunmuştur (Öztan 2007). Ayrıca mikroorganizmalarda ve özellikle mantar ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunur. PFO enzimine kabuklu deniz hayvanlarının bazılarında da (beyaz karides, küçük karides) rastlanılmıştır (Doğan, 2002).

Polifenoloksidaz ilk olarak mantarlarda keşfedilen yaygın bir enzimdir. Bunlar bitkideki plastidlerin ve kloraplastların içinde bulunmasına rağmen olgunlaşmış bitkinin stoplazmasında serbest olarak bulunur. Bu enzim, bitkinin mikrobiyal ve viral enfeksiyonlara, kötü iklim koşullarına karsı direnci açısından önemli bir role sahiptir (Turan, 2005) Bitkilerde meydana gelen mekanik zararlara ve virüs, bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karsı bitkinin direnç göstermesinde etkili bir role sahiptir. Pancar kurdu, domates kurdu, yeşil şeftali aphidi gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı yaralanmalardan sonra ekspire olan PFO, böceklere karsı bir savunma oluşturmaktadır (Thipyapong ve ark. 2004). Ayrıca PFO, böceklerde dış iskeletin gelişmesine yardımcı olurken sentezlenen melanin sayesinde mikroorganizmaları hapsederek koruma sağlamaktadır. İnsanlarda ise bu enzim cildin, saçın ve gözün pigmentasyonundan sorumludur (Sherman ve ark. 1991). Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir. Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişmeleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine "esmerleşme" denir. Birçok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişmeleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Enzimatik esmerleşme denilen bu reaksiyon, hem polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi, hem de fenolik madde konsantrasyonu ile ilgilidir. PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler, ürünün sadece renginde bozulmaya neden

olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir (ÖNEZ, 2006).



Şekil 1.2. Esmerleşmiş meyve

PFO enzimi kromozom 11 üzerindeki PFO geni tarafından üretilir. Bu genin mutasyonu bir çeşit albinizme neden olur. Çünkü değişen gen tarafından üretilen enzimde doğru çalışmaz. Albinizmli insanların gözlerinde, derilerinde ve saçlarında ya çok az pigment bulunur, ya da hiç bulunmaz. (Bazen sadece gözlerde de bulunabilir.) Bu yüzden derileri, saç – tüy – kıl gibi keratin yapıları beyaz renkli ve gözleri kırmızıdır. Beyaz renkli hayvanların albino olup olmadıkları, göz renklerine bakılarak anlaşılır. Ayrıca kanın pıhtılaşmaması, duyma bozukluğu, zekâ geriliği gibi problemleri olan birçok albinizm türleri de mevcuttur. (Dec ve Bollog, 1995).

Pek çok bitkisel kaynaktan polifenol oksidaz enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış; yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır: muz (Galeazzi ve ark. 1981), kuşburnu (Şakiroğlu ve ark. 1996), patates (Cho ve Ahn, 1998), yerelması (Ziyan ve Pekyardımcı, 2001), fasulye (Beena ve Gowda, 2000), ayçiçeği (Singh ve ark.1999).

1.1.3. Oksidoredüktazlar

Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır. Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. PFO enzimi oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir.

2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

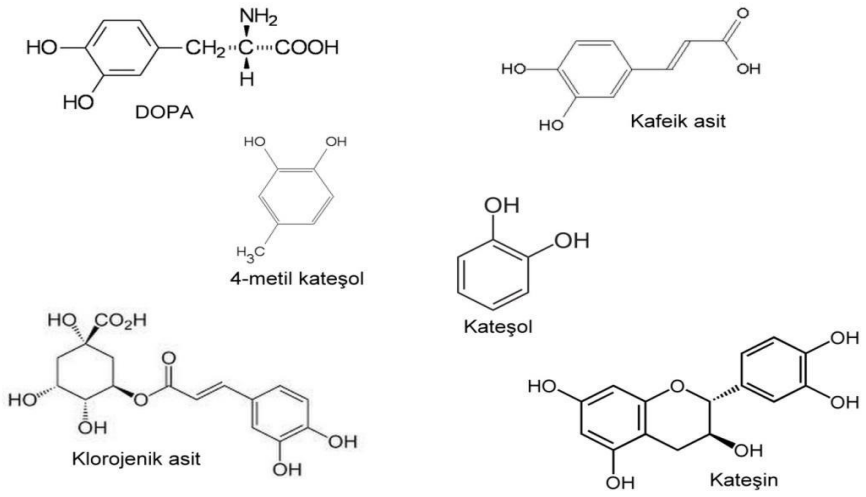
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir veya tam tersi bazı grupların çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar: Substratın izomerinin oluştuğu reaksiyonları katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir.

6. Ligazlar (Sentazlar): Bağ oluşumunun gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (1). (Tüzün, 1997).

1.1.4. Polifenoloksidazın Substratları

Meyve ve sebzeler çeşitli fenolik maddeler içermektedir. Bunlardan bazıları polifenoloksidaz enziminin de substratıdırlar. Genellikle flavonoid tipi fenollerle, basit fenoller yiyeceklerimizde bulunurlar. Bitkilerde doğal olarak bulunan flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, antosiyaninler, flavonoller, lökoantosiyanidinler, sinnamik asit türevleri ve basit fenoller besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler (Dogan, 2002).



Şekil 1. 3. Polifenol oksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı

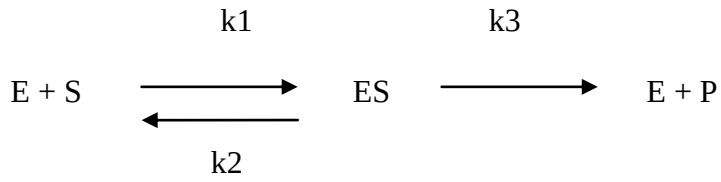
1.1.5 Aktivatörleri

Aktivatörlerin, enzimin içerdiği monomerlerin Cu2+ iyonu içeren oligomer oluşturacak şekilde etki gösterdiği ve enzimin aktivite göstermesi için gerekli polimerizasyonu sağladığı düşünülmektedir.

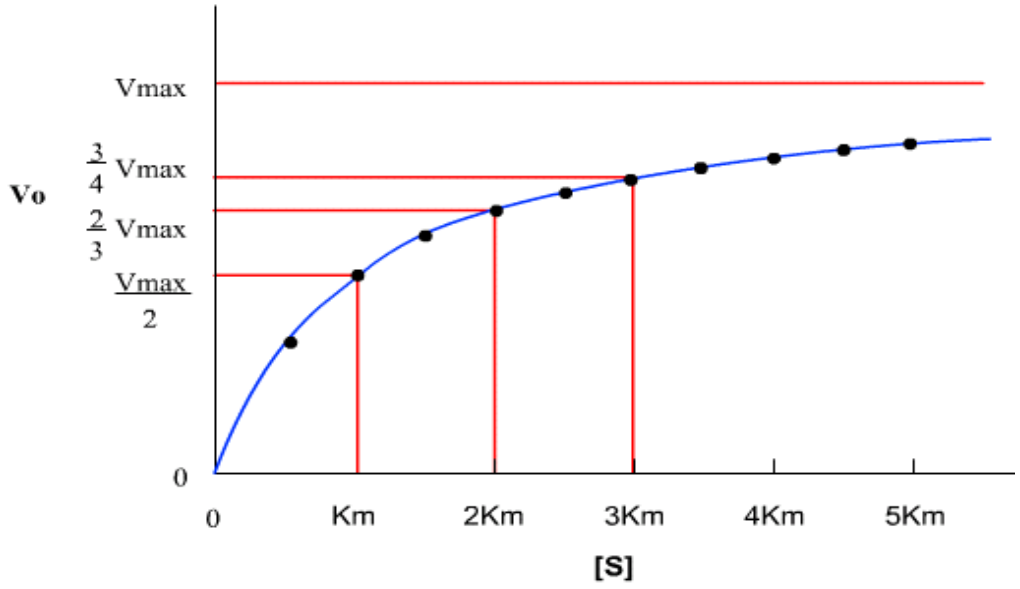
1.1.6. Enzim Kinetiği

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir. Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur. Michaelis-Menten grafiği hiperbol olduğu için bağıntı doğru denklemi elde etmek amacıyla çeşitli şekillere dönüştürülür. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemidir. Lineweaver-Burk denklemi Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir "Enzim-Substrat Kompleksi" oluşturur, daha sonra bu kompleks, ürün ve enzime dönüşür.

Enzim kinetiğinin mekanizması aşağıdaki gibidir:



Burada ES kompleksi, E ve S'den k1 hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise k2 hızında geri reaksiyonla ve k3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşınca "Kararlı Hal ilkesine" göre ES'nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur yani derişimi değişmez (Nelson ve Cox, 2005).



Sekil 1.4. Michaelis-Menten grafigi

Bu kimyasal reaksiyon için Michaelis-Menten denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

$$V0 = \frac{Vmax[S]}{[S] + Km}$$

Burada Vmax, hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına (Vmax/2) karşılık gelen substrat derişimi, KM (Michaelis –Menten sabiti) olarak belirtilir. Vmax ve KM, bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli kinetik sabitlerdir.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebiliniz.

Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemidir.

$$\frac{1}{Vo} = \frac{KM}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

Bu denkleme göre ordinatta 1/V0, apsiste 1/[S] değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise KM/Vmax'ı verir. (Şekil 1.4). (Gonzales ve ark. 1999)

1.1.7. İnhibisyon

Enzim inhibisyonu, enzimin katalitik yada düzenleyici merkezleri olarak tanımlanan aktif bölgelerine spesifik olarak bağlanan inhibitörler ile enzim aktivitesinin azaltılması olarak tanımlanabilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ve iyonlardır. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ya da dönüşümsüz olabilir.

Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Birçok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzeyen maddelerden oluşur. Bunlar substratla karşılaştığında ya hiç reaksiyon vermezler ya da çok yavaş reaksiyon verirler. (Voet ve ark. 2003). Voet, D., Voet, J.G., Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc. US, (2003). Bitkilerdeki kararma sadece enzimin inaktif olmasıyla değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli iki substrattan birinin (O2 veya fenolik bileşik) uzaklaştırılmasıyla da önlenebilir. Meyve ve sebzelerde çoğu kez enzimatik reaksiyonlara bağlı oluşan kararma istenmeyen bir durumdur. PFO enziminin kararmaya sebep olacak oksidasyonları katalizlemesini önlemek amacıyla PFO enzimi inhibitörleri hakkında detaylı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar halen de devam etmektedir. (Vámos – Vigyázó, 1981)

1.2. Biberin Anavatanı ve Önemi

Biberin anavatanının Amerika'nın tropik ve subtropik ülkeleri olduğunu bildiren (Şalk ve ark. 2008). sekonder gen merkezinin ise Guatemala olduğunu, *C. chinense* ve *C. frutescens*'in Amazon havzası, *C. pendulum ve C. pupescens*'in Peru ve Bolivya primer gen merkezi olduğunu, *C. anispi nemuum* ve *C. frutescens*'in Meksika'dan itibaren tüm Amerika ve Carib adalarında yaygın olarak bulunduğunu ve Güney Amerika'da en yaygın olarak yetiştirilen türün *C. chinense* olduğunu belirtmektedir. Yine aynı araştırıcılar Peru'da 2000 yıllık biber kalıntılarına rastlandığını, biberin Amerika'nın keşfinden sonra Christopher Columbus tarafından önce İspanya'ya getirildiğini ve 16. yy. da Avrupa'da yayılmaya başladığını, biber yetiştiriciliğinin önce Akdeniz havzasında yayılarak, buradan 1548 yılında İngiltere'ye geçtiğini ve 16. yy. sonlarından itibaren de Orta Avrupa'da yetiştirilmeye başlandığını, daha sonra Portekizlilerin Capsicum'u Hindistan'a götürdüğünü ve buradan da Çin'e geçtiğini belirtmişlerdir. Günümüzde biberin, soğuk bölgeler hariç dünyanın her yerinde yaygın olarak yetiştirildiğini, *Capsicum anispi nemuum'*un Dünya üzerinde yaygın olarak yetiştirilen biber türü olduğunu, diğer Capsicum türlerinin kendi anavatanlarında bulunduğunu veya başka yerlerde amatör amaçlarla yetiştirildiğini bildirmişlerdir. Biber sofralarımızda taze olarak, kızartılarak, etli ve zeytinyağlı yemekleri yapılarak tüketilir.

Bunun yanında biber salçası ve turşusu yapılır. Bölgelere göre değişik şekillerde toz biberler hazırlanarak yemeklerde kullanılır. Bunların dışında tatlı, acı ve dolmalık biberler kurutularak kışın değişik şekillerde yemeklik olarak değerlendirilir. Ayrıca özellikle acı biberlerden elde edilen biber suyu sanayide geniş ölçüde kullanılmaktadır. (Vural ve ark. 2000). Biber sağlıklı bir yaşam için gerekli olan bir sebzedir, kalp ve damar hastalıklarına karşı mutlaka tüketilmelidir. İhtiva ettiği A, B, C ve E vitaminleri ile renk maddeleri birer antioksidan özelliğe sahiptir. Bibere acılık veren madde capsaicin ($C_{18}H_{27}O_3N$)'dir. Capsaicin mide ve barsak hareketlerini arttırır, hazmı kolaylaştırır, emilimi teşvik eder ve peristaltisisi hızlandırır (Şalk ve ark. 2008).

1.2.1. Biberlerin Sınıflandırılması

Şalk ve ark. (2008) , değişik meyve özelliklerine bakılarak biberlerin aşağıdaki şekillerde sınıflandırılabileceklerini bildirmişlerdir.

a) Meyve şekillerine göre: Yuvarlak meyveli, konik meyveli ve dolmalık çeşitler,

b) Meyve renklerine göre: Yeşil, sarı, kırmızı veya diğer renklerde,

c) Meyve iriliklerine göre: Küçük, orta iri, iri ve çok iri meyveli,

d) Kullanma amaçlarına göre: Sofralık, yemeklik, dolmalık, sanayi tipi salçalık ve pul biber çeşitleri olarak (Vural ve ark.2000).

Çalışmamızda yeşil top biber kullanıldı (Şekil: 1.5).



Şekil:1.5. Deneyde kullanılan biberler

1.2.2. Dünya ve Türkiye'de Biber Üretimi ve İhracatı

Türkiye dünyanın önemli biber üreticisi ülkelerinden biridir. Çizelge 1.1.'de izlendiği gibi Dünyada üretilen 27,1 milyon ton biberin yaklaşık % 6,5'i ülkemizde üretilmektedir. Türkiye biber üreticisi ülkeler arasında Çin ve Meksika'dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Bunu Endonezya, İspanya, ABD, Nijerya ve diğer ülkeler takip etmektedir.

Çizelge 1.1. 2007 yılı Dünya ve diğer ülkelerin biber üretimi (Anonim, 2009a).

Ülkeler	Üretim (ton)	Oran (%)
Çin	**14,026,272**	**51.7**
Meksika	**1,890,428**	**7.0**
Türkiye	**1,759,224**	**6.5**
Endonezya	**1,128,790**	**4.2**
İspanya	**1,059,500**	**3.9**
ABD	**855,870**	**3.2**
Nijerya	**723,000**	**2.7**
Diğerleri	5,686,624	21.0
Dünya	**27,129,708**	**100**

Türkiye'nin 2004-2008 yılları arasındaki biber üretiminin seyri Çizelge 1.2'de görülmektedir. Buna göre ülkemizin yıllık toplam biber üretimi 1.8 milyon ton civarında olup en çok sivri biber üretimi yapılmaktadır.

Çizelge 1.2. 2004-2008 yılları Türkiye biber üretimi (Anonim, 2009b).

Yıllar	Salçalık	Dolmalık	Sivri	Toplam
2004	**615,000**	**375,000**	**710,000**	**1,700,000**
2005	**685,000**	**400,000**	**744,000**	**1,829,000**
2006	**673,981**	**392,617**	**775,577**	**1,842,175**
2007	**674,788**	**357,246**	**727,190**	**1,759,224**
2008	**690,531**	**371,050**	**734,596**	**1,796,177**

Akdeniz ihracatçılar Birliği 2009 yılı verilerine göre, Türkiye'nin biber ihracatı 2007 yılında 60,069,603 kg olup 70.212.810 $ gelir elde edilmiştir. 2008 yılında ise 78,998,680 kg biber ihraç edilerek 78.264.353 $ gelir elde edilmiştir. 2008 yılında bir önceki yıla göre ihraç edilen biber miktarı % 32 oranında artış göstermiştir (Anonim, 2009c).

1.2.3. Biberde Tohumluk ve Ticari Çeşit Durumu

Biber türünde 2008 yılında standart 49,835 kg ve hibrit 1,058.20 kg olmak üzere toplam 50,893.20 kg tohum üretilmiştir. 2008 yılı biber tohumluk ithalatı 2,946.52 kg standart ve 753.78 kg hibrit olmak üzere toplam 3,700.30 kg olarak gerçekleşmiştir (Anonim, 2009e). Buna göre 2008 yılında standart biber tohumluklarının %94'ü, hibrit biber tohumluklarının %58'i olmak üzere toplam biber tohumluğunun % 93'ü yurtiçinde üretilmiştir. Ülkemizde kamu araştırma enstitüleri tarafından geliştirilen 15 standart biber çeşidinin orijinal kademedeki tohumlukları her yıl tohum üreticisi özel firmaların sertifikalı tohumluk üretimi yapabilmeleri için belli miktarlarda üretilmektedir. Atatürk BKMAE (Yalova) tarafından 'Yalova Çarliston-341, Yalova

çorbacı-12, Yalova yağlık-28, Yalova tatlı sivri, Kandil dolma ve Sürmeli biberi çeşitleri; Anadolu TAE (Eskişehir) tarafından 11-B-14 ve Ilıca-256; BATEM (Antalya) tarafından Serademre-8 (sivri) ve Doru 16 (dolmalık); ETAE (Menemen) tarafından Bağcı Çarliston, Ege acı sivri, Ege-91 ve Menderes; Kahramanmaraş TAE tarafından da Sena çeşitlerinin orijinal kademe tohumlukları üretilmektedir.

2009 yılında, Kahramanmaraş TAE tarafından 750 kg'ı 'K.Maraş 1' çeşidi olmak üzere, kamu araştırma kuruluşlarınca toplam 820.3 kg orijinal kademede biber tohumu üretimi programa alınmıştır (Anonim, 2009e). Ticari sebze kayıt listesinde 2009 yılı itibariyle 82 sivri, 37 çarliston, 51 dolma, 32 kapya ve 2 acı Meksika biberi olmak üzere toplam 204 biber çeşidi bulunmaktadır (Anonim, 2009).

1.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR:

Ziyan ve Pekyardımcı (2003) enginar kabuk ve meyve etindeki PFO'ı ekstrakte etmişler ve $(NH_4)_2SO_4$ çökeltmesi ve jel filtrasyonu vasıtasıyla saflaştırmışlar. 50 mM katekol substrat olarak kullanıldığında optimum pH değerleri, kabuk PFO'su için 7.5, etli kısım PFO'su için 8.0 bulunmuştur. Optimum sıcaklık, kabuk ve etli kısım PFO'su için sırayla 25°C ve 30°C bulunmuştur. Yılmaz (2007) İspir şeker fasulyesinden, polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ile izole ederek bazı biyokimyasal özelliklerini incelemiştir. Km değeri kateşol, kateşin ve klorogenik asit için sırasıyla 2.4875, 1.3154, 2.2487 M, Vmax değerleri ise aynı substratlar için 3.148, 0.6130, 0.5039 EÜ/ml.dk. olarak bulunmuştur. Wada, vd. (1993) mantar tirozinazını Diaion WK-20 isimli zayıf asidik katyon değiştirici reçineye iyonik bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir.(Wada ve ark. 1993). Rapeanu ve ark. (2006) Güney Afrika'da yetişen Viktorya üzümlerinden ekstrakte edilen PFO enziminin biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. McIlvaine tamponu içindeki 10 mM kateşol substatı ile enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla, pH 5 ve 25 °C bulunmuştur. Km ve Vmaks değerleri sırasıyla 52.6±0.00436 mM ve 653± 24.0 OD400 nm. dak-1'dır (RAPEANU ve ark. 2006).

Astarcı (2003) termofilik bir küf olan *Thermomyces lanigunosus*'un hücre dışı polifenol oksidaz üretimini incelenmiş, Enzim için en uygun sıcaklık ve pH değerleri sırası ile

60°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir. Km ve Vmax değerleri sırası ile 5 mg /ml ve 38 U/ml bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığının 29 kDa olarak bulmuştur. (Astarcı, 2003).

Yağar (2004) çalışmasında, pH 7'de, 0.1 M fosfat tamponu kullanarak kereviz köklerinden PFO ekstrakte etmiştir. Substrat spesifikliği için kateşol, pirogallol, L-DOPA, p-kresol, resorsinol ve tirozin kullanılarak yapılmıştır. Pirogallol, kateşol ve L-DOPA için Km değerleri 25 °C'de sırasıyla; 4.5, 8.3 ve 6.2 mM bulunmuştur. En yüksek Vmaks/Km değeri pirogallol substrat olarak kullanıldığında bulunmuştur. Optimum pH değerleri kateşol ve L-DOPA ile optimum pH 7, pirogallol için 7.5'tir. Maksimum PFO aktivitesi için optimum sıcaklıklar; pirogallol için 25 °C, katekol için 40 °C ve L-DOPA için 45 °C bulunmuştur. (Yağar, 2004).

Beşel (2003), Mantardan (*Agaricus bisporus*) elde edilen polifenoloksidaz enzimini araştırmıştır. %8'lik TX-114 kullanıldığı zaman yaklaşık 5 kat saflaştırma elde edilmiştir. (Beşel, 2003).

Gülçin ve arkadaşları (2005), ısırgan otunda (*Urtica dioica L.*) PFO enzimini $(NH_4)_2SO_2$ ile çökeltme, diyaliz ve CM Sephadex iyon değişim kromotografisi aracılığıyla saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 4.5 ve 30°C olduğu ve Km ile Vmax değerlerinin substrat olarak L-tirosin kullanıldığında sırasıyla 7.90x10–4 mM ve 11290EU/ml olduğu bulunmuştur. (Gülçin ve ark.2005).

Cai ve ark.(2015) lotus tohumlarından polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfat ve afinite kromatografisi ile saflaştırmışlar. Optimum sıcaklığı 20^o C, optimum Ph' yı 7 olaak tespit etmişler. Molekül ağırlığı 38.6 kDa., Katekol subsratı için Km 6.04 mM , Vmax'ı ise 416,67 U olarak bulmuşlar.

Cheema ve sommerhalter (2015),Ataulfo mangosunun PFO enziminin kullanılan 3 tane subsrata göre optimum Ph sının 5.4- 6.4 arasında tespit etmişler ve enzimin oldukça termostabil olduğunu bulmuşlar.

Kim ve Kim (2013) , Jinseng köklerinden polifenol oksidaz enzimini karboksimetil sefaroz ve fenil sefaroz kromatografisini kullanarak saflaştırmışlar. Moleküler ağırlığını 40kDa. olduğunu ve en iyi subsratın ise Pyrogallol olduğunu tespit etmişler.

Şakiroğlu ve ark. (2013), İspir fasulyesinden PFO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırmışlar ve enzimin katekol için optimum pH'ını 5,5 sıcaklığını 40^0 C olarak bulmuşlar. Katekin ve klorogenik substratları için de optimum pH ve sıcaklıkları bulmuşlar. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda ise en iyi subsratı katekol olarak tespit etmişler.

Güray, M.Z. (2009), çalışmada, polifenol oksidazın jeotermal bir bölgeden izole edilmiş olan termofilik Bacillus suşundan kısmi olarak saflaştırmış ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Katekol substratı kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları için enzimin pH 7.0 ve 60ºC' de en yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Enzim, 30 ve 60ºC arası sıcaklıklarda stabil olduğunu ve pH 5-8 aralığında aktivitesinin %80' inden fazlasını koruduğunu belirtmiştir.

Xiao (2014), .*Lonicera confusa*' dan PFO enzimini eksrakte etmiş ve saflaştırmıştır. Enzimi 20.27 kat saflaştırmıştır. Moleküler ağırlığını 28.8 kDa. bulmuştur.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada Diyarbakır‘ daki yerel marketten satın alınan 16 gr yeşil top biber tohumu kullanıldı.



Şekil: 2.1.Biber tohumları

2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan katekol, askorbik asit Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. PEG (polietilen glikol), amonyum sülfat, $NaH_2PO,_4Na_2HPO_4$, 4-metilkatekol, sukroz, glukoz, riboz, akrilamid / bis akrilamid, Sodyum azid, SDS, EDTA, Sephadex G-100 jel filtratsyon resin ve serum albumin Sigma-Aldrich (St. Louis, Amerika) firmasından temin edilmiştir.

2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.1. Kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	FİRMA	MODEL
UV-VİSSPEKTROFOTOMETRE	THERMO SCİENTİFİC	GENESYS 10S
VORTEKS	GRAND -BİO	PV-1
SU BANYOSU	MEMMERT	
HASSAS TERAZİ	DENVER	INSTRUMENT
PH METRE	HANNA	
MAGNETİK KARIŞTIRICI	DROGAN LAB	MS-HS
EV TİPİ BLENDER	ARZUM	
SANTRİFÜJ	NÜVE	NF-200
SPEKTROFOTOMETRE	VARIAN	VİSİBLE
FRAKSİYON TOPLAYICI	BıO-RAD	MODEL 2110
PERİSTALTİK POMPA	BIO -RAD	NO FROST
DERİN DONDURUCU	VESTEL – ARÇELİK	NO FROST

2.4. Ham Ekstratların Hazırlanışı

Biber tohumları biber bitkisinden ayrıştırıldıktan 16 g tohum örneği 0,176 g askorbik asit ve 4 g polietilenglikol içeren 100 mL pH'sı 6,5 olan fosfat tamponunda 2 dakika süreyle bir blender ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü, santrifüj tüplerine alındı ve tüplerin ağırlıkları hassas bir terazide eşitlenerek 15000 x g'de 10 dakika süreyle +4 0C'de santrifüj edildi.

Oluşturulan enzimin PFO aktivitesine iyon etkisini engellemek için tampon konsantrasyonu 0,1 M seçildi. Santrifüj sonrası üst kısımları süzülerek elde edilen süpernatant kısmi saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu.

2.5. Polifenoloksidazın Saflaştırılması

Hazırlamış olduğumuz süpernatant amonyum sülfat ile % 60' lık doygunluğa getirildi. Bunun için kullanılması gereken amonyum sülfat miktarı belirlendi. Hazırladığımız katı amonyum sülfat, magnetik karıştırıcıda, buz banyosu üzerinde olan ham ekstrakta yavaş yavaş eklendi. Süspansiyon doygunluğa geldiğinde 20 dakika boyunca +4 ^{0}C'de 15000 x g'de santrifüj edildi. Oluşan çökelek pH 'sı 6.5 olan 0.1 M fosfat tamponunda çözünebildiği en az miktarında çözüldü [9]. (Sakiroglu, 1994)

Elde ettiğimiz enzim çözeltisi 0.1 M fosfat tamponunda 24 saat boyunca diyaliz edildi. Şekil: 2.2. Bu süre içinde diyaliz tamponu 2 kez değiştirildi. Diyaliz magnetik karıştırıcıda +4 ^{0}C'de buzdolabında gerçekleştirildi.



Şekil:2.2. Diyaliz edilen enzim çözeltisi

2.6. Ultrafiltrasyon:

Ultrafiltrasyon için Amicon Ultra 15 (Millipore) ultrafiltrasyon santrifüj tüpleri kullanılmıştır. Santrifüj koşulları +4 ºC, 4000 g'de (6200 rpm) 40 dakikadır. Santrifüj sonrasında filtrenin üzerinde kalan ve yüksek molekül ağırlıklara sahip proteinleri içeren kısımlar toplanmıştır. Toplanan ultrafiltrasyon ürünü kromatografi aşamasına geçilmeden önce, olası partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla +4 ºC, 14000 rpm, 10 dakika koşullarında santrifüjlenmiştir. (Gül Güven,1998).



Şekil:2.3. Ultrafiltrasyon düzeneği

2.7. Jel Fitrasyon Kromotografisi

% 60'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu PFO aktivitesi görülen süpernatant diyaliz edildikten sonra1,5 mL/min akış oranıyla Sephadex G-75 kolonundan (1.2 x 70 cm)geçirildi. Elüsyon işlemi 0,1 M fosfat tamponu (pH=6,5) ile yapıldı. 3'er ml'lik tüpler halinde toplanan elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein analizleri yapıldı. Protein olan tüplerdeki enzim aktiviteleri 420 nm'de belirlendi

2.8. Spektrofotometrik Ölçümler

Reaksiyon 1 cm ışık olan 3 mL hacimli kuvartz küvet içinde, GENESYS 10 S UV-Vis spectrometer (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. PFO'nun substrat spesifikligini belirlemek için katekol, 4-metilkatekol, substratları kullanıldı. Analiz karışımı genel olarak 2,8 mL fosfat tamponu; 0,1 mL substrat ve 0,1 mL enzim karışımından meydana geldi. Enzim çözeltisi reaksiyon karışımına en son ve hızlı bir şekilde ilave edildi. Enzim aktifliği birimi olarak 420 nm'de bir dakikada absorbansta 0,001 birimlik değişime neden olan enzim miktarı alındı ve bu ünite (I.U) olarak tanımlandı. 1 dakika sonra 420 nm de absorbans okundu .



Şekil: 2.4. Kuvartz küvetteki ölçümler

2.9. Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'yı bulabilmek için katekol ve 4-metilcatechol substratları kullanılarak 3-10 pH aralıklarında aktiviteler ölçülmüştür. pH 3-5 için 0.1 M sitrat tamponu, pH 6-10 için 0.1 M fosfat tamponu kullanılmıştır. PFO aktivitesi farklı tamponlarda, standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri optimum pH olarak belirlenmiş ve diğer deneyler bu pH'da gerçekleştirilmiştir.

2.10. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Biber tohumundan elde edilen PFO için substrat olarak katekol, 4-metilkatekol kullanılarak optimum sıcaklık çalışması yapıldı. 20-90°C'ler arasındaki farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Substrat ve tamponların sıcaklıkları termostatlı bir su banyosunda ayarlandı. Enzim en son olarak eklenip hemen ölçüm alındı. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

2.11. Termal İnaktivasyon

Biber tohumundan elde edilen PFO enziminin termal inaktivasyonunu belirlemek için enzim, 55ºC'de (5, 10, ve15 dk), 65ºC'de (5, 10 ve 15 dk) ,75ºC'de (5, 10,15 dk) ve 80ºC (5, 10 ve 15 dk) ısıtıldıktan sonra enzim aktiviteleri belirlenmiştir Bu çalışma için deney tüplerine koyulan enzim çözeltisi sabit zaman aralıklarında çeşitli sıcaklıklarda inkübe edildi ve buz banyosunda soğutuldu. 2,8 mL tampon çözeltisi, 0,1 mL substrat ve 0,1 mL enzim çözeltisi kullanılarak aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler iki kez tekrarlandı.

2.12. İnhibisyon

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için 0,5 ve 2 mM konsantrasyonlarda 3 farklı inhibitör (EDTA, SDS, sodyum asid, askorbik asit) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. İnhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

İnhibisyon (%) = [(Ao – Ai)/Ao)]*100

(Ao: İnhibitör kullanmadan belirlenen enzim aktivitesi)

(Ai: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi.)

2.13. Protein İçeriği

Biber tohumu ekstraktının protein içeriği belirlenirken Lowry Metodu kullanıldı (Lowry, 1951). Kalibrasyon için bovin serum albumin kullanılmıştır. Konsantrasyonu bilinen standart protein çözeltisi (1 mg/mL BSA) hazırlandı. Konsantrasyonunu bilmediğimiz çözeltideki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Artan konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve 50 µL enzim çözeltisi alınarak tüplerin hepsine 5 mL alkalin çözeltisi eklendi ve 15 dk 40°C'de bekletildikten sonra tüplerin hepsine 1:1 oranında seyreltilmiş 500 µL Folin reaktifi (FCR) eklendi ve 30 dk. karanlıkta bekletildikten sonra 600 mm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

2.14. PFO Enziminin Vm ve Km Değerlerinin Tayini

Michealis sabiti (Km) ve maksimum hız (Vmaks)'ı belirlemek için substrat olarak çeşitli konsantrasyonlarda katekol (1-15 mM), 4-metil katekol (1-18 mM) çözeltileri kullanarak enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Enzimin Km ve Vmaks değerleri Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır.

2.15. Karbonhidratların Etkisi

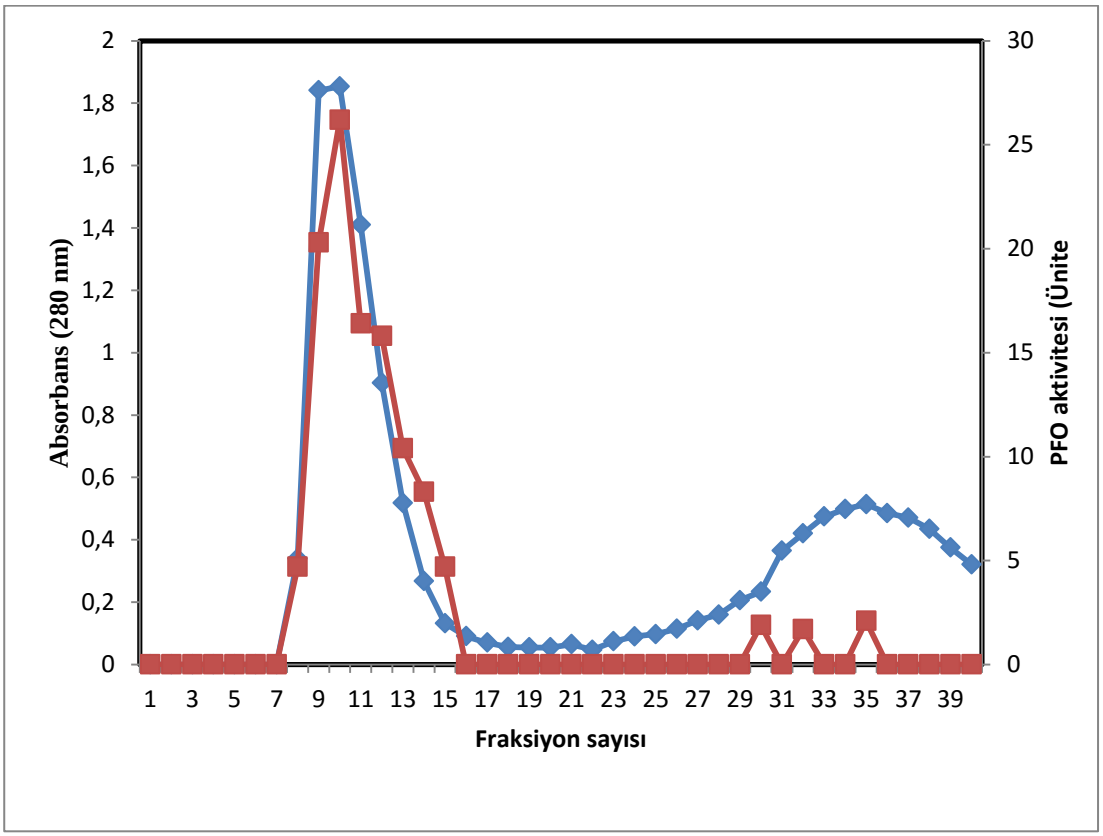
Karbonhidratların enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için 0.5 ve 2 mM konsantrasyonlarda 3 farklı karbonhidrat (sukroz, riboz ve glukoz) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Bu bölümde çalışmalar sonucunda elde edilen deneysel veriler sunulmaktadır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Enzimin Saflaştırılması

Jel kromatografisinde elde edilen fraksiyonların her birinde absorbans (280 nm) ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri pH'sı 5 olan 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanmış 0.1 M katekol kullanılarak yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlara karşı absorbans ve PFO aktiviteleri Şekil 3.1.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi tek bir aktivite piki elde edilmiş. A pikinde 8. ve 15. fraksiyonlar birleştirilmiş ve pikin biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

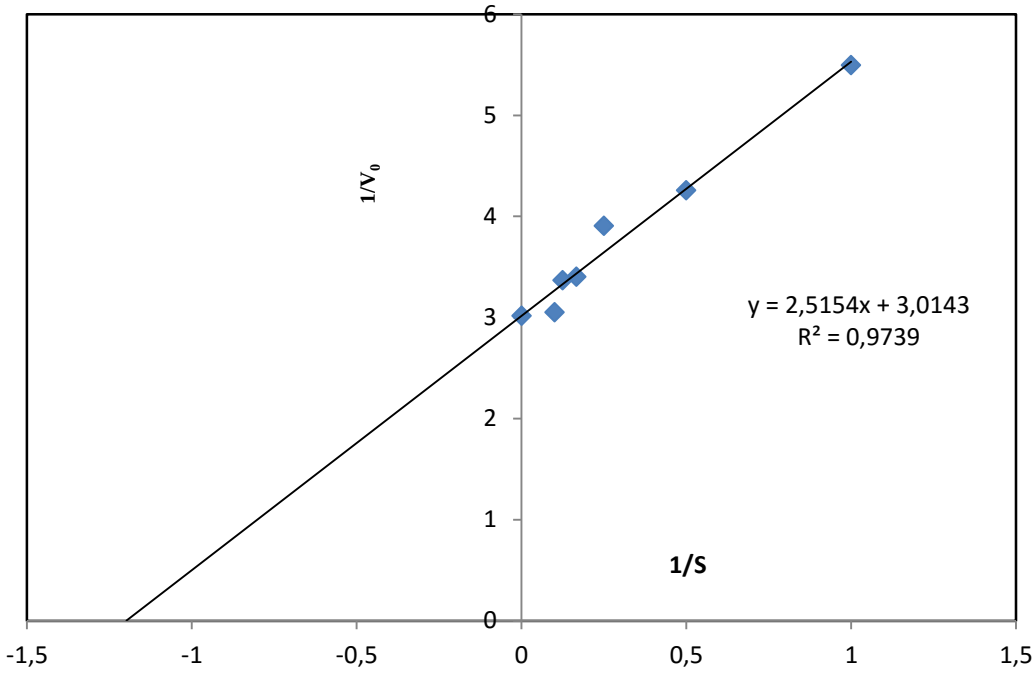


Şekil 3.1. Fraksiyonlara karşı absorbans ve PFO aktiviteleri

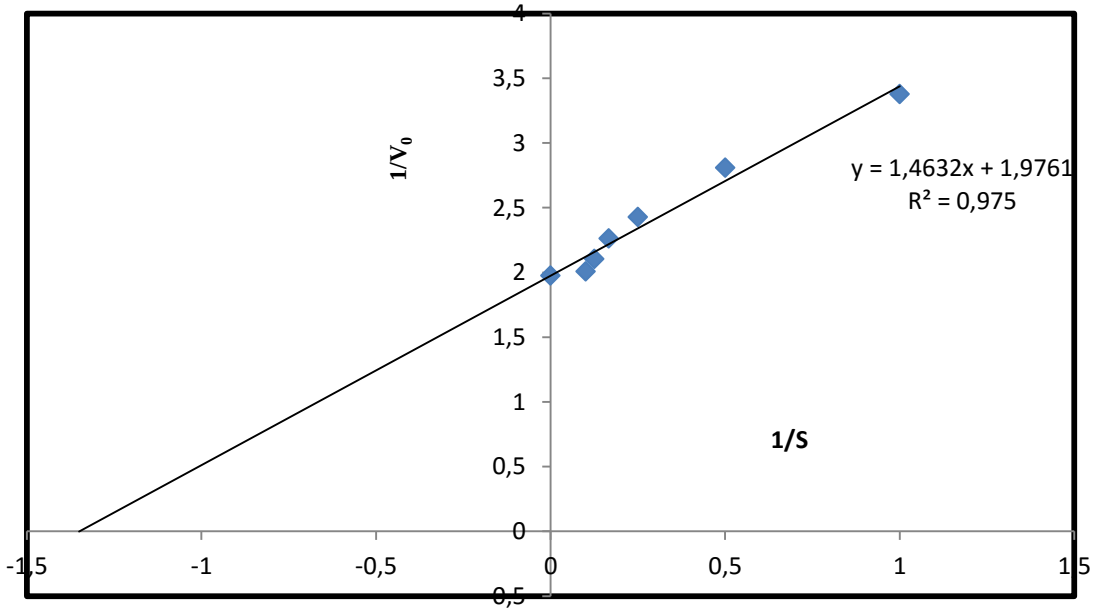
3.2. Substrat Spesifikliği

Michealis sabiti (Km) ve maksimum hız (Vmaks)'ı belirlemek için substrat olarak çeşitli konsantrasyonlarda katekol (1-15 mM), 4-metil katekol (1-18 mM) çözeltileri kullanarak enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Katekol (1-15 mM), 4-metil katekol (1-18 mM) çözeltilerinin ([S0]) tirozinaz enzimiyle vermiş olduğu reaksiyon başlangıç hızları saptandı.

(V0). 1/V0 değerleri 1/[S]'ye karşı grafiğe geçirildi. Vm değeri enzimin tamamının substrata doygun olması halinde elde edilen maksimum hızdır. Vm değeri denemelerdeki enzim derişimine bağlı bir sabittir oysa Km değeri eğer aynı substrat kullanılmışsa ve aynı kaynaktan izole edilen enzim söz konusu ise enzim derişiminden bağımsız gerçek bir sabittir. Km değeri enzim aktif merkezinin substrata olan ilgisini gösterir. Enzimin Km ve Vmaks değerleri Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo ve şekil üzerinde verilmiştir.(Şekil: 3.2. ve 3.3), (Çizelge: 3.1). Ünal ve Şener (2006), tarafından Türkiye'de yetiştirilen Emir üzümlerinden PFO enzimini *Km* ve *Vmax değerleri* sırasıyla 25.1 ±2.72mmol L^{-1} ve 0.925±0.04 $OD410dk^{-1}$ bulunmuştur. Yemencioğlu ve Cemeroğlu(1996), "Hale Haven" şeftalilerinde polifenol oksidaz (PFO) enziminin niteliklerini araştırmışlardır. Tam olgun şeftalilerden elde edilmiş enzimin *Km* değeri 14.3 mM ve *Vmax* değeri 1.25 Abs.dak-1. mL-1 olduğu saptanmıştır.



Şekil: 3.2. Katekol aktivitesi



Şekil: 3.3. Metil katekol aktivitesi

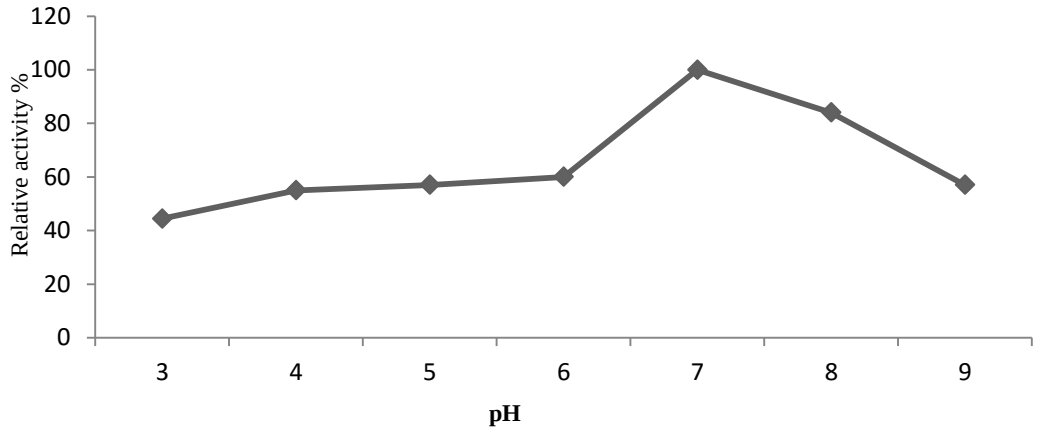
Çizelge 3.1. Polifenol aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş veriler

Substratlar	Vmax Abs./dak.	Km mM	Vmax/Km Abs./dak./ mM	R^2
Katekol	0,3317	0.83	0.4	0,973
4-Metilkatekol	0,5060	0,732	0,7	0,975

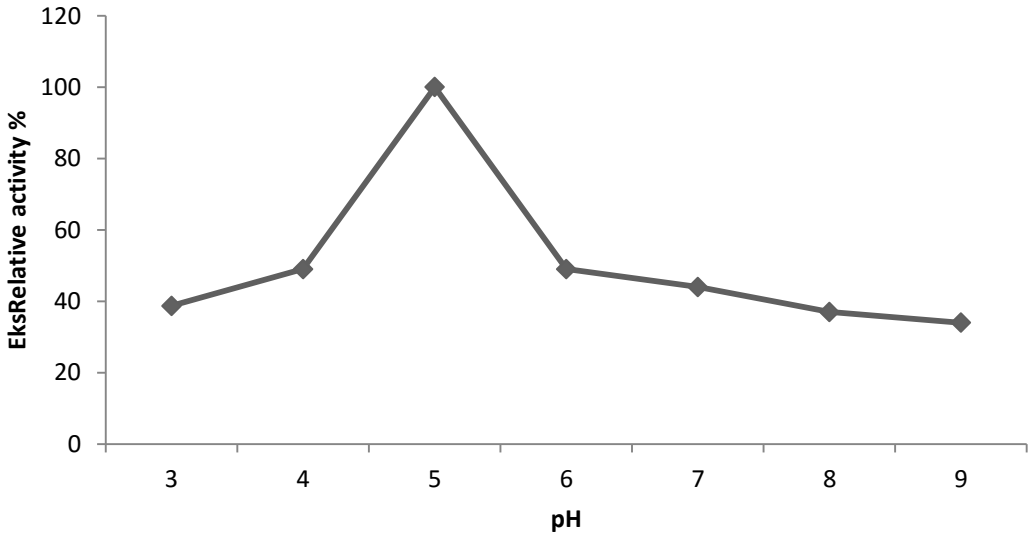
3.3 Optimum Ph ve Optimum Sıcaklık

Biber tohumları elde edilen polifenoloksidazın optimum pH değerleri katekol ve 4-metilkatekol substratları kullanılarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Katekol subsratı kullanıldığında optimum pH 7, 4-metil katekol kullanıldığında ise optimum pH 5 olarak bulunmuştur. Çeşitli kaynaklardan ize edilen PFO enziminin Optimum PH'sı 5-8 arasında rapor edilmiştir. Literatürde Sonali ve ark. (2015), patates kabuklarından elde ettiklerin enzimin optimum pH' ını 7, Arabaci ve Usluoğlu (20149 ayva yaprağında 7.5, Goyeneche ve ark. (2013), Raphanus sativus var. sativus 'da pH 'yı 7 olarak tespit etmişler. Ünal ve Şener (2006), Emir üzümlerinden PFO enzimini ekstrakte etmiş, substrat olarak katekol kullanıldığında üzüm kökenli PFO'nun optimum pH 4.2 olarak bulunmuştur. Gawlik-Dziki ve arkadaşları(2007) brokoli (*Brassica oleracea* var. *Botrytis italica)* elde ettikleri polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu yapmışlardır. Kateşol ve 4-metil kateşol kullanıldığında brokoli PFO'sunun optimum aktivite gösterdiği pH 5.7 olarak rapor etmişlerdir**.**

.

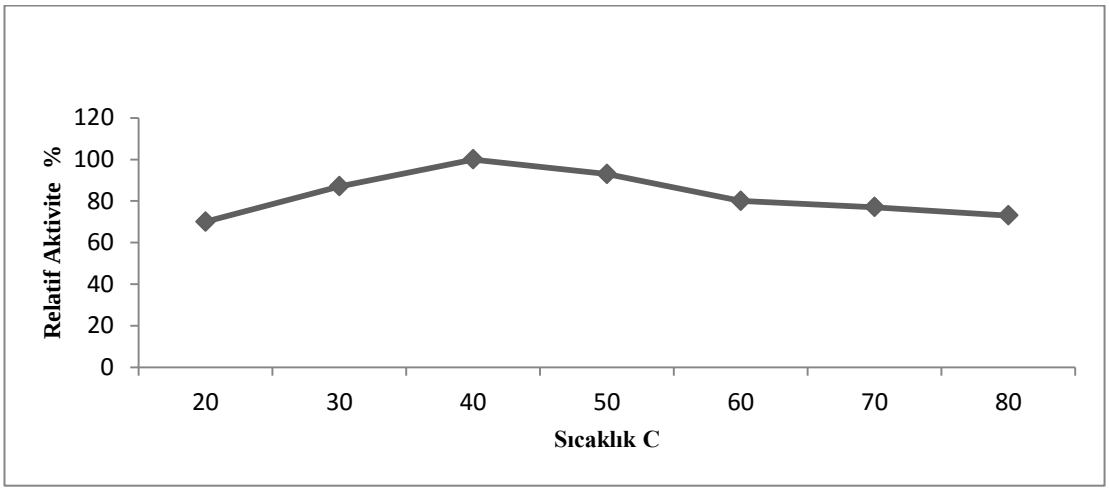


Şekil: 3.4. Katekol ortamında optimum pH

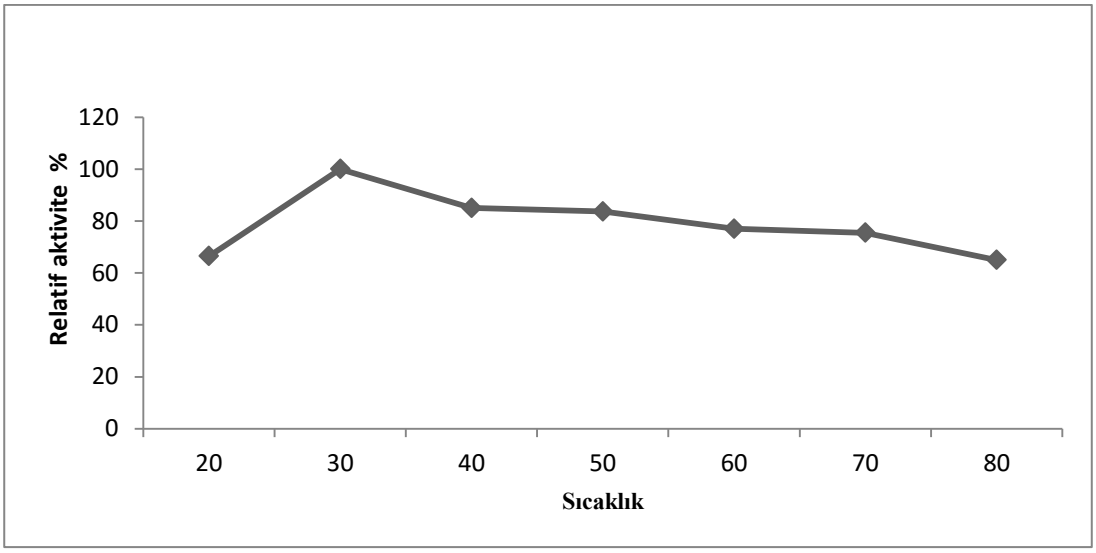


Şekil: 3.5. 4-Metilkatekol ortamında optimum pH

Yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler ve yüksek sıcaklıkta enzimler inaktive olurlar. Katekol ve 4-metilkatekol substratları kullanılarak biber tohumlarından elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi incelenmiştir. Elde edilen verilerek şekil 3.6 ve 3.7'de grafik edilmiştir. 4-metil katekol subsratı kullanıldığında PFO enziminin optimum sıcaklığı 40^{O} C, katekol kullanıldığında ise optimum sıcaklık 30ºC olarak tespit edildi. Literatürde Sonali ve ark. (2015), patates kabuklarından elde ettiklerin enzimin optimum sıcaklığını 30ºC , Mahmood, ve ark.(2009), patates yumrusunda, 22 ºC, Ünal ve Şener (2006), Emir üzümlerinden PFO enzimini ekstrakte etmiş, substrat olarak kateşol kullanıldığında üzüm kökenli PFO'nun optimum sıcaklığını 25°C olarak bulunmuştur . Enginar PFO enziminin optimum sıcaklığını 40^{O} C, Sun ve ark.(2010.)



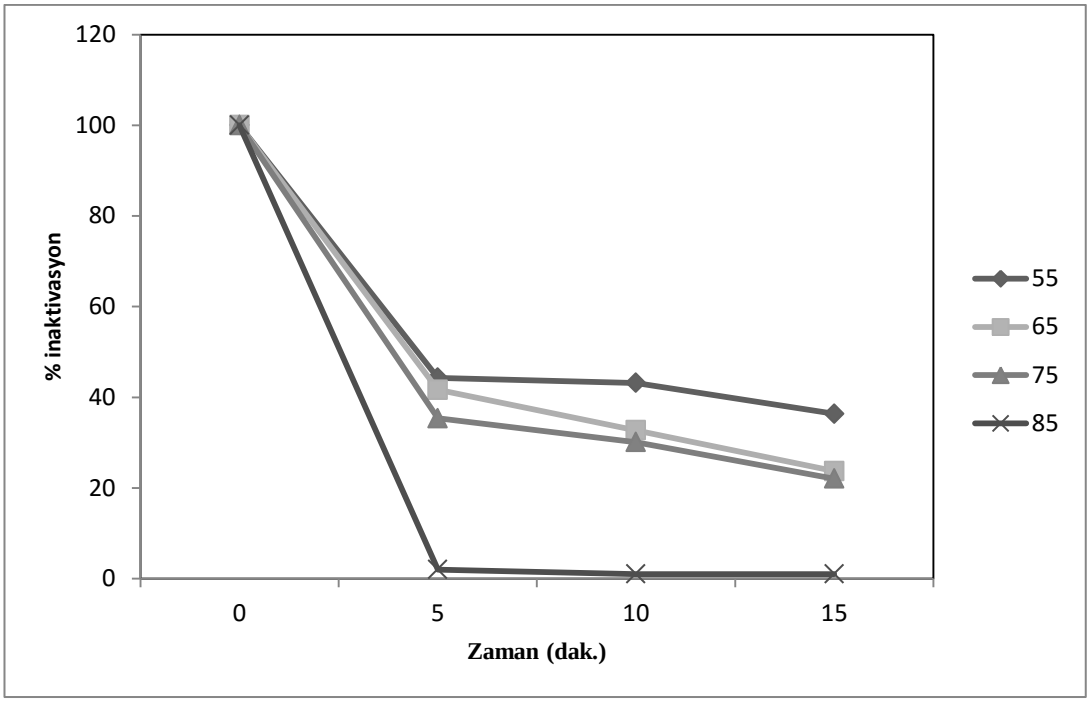
Şekil: 3.6. Metilkatekol ortamında optimum sıcaklık



Şekil: 3.7. katekol ortamında optimum sıcaklık

3.5 Termal İnaktivasyon

Biber tohumlarından elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla inaktivasyonu artan sıcaklığın ve inaktivasyon süresinin bir sonucu olarak araştırıldı. Elde edilen sonuçlar katekol substratı için artan sıcaklık ve inaktivasyon süresi ile enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir. (Şekil: 3.8) Yemencioğlu ve Cemeroğlu(1996), "Hale Haven" şeftalilerinde polifenol oksidaz (PFO) enziminin niteliklerini araştırmışlardır. Enzimin termal inaktivasyon kinetiği 70ºC de araştırılmıştır. Her enzim ekstraktının termal inaktivasyon kurvesinin, başlangıçta dik bir doğru, sonra daha yatık bir doğru olmak üzere iki bölümden oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil: 3.8. Termal inaktivasyon

3.6. Polifenoloksidazın İnhibisyonu

EDTA, SDS askorbik asit ve sodyum azidin PPO aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi 4-metil katekol substratı kullanılarak etkisi incelendi. Bu çalışmada EDTA'nın % 0,65 sodyum azidin % 62,9 ve SDS'nin % 36,2 ve askorbik asit ise % 65,7 oranında enzimi inhibe ettiği tespit edildi. Fakat bu çalışmada EDTA'nın 0,5 ve 2 Mm konsantrasyonları enzimi inhibe etmemiştir. (Çizelge 3.2.) PFO bir metallo proteindir. Şelat yapıcı ajanlarla inhibe edilebilir. ((EDTA= etilendiamintetraasetat) ve (sodyum azid)).katalizler (Zawistowski ve ark. 1991).

Doğan ve ark. (2007), mantar polifenol oksidazı, glutamik asidin sodyum azidden daha güçlü inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. (Serap ve ark. 2007).

Ünal ve Şener (2006), tarafından Türkiye'de yetiştirilen Emir üzümlerinden PFO enzimini üzerine değişik inhibitörlerin etkileri incelenmiş ve en etkin inhibitörün sodyum metabisülfit olduğu ve bunu askorbik asitin takip ettiği bildirilmiştir. Erzengi (2002) PFO enzimini saflaştırmak için yeni bir afinite jeli sentezlemiştir. Enzim kaynağı olarak dut (*Morus alba L.*) ve yer elması (*Helianhtus tuberosus L.*) kullanmıştır. Dut ve yer elması PFO enzimleri için ilk defa sülfanamid bileşikleri de inhibitör olarak

kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin belirli oranlarda her iki enzimi de inhibe ettiği saptanmıştır. (Erzengi, 2002)

Çizelge: 3.2. İnhibitörlerin Polifenol Oksidaz Enzimine Etkileri

İnhibitör	Konsantrasyon(İ)	İnhibisyon (%)
Sodyum azid	0,5 mM	62,9
	2 mM	64,4
EDTA	0,5 mM	0,65
	2 mM	0
SDS	0,5 mM	10,2
	2 mM	36,2
Askorbik asit	0,5 mM	60,7
	2 mM	65,7

3.7. Polifenoloksidaz Enziminin Aktivasyonu

Sukroz, riboz ve glukoz karbonhidratlarının biber tohumları PPO aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ribozun 2 ve 0,5 mM konsantrasyonları enzimi % 34 ve 7 oranında aktif ettiği, glikozun ve sukrozun ise enzimi aktive etmeyip inaktif (%14,8 ve % 40 oranında) ettiği tespit edilmiştir. (Çizelge 3.3) Literatür taraması yapıldığında PFO enziminin aktivasyonu üzerine çok fazla çalışmanın yapılmadığı görülmektedir. Bu enzimin inhibisyonu üzerine daha çok çalışma yapılmıştır. Çünkü polifenol oksidaz enziminin inhibisyonu istenen bir durum, aktivasyonu ise ürünlerin bozulmasını ve renginin değişmesine neden olduğu için istenmeyen bir durumdur. Fakat çay bitkisinin kararması istenen bir durumdur.

Çizelge 3.3. Karbonhidratların Polifenol Oksidaz Enzimine Etkileri

Karbonhidrat	Konsantrasyon(k)	Aktivasyon (%)
Riboz	0,5 mM 2 mM	7 34
Sukroz	0,5 mM 2 mM	-10,7 -40,8
Glikoz	0,5 mM 2 mM	-14,8 4

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada biber tohumlarından izole edilerek amonyum sülfat çöktürme, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel kromatografisi ile saflaştırılan polifenol oksidazın (PFO) biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada enzimin optimum pH ve sıcaklığı, substrat spesifikliği ve sıcaklık inaktivasyonu, inhibitörlerin ve karbonhidratların etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan; denenen substratlardan enzim ilgisinin en yüksek olduğu substratın 4-metilkatekol olduğu, termal stabilitesinin yüksek olduğu, sodyum azidin % 64,4 EDTA'nın %60,10 SDS'nin % 36,6 ve askorbik asidin ise % 65,7 oranında enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca etkisi araştırılan karbonhidratlardan ribozun enzimi % 34 oranında aktif ettiği, glikozun ve sukrozun ise enzimi inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. 4-metilkatekol subsratı kullanıldığında PFO enziminin optimum sıcaklığı 40^{O} C, katekol kullanıldığında ise optimum sıcaklık 30ºC olarak tespit edilmiş, optimum pH değerleri ise katekol ve 4-metilkatekol substratları kullanılarak sırasıyla 7 ve 5 olarak tespit edilmiştir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde biber tohumlarının pH'ının ve sıcaklığının bu aralıkların dışında tutulması, PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceği ifade edilebilir. Enzimatik kararma, tohumların rengini ve besin değerini değiştirir. Dolayısıyla elde edilen deneysel veriler biber tohumlarının korunması, saklanması koşullarının oluşturulmasında üreticiler açısından oldukça önemli olacaktır. Bu verilerle bozuk tohumların yol açtığı sorunlar engellenmiş olacaktır. Ayrıca gerçekleştirilen bu çalışma, yöremizde bolca yetişen biberin biyolojik potansiyelinin incelenmesine de olanak sağladığından önem arzetmektedir.

5.KAYNAKLAR

Anonim, 2009a. FAOSTAD Statistical Databases [http://www.fao.org/] Erişim Tarihi: 17.11.2009.

Anonim, 2009c. Akdeniz ihracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, Yaş Meyve Sebze ihracatçıları Birliği Değerlendirme Raporu [http://www.akib.org.tr/] Erişim Tarihi: 30.10.2009

Anonim, 2009e. TKB. Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ülkesel tohumluk tedarik dağıtım ve üretim programı kayıtları 2009

Anonim, 2009f. TKB. Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Standart tohumluk kaydına (ticari sebze) alınan çeşit listesi kayıtları 2009.

Arabaci G., Usluoglu A. (2014). The Enzymatic Decolorization of Textile Dyes by the Immobilized Polyphenol Oxidase from Quince Leaves. Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal Volume, Article ID 685975, 5 pages.

Astarcı, E.,(2003). Production and biochemical characterization of polyphenol oxidase from thermomyces lanuginosus, ODTÜ, Ankara.

Bais H.P., Walker, T.S.,Schweizer, H.P., Vivanco, J.M., "Root specific elicitation and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum*", Plant Physiol. Biochem., (2002) 40, 983-995

Beena, P., & Gowda, L. R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (Dolichos lablab). Journal of Agriculture Food Chemistry, 48, 3839-3846.

Beşel, E. (2003). Use of Triton X-114 Aqueous Two Phase System for Recovery of Mushroom(Agaricus Bisporus) Polyphenoloxidase. Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara.

Cai, Yong-Xiang Hong, Shao-Yun Wang, Li-Na Zhao, Ping-Fan Rao.(2015). Purification and enzymatic characteristics of a novel polyphenol oxidase from lotus seed (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). International Journal of Food Science & Technology. 50;4, 1026–1032.

Cheema, S., Sommerhalter, M.(2015) .Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. Food Chemistry, 171, 382-387.

Cho, Y. K., & Ahn, H. K. (1998). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. Journal of Food Biochemistry, 23, 577-592

Dec., J. and Bollog. J. M., (1995). "Effect of various factors on dehalojenation of chlorinated phenols anilines during oxidative coupling", Envirom.Sci.Technol., 29: 657-663

Dogan,S., ,(2002). ''Origanum L. (Lamiaceae) Taksonlarının (Origanum onites L. Ve Origanum vulgare L.spp. hirtum (Link) Ietswaar) Çevre Faktörleriyle Olan iliskilerinin ve PFO Aktivitesinin Belirlenmesi'', Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Egitimi Anabilim Dalı, Balıkesir.

Erzengi, M., (2002). Farklı kaynaklardan afinite kromotografisiyle polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Ünversitesi, Balıkesir.

Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. & Costantinides, S. M. (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (Musa cavendishii L.). Journal of Food Science, 46, 150-155.

Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B. (2007).Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (Brassica oleracea var. botrytis italica) florets. Food Chem.; 105,1047-1053.

Gonzales, E.M., Ancos, B., Cano, M.P., (1999). "Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4068

Rosario Goyeneche, Karina Di Scala , Sara Roura (2013). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (Raphanus sativus var. sativus). LWT - Food Science and Technology 54 , 57-62.

Gül Güven, R., (2007). Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve *Alicyclobacillusacidocaldarius* Subsp. *Rittmanii*'nin b-galaktozidaz enziminin saflaştırılması, Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Oktay, M., (2005). Purification and Characterization of Polyphenol oxidase from Netle (Urtica dioica L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20(3):297-302.

Güray, M. Z..(2009). Polifenol Oksidaz Enziminin Termofilik Bacillus sp.' den Kısmi olarak saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. İzmir İleri teknoloji Enstitüsü.

Jae-Joon Kim and Woo-Yeon Kim.(2013).Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng. Ginseng Res. 37(1): 117–123.

Lineweaver, H., Burk, D. (1934).The determination of enzyme dissociation constants. Journal of American Chemical Society . 56, 658-666.

Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall RJ.(1951).Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem.193(1):265-75.

Mahmood, W.A.; Sultan, S.H.; Hamza, S.R.(2009). Extraction and Characterization of Polyphenol Oxidase From Apricot , Apple, Eggplant and Potato. Mesopotamia J. Agric. 37, 8.

Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C., (2000). " Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods", FAO, Rome, Italy.

Nelson, D., Cox, M., , (2005). "Lehninger Biyokimyanın ilkeleri",Çeviri editörü, Kılınç, N., Palme Yayıncılık, Ankara.

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

Özalp, R., (2008). Türkiye' de biber üretimi ve biber tohumculuğunun durumu. VII. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, 192s, Yalova.

Öztan, D., (2007). ''Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı". Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Ankara.

Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, NA., Sampedro, JG., Nájera, H. (2014). Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (Mangifera indica cv. Manila).J Agric Food Chem., 8;62(40):9832-9840.

Park T. G., Hoffmann, A. S., (1993). "Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized β- Galactosidase in temperature sensitive hydrogel beads", Enzyme Microbial Technology, 15: 476-556.

Rapeanu, G., Loey, A. V., Smout, C. ve Hendrıckx, M., (2006). Biochemical Characterization and Process Stability of Poliphenoloxidase Extacted from Victoria Grape (Vitis vinifera ssp. Sativa) . Food Chemistry, 94: 253-261.

Sakiroglu, H., (1994). "Kuşburnu meyvesinde izole edilen polifenoloksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.

Sakiroglu, H., Yılmaz, E., Erat M., Öztürk, A.E.(2013).Selected properties of polyphenol oxidase obtained from ispir sugar bean .International Journal of Food Properties, 16, 1314–1321.

Doğan S., Turan P., Doğan M. , Alkan M. , Arslan O . (2007).Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid. Eur Food Res Technol. 225:67–73.

Sherman,T.,O., Vaughn, K., C., Duke, S., O., (1991). "A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase", Phytochemistry, 30, 2499-2506.

Singh, N., Singh, R., Kaur, K., & Singh, H. (1999). Studies of the physicochemical properties and polyphenol oxidase activity in seeds from hybrid 70 sunflower (Helianthus annuus) varieties grown in India. Food Chemistry, 66, 241-247

Sonali S. Niphadkar, Mangesh D. Vetal, and Virendra K. Rathod.(2015). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Waste Potato Peel by Aqueous Two-Phase Extraction. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 45:632–649.

Sun, J. Y., You, E.G., Long, X. and Wang, J. (2010). Biochemical properties and potential endogenous substrates of polyphenoloxidase from chufa (Eleocharis tuberosa) corms. Food Chemistry,118,799-803.

Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, O., Kocaçalişkan, I., Oktay, M., & Onganer, Y. (1996). Purification and characterization of dog-rose (Rosa dumalis Rechst.) polyphenol oxidase. Journal of Agriculture Food Chemistry, 44, 2982-2986.

Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S., (2008). Özel sebzecilik, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 448 s., Tekirdağ.

Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J. C., (2004). "Supression of polyphenol oxidase increases stress tolarence in tomato" Plant Science, 167, 693-703.

Turan, P., (2005). "Ocimum basilicum L. Polifenol Oksidazının Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

Tüzün, C. (1997). "Biyokimya üçüncü baskı" Palme Yayınları, Ankara, 124 – 125.

Unal, M. U. ve Şener, A., (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (Vitis vinifera L. cv. Emir). Journal of the Science of Food and Agriculture. 86:14, 2374–2379.

Vámos – Vigyázó, L., (1981). "Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 15: 49 – 127.

Voet, D., Voet, J.G., (2003).Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc. US,

Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. (2000). Kültür sebzeleri (sebze yetiştirme),E.Ü.Z.F. Bahçe Bitkileri Bölümü, Ege Üniversitesi, Bornova İzmir.

Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., (1993). "Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase", Biotechnology and Bioengineering, 42, 854-858.

Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M. W., ,(1990). "Strawberry polyphenol oxidase: extraction and partial characterization", Journal of Food Science. 55, 1320-1325.

Xiao-Feng Feng, Feng Liu, Chang-Hu Lin, Xiao-Jing Lin1, Na-Na Liu and Xiao Wang. (2014).Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Bud of Lonicera confusa. Journal of Food Biochemistry. Volume 38, Issue 6, pages 533–541.

Yağar, H., (2004). Some Biochemical Properties of Poliphenol Oxidase from Celery, Preparative Biochemistry and Biotechnology, (4) 34: 378–397.

Yahsi, A., Sahin, F., Demirel, G., Tümtürk, H. (2005). Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, International Journal of Biological Molecules, 36, 253- 258.

Yemenicioğlu A., Cemeroğlu, B. (1996). Hale Haven şeftalilerinde polifenoloksidaz enzimlerininBazı Nitelikleri.Journal of Agricultural of Forestry.22:261-265.

Yılmaz, E., (2007). İspir şeker fasulyesinden elde edilen polifenoloksidaz enziminin bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

Zawistowski, J., Biliaderis, C. G., Eskin, N. A. M. (1991). Polyphenol Oxidase. In Oxidative Enzymes in Foods. D. S. Robinson and N. A. M. Eskin (Eds), Elsevier, pp 217-273.)

Ziyan, E. ve Pekyardımcı, Ş., (2003). Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus). Turkish Journal of Chemistry, 27:217-225.

Ziyan, E., (1998)."Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (pyrus communis)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi" ,Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Diyarbakır'da tamamladım. 2005 yılında Dicle Üniversitesi, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nde lisans öğrenimine başladım ve 2009 yılında bu bölümden derece ile mezun oldum. Aynı yıl MEB' de Fen Bilgisi öğretmeni olarak atandım. 2012 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans programına başladım.