

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selin Nazmiye YABACI

**ÇAY BİTKİSİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇAY BİTKİSİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Selin Nazmiye YABACI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez .../.../2008 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza:.....
Yrd.Doç.Dr.M.Ümit ÜNAL
Danışman

İmza:.....
Yrd.Doç.Dr.M.Sertaç ÖZER
Üye

İmza:.....
Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
Üye

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve mühür**

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2006.YL.85

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇAY BİTKİSİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Selin Nazmiye YABACI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Yrd. Doç. Dr. M. Ümit ÜNAL
Yıl : 2008, Sayfa : 35
Jüri : Yrd. Doç. Dr. M. Ümit ÜNAL
Yrd. Doç. Dr. M. Sertaç ÖZER
Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Bu çalışmada, Karadeniz bölgesinde yetiştirilen çay bitkisinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin (PFO) optimum sıcaklık, optimum pH, substrat spesifikliği, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır.

Denenen substratlar içerisinde enzimin ilgisinin en yüksek olduğu substrat 4-metil kateşoldür. PFO aktivitesi için optimum pH değeri 6.02 olarak bulunmuş ve enzim 4.03-7.00 gibi geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur. Enzim 20-80°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında %70'in üzerinde aktivite göstermiştir. Termal inaktivasyon sonuçlarına göre, sıcaklık arttıkça k_D değerleri artarken yarı ömür ve D değerlerinin azalmıştır. Enzimin aktivasyon enerjisi (E_a) ve Z değerleri sırasıyla, 58.301 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9614$) ve 39.68°C ($r^2=0.9645$) olarak bulunmuştur. Enzimin termal stabilitesi yüksektir. Denenen inhibitörlerden en düşük inhibisyon etkisi L-sistein'de görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Çay, polifenol oksidaz, kinetik, termal stabilite, termal inaktivasyon.

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION AND DETERMINATION OF SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE FROM TEA PLANT

Selin Nazmiye YABACI

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assist. Prof. Dr .M. Ümit ÜNAL

Year : 2008, Pages : 35

Jury : Assist. Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL

Assist. Prof. Dr. M. Sertaç ÖZER

Assist. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

This research was undertaken to determine some of the biochemical properties (substrate specificity, optimum pH, optimum temperature, heat inactivation, and effect of inhibitors) of polyphenol oxidase (PPO) which was isolated from fresh tea leaves and partially purified.

Of the substrates tested, the best substrate for PPO was 4-methylcatechol. The optimum pH for PPO activity was found to be 6.02 and the enzyme showed high activity over a broad pH range of 4.03-7.00. The optimum temperature for PPO activity was 30°C. Enzyme activity was more than 70% between 20-80°C. According to thermal inactivation studies, k_D values increased as the temperature increased whereas half-life and D values decreased. Energy of activation (E_a) and Z values were found to be 58.301 kJ/mol ($r^2=0.9614$) and 39.68 °C ($r^2=0.9645$), respectively. The enzyme is thermo-stable. Of the inhibitors tested, L-cysteine was the least effective inhibitor.

Key Words: Tea, polyphenol oxidase, kinetics, thermal stability, thermal inactivation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren, bana yol gösteren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Ümit Ünal'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; Araştırma Görevlisi Aysun Şener ve değerli arkadaşlarım Erkan Akar, Ender Bellur ve Aykut Aksoy'a,

Tez için kullandığımız çay yapraklarını temin eden değerli arkadaşım Onur Işın'a,

İlgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Merdan Yabacı, annem Hatice Yabacı ve kardeşim Beyza Yabacı'ya,

Destek ve katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesine ve Gıda Mühendisliği Bölümü personeline teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yeşil Çay Yaprağının Önemli Bileşenleri.....	3
1.2. İşlenmiş Çayın Önemli Bileşenleri.....	4
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Çay Örnekleri.....	12
3.1.2. Analizlerde Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler.....	12
3.2. Metot.....	13
3.2.1. Polifenol Oksidaz Ekstraktının Hazırlanması.....	13
3.2.2. Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	13
3.2.3. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma.....	13
3.2.4. Protein Tayini.....	14
3.2.5. Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	14
3.2.6. Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	14
3.2.6.1. Optimum pH.....	14
3.2.6.2. Optimum Sıcaklık.....	15
3.2.6.3. Substrat Spesifikliğı.....	15
3.2.6.4. Termal İnaktivasyon.....	15
3.2.6.5. İnhibitörlerin Etkileri.....	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	18
4.1. Enzimin Saflaştırılması.....	18

4.2. Optimum pH.....	20
4.3. Optimum Sıcaklık.....	22
4.4. Substrat Spesifikliği.....	23
4.5. Termal İnaktivasyon.....	25
4.6. İnhibitörlerin Etkisi.....	27
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Dünya Çay Üretiminde Lider Olan Ülkeler, Üretim Değerleri ve Dünya Çay Üretimindeki Payları (%)	2
Çizelge 1.2. Dünya Çay Tüketim Değerleri ve Toplam Tüketimdeki Payları (%) ...	2
Çizelge 1.3. Çay Yaprağının Önemli Bazı Bileşenleri	3
Çizelge 4.1. Çay Bitkisi PFO Enzimi Saflaştırma Çizelgesi.....	18
Çizelge 4.2. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri ...	21
Çizelge 4.3. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum Sıcaklık Değerleri	23
Çizelge 4.4. Çay Yaprağı PFO'sunun Kinetik Parametreleri.....	24
Çizelge 4.5. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların K_m Değerleri	24
Çizelge 4.6. Çay Yaprağı PFO'sunun Termal İnaktivasyon Parametreleri	25
Çizelge 4.7. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Aktivasyon Enerjileri	26
Çizelge 4.8. İnhibitörlerin Çay Yaprağı PFO'suna Etkileri	28

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 1.1. Kateşinin ve epigallokateşinin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu.....	5
Şekil 1.2. Oksitlenmiş flavan-3-ol'lerden teafavin oluşumu.....	6
Şekil 4.1. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile çay PFO'sunun saflaştırılması.....	18
Şekil 4.2. pH'nın çay bitkisi PFO aktivitesine etkisi.....	21
Şekil 4.3. Sıcaklığın çay bitkisi PFO aktivitesine etkisi.....	23

1. GİRİŞ

Çayın anavatanı Çin olarak bilinmektedir ve ilk kültüre alındığı ülkedir. Çay tüketiminin Çin’de yaklaşık 3000 yıllık bir geçmişi olduğu bilinmektedir. Çayın Avrupa’da ve ülkemizde tanınıp tüketilmeye başlanması M.S. 17. ve 18. yüzyıllarda olmuştur. (Peterson ve ark., 2004). Bugün, çay dünyada en çok tüketilen kafein-içeren içecektir ve dünya çapındaki tüketimi sudan sonra ikinci sıradadır (Wright, 2002). Dünyada üretilen çay çeşitleri; siyah çay (fermente edilmiş), yeşil çay (fermente edilmemiş) ve oolong (yarı fermente, siyah çay ile yeşil çay arasında) çayıdır (Spille, 1997).

Çay “*Theaceae*” familyasının “*Thea*” cinsinden “*sinensis*” türünde genellikle çalı formunda olan bir bitkidir (*Thea sinensis*). Botanikçiler tarafından “*Camellia sinensis*” adıyla da anılan bu bitkinin bilinen 3 çeşidi vardır. (Altan, 2003). Bunlardan ilki başlıca Çin ve Japonya’da yetiştirilen (Eski Sovyetler Birliği, Türkiye, İran ve daha kuzey ülkelerinde ve Hindistan’ın deniz seviyesinden yüksek bölgelerinde) soğuğa dayanıklı olan Çin çeşidi (*Thea sinensis var. sinensis*)’dir. İkincisi Sri Lanka, Hindistan, Bangladeş ve Endonezya gibi tropik iklim bölgelerinde yetişen Assam çeşidi (*Thea sinensis var. assamica*) ve üçüncü olarak da var. *irrawadiensis* çeşididir (*Camellia sinensis var. irrawadiensis*) (Spille, 1997).

Türkiye’de yetiştirilen çaylar genellikle saf olmayıp karışık melezler halindedir. Sovyetler Birliği’nden getirilerek ülkemizde tarımı yapılan çay bitkileri *Thea sinensis var. assamica X Thea sinensis var. sinensis* melezidirler. Türkiye’de çay bitkisi Doğu Karadeniz Bölgesi’nde, Gürcistan hududundan başlayan ve batıda Fatsa’ya kadar uzanan alan içerisinde yetiştirilmektedir. Sahilden yer yer 30 km içerilere kadar giren, ortalama 8 km derinliğinde olan Araklı-Karadere sınırına kadar uzanan alan, çay yetiştiriciliği için en elverişli bölge olması nedeniyle birinci sınıf çay bölgesi olarak kabul edilmektedir. Bahsedilen bölge içerisinde çaycılık, sahilden 400-500 m yüksekliğe kadar birbirine eklenerek yer yer bir çay denizi oluşturmakta ve kimi yerlerde 1000 metre yükseklikte çay bahçelerinin kurulduğu görülmektedir. Araklı-Karadere’den başlayan Fatsa ilçesine kadar uzanan, çay yetiştiriciliğinin yönünden göreceli olarak daha az ekonomik bulunan bölge, ikinci sınıf çay bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Demir, 2002).

Şu anda dünyanın en önemli çay üreticisi ülkeler arasında Hindistan, Çin, Sri Lanka, Kenya ve Türkiye bulunmaktadır. Dünyada, ülkemizin de içinde bulunduğu 40 kadar ülkede çay tarımı yapılmaktadır. Dünya çay üretimi (siyah ve yeşil) yaklaşık 3.645.200 tondur. Çizelge 1.1’de 2006 yılı verilerine göre dünya çay üretiminde ilk beş sırada bulunan ülkeler, üretim değerleri ve dünya çay üretimindeki % payları verilmiştir. Çizelge 1.2’de de dünya çay tüketiminde lider ülkeler görülmektedir.

Çizelge 1.1. Dünya Çay Üretiminde Lider Olan Ülkeler, Üretim Değerleri ve Dünya Çay Üretimindeki Payları (%) (FAO, 2008)

Üretim Miktarına Göre Sıralama	Ülke	2006 Yılı Üretim Değerleri (bin ton)	Dünya Çay Üretimindeki Payı (%)
1	Çin	1047.4	28.73
2	Hindistan	945.3	25.93
3	Kenya	313.0	8.59
4	Sri Lanka	312.0	8.56
5	Türkiye	200.1	5.49

Çizelge 1.2. Dünya Çay Tüketim Değerleri ve Toplam Tüketimdeki Payları (%) (FAO, 2008)

Tüketim Miktarına Göre Sıralama	Ülkeler	2006 Yılı Tüketim Değerleri (bin ton)	Dünya Çay Tüketimindeki Payı (%)
1	Çin	776.9	21.32
2	Hindistan	762.7	20.93
3	Avrupa Birliği (27)	356.2	9.77
4	Türkiye	201.0	5.52
5	Rusya Federasyonu	175.9	4.83
6	İngiltere	161.3	4.43

1.1. Yeşil Çay Yaprağının Önemli Bileşenleri

Çayın bileşimindeki birçok reaksiyon ürünleri kafeinle etkileşir, aromayı değiştirir ve çay üretiminde bazı problemlere yol açarlar (Spille, 1997). Çay yaprağı önemli miktarda metilksantin ve polifenol bileşikleri içerir. Bu iki bileşen çayın bir içecek olarak popülerliğine sebep olan eşsiz özelliklerinden büyük oranda sorumludurlar. Çay yaprağının kimyasal bileşimi, iklim koşulları, mevsim, çıkan sürgünlerin konumu, zirai uygulamalar gibi nedenlerden dolayı değişkenlik gösterir. (Venkatesan ve ark., 2006) Yeşil çay yaprağının bileşimi Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Yeşil Çay Yaprağının Bileşimi (Spille, 1997)

Yeşil Çay Yaprağının Bileşimi	
Bileşenler	Kuru Ağırlıktaki %
Flavanoller	25.0
Flavonoller ve glikozitleri	3.0
Polifenolik asitler ve depsidler	5.0
Diğer polifenoller	3.0
Kafein	3.0
Teobromin	0.2
Amino asitler	4.0
Organik asitler	0.5
Monosakkaritler	4.0
Diğer Polisakkaritler	13.0
Selüloz	7.0
Protein	15.0
Lignin	6.0
Lipidler	3.0
Klorofil ve diğer pigmentler	0.5
Kül	5.0
Uçucu bileşikler	0.1

Tablodan da görüldüğü üzere çay yaprağı bileşikleri içerisinde en fazla bulunan grup polifenollerdir. Taze çay filizinin bileşiminde bulunan fenolik

bileşikler 4 grupta toplanırlar. Flavanoller (kateşinler+gallokateşinler); epikateşin, epikateşingallat, epigallokateşin, epigallokateşingallat, kateşin, gallokateşin en fazla bulunan gruptur. Bunlardan da kateşin grubunun *epi-* formu baskındır. Çeşitli kateşinlerin nispi oranları oksidasyonun gidişatı ve son ürünün özellikleri üzerine etki gösterir. Toplam kateşin seviyesi taze yaprağın kuru maddesi üzerinden %20-30 arasında değişir. Kateşinler suda çözünür, renksiz ve sert-acı bir tada sahiptirler. Kolay okside olurlar ve metilksantinlerin de dahil olduğu birçok diğer maddelerle kompleks oluştururlar. Çayın kalitesi yaş çay yaprağının kateşin seviyesi ile orantılıdır. Bunların dışında; flavonoller ve glikozidleri; çay üretimi sırasında oksidatif reaksiyonlara girebilirler. Çay yaprağında fenolik asitler ve debsidler ve flavandioller (lökoantosiyanidinler) de bulunur.

Çay yaprağının diğer önemli bileşeni de enzimler ve enzimler içerisinde de en önemlisi polifenol oksidazdır (PFO); taze çay yaprağı çok yüksek oranda PFO içerir. PFO enzimi yaprak dokusunda bulunur ve atmosferik oksijenle kateşinlerin oksidasyonunu katalizler. PFO bakır içerir ve değişik izoenzimlerden oluşur. Enzim, yaprak epidermisinde yoğundur. Toprağın bakır eksikliği bazen proses sırasında yetersiz oksidasyonun sebebi olabilir (Spille, 1997).

1.2. İşlenmiş Çayın Önemli Bileşenleri

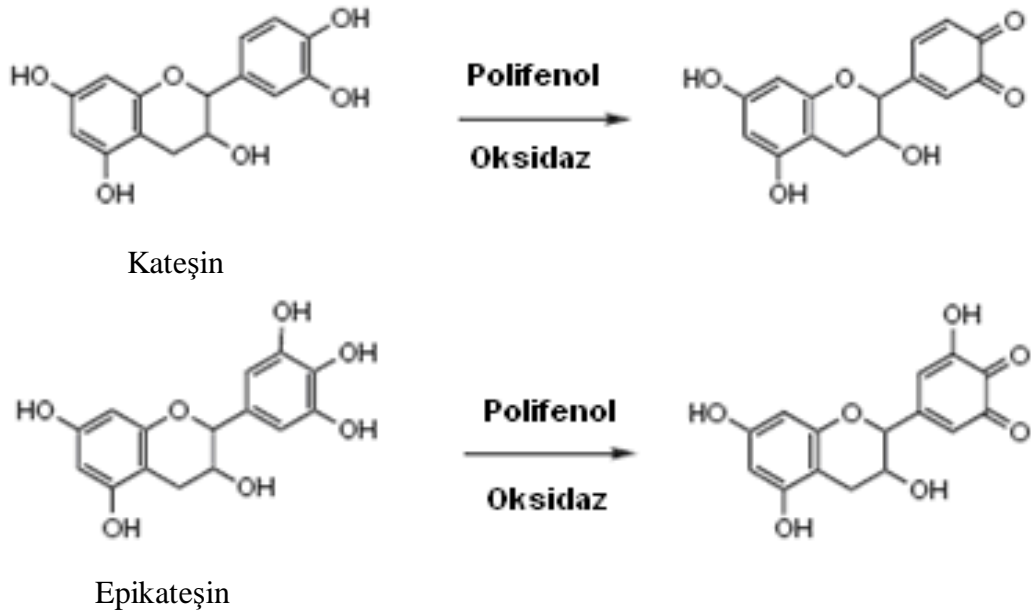
Çay deminin niteliği üzerinde en etkin iki polifenol olan teaflavinler ile tearubijinlerdir.

Flavanollerin birleşmesi ve oksidasyonu ile oluşan teaflavinler, siyah çayın kurumadde içeriğinin %0.3-2.0'sini, çay demi kuru maddesinin ise %1.0-6.0'sını oluştururlar. Nötr karakterli olan bu portakal sarısı renkli bileşikler, çay deminin açık portakal rengini ve parlaklığını verirler. Çayda 9 değişik teaflavin bileşiği bulunabilir.

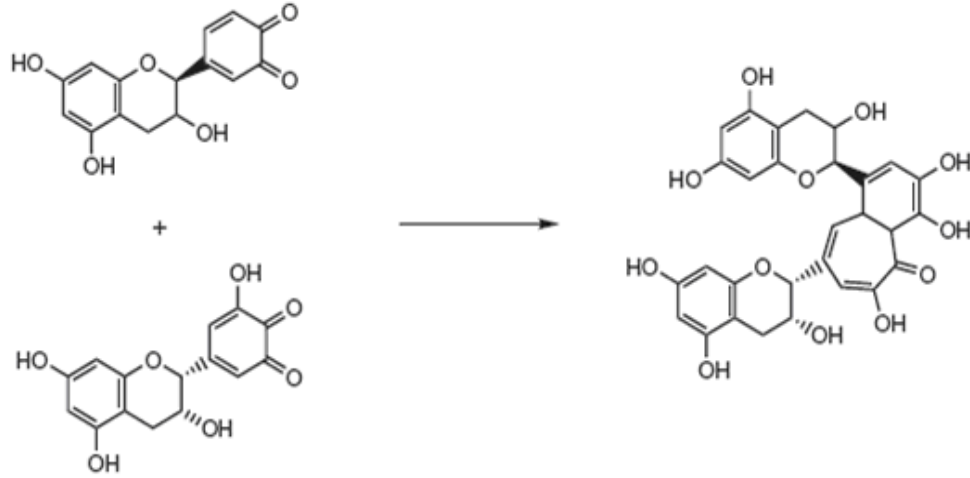
Tearubijinler, teaflavinlerin çayda bulunan diğer polifenollerle birleşmesi ve polimerizasyonu sonucu oluşurlar. Tearubijinler, siyah çay kurumaddesinin %7-17'sini, dem kurumadde içeriğinin ise %30-60'ını oluştururlar. Asidik karakterli, kahverengi bileşiklerdir. Çay deminin koyu rengini oluştururlar. Türk çaylarının çok koyu olması tearubijinin fazla olmasından kaynaklanır. Teaflavinlerin etil asetatta

çözünmelerine karşılık tearubijinler etil asetatta çözünmezler. Teaflavinlerin hepsinin suda çözünür olmasına karşın, bazı tearubijin bileşikleri zor çözünür, bir kısmı ise hiç çözünmezler (Altan, 2003).

Siyah çayın işlenmesi sırasında çay bitkisi PFO'ları çay yapraklarında bulunan polifenolik bileşiklerin *o*-kinonlara oksidasyonunu katalizlerler (Şekil 1.1). Fermente çayın karakteristik renk ve aromasından sorumlu olan teaflavin (TF) ve tearubijinlerin (TR) oluşumuna öncülük eden flavan-3-ol'lerin oksidasyonu polifenol oksidaz tarafından katalizlenir (Shahidi ve Nacz, 2003). Şekil 1.2'de okside olmuş flavan-3-ol'den teaflavin oluşumu görülmektedir.



Şekil 1.1. Kateşinin ve epigallokateşinin *o*-kinonlara oksidasyonu



Şekil 1.2. Oksitlenmiş flavan-3-ol'lerden teaflavin oluşumu

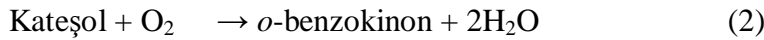
Fermente çayın karakteristik renk ve tadının oluşumunda teaflavin ve tearubijinlerin çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu maddelerin oluşumuna öncülük eden flavan-3-ol'lerin oksidasyonu da bilindiği üzere polifenol oksidaz tarafından katalizlenir (Shahidi ve Nacz, 2003). Hatta çay kalitesinin belirlenmesinde en önemli ve en güvenilir biyokimyasal metotlar, polifenol oksidaz aktivitesi ve çay bitkisinin kateşin içeriği ölçümlerini temel alanlardır (Wright, 2002).

Çay bitkisinin teaflavin ve tearubijin içeriği ve buna bağlı olarak da bu maddelerin oluşumu ve yıkımından sorumlu faktörler de satış fiyatını önemli ölçüde etkilerler (Bajaj ve ark, 1987).

Ülkemizde yetiştirilen çaylarda PFO enzimi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı çayın kalitesi üzerinde etkili olan PFO enzimini çay bitkisinden ekstrakte ederek kısmen saflaştırmak ve enzimin optimum pH, sıcaklık, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi, substrat spesifikliğı ve kinetik parametreler gibi özelliklerini belirlemektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

PFO enzimi oksidoredüktaz grubu enzimlerdendir ve aktif merkezinde bakır bulunur. Etki ettiği substratlar fenolik bileşiklerdir. Substratlarını oksijen varlığında esmer renkli bileşiklere oksitlemektedir. Bu olay gıda teknolojisinde enzimatik esmerleşme olarak bilinmektedir. PFO tirozinaz, fenolaz, kateşoloksidaz, kateşolaz, *o*-difenoloksidaz, mono fenoloksidaz ve kresolaz olarak da bilinir ve ilk olarak Schoenbein tarafından 1856'da keşfedilmiştir. PFO Uluslararası Biyokimya Birliği'nin sınıflandırmasına iki kez girmiştir: EC 1.14.18.1 (monofenol, L-dopa:oksijen oksidoredüktaz) monohidroksifenolü (ör.*p*-kresol) *o*-pozisyonuna hidroksile eder. EC 1.10.3.1 (1,2-benzendiol:oksijen oksidoredüktaz) *o*-dihidroksifenollerini (ör.kateşol) okside edip hidroksil grubundan hidrojenleri uzaklaştırarak benzokinonlar oluştururlar (Mayer, 1979).



PFO, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak görülen bir enzimdir. Bitkilerde tüm kısımlarda bulunabilirken, gelişmiş hayvanlarda deri, saç, tüy ve gözlerde bulunur. Bitkisel dokularda öncelikle inaktif formda sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, proteazlar ve etilen gibi bir takım solunum metabolitlerince aktif hale gelmektedir (Mayer, 1979). Yenilebilir bitkilerdeki PFO dağılımı, birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Son yıllarda farklı kaynaklardan da izole edilmiş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. PFO aktivitesine rastlanan bazı gıda ürünleri; çay, muşmula, enginar, Cassava bitkisi, ananas, Napoleon üzümü, patlıcan, Anamur muzunu, elma, zambak ve çilek olarak sayılabilir. Bitkilerdeki PFO miktarı çeşit, kültürel işlemler, olgunluk ve yaşa bağlıdır (Spille, 1997).

Şekerpancarında, PFO kloroplastta ve çeşitli dokusal yapılarda aromatik olmayan aminoasitlere peptid bağlarıyla bağlı olarak bulunur. PFO'nun serbest kalması için bu dokunun parçalanması gerekir. Yapılan çalışmalarda en yüksek enzimatik aktivite üzüm kabuklarında, bazı elma kültürlerinde, hıyarda ve diğer bazı meyvelerde görülmüştür. Bunların dışında, mantarın sap ve epidermis kısımlarında

yüksek PFO aktivitesi gözlenmiştir. Istakozda epidermis veya kütikul PFO'nun en çok bulunduğu yer olarak saptanmıştır. Bitkilerde ve kabuklu deniz ürünlerinde PFO dağılımının türe, yaşa, olgunluğa göre değişmesi çok önemli bir noktadır (FAO, 2000). Çayda ise enzim yaprak epidermisinde yoğundur (Spille, 1997). Halder ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada ise daha spesifik olarak çayda enzimin kloroplast içinde bulunduğunu belirlemişlerdir.

PFO'lar meyve ve sebzelerin hasat, depolama ve işleme kalitesi ve ekonomisini belirleyen çok önemli enzimlerdir. Oksijen geçişine neden olan hasat, depolama ve işleme sırasındaki zedelenme, kesilme ve diğer mekanik zararlar çoğu meyve ve sebzelerde melonin oluşumuna, bu da hızla esmerleşmeye neden olur. Esmerleşme yüzünden meyvelerde önemli kayıplar olmaktadır. Muz, şeftali, kayısı, elma, üzüm, çilek ve bazı tropik meyveler ve suları, ayrıca, patates, marul ve diğer yapraklı sebzelerde istenmeyen esmerleşmeler görülmektedir. Bunlardan farklı olarak, çay, kahve, kakao, siyah üzüm ve siyah incirlerde PFO aktivitesi istenen bir durumdur (Spille, 1997). Çünkü enzim sayesinde bu ürünler istenen son ürün karakteristiklerine kavuşurlar. Yukarıda da belirtildiği üzere PFO enzimi sayesinde polifenollerin oksidasyonu ile çayın karakteristik renk ve aroması oluşur.

PFO enzimi, çay bitkisi dışında pek çok meyve ve sebzede de çalışılmıştır. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Yemenicioğlu ve ark. (1997) altı elma çeşidinin (Golden Delicious, Starking Delicious, Granny Smith; Gloster, Starcrimson ve Amasya) PFO'larının ısı inaktivasyon kinetiklerini üç sıcaklıkta çalışmışlardır (68°, 73° ve 78°C). PFO aktivitesi başlangıçta artmış ve daha sonra ısıyla birlikte birinci dereceden kinetiğe uyarak azalmıştır. Aktivitedeki artış latent PFO'nun varlığını göstermektedir. 78°C'de Amasya cinsindeki PFO'nun en düşük, Starking Delicious'takinin ise en yüksek ısıl-dayanıklılığa sahip olduğu bulunmuştur.

Ziyan ve Pekyardımcı (2003) enginar kabuk ve meyve etindeki PFO'ı ekstrakte etmişler ve (NH₄)₂SO₄ çökeltmesi ve jel filtrasyonu vasıtasıyla saflaştırmışlar. 50 mM kateşol 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. Çalışmada altı

inhibitör test edilmiş ve hem kabuk hem de meyve eti PFO'su için, en etkili inhibitörler olarak, sodyum azid ve thiourea bulunmuştur. K_m ve V_{maks} değerleri, sırasıyla kabuk PFO 'su için 5.09 mM ve 363.6 birim.dak⁻¹.ml⁻¹ ve meyve eti PFO'su için 4.03 mM ve 714.2 birim.dak⁻¹.ml⁻¹ bulunmuştur. Aktivasyon enerjisi kabuk PFO'su için 122.76 kJ.mol⁻¹, meyve eti PFO'su için ise 178.07 kJ.mol⁻¹ bulunmuştur.

Rapeanu ve ark. (2006) Güney Afrika'da yetişen Viktorya üzümlerinden ekstrakte edilen PFO enziminin biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. McIlvaine tamponu içindeki 10 mM kateşol substratı ile enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla, pH 5 ve 25 °C bulunmuştur. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 52.6±0.00436 mM ve 653± 24.0 OD₄₀₀ nm.dak⁻¹'dir. Çalışmada sekiz inhibitör test edilmiş ve en etkili inhibitörler olarak askorbik asit, L-sistein ve sodyum metabisülfid bulunmuştur. Termal inaktivasyon çalışmalarında Viktorya üzümü PFO'sunun termal inaktivasyonunun, $E_a=225±13.5$ kJ.mol⁻¹'lük bir aktivasyon enerjisi ile, birinci dereceden kinetiğe uyduğunu göstermiştir.

Espin ve ark. (1997) enginardan elde edilen PFO enziminin monofenolaz aktivitesini incelemişlerdir. Enginar PFO'su aseton tozu yöntem kullanarak izole edilmiştir. Enzim ekstraktı hem monofenolaz hem de difenolaz aktivite göstermiştir. Enzim monofenolaz aktivitesi, substrat olarak çiftli bir nükleofil olarak 3-metil-2-benzothiazolinon ile birlikte 4-hidroksianisol, kullanılarak tanımlanmıştır. Bu metot yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik göstermiş ve PFO'nun mikro miktarlarını tespit etmede faydalı olabilecek olan, bir kalibrasyon eğrisi elde etmeye olanak vermiştir.

Doğan ve ark. (2002), kurutma işlemleri için en uygun patlıcan çeşidini belirleyebilmek için, farklı patlıcan çeşitlerinden elde edilen PFO enziminin substrat spesifikliğini, ısıl inaktivasyonunu, sıcaklık ve inhibitörlerin etkilerini araştırmışlardır. PFO kateşol ve 4-metilkateşole karşı aktivite göstermiş, fakat L-tirozine aktivite göstermemiştir. Çeşit I ($V_{maks}=3333.3$ EU dak⁻¹ ml⁻¹, $K_m=8.7$ mM ve $V_{maks}/K_m= 384.9$ dak⁻¹) ve çeşit III (V_{maks} 1000 EU dak⁻¹ ml⁻¹, $K_m=9.3$ mM ve $V_{maks}/K_m= 107.5$ dak⁻¹) için en iyi substrat kateşol bulunurken, çeşit II için ($V_{maks}=5000$ EU dak⁻¹ml⁻¹, $K_m=35.5$ mM ve $V_{maks}/K_m= 140.8$ dak⁻¹) en iyi substrat 4-metilkateşol bulunmuştur. Substrat olarak kateşol kullanıldığında optimum pH 7,

4-metilkateşol kullanıldığında ise pH 6'dır. Isıl inaktivasyon çalışmalarına göre 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesi düşmüştür. Kateşol ve 4-metil kateşol substratları için maksimum aktivite elde etmek için optimum sıcaklık, kateşol kullanılan ve optimum sıcaklığı 20 °C bulunan çeşit I dışında, tüm patlıcan çeşitleri için 30°C olarak bulunmuştur. Katalizlenen PFO reaksiyonları üzerine Tropolon, D, L-ditiotreitrol ve glutatyon gibi bileşenlerin inhibitör olarak etkileri test edilmiş ve genelde en etkili inhibitör olarak tropolon bulunmuştur.

Yağar (2004) çalışmasında, pH 7'de, 0.1 M fosfat tamponu kullanarak kereviz köklerinden PFO ekstrakte etmiştir. Substrat spesifikliği denemeleri, kateşol, pirogallol, L-DOPA, *p*-kresol, resorsinol ve tirozin kullanılarak yapılmıştır. Pirogallol, kateşol ve L-DOPA için K_m değerleri 25 °C'de sırasıyla ; 4.5, 8.3 ve 6.2 mM bulunmuştur. En yüksek V_{maks}/K_m değeri pirogallol substrat olarak kullanıldığında bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık değerleri substrat olarak kateşol, pirogallol ve L-DOPA kullanılarak belirlenmiştir. Kateşol ve L-DOPA ile optimum pH 7, pirogallol için 7.5'tir. Maksimum PFO aktivitesi için optimum sıcaklıklar; pirogallol için 25 °C, kateşol için 40 °C ve L-DOPA için 45 °C bulunmuştur. Isıl inaktivasyon çalışmaları, 60°C'nin üzerinde enzimatik aktivitede düşüş olduğunu göstermiştir. İnhibitörlerin etki sırası şu şekilde bulunmuştur: L-sistein>askorbik asit>glisin>resorsinol>NaCl.

Çay bitkisi PFO'su üzerinde yapılmış çalışmalar sınırlı olup bunlar aşağıda özetlenmiştir.

Halder ve ark. (1998), çay yapraklarından (*Camellia sinensis*) aseton tozu yöntemi ile PFO'yu ekstrakte ettikten sonra saflaştırılıp bazı özelliklerini belirlemişlerdir. PFO'nun izozimlerini DEAE selüloz kolonunda ayırmışlardır. İki fraksiyon absorbe edilirken diğeri edilmemiştir. Absorbe edilmeyen fraksiyon farklı kromatografik adımlarda saflaştırılmıştır: jel filtrasyonu, hidroksiyapatit, centricon-30, FPLC. pH, sıcaklık ve kinetik parametreler çalışılmıştır. Yüksek oranda saflaştırılmış enzim, monofenolleri, *p*-kinolleri okside edememişken, kateşolu okside etmiş ve bundan dolayı kateşol oksidaz olabileceği düşünülmüştür. Kateşin 0.49 mM'lık bir K_m ile en iyi substrat olarak bulunmuştur. Enzim 2 mM'lık tropolone ile tamamen inaktive olmuştur.

Bir başka çalışmada, Mahanta ve ark. (1993) fermente (siyah) çayda, teaflavin olarak bilinen kahverengi bileşiklerin oluşumundan sorumlu olan iki temel enzimin PFO ve peroksidaz (POD) spesifik aktiviteleri çalışmışlardır. Pigmentlerin teaflavin grupları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ölçülürken, PFO ve POD aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. PFO ve POD'un en yüksek aktivitelerinin çay işlenmesi sırasındaki kıvrırma işlemi sırasında olduğu gözlenmiştir. Enzim aktivitesinde gözlenen düşüş ve daha sonra artışın, fermente siyah çayda oksidatif fermantasyona (enzimatik esmerleşme) öncülük eden mekanik zararlanmalardan kaynaklandığı bulunmuştur.

Gregory ve ark. (1966)'nın çalışmalarında, çay bitkisi PFO'su sürgünlerden (kuru ağırlığa göre) 5000 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırmanın ara aşamalarında dört tane çözünür özellikte sarı fraksiyon elde edilmiştir. Bunların asidik fenolik oksidasyon ürünleri ile beraber temel enzim proteinleri ve nükleik asitler oldukları düşünülmüştür. Kompleks oluşturucu materyallerin ayrılmasından sonra fraksiyonlar mavi ve birbirlerine benzer hale gelmiştir. Bakır içeriği %0.32 bulunmuştur. Pirogallol'e karşı spesifik aktivite, 30° C'de, 373 ünite/mg olarak bulunmuştur. En iyi substrat o-dihidrik fenollerdir. Kuinol ve p-fenilenediamin yavaşça okside olmuşlardır. Monohidrik fenoller ve askorbik asit okside olmamışlardır. Sonuçların çay fermantasyon mekanizması ile bağlantısı tartışılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. ay rnekleri**

Denemelerde kullanılan çay yaprakları Karadeniz (Rize ve Trabzon) Bölgesi'nden temin edilmiştir.

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasal Maddeler

Aseton tozunun elde edilmesinde "Torrington HGBTWTS3 (Amerika)" marka waring blender kullanılmıştır. Tamponların ayarlanmasında ve pH limlerinde cam elektrodlu "Inolab (Almanya)" marka pH metre kullanılmıştır. Spektrofotometrik limler, sıcaklık kontrol nitesi olan "Shimadzu UV-1700" marka spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Enzim ekstraktının elde edilmesinde "Nüve NM 110" marka karıştırıcı ve "Kubota 7780 (Japonya)" marka santrifüj kullanılmıştır. Enzimlerin saflaştırılmasında "Atto AC-5750 (Japonya)" marka fraksiyon kollektörü kullanılmıştır. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi sırasında "Memmert WB14" ve "Nüve BM402" marka su banyosu kullanılmıştır.

Enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan kateşol, pirogallol, triton X-100, sodyum metabisülfit, PVPP (polivinilpolipirolidon), askorbik asit, commasie brillant blue (CBB) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. PEG (polietilen glikol), PMSF (fenilmetilslfonil florid), 4-metilkateşol, kafeik asit, gallik asit, L-sistein, aseton, amonyum sülfat, DEAE-sellz ve sellz membran (76mmx49mm) Sigma-Aldrich (St. Louis, Amerika) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot**3.2.1. Polifenol Oksidaz Ekstraktının Hazırlanması**

Sapları ayrılmış ve dondurulmuş (-25°C) 150 g yaş çay yaprağı, 1.875 g polietilen glikol (PEG) içeren 225 ml önceden soğutulmuş (-18°C) aseton içerisinde 2 dk Warring blendorda homojenize edilmiştir. Homojenat vakumlu filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtre keki 150 ml soğutulmuş aseton ile karıştırılarak aynı işlemler uygulanmıştır. Filtre üzerinde kalan kısım, beyaz aseton tozu elde edilene kadar 150 ml soğuk aseton kullanımlarıyla ekstrakte edilmiştir. Elde edilen aseton tozu bir gece oda sıcaklığında kurutulduktan sonra cam kavanoz içerisinde -25°C'de saklanmıştır (Coseteng ve Lee, 1987).

3.2.2. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Elde edilen aseton tozundan 10 g alınarak 10 mM askorbik asit, %0.1 polivinilpoliprolidon, %0.5 Triton X-100 ve 1mM PMSF içeren 1 litre, 0.1 M, pH 6.8 fosfat tamponunda 40 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat 1 saat, +4°C'de magnetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve daha sonra 10.000 x g'de 30 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, berrak kısma %30-90 amonyum sülfat çökeltmesi uygulanmıştır. Çökeltilen fraksiyonlar 10.000 x g'de 30 dakika, + 4°C'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Çökelti, az miktarda 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponunda çözülmüş ve +4°C'de aynı tampona karşı bir gece boyunca diyaliz edilmiştir (Serradell ve ark., 2000).

3.2.3. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma

Diyaliz edilen enzim çözeltisi, 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponu ile dengelenmiş DEAE-Selülöz iyon değişim kolonuna (2.5 x 30 cm) 0.5 ml.dak⁻¹ hızla verilmiştir. Enzim çözeltisi verildikten sonra 0.5 ml.dak⁻¹ hızla yaklaşık 130 ml başlangıç tamponu geçirildikten sonra 0.01 – 0.20 M, pH 6.8 fosfat tamponu kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Bu işlem iki parti halinde yapılmıştır. Toplam 40 ml enzim çözeltisi kolona verilmiştir. Fraksiyonlar 4'er ml olacak şekilde toplanmış ve elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivitesi ve protein tayini yapılmıştır.

3.2.4. Protein Tayini

Enzimlerin protein içeriği standart olarak sığır serum albumini kullanılan Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford, 1976).

3.2.5. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesi 30°C'de 410 nm'de 40 sn boyunca absorbanstaki artıştan belirlenmiştir. Absorbans-zaman grafiğinin lineer kısmının eğiminden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Ölçümler iki paralelli olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde ifade edilmiştir. Optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış ve 30°C'ye ısıtılmış 0.9 ml substrat çözeltisi 0.1 ml enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra absorbanstaki artış otomatik olarak kaydedilmiştir. Sadece inhibitörün etkisini belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 0.8 ml substrat, 0.1 ml inhibitor ve 0.1 ml enzim çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol olarak fosfat tamponunda hazırlanmış substrat kullanılmıştır. 1 ünite PFO aktivitesi 30°C'de dakikada 0.001 birimlik absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Ünal ve Şener, 2006).

3.2.6. Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum pH ve sıcaklığı, substrat spesifikliğı, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri Ünal (2007)'a göre belirlenmiştir.

3.2.6.1. Optimum pH

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'yı bulabilmek için 4.03-7.00 pH aralıklarında aktiviteler ölçülmüştür. pH 4.03-5.49 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.02-7.00 için 0.2 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. .

3.2.6.2. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklığı belirleyebilmek için 20-80°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tamponla hazırlanmış 0.9 ml kateşol çözeltisi ilgili sıcaklıkta su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 0.1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

3.2.6.3. Substrat Spesifikliğı

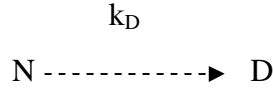
Michealis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks})'ı belirlemek için substrat olarak çeşitli konsantrasyonlarda kateşol (25-200 mM), 4-metil kateşol (6.25-100.00 mM), gallik asit (50-200 mM), pirogallol (200-400 mM) ve kafeik asit (0.75-3.00 mM) çözeltileri kullanarak enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Enzimin K_m ve V_{maks} değerleri Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.4. Termal İnaktivasyon

Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisini belirlemek için enzim 70°C'de (5, 10, 15 ve 20 dk), 75°C'de (5, 10, ve 15 dk) ve 80°C'de (2, 5, 10 dk) ısıtıldıktan sonra enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Vidalı deney tüpü ilgili sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra içerisine 0.3 ml enzim konulup değişik sürelerde sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Süre sonunda enzim hızlı bir şekilde su banyosundan çıkarılıp buz banyosunda soğutulmuş, ardından oda sıcaklığına getirildikten sonra enzim aktivitesi standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol olarak sıcaklığa maruz bırakılmayan enzim kullanılmıştır. Sıcaklığa maruz kalan enzimlerdeki kalıntı aktivite (E_t), sıcaklığa maruz kalmamış enzimin aktivitesi (E_o) ile kıyaslanarak birinci dereceli inaktivasyon sabiti (k_D), yarı ömür ($t_{1/2}$), aktivasyon enerjisi E_a , sabit bir sıcaklıktaki enzim aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre (D değeri) ve D değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı (Z değeri) hesaplanmıştır.

Bu değerlerin hesaplanması aşağıda özetlenmiştir.

Belli bir zaman süreci içerisinde doğal enzimin aktivitesindeki kayıplar ya da konsantrasyonundaki azalmalar birinci dereceden kinetiğe uyar ve aşağıdaki gibi ifade edilebilir.



Burada N doğal enzimi, D denatüre olmuş enzimi ve k_D ise (1/zaman) enzim için birinci dereceli inaktivasyon sabitini göstermektedir. Enzimlerin termal inaktivasyonu genellikle birinci dereceden reaksiyonla ifade edilir:

$$E_t = E_0^{-k_d.t}$$

E_t , t anındaki enzim aktivitesi ve E_0 başlangıçtaki aktiviteyi, t ise ısı işlem uygulama süresini ifade eder. Sabit sıcaklıkta $\ln(E_t/E_0)$ 'ın süreye karşı grafiği çizildiğinde, kurvenin eğimi $-k_D$ 'dir.

Yarı ömür ($t_{1/2}$) değeri, enzim stabilitesinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bir parametredir. Belli bir sıcaklıkta enzim aktivitesinin yarı yarıya azalması için gereken süredir. Enzimlerin ısı yolla inaktivasyonu çoğunlukla birinci dereceden kinetiğe uyduğundan aşağıdaki formülden kolaylıkla hesaplanabilir:

$$t_{1/2} = 0.693/k_D$$

Sabit bir sıcaklıktaki orijinal enzim aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre olarak tanımlanmaktadır. D değeri aşağıdaki formülden hesaplanabileceği gibi,

$$D = \ln(10)/k_D$$

$\log 10 (E_t/E_0)$ 'ın zamana karşı grafiğinin eğiminden de hesaplanabilir. Eğim $-1/D$ 'ye eşittir.

Eğer hız sabitleri farklı sıcaklıklarda elde edilirse denatürasyon için aktivasyon enerjisi hesaplanabilir. Aktivasyon enerjisi aşağıda verilen Arrhenius modeli yardımıyla hesaplanabilir.

$$\ln k_D = \ln A - (E_a/RT)$$

A (1/zaman), kimyasal reaksiyonlar sırasında meydana gelen çarpışmaların toplam sayısı ile ilgili bir parametredir. E_a (kJ.mol^{-1}), aktivasyon enerjisidir. R ($\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), universal gaz sabiti ve T(K) mutlak sıcaklıktır.

Aktivasyon enerjisi ile yakından ilişkili bir parametre olan Z değeri, desimal azalma süresinin (D) sıcaklığa bağımlılığını ifade eder ve enzimin ısıl direncini yansıtan bir parametredir. Z değeri, D değerinde bir log₁₀ azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışıdır. Log₁₀D'nin sıcaklığa karşı grafiği çizildiğinde, doğrunun eğimi 1/Z'dir (Marangoni, 2003).

3.2.6.5. İnhibitörlerin Etkileri

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonlarda 3 farklı inhibitör (askorbik asit, sodium disülfid ve L-sistein) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış kateşol çözeltisinden 0.8 ml ve optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki inhibitör çözeltilerinden 0.1 ml deney tüpüne konularak 5 dk 30 °C'de su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra üzerine 0.1 ml enzim ilave edilerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Kontrol olarak inhibitör kullanılmadan hazırlanan standart reaksiyon karışımında enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_o - A_i)/A_o] * 100$$

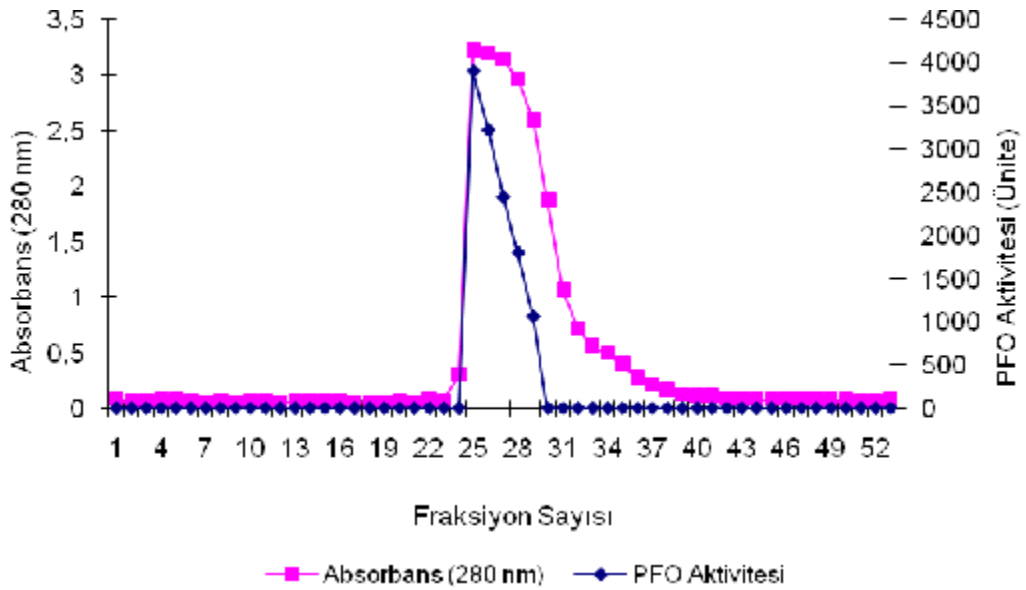
A_o: İnhibitör kullanmadan belirlenen enzim aktivitesi

A_i: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Enzimin Saflaştırılması

İyon değişim kromatoğrafisinde elde edilen fraksiyonların her birinde absorbans (280 nm) ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri pH'sı 4.98 olan 0.2 M sitrat tamponunda hazırlanmış 50 mM kateşol kullanılarak, protein tayini ise örneğin 280 nm'deki absorbansı ölçülerek yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlara karşı absorbans ve PFO aktiviteleri şekil 4.1'de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi absorbansın yüksek olduğu fraksiyonlarda enzim aktivitesi yüksek bulunmuş ve en yüksek aktiviteye sahip (25-29'uncu fraksiyonlar) fraksiyonlar birleştirilerek enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen protein ve aktivite değerlerinden saflaştırma çizelgesi hazırlanmıştır (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi enzim 3.32 kat saflaştırılmıştır.



Şekil 4.1. DEAE-selüloz iyon değişim kromatoğrafisi ile çay PFO'sunun saflaştırılması

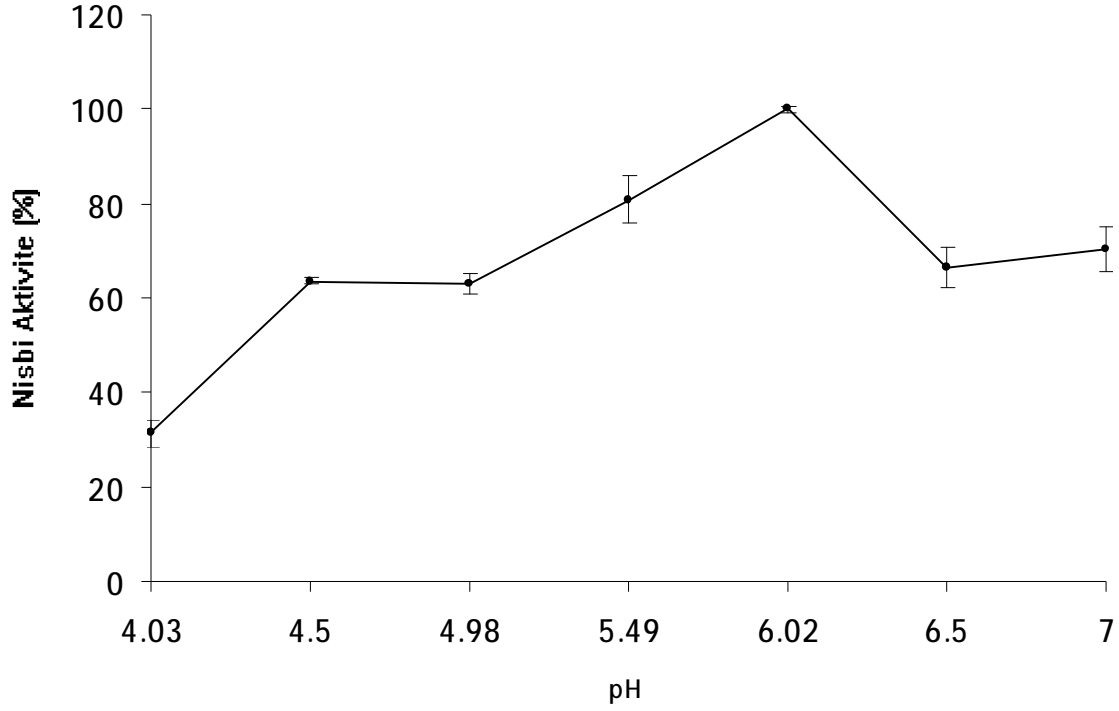
Çizelge 4.1. Çay Bitkisi PFO Enzimi Saflaştırma Çizelgesi

Örnek	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivite (Ünite/ml/dak)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (Ünite)	Spesifik Aktivite (Ünite/mg)	Saf. Katsayısı	Verim (%)
Kaba Ekstrakt	936.00	0.1393	3453.00	130.38	3232008.0	24789.1	1.00	100.00
Diyaliz	40.00	0.1925	5001.67	7.70	200066.8	25982.7	1.05	6.19
DEAE-Selüloz	36.00	0.0559	4591.33	2.01	165287.9	82232.8	3.32	5.11

4.2. Optimum pH

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir pH veya pH aralığı vardır. Bu optimum pH'nın altında ve üzerinde aktiviteleri düşer. Enzimler kuvvetli asit ve bazlara fazla dayanıklı değildirler. Ortam pH'sındaki aşırı olmayan değişiklikler enzimin ve çoğu kez de substratın iyonik durumunda değişikliklere neden olur. Enzimler kendileri için aşırı pH değerlerinde aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların yapılarında değişimler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar (Koolman ve Roehm, 2005). Kovalent olmayan elektrostatik bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve kovalent disülfid bağları enzimlerin üçüncül ve dördüncül yapılarını stabilize eder. Enzim üzerindeki pozitif ve negatif gruplar arasında oluşan elektrostatik bağlar pH'dan etkilenirler. Nötral pH'larda iyonlaşabilen yan gruplar $-COO^-$, H_3N^+ ve H_2N-C gruplarıdır ve bunlar kuvvetli elektrostatik bağlar oluşturabilirler. pH 3'ün altında karboksil grupları protonlanırlar ($-COOH$) ve elektrostatik bağ oluşturamazlar. pH 10'un üzerinde ise amonyum grupları protonlanırlar ($-NH_2$) ve elektrostatik bağlar oluşturamazlar (Whitaker, 2003)

Çay bitkisi PFO'nun en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'sını belirleyebilmek için standart reaksiyon karışımında pH'sı 4.3-7.0 arasında değişen tamponlar kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % nisbi aktivite olarak Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi pH değeri 4.03'ten 6.02'ye doğru artırıldıkça aktivite de artmış ve en yüksek aktivite 6.02'de görülmüştür. Optimum pH'dan sonra aktivitede az da olsa düşme görülmüştür. Enzim genel olarak geniş bir pH aralığında yüksek bir aktiviteye sahiptir. pH 4.5-7.0 arasında enzim aktivitesi % 63'ün üzerindedir.



Şekil 4.2. pH'nın çay bitkisi PFO aktivitesine etkisi

Değişik ürünlerde PFO ile yapılan optimum pH çalışma sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerden izole edilen PFO'nun optimum pH değerleri 3-7.5 gibi geniş bir aralıktadır ve bu çalışmada elde edilen sonuç (6.02) literatürdeki değerlerle uyum içindedir.

Çizelge 4.2. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO'ların Optimum pH Değerleri

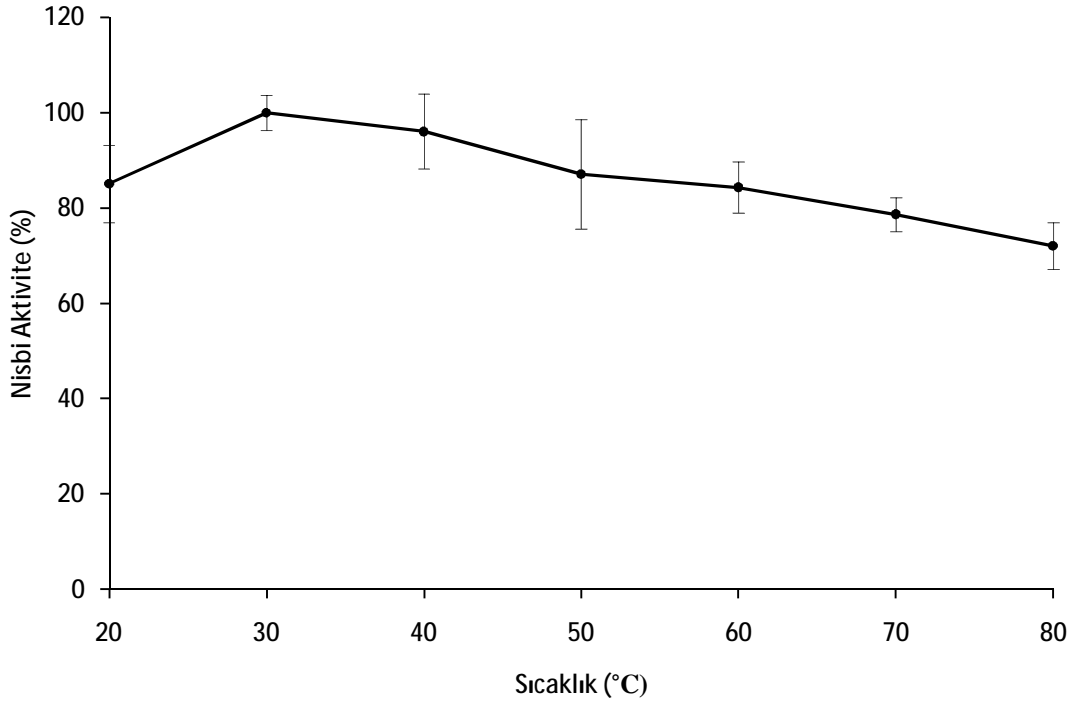
Optimum pH	Ürün	Substrat	Referans
7.5	Cassava kökleri	Kateşol, L-Dopa	Barthet,1997
7.0	Muşmula	4-Metil Kateşol	Ayaz ve ark., 2008
5.0 – 7.5*	Jonagored elması	Kateşol	Rocha ve Morais, 2001
5.0	Hint çay yaprağı	Kateşol	Halder ve ark., 1998
4.0 -7.0*	Zambak	Kateşol	Yang ve Wang, 2008
9.0	Fasulye sürgünleri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

* Enzimin iki optimum pH'sı bulunmuştur.

4.3. Optimum Sıcaklık

Kimyasal reaksiyonların hızı genellikle sıcaklıktaki artışla artar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları da sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler. Yüksek sıcaklıklar enzimatik reaksiyonda rol oynayan fonksiyonel grupların disosiyasyonunu etkileyebilir; enzimin aktivatörlere ve inhibitörlere ilgisini etkileyebilir; reaksiyonda substrat olabilecek oksijeninin çözünürlüğünü etkileyebilir. Bunların dışında, yüksek sıcaklık enzimleri inaktive edebilir. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum aktivitesi 30-40 °C'dir ve 45 °C'nin üzerinde denatürasyon başlar.

Çay bitkisi PFOsunun en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirleyebilmek için 20-80°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % nisbi aktivite olarak şekil 4.3'de verilmiştir. Ölçümlerde standart reaksiyon karışımı kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Sıcaklığın çay bitkisi PFO aktivitesine etkisi

Şekilden de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 30°C’de göstermiştir. 30°C’den itibaren sıcaklıktaki artışla beraber enzim aktivitesinde yavaş da olsa düşme gözlenmiştir. Ancak, enzim 20-80°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında yüksek aktivite göstermektedir. 80°C’de dahi % 72 gibi yüksek aktiviteye sahiptir.

Değişik ürünlerden izole edilen PFO ile yapılan optimum sıcaklık çalışma sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi değişik ürünlerin optimum sıcaklık değerleri 12-45 °C gibi geniş bir aralıktadır ve bu çalışmada elde edilen sonuç (30° C) literatürdeki değerlerle uyum içindedir.

Çizelge 4.3. Çeşitli Ürünlerden İzole Edilen PFO’ların Optimum Sıcaklık Değerleri

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

4.4. Substrat Spesifikliği

Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerlerini belirleyebilmek için pH 6.02 ve 30°C’de çeşitli konsantrasyonlarda kateşol, 4-metil kateşol, pirogallol ve kafeik asit kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ölçümler iki paralelli yapılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak her bir substrat için K_m ve V_{maks} değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4’de görülmektedir.

Çizelge. 4.4. Çay Yaprağı PFO'sunun Kinetik Parametreleri

Substrat	Substrat Konsantrasyonu (mM)	K_m (mM)	r^2	V_{maks} (Abs.dk ⁻¹)	V_{maks}/K_m Abs.dk ⁻¹ .mM ⁻¹
Kateşol	25.00 - 200.00	243.70	0.979	2.90	0.012
4-metil kateşol	6.25 - 100.00	10.30	0.999	1.80	0.174
Gallik asit	50.00 - 200.00	-	-	-	-
Pirogallol	200.00 - 400.00	3113.40	0.923	7.90	0.003
Kafeik asit	0.75 - 3.00	-	-	-	-

Çay bitkisi PFO enzimi, denenen substratlardan kafeik asit ve gallik asite karşı hiç aktivite göstermemiştir. Bir enzim için K_m maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu gösterir. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve bu değer ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksektir. K_m değerleri kıyaslandığında enzim ilgisinin en yüksek olduğu substrat 4-metil kateşoldür. V_{maks}/K_m oranı da enzim için en iyi substratı gösterir. Bu değer en yüksek olduğu substrat 4-metil kateşoldür. Bir başka ifadeyle, enzim için en iyi substrat 4-metil kateşol olmuştur. Halder ve ark.'nın çalışmalarında (1998) çay PFO'su için kateşin en iyi substrat olarak bulunmuştur (K_m : 0.49 mM), enzim monofenoller ve p-kuinolü okside edememiş, kateşölü okside edebilmiştir.

Çizelge 4.5'de değişik ürünlerden izole edilen PFO'nun K_m değerleri verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerden izole edilen PFO'ların K_m değerleri 3.4-230 mM gibi geniş bir aralıkta değişmektedir.

Çizelge 4.5. Çeşitli Ürünlerin PFO'larının K_m Değerleri

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

4.5. Termal İnaktivasyon

PFO'nun termal inaktivasyon kinetiği 70°C'de 5, 10, 15 ve 20 dk, 75°C'de 5, 10, ve 15 dk ve 80°C'de ise 2, 5, 10 dk sürelerde çalışılmıştır. Termal inaktivasyon parametreleri ısıtılma maruz kalmış enzimlerin aktivitelerinin ısıtılmamış örneğin aktivitesine kıyaslanmasıyla k_D (inaktivasyon sabiti), $t_{1/2}$ (yarı ömür) ve D (desimal indigenme süresi) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar çizelge 4.6'da verilmiştir. Sıcaklık arttıkça k_D değerleri artmış buna karşılık enzim aktivitesini yarı yarıya azaltmak için gereken süre ve D değerleri azalmıştır. 70°C'de enzimin yarı ömür değeri 52.9 dk iken 80°C'de 29.6 dk olmuştur. Bu değerlerden enzimin termal dayanırlılığının yüksek olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.6. Çay Yaprağı PFO'sunun Termal İnaktivasyon Parametreleri

Sıcaklık (°C)	k_D (dak ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (dak)	D (dak)
70	0.0131	0.7352	52.9	175.8
75	0.0159	0.9227	43.6	144.8
80	0.0234	0.9716	29.6	98.4

Termal inaktivasyon çalışmalarının diğer önemli parametreleri aktivasyon enerjisi (E_a) ve enzimin D değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı ifade eden Z değeridir. Bu çalışmada, Z ve E_a değerleri sırasıyla 39.68°C ($r^2=0.9645$) ve 58.301 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9614$) olarak hesaplanmıştır. Termal inaktivasyon parametrelerinin diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılması çalışılan sıcaklık ve sürelerdeki farklılıklar nedeniyle zordur. Çizelge 4.7'da değişik ürünlerden izole edilen PFO enzimlerinin aktivasyon enerjileri (E_a) değerleri görülmektedir. Bu değer ürüne göre ve hatta aynı üründe bile önemli farklılık göstermektedir. Çizelgeden görüldüğü gibi değişik ürünlerin aktivasyon enerji değerleri 15.80-225.43 kJ.mol⁻¹ gibi geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuç (58.301 kJ.mol⁻¹) literatürdeki değerler arasındadır.

Çizelge 4.7. Çeşitli Ürünlerden izole edilen PFO'ların Aktivasyon Enerjileri

Ürün	Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kJ.mol ⁻¹)	Referans
Victoria üzümü	225.43	Râpeanu ve Bulancea, 2005
Zambak	100.80	Yang ve Wang, 2008
Anamur muzusu	155.00	Ünal, 2007
Ananas püresi	82.80	Chutintrasria ve Noomhomb, 2006
Enginar başı	15.80	Aydemir, 2004

Z değerinin büyük olması enzimin ısı dayanıklılığının diğer bir göstergesidir. Râpeanu ve Bulancea (2005) Victoria üzümü PFO enzimi ile yaptıkları çalışmada enzimin Z değerinin 9.66°C olduğunu bulmuşlardır. Ünal (2007) çalışmasında Anamur muzusu PFO enziminin Z değerinin 14.2°C olduğunu bulmuştur. Chutintrasria ve Noomhomb (2006) çalışmalarında Ananas püresi PFO enziminin Z değerini 21.5°C bulmuşlardır. Bu değerlerle karşılaştırıldığında çay bitkisi PFO'sunun Z değeri oldukça yüksektir (Z=39.68°C). Bir başka ifade ile, çay bitkisi PFO enziminin ısı dayanıklılığı yüksektir.

Çay bitkisi PFO'sunun ısı direncinin yüksek olması kurutma aşaması bakımından önemlidir. Kurutma aşaması; ısı işlem uygulaması ve nem kaybı ile enzimatik reaksiyonlarının durdurulduğu ve ısı etkisi ile yeni bileşiklerin ortaya çıktığı önemli bir aşamadır. Sıcaklığa dayanıklı olduğu için PFO enzimini inaktive etmek için, sanayide kurutma aşamasında çaya ilk aşamada 120-140°C gibi yüksek sıcaklık uygulanır. Üretim metodu ile değişmekle beraber, daha sonra bu sıcaklık derecesi azaltılarak işleme devam edilir ve sıcaklık en son 90-100 °C'ye iner (Temple ve ark.,2001). Çay bitkisinde görülen enzimatik oksidasyon, kurutma safhasına geçilince birden kesilmez. Yani, bu safhada da yeni bileşikler oluşmaya devam eder. Su miktarının giderek azalması ve sıcaklık uygulaması ile kademeli olarak enzimatik oksidasyon yavaşlar ve kurutma işleminin sonunda tamamen durur. Bu işlemin uygun olmayan koşullarda yapılması istenmeyen bileşikler oluşmasına ya da arzulanan bileşiklerin oluşmamasına sebep olabilir. Bu da kaliteyi doğrudan etkileyecektir.

4.6. İnhibitörlerin Etkisi

İnhibitörler reaksiyon ortamına eklendiğinde enzim hızını azaltan doğal ya da yapay kimyasal maddelerdir. Bileşiklerin inhibe edici etkileri inhibitörün saflığına, konsantrasyonuna, enzimin kaynağına, substratın varoluşuna, pH ve sıcaklığa bağlıdır. PFO bir metallo proteindir. Şelat yapıcı ajanlarla inhibe edilebilir (etilendiamintetraasetat (EDTA), sodyum dietilditiokarbomat (DIECA) ve sodyum azid). Askorbik asidin inhibisyonu ile ilgili iki mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan ilkinde göre, askorbik asit enzimin aktif merkezindeki bakırla şelat oluşturarak inhibisyona neden olmaktadır. İkincisinde ise askorbik asit merkezdeki bakırı indirgemektedir. Sodyum disülfid, indirgeyici bir ajandır. İndirgeyici ajanlar gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ajanlar *o*-kinonların birikimini önlemek yolu ile melaninlerin oluşumunu inhibe eder veya stabil renksiz ürünler oluştururlar. L-sistein antioksidan özellikte bir maddedir (Zawistowski ve ark., 1991).

Bu çalışmada, askorbik asit, sodyum disülfid ve L-sisteinin çay bitkisi PFO'suna olan inhibe edici etkileri 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonlarda incelenmiştir. Sonuçlar % inhibisyon olarak Çizelge 4.8'de verilmiştir. Denenen tüm inhibitörlerde % 100 inhibisyon görülmemiş, en yüksek inhibisyon derecesi % 16.9'luk inhibisyon derecesi ile 1 mM konsantrasyonda sodyum disülfitle olmuştur. Askorbik asit ve sodyum disülfidin inhibe edici etkileri birbirine yakın olmuş, buna karşılık L-sistein en düşük inhibisyonu göstermiştir.

Çizelge 4.8. İnhibitörlerin Çay Yaprağı PFO'suna Etkileri

Inhibitör	Konsantrasyon(mM)	İnhibisyon (%)
Askorbik asit	0.01	12.7 ± 1.53
	0.10	14.5 ± 4.10
	1.00	15.5 ± 0.92
Sodyum disülfid	0.01	6.4 ± 0.21
	0.10	7.9 ± 1.99
	1.00	16.5 ± 0.46
L-Sistein	0.01	Yok
	0.10	3.3 ± 1.70
	1.00	6.6 ± 2.10

Halder ve ark. (1998) Hint çay yaprağı PFO'su üzerine yaptıkları çalışmalarda enzimin 2 mM tropolone ile tamamen inhibe olduğunu bulmuşlardır. Gregory ve ark.'ın (1966) çay bitkisi PFO'su üzerine yaptıkları çalışmada ise 1 mM potasyum siyanide ile tam inhibisyon gerçekleşmiştir. Dietilamonyum dietilditiokarbameyt 5 mM konsantrasyonda enzimi tamamen inaktif etmiştir. Bu iki inhibitör de zamana-bağlı etki göstermişlerdir. 10mM tioürea, %80 inaktivasyona yol açmıştır. Sodium EDTA (10mM),doymuş 8-hidroksikinolin and 10mM kloroasetofenon inhibe edici etki göstermemişlerdir.

Yang ve Wang'ın (2008) zambak bitkisi PFO'su üzerine yaptıkları çalışmada en etkili inhibitör sodyum sülfid (0.1 mM) bulunurken, askorbik asit, L-sistein ve tioüreadanın yüksek konsantrasyonlarda (10 mM) oldukça etkili inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur. NaCl ve sitrik asit bu bitki enzimi için zayıf inhibitörler olarak belirtilmiştir. Nagai ve Suzuki'nin (2003) fasulye filizi PFO'su üzerine yaptıkları çalışmada 3 mM konsatrasonda askorbik asit, L-sistein, 2-merkaptolan ve glutatyon etkili inhibitörler olarak gösterilmiştir. Ünal'ın (2007) Anamur muzu PFO'su üzerine yaptığı çalışmada askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitörler olarak bulunmuştur. NaCl ve sitrik asit daha az etkili bulunmuştur. Ziyen ve Pekyardımcı'nın (2003) Ankara armudu PFO'su üzerine yaptıkları çalışmada sodium dietilditiyokarbameyt en etkili inhibitör olarak bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada çay yaprağından izole edilerek kısmen saflaştırılan Polifenol oksidaz'ın (PFO) biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, substrat spesifikliğı ve termal inaktivasyonu incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan;

- Denenen substratlara enzimin ilgisinin düşük olduğı, kafeik asit ve gallik asite karşı hiç aktivite göstermediğı ve enzim ilgisinin en yüksek olduğı substratın 4-metil kateşol olduğı,
- pH 4.03'ten 6.02'ye doğru artırıldıkça aktivitenin de arttığı, en yüksek aktivitenin 6.02'de görüldüğü ve enzimin pH 4.5-7.0 gibi geniş bir aralıkta yüksek aktivite gösterdiği,
- En yüksek aktivitenin 30 °C'de olduğı, 30 °C'den itibaren enzim aktivitesinin yavaşça düştüğü, ancak yine de, enzimin 20-80°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında yüksek aktivite gösterdiği,
- Enzimin Z değerinin 39.68°C ($r^2=0.9645$) olduğı ve termal stabilitesinin yüksek olduğı,
- En düşük inhibisyon etkisinin L-sistein'de görüldüğü, askorbik asit ve sodyum disülfid'in 1 mM konsantrasyonda inhibisyon etkilerinin yakın olduğı bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- ALTAN, A., 2003. Özel Gıdalar Teknolojisi, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset Atolyesi, Adana, 179-197.
- FAO, 2000. Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C., Report on “Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods”.
- FAO, 2008. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental Group on Tea, Current Situation And Medium-Term Outlook, Eighteenth Session, Hangzhou, China, 14 – 16 May 2008.
- ARSLAN, O., ERZENGIN, M., SINAN, S. ve ÖZENSOY, O., 2004. Purification of Mulberry (*Morus alba l.*) Polyphenol Oxidase by Affinity Chromatography and Investigation of Its Kinetic and Electrophoretic Properties, Food Chemistry, 88: 479–484.
- AYAZ, F.A., DEMİR, O., TORUN H., KOLCUOĞLU Y., ÇOLAK, A., 2008. Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) and Total Phenolic Contents in Medlar (*Mespilus germanica L.*) Fruit During Ripening and Over Ripening, Science Direct, Food Chemistry, 106: 291–298.
- AYDEMİR, T., 2004. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Heads, Food Chemistry, 87: 59–67.
- BAJAJ, K. L., ANAN, T., TSUSHIDA T., ve IKEGAYA K., 1987. Effects of (-)-Epicatechin on Oxidation of Theaflavins by Polyphenol Oxidase from Tea Leaves, Agricultural Biology and Chemistry, 51 (7): 1767-1772.
- BARTHET, V. J. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot Esculenta C.*) Root: Extraction, Purification and Characterization, Submitted to Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGiU (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- BRADFORD, M. M., 1976. a Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

- CHUTINTRASRIA, B. ve NOOMHORMB, A., 2006. Thermal Inactivation of Polyphenoloxidase in Pineapple Puree, *LWT - Food Science and Technology*, 39: 492–495.
- COSETENG, M. Y. ve LEE, C. Y., 1987. Changes in Apple Polyphenol Oxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning, *Journal of Food Science*, 52: 985-989.
- DEMİR, A., 2002. Çay, T.E.A.E.-Bakış, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, (1/10) 1-4, <http://www.gdf.org.tr/tr/rapor/TEAE/2002/cay2002.pdf> (En son erişim tarihi: 23.09.2008).
- DELICADO, E. N, MEGÍAS, M.S., LOPEZ, A.J.P., NICOLA'S, J.M.L., 2007. Characterization of Polyphenol Oxidase from Napoleon Grape, *Food Chemistry*, 100: 108–114.
- DOĞAN, M., ARSLAN, O. ve DOĞAN, S., 2002. Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Different Aubergine Cultivars *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 415-423.
- ERAT, M., SAKIROGLU, H. ve KUFREVIOGLU, O. I., 2006. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Ferula* sp., *Food Chemistry*, 95: 503–508.
- ESPIN, J.C., TUDELA, J. ve GARCIA-CANOVAS, F., 1997. Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Artichoke Heads (*Cynara scolymus L.*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30: 819-825.
- GREGORY, R. P. F. ve BENDALL, D. S., 1966. The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis L.*), *Biochemical Journal*, 101: 569-581.
- HALDER, J., TAMULI, P. ve BHADURI, A.N., 1998. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*), *Nutritional Biochemistry*, 9: 75-80.
- KOOLMAN, J. ve ROEHM, K. H., 2005. *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd Edition Thieme, Stuttgart, 88-94.

- MAHANTA, P. K., BORUAH, S.K., BORUAH, H.K., ve KALITA, N.J., 1993. Changes of Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities and Pigment Composition of Some Manufactured Black Teas (*Camellia sinensis L.*) Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41: 272-276.
- MARANGONI, A. G., 2003. Enzyme Kinetics: A Modern Approach, New Jersey: John Wiley & Sons, 140-157.
- MAYER, A. M. ve HAREL, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants, Phytochemistry, 193-215.
- NAGAI, T. ve SUZUKI, N., 2003. Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max L.*), Journal of Food Science (68) issue 1, 16-20.
- PETERSON, J., DWYER, J., JACQUES, P., RAND, W. , PRIOR, R. ve CHUI, K., 2004. Tea variety and Brewing Techniques Influence Flavonoid Content of Black Tea, Journal of Food Composition and Analysis, 17: 397–405.
- RAPEANU, G., LOEY, A. V., SMOUT, C. ve HENDRICKX, M., 2006. Biochemical Characterization and Process Stability of Polyphenoloxidase Extracted from Victoria Grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*) . Food Chemistry, 94: 253-261.
- RAPEANU, G. ve BULANCEA, M., 2005. Thermal Inactivation Kinetics of Polyphenoloxidase Extracted from White Grapes, Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, Vol. IX, no.1.
- ROCHA, A.M.C.N. ve MORAIS, A.M.M.B., 2001. Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) Extracted from "Jonagored" Apple, Food Control, 12: 85-90.
- SERRADELL, M. A., ROZENFELD, P. A., MARTINEZ, G. A., CIVELLO, P. M., CHAVES, A. V. ve ANON, M. C., 2000. Polyphenoloxidase Activity From Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and Partial Purification, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 1421-1427.
- SHAHIDI, F. ve NACZK, M., 2003. Phenolics in Food and Nutraceuticals CRC Press; part 5, Phenolic Compounds of Beverages, 241-248, Part 10, Methods of Analysis and Quantification of Phenolic Compounds, 483-530.

- SPILE, G. A., 1997. Caffeine, Chapter 3. Tea: The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage, CRC Press, 1-38.
- TEMPLE, S.J., TEMPLE, C.M., VAN BOXTEL A.J.B. ve CLIFFORD M.N., 2001. The Effect of Drying on Black Tea Quality, Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 764-772.
- ÜNAL, M. Ü., 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*), Food Chemistry, 100: 909-913.
- ÜNAL, M. Ü. 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: 2374–2379.
- VENKATESAN, S., SENTHURPANDIAN, V.K., MURUGESAN, S., MAIBUAM, W. ve GANAPATHY, M.N.K., 2006. Quality standards of CTC black teas as influenced by sources of potassium fertiliser, Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 799–803.
- WHITAKER, J. R., 2003. Enzyme Catalyzed Reactions: Experimental Factors that Affect Rates, Handbook of Food Enzymology (Editörler; Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. ve Wong D. W. S) Marcel Dekker, New York, 31-65.
- WRIGHT, L. P., 2002. Biochemical Analysis for Identification Quality of Black Tea (*Camellia sinensis*). Submitted to Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor (Biochemistry), in the Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Biochemistry, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, 200s.
- YAĞAR, H., 2004. Some Biochemical Properties of Poliphenol Oxidase from Celery, Preparative Biochemistry and Biotechnology, (4) 34: 378-397.
- YANG, Y. ve WANG, Z., 2008. Some Properties of Polyphenol Oxidase from Lily, International Journal of Food Science and Technology, 43: 102–107.
- YEMENICIOĞLU, A., ÖZKAN, M. ve CEMEROĞLU, B., 1997. Inactivation Kinetics of Apple Polyphenoloxidase and Activation of its Latent Form, Journal of Food Science, No. 3, 62: 508-510.

- ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G. ve ESKIN, N.A.M., 1991. Polyphenol Oxidase. In: Oxidative Enzymes in Foods, Editörler; D.S. Robinson ve N.A.M. Eskin, Elsevier Science Publishers Ltd., 217-273.
- ZIYAN, E. ve PEKYARDIMCI, S., 2003. Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Turkish Journal of Chemistry 27: 217- 225.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde lisans öğrenimime başladım. 2005 yılında Gıda Mühendisi unvanı ile mezun oldum. Yine aynı sene Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Yüksek lisans eğitimimin bir kısmını, Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında, Yunanistan’ın Girit Adası’ndaki “Mediterranean Agronomic Institute of Chania”da tamamladım (2006-2007).