



**ÇAY YAPRAKLARINDAN (*Camellia sinensis* L.) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Cansu YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAY YAPRAKLARINDAN (*Camellia sinensis* L.) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Cansu YILMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her Hakkı Saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**ÇAY YAPRAKLARINDAN (*Camellia Sinensis* L.) POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Cansu YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 19/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oyçokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25./02./2016 tarih ve 9./37 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇAY YAPRAKLARINDAN (*Camellia sinensis* L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Cansu YILMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Polifenol oksidaz enzimi sebze ve meyvelerde kararmaya neden olur. Bu çalışmada, bu enzim Rize yöresinden toplanan çay yapraklarından (*Camellia sinensis* L.) Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak ilk kez saflaştırıldı. Enziminin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı. Katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak, PFO enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, stabil pH, K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Enzimin iki ayrı substrat için sırasıyla optimum pH'sı 9,0-8,5, optimum sıcaklığı 10°C, optimum iyonik şiddeti 0,05 M, stabil pH'sı 5,5, K_M değeri 3,782-3,881 mM, V_{max} değeri 1,676-1,912 $\mu\text{mol/dk}$ olarak belirlendi. İnhibitör çalışmalarında substrat olarak katekol kullanılarak, sodyum metabisülfid, sodyum sülfid, ditiyoeritritol, glutatyon, askorbik asit inhibitörleri ile çalışıldı. Bu inhibitörler için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda IC_{50} değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla bu inhibitörler için K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlendi. K_i sabitleri ve IC_{50} değerlerine göre en etkili inhibitörün sodyum metabisülfid olduğu tespit edildi.

2016, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çay yaprağı, polifenol oksidaz, afinite kromatografisi, karakterizasyon, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM TEA LEAVES (*Camellia sinensis* L.) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION THE EFFECT OF SOME CHEMICALS ON THE ENZYME ACTIVITY

Cansu YILMAZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Advisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Polyphenol oxidase enzyme causes the enzymatic browning in some fruits and vegetables. In this study polyphenol oxidase (PPO) enzyme was purified from tea leaves (*Camellia sinensis* L.) from Rize region origin using sepharose 4B-L-tyrosine p-amino benzoic acid affinity chromatography for the first time. The purity of the enzyme was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum pH, optimum temperature, optimum ionic strength, stable pH, K_M and V_{max} values of PPO enzyme were determined using catechol, 4-metil catechol as substrate. The optimum pH and temperature of PPO were determined as 9.0-8.5, 10°C. Optimum ionic strength of this enzyme was found as 0.05 M for both substrates. K_M constants and V_{max} values of enzyme for the used two substrates were found as 3.782-3.881 mM and 1.676-1.912 $\mu\text{mol/dk}$, respectively. Sodium metabisulfite, sodium sulfate, dithioerythritol, glutathione, ascorbic acid inhibitors were studied in inhibitor studies using catechol as the substrate. IC_{50} values were determined in five different inhibitor concentrations for these inhibitors. K_i constant and the types of inhibition of these inhibitors were determined by using Lineweaver-Burk graphics. Sodium metabisulfite was appointed to be the most effective inhibitor according to the K_i constants and values of IC_{50} .

2016, 80 pages

Keywords: Tea leaf, polyphenol oxidase, affinity chromatography, characterization, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU'na,

Biyokimya çalışmalarım boyunca her türlü yardımını esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkısı olan Sayın Arş. Gör. Mine AKSOY'a, her türlü manevi desteğini gördüğüm Neslihan BALCI'ya, Songül BAYRAK'a, Dilek TEKE'ye, ayrıca Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma teşekkürü ve minneti bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum.

Cansu YILMAZ

Şubat, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çay Bitkisinin Morfolojik Özellikleri	1
1.2. Dünyada ve Türkiye’de Çay Üretimi ve Tüketimi.....	2
1.3. Çayın Sınıflandırılması.....	3
1.3.1. Yeşil çay	3
1.3.2. Oolong çay	3
1.3.3. Siyah çay	4
1.4. Çay Bitkisinin Bileşimi	4
1.4.1. Çay bitkisinin genel bileşimi	4
1.4.1.a. Yeşil çay yaprağının önemli bileşenleri	5
1.4.1.b. İşlenmiş çayın önemli bileşenleri	8
1.5. Enzimatik Kararma.....	10
1.6. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	12
1.6.1. PFO’nun substratları.....	15
1.6.1.a. Flavonoidler.....	15
1.6.1.b. Basit fenoller	18
1.6.2. PFO’nun aktivatörleri.....	19
1.6.3. PFO enzimin inhibitörleri ve enzimatik kararmanın önlenmesi	20
1.7. Çalışmanın Amacı	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	30

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	30
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	31
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Protein tayini	35
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	35
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini.....	35
3.2.2. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi tayini.....	36
3.2.3. Çay yapraklarından polifenol oksidaz enziminin izolasyonu ve saflaştırma çalışmaları.....	37
3.2.3.a. Çay yapraklarının temini ve ham ekstrakt hazırlanması	37
3.2.3.b. Diyaliz	38
3.2.4. PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	38
3.2.4.a. Afinite jelinin hazırlanması	38
3.2.4.b. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması	39
3.2.4.c. L-Tirozinle modifiye edilen Sepharose-4B'ye p-aminobenzoik asidin bağlanması.....	39
3.2.4.d. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu.....	40
3.2.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	41
3.3. Çay Yapraklarından Saflaştırılan PFO Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları	42
3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	42
3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	43
3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	43
3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi.....	43
3.3.5. Farklı substratlar için optimal şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması ..	44
3.3.6. Farklı inhibitörler için K_i sabitlerinin ve IC_{50} değerlerinin bulunması	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. Polifenol Oksidaz Enzimi İle İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	46
4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	46
4.2. Çay Yaprığı PFO Enziminin Saflaştırması İle İlgili Sonuçlar.....	47
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları	47

4.3. SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi İle PFO Enzim Saflığının Kontrolü	48
4.4. Çay Yapağı PFO Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	
Sonuçları.....	48
4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	48
4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları	50
4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları.....	52
4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları	53
4.4.5. Farklı substratlar için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	57
4.5. Çay Yapağı PFO Enzimi Üzerine Bazı Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	58
4.5.1. Çay yapağı PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	58
4.5.2. Çay yapağı PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	66
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	Mikrolitre
C	Katekin
DTT	Ditiyoeritritol
E	Enzim
E.C.	Enzim komisyon
EC	Epikatekin
ECG	Epikatekin gallat
EGC	Epigallokatekin
EGCG	Epigallokatekin gallat
EÜ	Enzim ünitesi
GC	Gallokatekin
GSH	Glutatyon
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PER	Amonyum per sülfat
PFO	Polifenol oksidaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TF	Teaflavinler
TR	Tearubijinler
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Basit teaflavinin yapısı	9
Şekil 1.2. Tearubijinlerin genel yapısı	9
Şekil 1.3. Katekinin ve epigallokatekinin o-kinonlara oksidasyonu.....	10
Şekil 1.4. Oksitlenmiş katekinler'den teaflavin oluşumu	10
Şekil 1.5. Monofenollerin o-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi).....	13
Şekil 1.6. o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)	13
Şekil 1.7. PFO Enzim katalizi.....	14
Şekil 1.8. PFO'nun bakır merkezleri	14
Şekil 1.9. Flavonoidlerin genel yapısı.....	15
Şekil 1.10. Katekinlerin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.11. Lökoantosiyaniidlerin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.12. Antosiyaniinlerin kimyasal yapısı	17
Şekil 1.13. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.14. Klorogenik asidin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.15. Kafeik asidin (3,4-dihidroksi sinamik asit) kimyasal yapısı	18
Şekil 1.16. p-kumarik asidin (4- hidroksi sinamik asit) kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.17. Bazı fenollerin kimyasal yapısı	19
Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları	40
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	46
Şekil 4.2. Çay yaprağı PFO enziminin afinite kolonundan elüsyon grafiği	47
Şekil 4.3. Çay yaprağı PFO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı	48
Şekil 4.4. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM katekol substratıyla elde edilen aktivite-pH grafiği	49
Şekil 4.5. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-pH grafiği.....	50
Şekil 4.6. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-konsantrasyon grafiği	51

Şekil 4.7. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-konsantrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.8. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM katekol substratıyla elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği.....	53
Şekil 4.9. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği	53
Şekil 4.10. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'sını belirlemek için asetat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği	54
Şekil 4.11. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'sını belirlemek için fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği	55
Şekil 4.12. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği	56
Şekil 4.13. Çay yaprağı PFO enzimi için katekol substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	57
Şekil 4.14. Çay yaprağı PFO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	58
Şekil 4.15. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfid'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Sodyum sülfid] grafiği	59
Şekil 4.16. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfid farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Sodyum metabisülfid] grafiği.....	59
Şekil 4.17. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine ditiyoteritrol farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [DTT] grafiği	60
Şekil 4.18. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asit farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Askorbik asit] grafiği	60
Şekil 4.19. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine Glutasyon farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [GSH] grafiği	61
Şekil 4.20. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfid'in inhibisyon etkisi	62

Şekil 4.21. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfıt'in inhibisyon etkisi	63
Şekil 4.22. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine ditiyoeritritol'ün inhibisyon etkisi	63
Şekil 4.23. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asit'in inhibisyon etkisi	64
Şekil 4.24. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi	64



ÇİZELGELER DİZİNİ

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. Genç çay sürgünlerindeki önemli bileşenlerin yaklaşık yüzdeleri	7
Çizelge 1.4. Suda çözünen siyah çay bileşenlerinin başlıcaları	8
Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı.....	34
Çizelge 3.2. Çay yapraklarından PFO enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	37
Çizelge 4.1. Çay yaprağı afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları.....	47
Çizelge 4.2. Çay yaprağı PFO enzimi için iki farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen aktivite değerleri.....	49
Çizelge 4.3. Çay yaprağı PFO enziminin için, iki farklı substrat için farklı konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerleri.....	51
Çizelge 4.4 Çay yaprağı PFO enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	52
Çizelge 4.5. Çay bitkisi PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için asetat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları	54
Çizelge 4.6. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları	55
Çizelge 4.7. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları	56
Çizelge 4.8. Çay yaprağı PFO enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	58
Çizelge 4.9. Çay PFO enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC_{50} değerleri.....	61
Çizelge 4.10. Çay yaprağı PFO enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan kimyasal bileşikler.....	65

1. GİRİŞ

1.1. Çay Bitkisinin Morfolojik Özellikleri

Çay bitkisi “*Theaceae*” familyasının “*Camellia*” cinsine (*Camellia sinensis* L.) ait her mevsim yeşil kalan, çok yıllık bir bitkidir (Caffin *et al.* 2004). *Camellia sinensis*’in 3 çeşidi vardır. Bunlardan birincisi Çin, Japonya ve Tayvan’da yetiştirilen *Camellia sinensis* varyete *sinensis* (Çin çayı)’dır. Bu çay çeşidi soğuğa dayanıklıdır. İkincisi Sri Lanka, Hindistan, Bangladeş ve Endonezya gibi tropik iklim bölgelerinde yetişen *Camellia sinensis* varyete *assamica* (Assam çayı)’dır (Chan *et al.* 2007). Üçüncüsü ise *Camellia sinensis* varyete *irrawadiensis*’tir (Spille 1997). Ülkemizde yetiştirilen çaylar genellikle Çin varyetesidir ve bunların hibritleri de bulunmaktadır (Tüfekci and Güner 1997).

Çay ağacı, yaklaşık olarak 20-30 m yüksekliğe ulaşabilir (Caffin *et al.* 2004). Yılda 15-20 cm kadar büyümektedir. Fakat bu durum, çay hasatının zorlaştırmakta ve verimi düşürmektedir. Bu yüzden belirli zamanlara budama yapılır (Ravichandran 2004). Çay bitkisi yüksek düzeyde yıllık yağış ve neme ihtiyaç duyar. Yüksek oranlarda verim elde edebilmek ve bitki gelişimi için hava sıcaklığı 18-30°C, toprak sıcaklığı ise 20-25°C olmalıdır. En iyi verimi asitli topraklarda (pH:5,0-5,6) gösterir (Mehra and Baker 2007). Çay bitkisi genel olarak yüksek bölgelerde yetiştirilir. Hindistan, Sri Lanka ve Kenya’da 2000 m yüksekliklere kadar çay tarımı yapılmaktadır (Chan *et al.* 2007). Çay üretimi için, çay bitkisinin sürgün ucundan iki yaprak ve bir tomurcuğun (buna 2,5 yaprak adı verilir) kullanılması önerilir ve istenir. Bunun nedeni, kalite açısından önem taşıyan çeşitli maddelerin genç yapraklarda ve tomurcukta yoğun olarak toplanmış olmasıdır. Çay yaprakları ve tomurcuk, bitkinin gelişme oranına bağlı olarak tropik bölgelerde 1 veya 2 hafta aralıklarla toplanmasına rağmen ülkemizde 5-7 hafta aralıklarla toplanmaktadır. Çay bitkisi kış dinlenmesi olarak bilinen dinlenme sürecine girer. Bu süre içerisinde bitkinin düşük sıcaklığa maruz kalması, bitkide reaktif oksijen türlerinin artmasına ve bu nedenle bitkide oksidatif strese neden olur. Sonuç olarak bitkide hücresel zararlar ortaya çıkmaktadır (Vyas and Kumar 2005).

1.2. Dünyada ve Türkiye’de Çay Üretimi ve Tüketimi

Dünyada yıllık yaklaşık olarak 3.645.200 ton çay üretimi yapılmaktadır. Bunun %78’i siyah çay, %20’si yeşil çay ve %2’si de oolong çaydır (Rio *et al.* 2004). Ülkemiz dünyada çay üretimi açısından beşinci sırada yer almaktadır. Çizelge 1.1’de 2006 verilerine göre dünyada en çok çay üretimi yapan ülkelerin üretim değerleri ve dünya çapındaki üretim yüzdeleri verilmiştir. Çizelge 1.2’de ise en çok tüketim yapan ülkeler ve yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya çay üretiminde lider olan ülkeler, üretim değerleri ve dünya çay üretimindeki payları (%) (FAO 2008)

Üretim Miktarlarına 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 Tüketim 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	179,9	4,83
6	İngiltere	161,3	4,43

1.3. Çayın Sınıflandırılması

Ticari çaylar üretim yöntemine göre 3 ana sınıfa ayrılmaktadır.

- 1) Fermente olmayan Yeşil Çay
- 2) Yarı fermente Oolong Çay
- 3) Fermente olmuş Siyah Çay (Fernández *et al.* 2003; Wheeler and Wheeler 2004).

1.3.1. Yeşil çay

Geleneksel alkolsüz bir içecek olan yeşil çay Çin ve Japonya'da tüketilmektedir (Yoshida *et al.* 1999). Yeşil çay, fenolik bileşikleri oluşturan katekinlerin enzimatik reaksiyonuna izin vermeden oluşturulan bir çay çeşididir, yani çay yapraklarının fermentasyona uğratılmamasıdır (Zhen 2002). Yeşil çayın rengi katekinlerin oksidasyona uğramaması nedeniyle oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir. Antioksidatif ve antikarsinogenik özelliklere sahip bileşikleri arasında yer alan ve yeşil çayın ağırlıkça %20'sini oluşturan katekinlerin, oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Wang and Helliwell 2000). Fermentasyon işlemi katekin miktarında önemli oranda azalmaya neden olduğu için yeşil çay, oolong ve siyah çaylardan daha fazla katekin içermektedir (Cabrera *et al.* 2003). Yeşil çayda katekinlerden en fazla EGCG bulunmaktadır. Bunu sırasıyla EGC, ECG, EC, CG, GC ve C izlemektedir (Goto *et al.* 1996; Lin *et al.* 1996; Zuo *et al.* 2002; Nishitani and Sagesaka 2004; Perva-Uzunalic *et al.* 2006).

1.3.2. Oolong çay

Oolong çay, Çin ve Tayvan'da yaygın olarak tüketilen bir çay çeşididir (Satoh *et al.* 2005). Oolong çayın üretiminde ise karmaşık bir yarı fermentasyon işlemi uygulanmaktadır. Karakteristik özellikleri bakımından oolong çay, siyah çay ile yeşil çay arasında yer almaktadır (Wang *et al.* 2000). Kullanılan çay bitkisinin özel koşullarda yetiştirilmesi ve özel bir üretim tekniği ile üretilmesi nedeniyle oolong çay

yoğun bir aromaya ve doğal çiçek kokusuna sahiptir (Zhan and Xu 2004). Oolong çayın yapısında bulunan katekinlerin polimerizasyonu sonucunda oluşan polifenol bileşikleri, yeşil ve siyah çaydan farklılıklar gösterir (Matsui 2004) ve katekin, teaflavin ve tearubijinlerin karışımından oluşmaktadır (Wheeler and Wheeler 2004).

1.3.3. Siyah çay

Siyah çay, özellikle Batı Avrupa, Amerika, Avustralya ve bazı Asya ülkelerinde tüketilmektedir (Wheeler and Wheeler 2004). Siyah çay üretimi için çoğunlukla polifenol içerikleri daha fazla olan Assam çeşitleri kullanılmaktadır (Astill *et al.* 2001).

1.4. Çay Bitkisinin Bileşimi

1.4.1. Çay bitkisinin genel bileşimi

İşlenmemiş çay yapraklarının kimyasal bileşimi, çevresel faktörleri ve üretim yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Kuroda and Hora 1999). Çay yaprağının yaklaşık olarak %80'ini su oluşturur. Çayın en önemli bileşenleri fenolik maddeler ve alkaloidlerdir. Ayrıca çayın yapısında 26 çeşit aminoasit bulunur ve bunların en önemlisi theanindir (Yao *et al.* 2006). Theanin yeşil çaya tat ve koku vermektedir (Juneja *et al.* 1999).

Çay yaprağında bulunan maddeler:

- **Fenolik Bileşikler:**

Flavanoller

Flavonoller ve flavonol glikozidler

Lökoantosiyeninler

Fenolik Asitler ve depsidler

- **Fenolik Olmayan Bileşikler:**

Kafein

Amino asitler ve proteinler

Şekerler ve polisakkaritler

Organik asitler

Lipidler

Klorofil ve karotenoidler

Uçucu bileşikler

Ham selüloz

Kül

- **Enzimler**

Polifenol oksidaz enzimi

Pektin metil esteraz enzimi

Peroksidaz enzimi

Fosfatazlar

- **Vitaminler**

B₂ vitamini

C vitamini

1.4.1.a. Yeşil çay yaprağının önemli bileşenleri

Çay yaprağının bileşimindeki birçok reaksiyon ürünü kafeinle etkileşir ve çayın aromasını değiştirerek önemli sorunlara yol açar (Spille 1997). Metilksantin ve polifenol bileşikleri içeren çay bitkisi, popülerliğini bu iki bileşikten almaktadır. Çay

yaprağının kimyasal yapısı, iklim koşulları, mevsim gibi sebeplerden dolayı değişiklik gösterir (Venkatesan *et al.* 2006).

Fenolik maddeler (polifenoller), çayın en önemli bişenleridir. Flavanoller, flavonoller ve flavonol glikozitler, flavandioller ve fenolik asitler olmak üzere 4 ana grup altında toplanırlar. Çayın yapısında fazla miktarda bulunan ve oldukça önem taşıyan flavanoller; katekinler ve gallokatekinler ile birlikte bunların gallatları oluşturur (Öksüz 1987). Katekinler renksiz ve suda çözünen bileşikler olup, miktarları kuru çay ağırlığının %20-30'u kadardır (Wang *et al.* 2000). Toplam katekin miktarları açısından yeşil çayın birinci sırada yer aldığı ve bunu sırasıyla oolong ve siyah çayın takip ettiği saptanmıştır (Lin *et al.* 2003). Aynı şekilde en fazla katekin miktarının yeşil (%26,7), daha sonra oolong (%23,2) ve en az siyah çayda (%4,3) bulunduğu belirtilmektedir (Chan *et al.* 2007).

Çay bitkisinin en önemli bileşenlerinden olan PFO enzimi yaprak dokusunda bulunur ve oksijenle katekinlerin oksidasyonunu katalizler. PFO bakır içeren bir enzimdir ve farklı izoenzimleri vardır. Bu enzim çay yaprağının epidermisinde yoğundur (Spille 1997).

Proteinler ve aminoasitler, kuru madde üzerinden çayın yaklaşık %15-23'ünü oluşturur. Bu proteinlerin bazıları suda çözünmez. Bitkilerde yaygın olarak bulunan aminoasitler de çayda bulunur. Ayrıca çaya özgü 8-N-etil glutamin yapısında theanin amino asiti bulunur ve yeşil çay yaprağının yaklaşık %2 kadarını oluşturur.

Yeşil çayda bulunan karbohidratlar; sakkaroz, fruktoz, maltoz, glukoz, arabinoz, riboz, rafinoz ve ramnoz şekerleridir (Hilton 1973; Kirk-Othmer 1983).

Çizelge 1.3. Genç çay sürgünlerindeki önemli bileşenlerin yaklaşık yüzdeleri (Hilton 1973; Kirk-Othmer 1983)

Bileşen	% Miktarı (Kuru madde üzerinden)
<u>Soğuk suda çözünenler</u>	
Flavanoller (Katekinler): Epigallokatekin gallat (EGCG)	9-13
Epigallokatekin (EGC)	3-6
Epikatekin gallat (ECG)	3-6
Epikatekin (EC)	1-3
Gallokatekin (GC)	1-2
Katekin (C)	1-2
Flavonoller ve flavonol glikozitler	3-4
Flavondioller (Leucoantosiyaniidler)	2-3
Fenolik asitler	4
Fenolik maddeler toplamı	~30
Kafein	3-4
Aminoasitler: Theanin	2
Diğerleri	2
Karbohidratlar	4
Organik asitler	0,5
<u>Sıcak suda kısmen çözünenler</u>	
Polisakkaritler: Nişasta	2,5
Diğerleri	12
Proteinler	15
İnorganik maddeler	5
<u>Suda çözünmeyenler</u>	
Selüloz	7
Lignin	6
Lipidler	3
Pigmentler	0,5
Uçucu maddeler	0,1

1.4.1.b. İşlenmiş çayın önemli bileşenleri

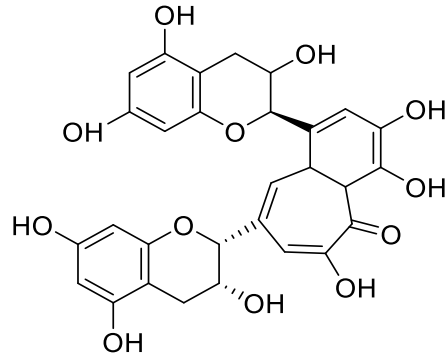
Yeşil çay, siyah çaya dönüşürken bir seri kimyasal yapı değişikliğe uğrar. Bu değişiklikler sonunda, flavanollerin %90'ı, flavandiollerin tamamı, flavonollerin %20'si, fenolik asitlerin bir kısmı bozunur. İşlenmiş çaydaki suda çözünen madde miktarı Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Suda çözünen siyah çay bileşenlerinin başlıcaları (İçen 2001)

Bileşen	%Miktarı (Kuru madde üzerinden)
<u>Suda çözünenler</u>	
Oksitlenmemiş flavanoller	1-3
Flavonoller ve flavonol glikozitler	2-3
Fenolik asitler	4
Teaflavinler	1-2
Diğer fenolik maddeler (Tearubijinler, vs)	7-17
Kafein	3-4
Aminoasitler ve peptitler	5
<u>Kısmen çözünenler</u>	
Protein	15
Polisakkaritler	14
Mineral maddeler (kül)	4,5-9
Aroma maddeleri	Eser

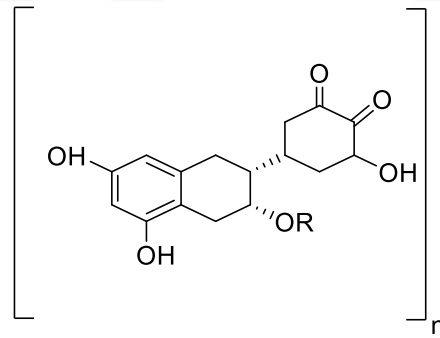
Siyah çayın oluşumu esnasında, yaprakların oksidasyona uğratılmasıyla biyokimyasal değişiklikler oluşur ve çayın karakteristik aroması ve kalite bileşenleri meydana gelir. Yaprakların kloroplastında bulunan PFO enzimi oksidasyon esnasında, katekinlerle oksijen varlığında reaksiyona girer (Lopez *et al.* 2005) ve teaflavinler (TF), tearubijinler (TR) oluşur.

Yeşil çaydaki katekinlerden ve gallokatekinlerden enzim katalizli oksidatif kenetlenme sonucu oluşan teaflavinler, parlak ve portakal sarısı rengi sahiptirler. Çaydaki bu maddenin miktarı arttıkça, çayın kalitesi artmaktadır.



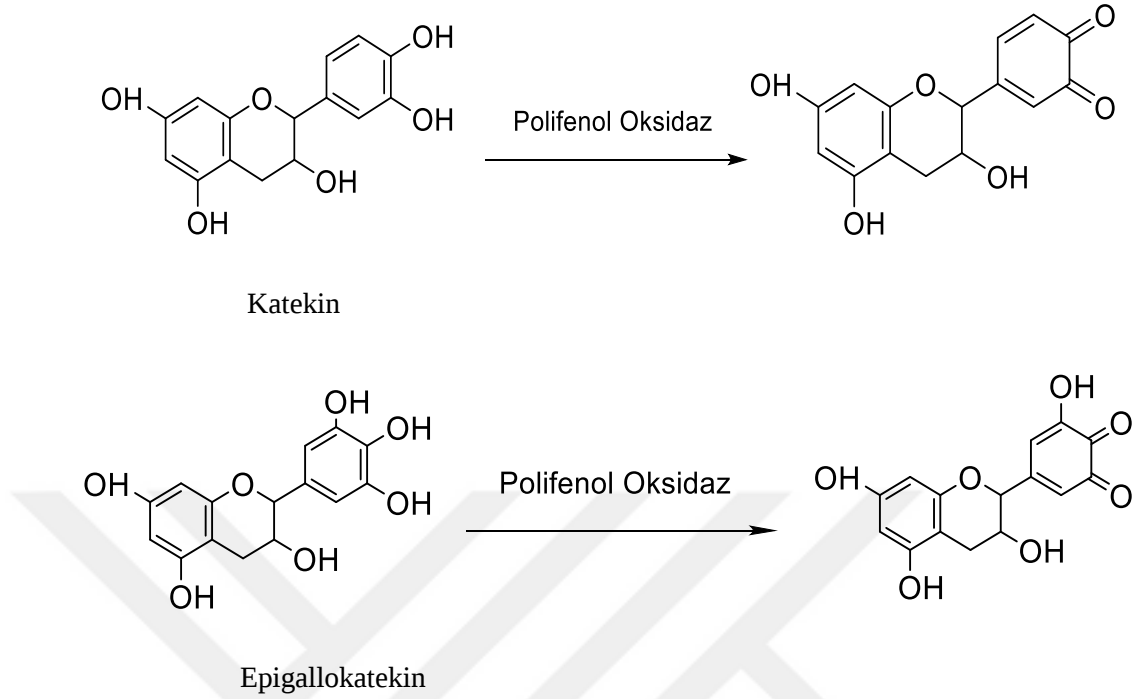
Şekil 1.1. Basit teaflavinin yapısı (Kuroda and Hora 1999)

Çayda bulunan diğer polifenoller ve teaflavinlerin birleşimi ve polimerizasyonu sonucu tearubijinler meydana gelir. Tearubijinler kahverengi-kırmızı renkli teaflavinlere göre kimyasal olarak daha heterojendir. Çayın tearubijin miktarı artıkça ise kalitesi düşmektedir. Bu bileşikler siyah çayın tat ve renginden önemli oranda sorumludur (Obanda *et al.* 2001).

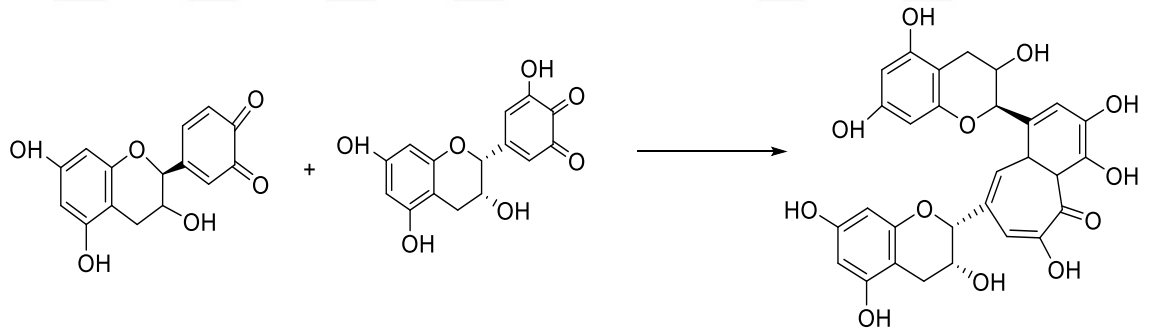


Şekil 1.2. Tearubijinlerin genel yapısı (Wang *et al.* 2000)

Şekil 1.3’de işlenmiş çayın renk ve aromasından sorumlu teaflavin ve tearubijinlerin oluşumunu sağlayan flavan-3-ol’lerin (katekin) oksidasyonu PFO tarafından katalizlenir. Şekil 1.4’de de okside olmuş flavan-3-ol’den teaflavin oluşumu görülmektedir (Shahidi and Nacz 2003).



Şekil 1.3. Katekinin ve epigallokatekinin o-kinonlara oksidasyonu



Şekil 1.4. Oksitlenmiş katekinler'den teaflavin oluşumu

1.5. Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin dilimlenmesi, kesilmesi ve kabuklarının soyulması gibi mekanik hareketler sonucu oluşan renk değişimlerine kararma denir. Polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltgeyerek polimerizasyonları sonucu

esmerleşmeyi sağlayan melanin pigmentlerinin oluşumunu yapan enzimdir (Laurila *et al.* 1998).

Esmerleşme reaksiyonuna yol açan sebepler:

- Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları
- Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları

Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonu bu reaksiyonlar içinde en yaygın olanıdır. Meyve ve sebzelerde oluşan enzimatik esmerleşme polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içinde oksijenle temas halinde değildir. Fakat meyve yada sebze kesildiği zaman enzim hücre dışına çıkarak oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girer ve renkli bileşikler oluşur (Mcweeny 1974; Mathewson 2000). Enzimatik esmerleşmenin azaltılması ya da tamamen durdurulması fenolik maddenin, moleküler oksijenin yada polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile sağlanabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları substratların uzaklaştırılması, ortamın pH'sının düşürülmesi, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi veya ısı inaktivasyonu ile önlenabilir (Laurila *et al.* 1998).

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, başka faktörlerin etkisiyle özellikle ısı etkisiyle hızlanan bir renk esmerleşmesine uğradıkları bilinmektedir. Enzimatik olmayan renk esmerleşmelerinin nedenleri konusunda birçok kuram ileri sürülmektedir. Enzimatik olmayan esmerleşme diye bilinen renk değişimlerinin en yaygın çeşidi Maillard reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlarda amino asitlerle indirgen şekerler arasında bir dizi reaksiyon meydana gelir ve akabinde esmerleşme gerçekleşir. Enzimatik olmayan renk bozulmaları, ısı, ışık, metaller ve oksijen gibi faktörlerin etkisiyle gerçekleşmektedir (Pekyardımcı 1992).

1.6. Polifenol Oksidaz Enzimi

1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarda bulunan polifenol oksidaz enzimi (PFO) bitkilerde, kabuklu deniz canlılarında, mikroorganizmalarda ve özellikle de funguslarda yaygın olarak bulunan bir enzimdir (Pomerantz 1963; Whitaker 1972; Simpson *et al.* 1988). Polifenol oksidaz enzimi bitkinin yaşına, çeşidine ve olgunluğuna bağlı olarak değişir ve bitkilerde bulunduğu yere göre de farklılık gösterir. Çay bitkisinin epidermisinde yüksek oranda bulunmaktadır (Spille 1997). Halder ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada ise çay bitkisinin kloroplast bölümünde yüksek oranda bulunmuştur.

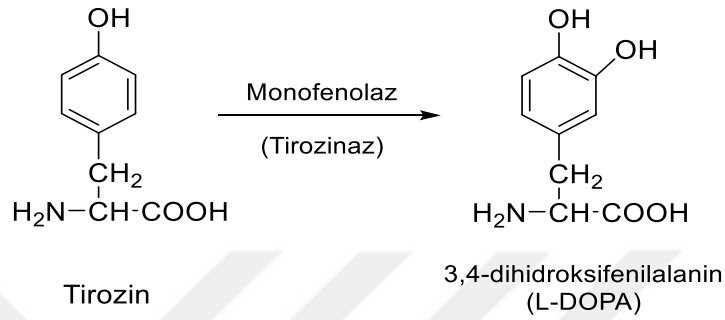
PFO Uluslararası Biyokimya Birliğinin sınıflandırmasına iki kez girmiştir ve bu sınıflandırmalarda yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için oksidoredüktazlar sınıfındadır. Aktif merkezinde kofaktör olarak bakır bulundurur (Mayer and Harel 1979).

Bu sınıflandırmalarda monofenol mono oksijenaz [E.C. 1.14.18.1] ve difenol oksidaz [E.C. 1.10.3.2] olarak yer almıştır. Monofenol oksidaza farklı isimler verilmiştir. Bunlar; tirozinaz, fenolaz, monofenol oksidaz ve kresolazdır. Difenol oksidaz da aynı şekilde farklı geleneksel isimler verilmiştir. Bunlar ise katekol oksidaz, o-difenolaz, fenolaz, polifenol oksidaz ve tirozinazdır (Hammer 1993).

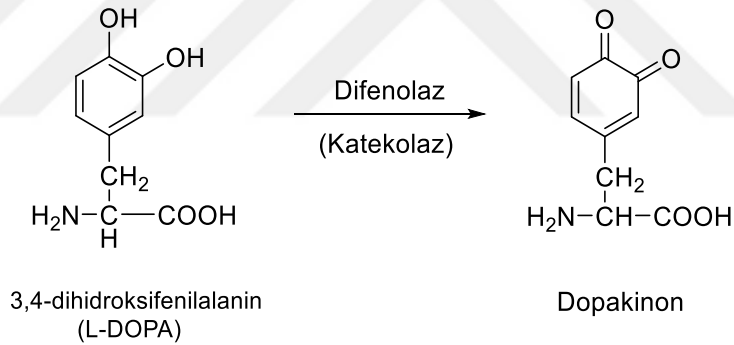
Polifenol oksidaz enzimi moleküler oksijen varlığında birbirinden tamamen farklı aktivite gösteren iki farklı reaksiyonu katalizler, yani enzimatik esmerleşme olayı iki farklı mekanizmaya göre yapılır. Bunlar:

1- Monofenolik bileşiklerin O₂ varlığında o-difenollere o-hidroksillenme reaksiyonudur. [E.C.1.14.18.1] ve bu enzimin aktivitesi monofenolaz ve kresolaz aktivitesi olarak da bilinir (Sıddıq *et al.* 1992; Epsin *et al.* 1995).

2- o-difenollerin o-kinonlara yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir [E.C.1.10.3.2] ve bu enzimin aktivitesi o-difenol oksidaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinir (Sıddıq *et al.* 1992).



Şekil 1.5. Monofenollerin o-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)

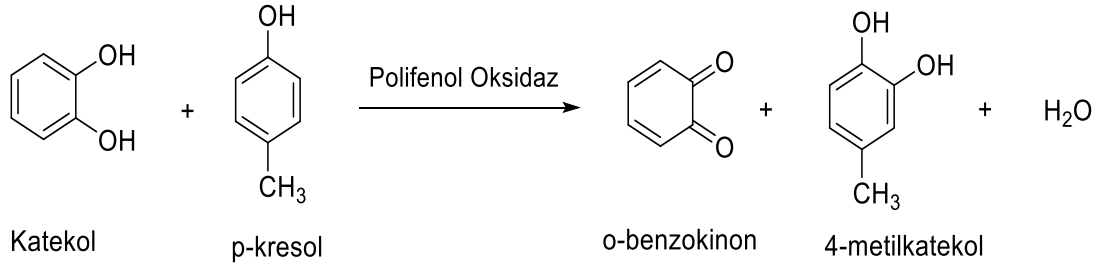


Şekil 1.6. o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi) (Cemeroğlu vd 2001)

Çeşitli kaynaklardan sağlanan enzim ekstraktları her iki aktiviteye farklı şekillerde sahiptirler. Patates, şeker pancarı yaprağı, elma ve mantar gibi farklı PFO ekstraktları her iki aktiviteye sahip olmasına rağmen, çay yaprağı, muz, kiraz gibi PFO enzimleri dihidroksi fenollere etki etmektedir.

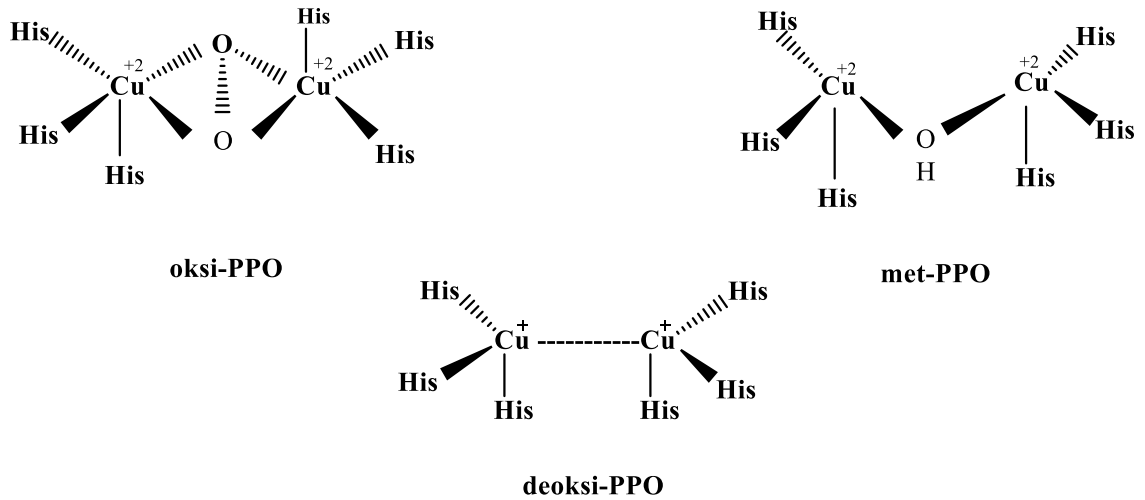
Her iki reaksiyonda da oksijen yardımıyla monofenollerin hidroksilasyonu ile dihidroksi fenoller oluşur ve bu dihidroksi fenoller PFO enzimi tarafından katalizlenerek o-kinonlara dönüşür. Oluşan o-kinonlar enzimatik olmayan reaksiyonla kararmaya neden

olur yani melanin pigmentine dönüşür (Mayer 1987). Vamos-Vigyazo'nun önerdiği enzim katalizi ile alakalı reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.7. PFO Enzim katalizi (Vamos-Vigyazo 1981)

Polifenol oksidaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 55-65 kDa'dur. Şeker pancarı kloroplastları ve muzdan elde edilen enzimler için, dikkatte alınacak derecede daha düşük molekül kütleleri (10 ve 20 kDa) olduğu tespit edilmiştir. (Jolley and Mason 1965). Yapılan çalışmalarda, Polifenol oksidaz enzimi binükleer bakır kompleksi bulunduran bir aktif bölgeye sahip olduğu belirtilmiş ve PFO'nun merkezi, Tip 3 bakır merkezidir. Bakır merkezleri "met", "oksi", "deoksi" halleridir. Met formu Cu⁺²-Cu⁺² aktif bölgesi met polifenol oksidazdır. Deoksi formu Cu⁺¹-Cu⁺¹ aktif bölgesi PFO'nun indirgenmiş halidir ve oksi formu ise Cu⁺²-O₂⁻²-Cu⁺² aktif bölgesi oksi polifenol oksidazdır (Fenton 1995).



Şekil 1.8. PFO'nun bakır merkezleri

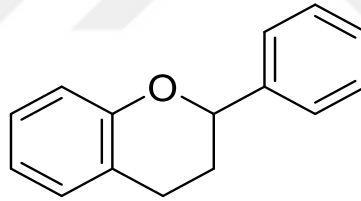
1.6.1. PFO'nun substratları

Meyvelerde ve sebzelerde sekonder metabolit olarak çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Hermann 1974). PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli substratları flavonoid tipi fenoller ve basit fenollerdir (Baruah and Swain 1959).

1.6.1.a. Flavonoidler

Flavonoidler bitkide yayılmış olarak kök, gövde, yaprak ve meyve kısmında bulunurlar (Swain 1962). Bu flavanoidlerden en önemlileri; katekinler, lökoantosiyanidler, antosiyaninler, flavonoller ve sinamik asit esterleridir.

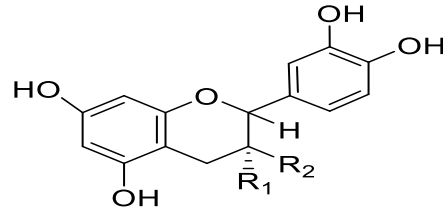
Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Frudenberg and Weinges 1962);



Şekil 1.9. Flavonoidlerin genel yapısı

a. Katekinler

Katekinler, C3 atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Flavonoidlerin 3-hidroksi türevleri olan katekinler (+)-katekin ve onun stereoizomeri olan (-)-epikatekin olarak bulunmuştur. Diğer formları ise katekinlerin sıcak sodyum karbonatla muamelesinden meydana gelir. Kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Frudenberg and Weinges 1962);



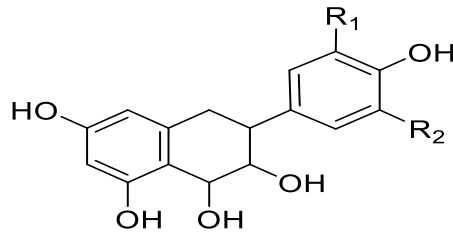
(+)- Katekin ($R_1=H$, $R_2=OH$)

(-)- Epikatekin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

Şekil 1.10. Katekinlerin kimyasal yapısı

b. Lökoantosiyamidler

Bu sınıfın bileşikleri pek bilinmemekle birlikte asidik ortamda ısıtılmalarıyla antosiyanidlere dönüşürler. 3 önemli üyesi vardır ve bunlar; Lökosiyanidin, lökodelfinidin ve lökopelargonidin bileşikleridir. Bunların kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Geissman 1963);



Lökopelargonidin ($R_1=R_2=H$)

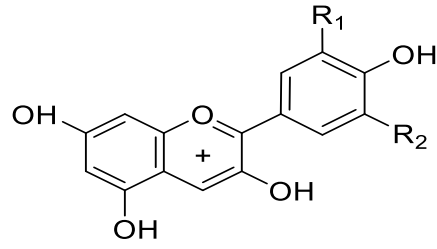
Lökodelfinidin ($R_1=R_2=OH$)

Lökosiyanidin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

Şekil 1.11. Lökoantosiyamidlerin kimyasal yapısı

c. Antosiyaninler

Hücre özsuyunda bulunan renkli bileşiklerdir. Bunlar pelargonidin, siyanidin ve delfinidin olarak üç ana sınıfta sınıflandırılmıştır. Kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Hayashi 1962);



Pelargonidin ($R_1=R_2=H$)

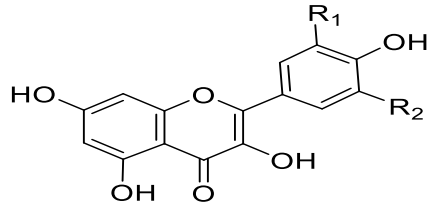
Siyanidin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

Delfinidin ($R_1=R_2=OH$)

Şekil 1.12. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı

d. Flavonoller

Antoksanin olarak bilinen açık yeşil renkli bileşiklerdir. Quercetin, myricetin, kaempferol flavonollerin yapısında bulunan önemli bileşiklerdir. Kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Harborne 1964);



Quercetin ($R_1= OH$, $R_2= H$)

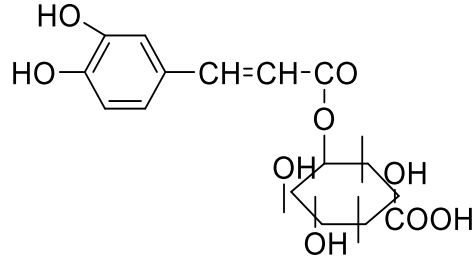
Myricetin ($R_1=R_2= OH$)

Kaempferol ($R_1=R_2= H$)

Şekil 1.13. Flavonollerin kimyasal yapısı

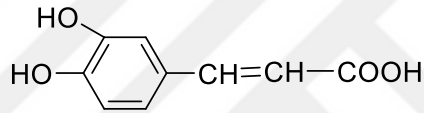
e. Sinamik asit türevleri

Klorogenik asidin yapısı aşağıdaki gibidir;

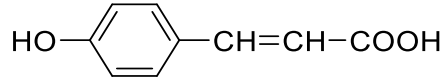


Şekil 1.14. Klorogenik asidin kimyasal yapısı

Klorogenik asidin kafeik asit kısmı, p-kumarik asidin PFO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu belirtilmiştir (Sato 1962).



Şekil 1.15. Kafeik asidin (3,4-dihidroksi sinamik asit) kimyasal yapısı

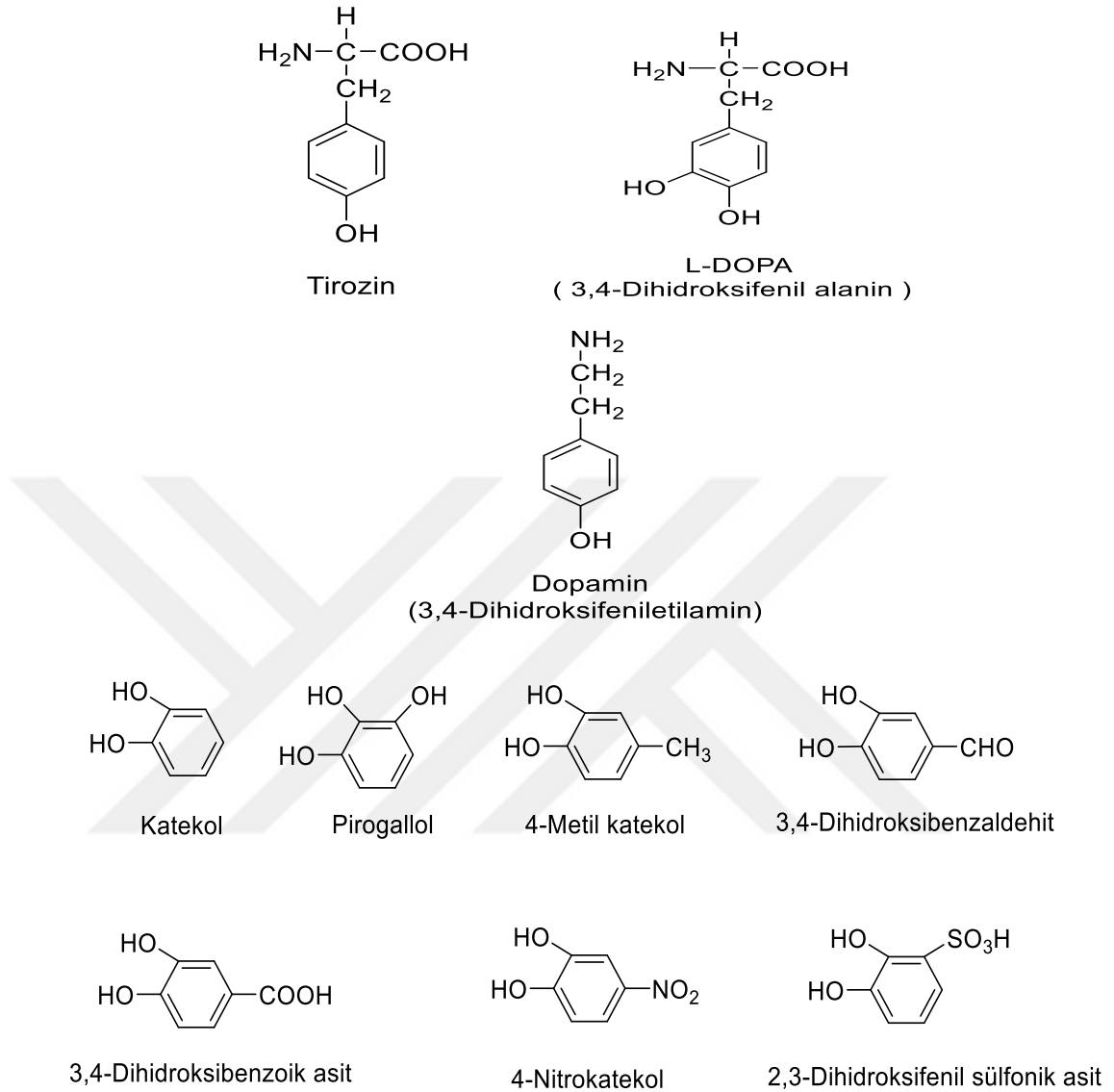


Şekil 1.16. p-kumarik asidin (4- hidroksi sinamik asit) kimyasal yapısı

Klorogenik asidin izomerleri olan izo-klorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudoklorogenik asit ve “Band 510” PFO’nun doğal substratlarıdır (Sandheimer 1964).

1.6.1.b. Basit fenoller

Aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu bulundurlar. O-dihidroksi fenol olan katekol en basit fenoldür ve aromatik halkada iki hidroksil grubu ihtiva eder.



Şekil 1.17. Bazı fenollerin kimyasal yapısı

Proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biri olan tirozin de bir monohidroksi fenoldür. Dopamin ve tirozinin hidroksilasyonu sonucu L-DOPA oluşur (Walker 1964; Stelzig *et al.* 1972).

1.6.2. PFO'nun aktivatörleri

Literatürde polifenol oksidaz enziminin inaktivasyonu ve kararmanın önlenmesi istenen bir durum olduğuna dair pek çok bilgi varken, aktivasyonu istenmeyen bir durumdur.

Elma kabuğundan elde edilen enzim polivinilpirolidin (PVP) tarafından inaktive etmiştir. Sonrasında ise sodyum dodesil sülfat (SDS) ile tekrar aktivite edilmiştir (Coetzer *et al.* 2001). Üzüm PFO'sunu üre ve asidik pH'a dönüşümlü olarak aktive etmektedir. Üre inaktif bakla PFO'sunu aktivite eder ve enzimin monofenoller üzerine olan etkisi artar (Lerner *et al.* 1972).

Enzimin kofaktörü olan bakırın Cu^{+2} olarak olarak patates PFO'suna herhangi bir etkisi olmazken, turp PFO'sunun aktivitesini yükseltmiştir (Weaver *et al.* 1968; Ishiguro and Aoyama 1970). PFO'nun aktif formu, Cu içeren bir oligomerik protein olduğunu gösterir (Arnaud 1965). Aktivatörün rolü, enzimi biyolojik aktivite için gerekli konformasyon derecesine getirir (Palmer and Roberts 1967).

1.6.3. PFO enziminin inhibitörleri ve enzimatik kararmanın önlenmesi

Enzimin aktivasyonu istenmeyen bir durum olmasından dolayı enzimin inhibisyonu ve enzimatik kararmanın önlenmesi geniş çapta araştırılmıştır. Bu iki durum aynı başlık altında incelenir. Ancak kararmanın önlenmesi, yalnızca enzimin inaktivasyonu ile değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli olan iki substrattan (O_2 ve polifenol) birinin uzaklaştırılması veya enzim reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin, ikinci defa enzimatik olmayan bir reaksiyonla yeni renkli bileşiklere dönüştürülmesiyle gerçekleşir (Walker 1975). Enzim inhibisyonu enzimin in vivo ve in vitro şekilde aktivitelerinin azalmasına ya da tamamen yok olmasına denir ve üç şekilde gerçekleşir.

1. Enzimin inaktivasyonu (direkt enzimi etkilemek)
2. Substratın inaktivasyonu (oksijen yada fenolik bileşikler gibi substratları uzaklaştırmak)
3. Ürünün inaktivasyonu (ürün bileşimini değiştirmek)

Enzim inhibisyonuna sebep olan maddelere inhibitör denir. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır.

PFO, prostetik grup olarak Cu içeren bir metaloenzim olduğu için enzimi metal şelatlayıcı özellikleriyle birinci derece etkileyen inhibitörler şunlardır: Siyanür, karbonmonoksit, sodyum-dietil-ditiyo-karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid ve potasyum metil ksantat (Palmer and Roberts 1967; Walker 1975; Sapers *et al.* 1990; Şakiroğlu 1994; Oktay *et al.* 1995).

Bir inhibitör olarak üzerinde en çok çalışılan maddelerden biri de askorbik asittir. Askorbik asit gıda maddelerinin biyolojik değerini artırmaktadır. Oksidatif parçalanmadan gelen antosiyaninlere karşı koruyucu rol oynar ve kırmızı meyvelerin renklerini korumasında rol oynar. Askorbik asitin kinetik çalışmalarda iyi inhibitör olduğunu belirlenmiş ve kinonları indirgeyerek şelatlama reaktifi olarak görev yaptığı belirtilmiştir (Keskin ve Erkmen 1987). Askorbik asit aynı zamanda enzim tarafından direkt oksitlenerek yarışmalı inhibitör görevi yapar. Bazı fenollerde gözlemlendiği gibi PFO'nun yarışmalı inhibisyonu askorbik asit ile arttırılabilir (Taufel and Voigt 1964; Singh and Ahlawati 1974).

PFO'nun iyi bir inhibitörü olan sülfidler meyve ve sebzelerin taze olarak satılması gibi durumlarda kullanıma çok fazla izin verilmez (FDA 1996). Sülfidler, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeleri önler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol ederler. Fakat sülfidler, besinleri yıkıcı özelliği vardır. Bitki ve meyvelerin yumuşamasına ve tadının bozulmasına neden olurlar (Langdon 1987; McEvily *et al.* 1991).

1.7. Çalışmanın Amacı

Enzim teknolojisinin çağımızda artan şekilde gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının farklılığı ve ekonomik açıdan çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlere yönelik çalışmaları daha da önem kazanmaktadır. Enzim yada enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Bu nedenle enzimler endüstride oldukça fazla öneme sahiptir. Dolayısıyla, PFO'lar veya

benzeri reaksiyonları katalizleyen enzimler bu açıdan son yıllarda oldukça ilgi toplamışlardır (Labuza *et al.* 1992).

Enzimatik kararma polifenollerin o-kinonlara oksidasyonu ve o-kinonların da esmer renk maddelerine veya melanin polimerizasyonuna cereyan etmesidir. Gıda teknolojisi için, bu esmerleşme olayı istenmeyen bir durum arz eder. Elma, armut, muz gibi meyvelerde ve mantar, patates gibi sebzelerde enzimatik kararma nispeten fazla görülür. Fakat yeşil çay yapraklarından siyah çay üretiminde enzimatik kararma istenen bir olaydır. Çünkü kinonlar, çaya içim tadı ve kalitesini kazandıran teaflavin ve tearubijinlerin ön maddeleridir. Bu nedenle çalışmada ekonomik öneme sahip Rize yöresinde yetişen çay bitkisi yapraklarından PFO enzimlerinin Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asid afinite kolonu ile saflaştırılması planlanmıştır ve elde edilen PFO enzimlerinin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bunun için aşağıdaki hedefler belirlenmiştir;

- Afinite jelinin sentezi,
- Çay bitkisi yapraklarından bu afinite jeli ile PFO enzimlerinin saflaştırılması,
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile PFO enzimlerinin yaklaşık molekül ağırlıklarının tespit edilmesi,
- Çalışılan iki substrat için optimum pH ve sıcaklıkların belirlenmesi,
- Belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla inhibisyon türünün tespiti ve K_i sabitlerinin ve IC_{50} değerlerinin bulunması.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçların hem bilimsel açıdan faydalı olacağına hem de çay işletmeciliğine yön vereceğine inanıyoruz.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gregory ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çay bitkisi PFO'su sürgünlerden (kuru ağırlığa göre) 5000 kat saflaştırılmıştır ve saflaştırmanın ara aşamalarında dört tane çözünür özellikte sarı fraksiyon bulunmuştur. Bunların asidik fenolik oksidasyon ürünlerine ilaveten temel enzim proteinleri ve nükleik asitler oldukları düşünülmüştür. Kompleks oluşturucu materyallerin ayrılmasından sonra fraksiyonlar mavi ve birbirlerine benzer şekilde meydana gelmiştir. %0.32 bakır içeriği elde edilmiştir. Pirogallol'un spesifik aktivitesi 30°C'de, 373 EÜ/mg olarak belirlenmiştir. En iyi substrat olarak o-dihidroksi fenol bulunmuştur. Kuinol ve p-fenilendiamin yavaşça okside olmasına karşın monohidroksi fenoller ve askorbik asit okside olmamıştır. Çay fermantasyon mekanizması ile sonuçlar arasındaki ilişki tartışılmıştır (Gregory *et al.* 1966).

Mahanta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada işlenmiş çay yapraklarında, renk ve aromadan sorumlu olan teaflavin maddesinin oluşumuna neden olan polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri çalışılmıştır. Pigmentlerin teaflavin grupları sıvı kromatografisi yardımıyla belirlenmiştir. Bu iki enzimin aktiviteleri ise spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Enzimlerin en yüksek aktivitelerinin çay işlenmesi süresince kıvrırma işlemi esnasında görülmüştür. İşlenmiş siyah çayda enzimatik esmerleşmeye öncülük eden mekanik zararlanmalardan dolayı enzim aktivitesinde düşüş ve daha sonra artış olduğu gözlenmiştir (Mahanta *et al.* 1993).

Halder ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çay yapraklarından polifenol oksidaz enzimi ekstrakte edilmiş ve daha sonra saflaştırılıp bazı özellikleri belirlenmiştir. DEAE selüloz kolonu yardımıyla PFO'nun izoezimleri ayırmış ve iki fraksiyon absorbe edilirken diğeri edilememiştir. Absorbe edilmeyen fraksiyon jel filtrasyon, hidroksiapatit, centricon-30, FPLC gibi farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. Optimum şartlar belirlenmiştir. Yüksek oranda saflaştırılmış olan enzim, katekolü okside ederken, monofenolleri, p-kinolleri okside edemediğinden dolayı katekol oksidaz olabileceği düşünülmüştür (Halder *et al.* 1998).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, çay bitkisinden ekstrakte edilen, polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırılmış ve kinetik özellikleri belirlenmiştir. Çalışılan substratlardan etkili substrat 4-metil katekol olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri 6,02 olarak belirlenmiş ve optimum sıcaklığının 30°C olduğu tespit edilmiştir. Termal inaktivasyon çalışmalarında, sıcaklık artışına bağlı olarak kD değerleri artarken yarı ömür ve D değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. E_a değerinin 58,301 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0,9614$) olduğu bulunmuş, Z değerinin ise 39,68°C ($r^2=0,9645$) olduğu saptanmıştır. Çalışılan inhibitörlerden L-sistein'in en düşük inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Yabacı 2008).

Yapılan bir çalışmada Erzurum-İspir yöresinden temin edilen çadır bitkisinin yaprak ve gövdesinden polifenol oksidaz enzimi izole edilmiş ve beş ayrı substrat için optimum şartlar belirlenmiştir. K_M ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Çadır bitkiden izole edilen PFO enziminin en etkili substratının katekol olduğu belirlenmiştir. Substrat olarak katekol kullanılan inhibitör çalışmalarında askorbik asit, β -merkapt etanol, sodyum metabisülfid, sodyum dietilditiyokarbomat ve L-sistein klorür kullanılmış Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri ve inhibisyon türleri bulunmuştur. Yaprak için en etkili inhibitörün L-sistein klorür, gövde için sodyum metabisülfid olduğu belirlenmiştir (Erat 1998).

Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ısırgan otundan PFO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi yardımıyla saflaştırılmış ve optimum şartları belirlenmiştir. Enzimin altı farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiş ve en etkili substratın L-tirozin olduğu tespit edilmiştir. Optimum pH değeri 4,5, sıcaklık değerleri ise 30°C olarak bulunmuştur. Substrat olarak L-tirozin kullanıldığında K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 7.90×10^{-4} mM ve 11290 EÜ/ml olarak belirlenmiştir. İnhibitör çalışmasında L-sistein, klorür, sodyum azotür, sodyum siyanür, benzoik asit, salisilik asit, L-askorbik asit, glutatyon, tiyoüre, sodyum dietil ditiyokarbomat, β -merkapt etanol ve sodyum metabisülfid gibi çeşitli inhibitörler çalışılmış ve sodyum dietil ditiyokarbamat en etkili inhibitör olarak bulunmuştur (Gülçin *et al.* 2005).

Enginar bitkisinin yaprağından ve gövdesinden yapılan bu çalışmada, PFO enzimi ekstrakte edilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon vasıtasıyla saflaştırılmıştır. 50 mM katekol substratı kullanarak optimum şartları belirlenmiştir. Çalışma esnasında 6 inhibitör çalışılmış bitkinin yaprağı ve gövdesi için en iyi inhibitörün sodyum azotür ve tiyoüre olduğu belirlenmiştir (Ziyan and Pekyardımcı 2003).

Aydemir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yer elmasından polifenol oksidaz enzimi izole edilmiştir. Enzim katekol ve L-DOPA karşı aktivite gösterirken, bir monofenol olan L-tirozine karşı aktivite göstermemiştir. Enzimin optimum pH değeri 7,0 ve sıcaklık değeri ise 25°C olarak bulunmuştur. Enzimin nötr pH civarında kararlı olduğu görülmüştür. 60 ve 80°C'deki aktivitenin %50 inaktivasyonu için gerekli olan zaman sırasıyla, 40 ve 20 dakika olarak belirlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak belirlenen K_M değeri 5,88 mM, V_{max} değeri ise 25,402 EÜ/mg.dk'dır. İnhibisyon çalışmasında ise potasyum siyanür, β -merkaptetanol ve tiyoüre'nin en iyi inhibitörler olduğu görülmüştür (Aydemir vd 2003).

İspir şeker fasulyesinden izole edilmiş olan polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmi saflaştırılmış ve enzimin bazı kimyasal özellikleri incelenmiştir. Enzimin 3 farklı substrat için optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak yapılan çalışma esnasında dört farklı inhibitör ile çalışılmış ve glutatyonun en etkili inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Yılmaz 2007).

Çağla bademinden izole edilmiş olan polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. PFO enziminin karakterizasyonunda amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemlerinden elde edilen numune kullanılmıştır. Optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı substrat kullanılarak belirlenmiştir. En iyi substrat olan 4-metil katekol için optimum pH değeri 6,5, optimum sıcaklık değeri ise 35°C olarak tespit edilmiştir. K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. İnhibitör çalışmalarında ise en etkili olanların sodyum azotür, benzoik

asit, sitrik asit, L-askorbik asit ve tiyoüre olduğu bulunmuştur. Metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} , Pb^{+2} metallerinin enzim aktivitesini artırırken Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Sn^{+2} , K^{+1} metallerinin enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur (Güngör 2008).

Şakiroğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dereotundan polifenol oksidaz enzimi izole edilerek çeşitli kinetik özelliklerini incelenmiştir. Katekol, klorogenik asit ve dopamin substratları için K_M ve $V_{\max}$ değerleri belirlenmiştir. Katekol substratı kullanılarak yapılan inhibitör çalışmalarında L-sistein klorür, askorbik asit ve glutatyon ile çalışılmıştır. Çalışılan inhibitörlerden en etkili inhibisyon etkisinin L-sistein klorür olduğu belirlenmiştir (Şakiroğlu *et al.* 2008)

Anamur muzundan saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin karakteristik özellikleri çalışılmıştır. Muz PFO'sunun optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,0 ve 30°C olarak belirlenmiştir. Termal inaktivasyon sonuçlarına göre, enzimin yarı ömür değerleri 7,3-85,6 dakika arasında saptanmıştır. Enzimin E_a değerinin 155 kJ.mol^{-1} ve Z değerinin ise 14,2°C olduğu tespit edilmiştir. Enzimin K_M değeri 8,5 mM, $V_{\max}$ değeri 0,754 $\text{OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$ 'dir. Çalışılan inhibitör çalışmalarında askorbik asit ve sodyum metabisülfite en etkili inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Ünal 2007).

Türkiye'de yetiştirilen emir üzümünden PFO enzimi izole edilmiş ve optimum şartları (pH, optimum sıcaklık, termal inaktivasyon, kinetik parametreler) incelenmiştir ve bazı inhibitörlerin enzim üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Substrat olarak katekol kullanıldığında, optimum pH 4,2 ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir. Enzim için K_M değeri $25,1 \pm 2,72 \text{ mmol L}^{-1}$, $V_{\max}$ değeri ise $0.925 \pm 0.04 \text{ OD}_{410} \text{ dk}^{-1}$ bulunmuştur. İnhibitörler çalışmalarında ise en etkili inhibitörlerin sodyum metabisülfite ve askorbik asit olduğu bildirilmiştir (Ünal and Şener 2006).

Sabancılar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Denizli narından PFO enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile 67 kat saflaştırılmıştır. PFO enziminin optimum pH ve

sıcaklığı sırasıyla 7,5 ve 40°C olarak saptanmıştır. Enzim için K_M ve V_{max} değerleri ise Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla belirlenmiştir (Sabancılar vd 2007).

Ayvadan ekstrakte edilen PFO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılmıştır ve katekol, pirogallol, L-DOPA, p-kresol, resorsinol ve tirozin substratlarıyla çalışılmıştır. En etkili substrat olarak katekol saptanmıştır. K_M değerleri katekol için 4,54 mM, pirogallol için 7,35 mM ve L-DOPA için 1,78 mM olarak belirlenmiştir. En iyi substrat olan katekol için optimum pH 8,0 ve optimum sıcaklık ise 40°C olarak bulunmuştur. Çalışılan inhibitörler içerisinde askorbik asit, potasyum siyanür, L-sistein'in enzim aktivitesi üzerine en etkili inhibitörler olduğu bulunmuştur (Yağar and Sağiroğlu 2000).

Arslan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada duttan izole edilen PFO enzimi amonyum sülfat ve afinite kromatografisi yardımı ile saflaştırılmıştır. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarıyla çalışılmıştır. Bu üç substrat için yapılan çalışmalarda optimum pH ve sıcaklık değerlerinin 4,5-8,0 ve 20-45°C arasında değiştiği saptanmıştır (Arslan *et al.* 2004).

Çukurova bölgesinde yetiştirilen domat çeşidi zeytinden ekstrakte edilen polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırmıştır. Enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Substrat olarak 4-metil katekol kullanılmış ve enzimin K_M ve V_{max} değerlerinin 14,52 ve 1,73 Abs/dk olduğu saptanmıştır. Enzimin optimum pH'sı 4,5, optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur. E_a değeri 121 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0,9496$), Z değeri ise 18,55°C ($r^2=0,9532$) olarak belirlenmiştir. Çalışılan inhibitörlerden en etkili olanlarının sistein ve sodyum disülfid olduğu tespit edilmiştir (Taş 2009).

Kereviz köklerinden 0,1M fosfat tamponu kullanarak pH 7'de PFO izole edilmiştir. Farklı substratlar kullanılarak K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. K_M değerleri 25°C'de sırasıyla, pirogallol için 4,5, katekol için 8,3 ve L-DOPA için 6,2 mM olarak saptanmıştır. Optimum pH ve sıcaklık çalışmaları bu substratlar ile belirlenmiştir.

Pirogallol için optimum pH 7,5, katekol ve L-DOPA için 7,0'dır. Optimum sıcaklıklar sırasıyla 25°C, 40°C ve 45°C olarak saptanmıştır. Farklı inhibitörler denenmiş ve en etkili inhibitörün L-sistein olduğu bulunmuştur (Yağar 2004).

Konya-Ereğli yöresinden temin edilen beyaz kirazdan izole edilen polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin optimum şartları belirlenmiş. Saflaştırma işleminden sonra iki farklı aktivite piki elde edilmiş ve ilk aktivite görülen pik izoenzim A, diğeri ise izoenzim B şeklinde adlandırılmıştır. İzoenzim A %48,7 verimle 3,9 kat, izoenzim B ise %54,3 verimle 76,7 kat saflaştırılmıştır. İzoenzim A için optimum pH ve sıcaklık değerler sırasıyla 4,5 ve 20°C, izoenzim B için ise 4,98 ve 30°C olarak saptanmıştır. İnhibisyon çalışmasında L-sistein ve sodyum disülfid inhibitör olarak kullanılmıştır. Bu iki inhibitörün her iki enzim için inhibisyon etkilerinin farklılık gösterdiği ve B enzimini her iki inhibitörün %100 inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gökkaya 2009).

PFO enzimi iki farklı mantardan izole edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimler için SDS-PAGE de tek bir bant elde edilmiştir. Mantar türleri için sırasıyla enzimin molekül ağırlığı 36 kDa ve 50 kDa civarında gözlenmiştir. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak, PFO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. *Lactarius salmonicolor* PFO enziminin kullanılan bu substratlar için optimum pH'ları 6,0-7,5 arasında, optimum sıcaklıkları ise 0-25°C arasında bulunmasına rağmen *Agaricus bisporus* PFO enzimi için optimum pH 7,5-8,0 ve sıcaklık ise 20-30°C arasında değiştiği bulunmuştur. LsPFO ve AbPFO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta bu üç substrat için K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile bulunmuş ve LsPFO enzimi için en uygun substratın 4-metil katekol, AbPFO enzimi için ise pirogallol olduğu saptanmıştır. Farklı inhibitörler kullanılarak her iki enzim için çalışmalar yapılmıştır (Dedeoğlu 2009).

Polifenol oksidaz enzimi yabani ve yenilebilir olan bir mantardan Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoikasit afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize

edilmiştir. Saf enzim elüatında PFO'nın varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant olarak bulunmuştur. Optimum şartlar katekol substratı kullanılarak belirlenmiş ve enzimin optimum pH'sı 7,0, sıcaklığı 20°C olarak saptanmıştır. Katekol substratı kullanılarak yapılan kinetik çalışmalar sonucunda, K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1 mM ve 25000 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir. İnhibisyon çalışmalarında ise askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum azotür ve benzoik asitin enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (Öz 2010).

Melisa bitkisinden polifenol oksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemler ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak, PFO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Bu substratlar için sırasıyla optimum pH, 6,5, 4,0 ve 8,5'dir. Optimum sıcaklık ise sırasıyla 40°C, 50°C ve 60°C'dir. V_{max}/K_M en iyi substratın pirogallol olduğu tespit edilmiştir. İnhibitör çalışmalarında ise etkili inhibitör glutatyon olarak bulunmuştur (Doğan *et al.* 2013).

Yeni bir keçiyoynuzu meyve çeşidinden polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimleri izole edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Polifenol oksidaz enzimi için optimum pH değeri 4,5, optimum sıcaklık değeri ise 30°C olarak tespit edilmiştir. Peroksidaz enzimi için ise optimum pH değeri 5,0, optimum sıcaklık değeri ise 35°C olarak bulunmuştur. Katekol substratı kullanılarak yapılan kinetik çalışmalarda K_M değeri PFO enzimi için, 47,11 mmolL⁻¹, guaiakol substratı varlığında ise peroksidaz enzimi için K_M değeri 153,00 mmolL⁻¹ olarak bulunmuştur. Çalışılan inhibitörlerden her iki enzim için 4-heksilresorsinol (4-HR), oksalik asit ve L-sistein güçlü inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Zhang and Shao 2015).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, redükte glutatyon (GSH), sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA), katekol, 4-metil katekol, sıvı azot, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum persülfat, etanol, gliserol, glutaraldehit ve diğer kimyasal maddeler Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol, sodyum dodesil sülfat (SDS) E.Merck AG'den temin edildi.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Laboratuvar çalışmalarımızda aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanıldı.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Thermo Scientific Orion Star A211
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf

Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturuu (1x10), Sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti

%0,5 PEG, 10 mM askorbik asit, Triton X-100 deterjanı, 0,1 M asetat tamponu (pH:6,0): 0,82 g NaCH₃COO, 0,5 g polietilenglikol (PEG), 0,176 g askorbik asit ve 1 mL Triton X-100 içeren karışım 80 mL saf suda çözüldü. pH'sı 6'a ayarlandı ve çözeltinin son hacimi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Diyaliz yapılırken kullanılan çözelti

5 mM KH₂PO₄ Tamponu (pH:6,3): 0,68 g KH₂PO₄ alınarak 950 mL saf suda çözüldü ve içerisine 100 µL gliserol eklendi. 1 M HCl ile pH 6,3'e getirildi ve saf su ile toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti

0,05 M Tris-HCl Tamponu (pH:9): 0,6 gr Tris alınarak 80 mL saf suda çözöldü. 1 M HCl ile pH 9,0'a gelinceye kadar titre edildi ve saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Substrat Çözeltileri

1. 100 mM Katekol: 0,55 g katekol bir miktar saf suda çözölüp toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.
2. 100 mM 4-metil katekol: 0,62 g 4-metil katekol bir miktar saf suda çözölüp toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO₃ Tamponu (pH:10,0): 8,401 gr NaHCO₃ 950 mL saf suda çözölerek, 1 M NaOH ile pH'sı 10,0'a gelinceye kadar titre edildi ve toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO₃ Tamponu (pH:8,8): 8,401 gr NaHCO₃ 450 mL saf suda çözölerek, 1 M NaOH ile pH'sı 8,8'e gelinceye kadar titre edildi ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
3. 0,01 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH:6,0): 1,42 gr Na₂HPO₄ 950 mL saf suda çözölerek, 1 M NaOH ile pH'sı 6,0'a gelinceye kadar titre edildi ve toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan çözelti

0,05 M Fosfat Tamponu (pH:6,0): 6,8 gr KH₂PO₄ alınarak 950 mL saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH'sı 6,0'a gelinceye kadar titre edildi ve toplam hacim saf su ile 1L'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda jele bağlanmış PFO enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti

0,05 M Fosfat Tamponu içinde 1 M NaCl (pH:8,0): 1,70 g KH_2PO_4 ve 14,61 g NaCl alınarak 200 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH'sı 8,0'a gelinceye kadar titre edildi ve toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1M Tris-HCl (pH:8,8): 12,114 g Tris tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 12,114 g Tris tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze hazırlandı ve hemen kullanıldı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,2 g glisin tartılarak 450 mL suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH: 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 3 ml, %10'luk SDS'den ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi karıştırılarak son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit Çözeltisi: 60 mL saf su, 30 ml %96'luk etanol, 10 mL asetik asit karıştırılmasıyla elde edildi.

2. Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 80 mL saf su ve 45 mL etanol karışımının pH'sı asetik asitle 6,0'a ayarlandı. 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit ilave edilerek son hacim saf suyla 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mg AgNO_3 (Gümüş nitrat), 100 mL saf suda çözülüp üzerine 30 μL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf suda çözülüp üzerine 120 μL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin, 1,25 mL asetik asit (%5'lik 250 mL asetik asit çözeltisi) saf suyla 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

İnhibisyon çalışması için kullanılan stok inhibitör çözeltileri

Enzim inhibisyonu çalışmalarında kullanılan çözeltiler (Çizelge 3.1) de gösterildiği miktar ve konsantrasyonlarında hazırlandı. İhtiyaç duyulan seyreltmeler saf su ile yapıldı.

Çizelge 3.1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı

İnhibitör	Miktar (g)	Mol sayısı (mol)	Stok çözelti konsantrasyonu (mM)	İnhibitörün çözündüğü ortam	Çözeltinin hacmi (mL)
Sodyum sülfat	0,00126	1.10^{-2}	1.10^{-3}	Su	10
Ditiyoeritritol	0,0077	1.10^{-2}	1.10^{-5}	Su	10
Sodyum metabisülfat	0,0019	1.10^{-2}	1.10^{-3}	Su	10
Glutasyon	0,00007	1.10^{-2}	1.10^{-5}	Su	10
Askorbik asit	0,0035	1.10^{-2}	1.10^{-2}	Su	10

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler

1. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözülerek içerisine %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. %0,04'lük bromtimol mavisi çözeltisi: 0,1 M bromtimol mavisi 16 mL 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim 250 mL olacak şekilde tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbsları 280 nm'de köre karşı okundu.

3.2.1.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bradford yönteminde boya olarak negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır. Kullanılan boya çözeltisi fosforik asitle hazırlanır ve asidik ortamda pozitif yüklenen protein ile negatif yüklü boya kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin renk şiddeti 595 nm'de ölçülür. Bu yöntemin bozucu faktörleri oldukça azdır. Hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir, hızlı cereyan eder ve iki dakikada tamamlanır. Tayin

işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanarak ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe 100'er µL alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9'ar mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem sonunda 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976) (Şekil 4.1).

3.2.2. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi ve aktivite ölçümleri 420 nm dalga boyunda gerçekleştirildi (Ponting and Joyslyn 1948). Aktivite ölçümü için (Çizelge 3.2) de gösterildiği gibi 10 µL enzim, 2,990 mL tampon + substrat çözeltileri kullanıldı. Aktivite tamponu olarak enzimin optimum pH'sına ve optimum iyonik şiddetine en uygun pH ve konsantrasyonda Tris-HCl tamponu kullanıldı. 100 mM substrat konsantrasyonunda çalışıldı. Bir dakika boyunca 15 saniyelik aralıklarla absorbanstaki değişim kaydedildi. Kör olarak enzim dışındaki bütün çözeltiler kullanıldı ve enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampondan enzim çözeltisinin hacmi kadar alındı. Enzim dışındaki bütün çözeltiler küvette birleştirildikten sonra enzimin ilave edildiği anda hemen süre ölçer çalıştırıldı. Küvet alt üst edilerek enzimin iyice karışması sağlandı ve spektrofotometreye yerleştirildi. Her 15 saniyede absorbans artışı kaydedildi. 1 Enzim Ünitesi (EÜ) reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0,001'lik artış olarak

tanımlandı. Aktivite birimi olarak “1 ml enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişim” kullanıldı.

Çizelge 3.2. Çay yapraklarından PFO enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
Stok aktivite çözeltisi	Hacim	Konsantrasyon	Hacim	Konsantrasyon
Tris-HCl tamponu	2400 µL	0,05 M	2390 µL	0,05 M
Katekol	600 µL	0,1 M	600 µL	0,1 M
Enzim numunesi	—	—	10 µL	—

3.2.3. Çay yapraklarından polifenol oksidaz enziminin izolasyonu ve saflaştırma çalışmaları

3.2.3.a. Çay yapraklarının temini ve ham ekstrakt hazırlanması

Çalışmalarımızda kullanılan çay bitkisi Rize yöresinden temin edildi. Çay bitkisinin yaprak kısımları 5, 10 ve 15 g gibi küçük kısımlar halinde alüminyum folyalara sarılarak pakettendi. Çalışmamızda kullanılıncaya kadar -20°C’de freezer’de muhafaza edildi. Ham ekstrakt hazırlamak amacıyla ekstraksiyon tamponu kullanıldı. Gerek numunenin az miktarıyla çalışılması yönünden gerekse hücre parçalamadaki etkinliği yönünden sıvı azotla ekstraksiyon yöntemi daha verimli bir yöntem olduğu için kullanıldı. 10 g çay örneği porsolen havana konuldu ve üzerine sıvı azot ilave edilerek un haline gelinceye kadar ezildi. Sonra üzerine 10 mL ekstraksiyon tamponu (0,1 M asetat, 10 mM askorbik asit, %0,5 PEG ve pH:6,0) ilave edildi ve homojenizatör vasıtasıyla yaklaşık iki dakika homojenize edildi. Elde edilen homojenat çift katlı tülbentten süzüldü. Süzüntü 13500 rpm’de ,+4°C’de 30 dakika santrifüj edildi. Daha

sonra karışım süzgeç kağıdıyla tekrar süzüldü ve böylece katı parçacıkların protein çözeltisinden uzaklaştırılması sağlandı. Süpernatant kısmı daha sonraki çalışmalarda ham ekstrakt olarak kullanılmak üzere alınarak soğukta saklandı.

3.2.3.b. Diyaliz

Ham ekstrakt olarak elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına konuldu. Enzimin içinde bulunduğu tampona (5 mM fosfat tamponu, pH:6,3) ile bir saat diyaliz yapıldı. Diyaliz işlemleri 4°C’de gerçekleştirildi.

3.2.4. PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Afinite kromatografisi PFO enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan birisidir. Bu kromatografi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, “matriks” adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Diğer yöntemlerle çok basamaklı işlemler gerektiren birçok ayırım, bu yöntemle çok defa bir tek basamakta gerçekleşir. Bu yöntem ile çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemleri kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir (Cuatrecasas 1970).

3.2.4.a. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibinin (2004) sentezlediği yöntemle göre sentezlendi. Bu yöntemde CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriksi, uzantı kolunu oluşturmak üzere tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. Ligand olarak polifenol oksidaz (PFO) enziminin spesifik inhibitörü olan ve afinite jelinin yapısına girerek enzimin yüksek oranda saflaştırılmasını sağlayan p-aminobenzoik asit seçildi. Bu şekilde elde edilen jel, afinite kromatografisi ile çay bitkisi yapraklarından PFO’nun saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı.

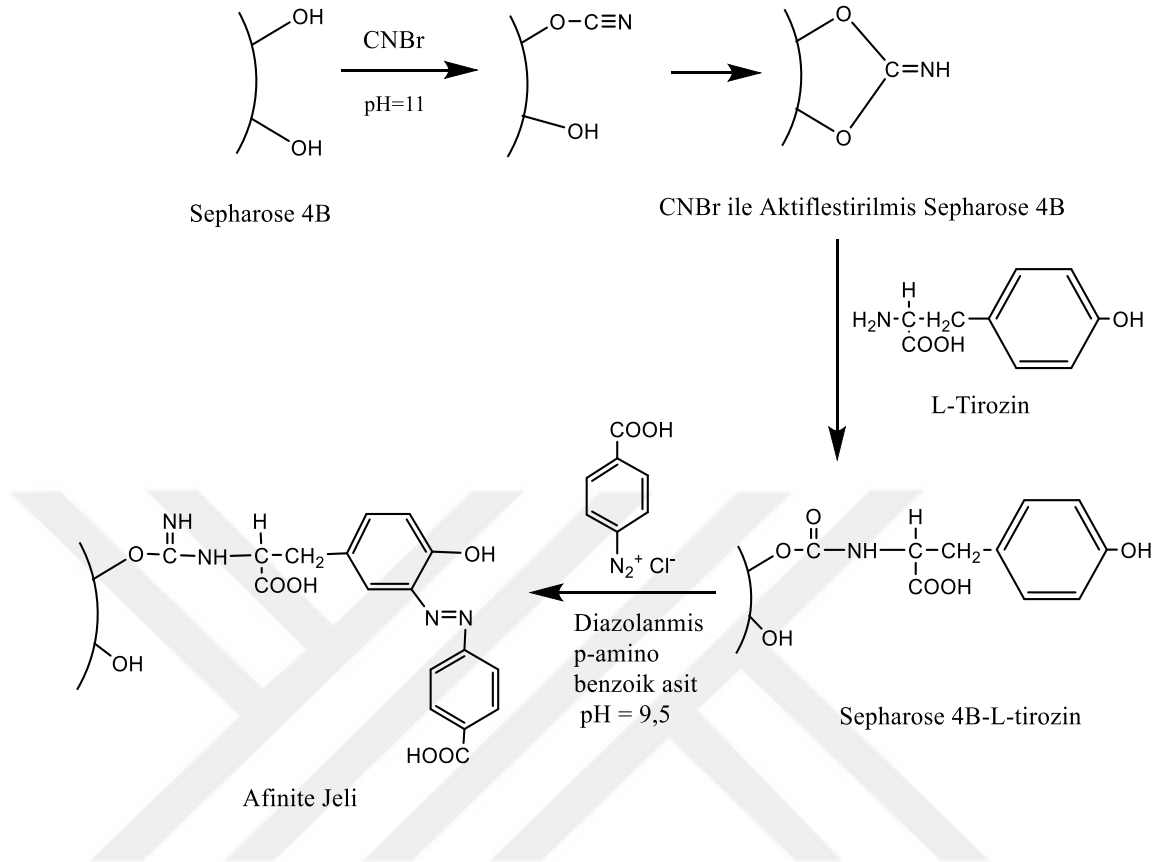
3.2.4.b. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO_3 tamponu (pH:10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözerek soğuk ortamda behere ilave edildi. Elde edilen süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama, 100 mL, 0,2 M NaHCO_3 tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, 40 mL'lik aynı tampona aktarıldı.

3.2.4.c. L-Tirozinle modifiye edilen Sepharose-4B'ye p-aminobenzoik asidin bağlanması

Buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözülen 75 mg NaNO_2 , 10 mL 1 M soğuk HCl içerisinde çözülen 25 mg p-aminobenzoik asit çözeltisi üzerine damla damla ilave edildi. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen reaksiyon sonunda, diazolanmış halde bulunan p-aminobenzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 4 M NaOH ile pH:9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, önce 1 L saf su ile ve ardından 200 mL 0,01 M pH'sı 6,0 olan Na_2HPO_4 tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan *et al.* 2004).

Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi, L-tirozin ile modifiye edilmesi ve p-aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyonlar Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları

3.2.4.d. Enzim çözeltisinin afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0,05 M fosfat tamponu (pH:6,0) ile dengeleme işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz sonrası elde edilen homojenat kolona tatbik edildi ve yine 0,05 M fosfat tamponu (pH:6,0) ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0,1 M (pH:8,5) Tris-HCl tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve 2'er mL halinde elüatlar toplandı. Toplanan tüplerde 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı.

3.2.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzimin saflaştırılma işlemi yapıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli yöntemine göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice temizlendi. Her iki kenarında aralık oluşturmaya yarayan bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıpçılarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Öncelikle ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Jelin donması beklendi ve jelin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa tatbik edildi ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kurumaya önlendi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra gerilim 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Jel sabitleştirme çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra redüksiyon çözeltisine alındı ve 30 dakika boyunca bu çözeltide bekletildi. Jel daha sonra boyama işlemi yapılmak üzere gümüş nitrat çözeltisi içerisine konuldu. 20 dakika süren bu işlem sonrasında jel çıkarılarak yıkama 1 ve yıkama 2 çözeltilerine konuldu. Protein bantlarının belirginleşmesine kadar çalkalayıcıda yıkanan jel alınarak fotoğraf çekimi yapıldı (Şekil 4.3).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 mL 1 M Tris-HCl (pH:8), 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %0,1'lik SDS, 0,13 mL %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilendiamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat, $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ (PER) eklendi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 0,4 mL %30'luk akrilamid- %0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED ve 2,45 mL saf su karıştırıldı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,1 mL ilave edildi.

3.3. Çay Yapraklarından Saflaştırılan PFO Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları

Enzimin karakterizasyon çalışmalarını belirlemek amacıyla kısmi olarak saflaştırılan PFO enzimi kullanıldı. Bütün kinetik çalışmalarda üç tekrar yapılmıştır. PFO enziminin kinetik çalışmaları sırasında iki farklı substrat kullanılarak, optimum pH, optimum sıcaklık ve optimum iyonik şiddetler belirlendi. Daha sonra her iki substrat için K_M ve $V_{\max}$ değerleri belirlendi. Beş farklı inhibitör kullanılarak katekol substratıyla her bir inhibitör için IC_{50} değeri, inhibisyon türü ve K_i sabitleri belirlendi.

3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimum pH çalışması; katekol ve 4-metil katekol substratları için yapıldı. Çay yaprağı PFO enziminin optimum pH'sını saptamak için pH'sı 4,0, 4,5, 5,0 ve 5,5 olan 0,05 M Asetat tamponları, pH'sı 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 olan 0,05 M olan fosfat tamponları, pH'sı 8,0, 8,5, 9,0 9,5 olan 0,05 M Tris-HCl tamponları ve pH'sı 10 olan 0,05 M glisin tamponu hazırlandı. Her bir tampon ile enzim aktivite ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.2, Şekil 4.4-4.5).

3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

İyonik şiddet etkisi çalışması; katekol ve 4-metil katekol substratları için 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,8 M, 1 M tris tamponlarıyla çalışıldı. Bu esnada her substratın kendi optimum pH'sında çalışıldı. Her bir çözelti için aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge 4.3, Şekil 4.6-4.7).

3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Katekol ve 4-metil katekol substratları için optimum sıcaklık çalışması yapıldı. Çay yaprağı PFO enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek için elektronik ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklık belirlenirken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substrat çözeltisi küvet içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda belli bir zaman tutuldu. Çıkarıldığında enzim pipetlenerek hemen okuma yapıldı ve su banyosuna tekrar konuldu. 0°C ile 80°C arasında ve her 10°C'de bir bu şekilde aktivite ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.4, Şekil 4.8-4.9).

3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi

Çay yaprağı PFO enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için 0,05 M'lık pH'sı 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ve 6,0 olan 0,05 M asetat tamponu, pH'sı 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5 olan 0,05 M olan fosfat tamponu ve pH'sı 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 0,05 M Tris-HCl tamponu hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 500 µL alınarak üzerine yine 500 µL amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi ilave edilerek ependorf tüplerine konulup ilk okuma yapıldıktan sonra +4°C'de korunarak her 24 saatte bir 5 gün okuma yapıldı. Aktivite ölçümlerinde optimum pH ve iyonik şiddete sahip tamponlar kullanıldı. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Çizelge 4.5-4.6-4.7, Şekil 4.10-4.11-4.12).

3.3.5. Farklı substratlar için optimal şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

Çay yaprağı PFO enzimi substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tespit etmek için katekol ve 4-metil katekol için optimum şartlarda 1,0 mM, 2,0 mM, 5,0 mM, 7,5mM, 10,0 mM, 12,5 mM, 15,0 mM, 17,5 mM ve 20 mM substrat konsantrasyonlarında enzim aktivite ölçümleri yapıldı. 420 nm'de ölçülen bu değerler reaksiyon hızı olarak ($\mu\text{mol/dk}$) alındı. Daha sonra $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunurak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerin doğru denklemleri yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Tüm aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen grafikler Çizelge 4.8, Şekil 4.13-4.14'de gösterilmektedir.

3.3.6. Farklı inhibitörler için K_i sabitlerinin ve IC_{50} değerlerinin bulunması

Bu çalışmada inhibitör olarak; sodyum metabisülfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), sodyum sülfite (Na_2SO_3), glutatyon (γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), L-askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), ditiyoeritritol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) kullanıldı. Kullanılan inhibitörlerin inhibisyon etkisini bulmak amacıyla; farklı inhibisyon konsantrasyonları denenerek inhibisyonun hangi aralıklarda etkili olduğu ön bir çalışmayla bulundu. Bunun için en uygun substrat konsantrasyonu olan 100 mM katekol kullanıldı. Sabit substrat konsantrasyonunda, en az beş olmak üzere farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Elde edilen değerler yardımıyla %aktivite-[I] grafikleri çizildi. IC_{50} değerlerinin hesaplanmasında sabit substrat konsantrasyonunda değişen inhibitör konsantrasyonuna göre %aktivite değişimini ifade eden %aktivite-[I] grafiğinden faydalanıldı. Bu grafiğin denkleminde yararlanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.9, Şekil 4.15-4.19).

Bu maddelerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla önce farklı inhibitörler için inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak aktiviteler bulundu. Daha sonra diyaliz sonrası kısmi olarak saflaştırılmış olan enzim aktivitesini yarıya düşüren kimyasal bileşik konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun en az beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat

konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Çizelge 4.10, Şekil 4.20-4.24). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri tespit edildi.

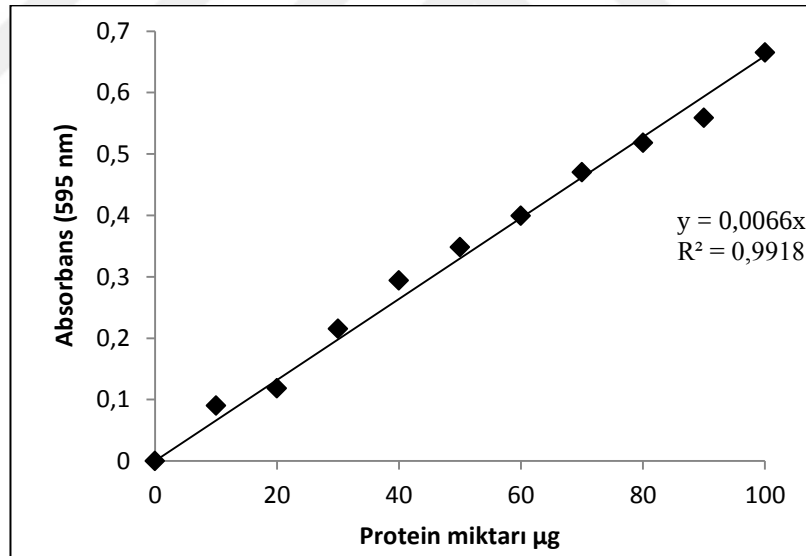


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Polifenol Oksidaz Enzimi İle İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Saflaştırma işlemleri sırasında bütün basamaklar için kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1’deki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



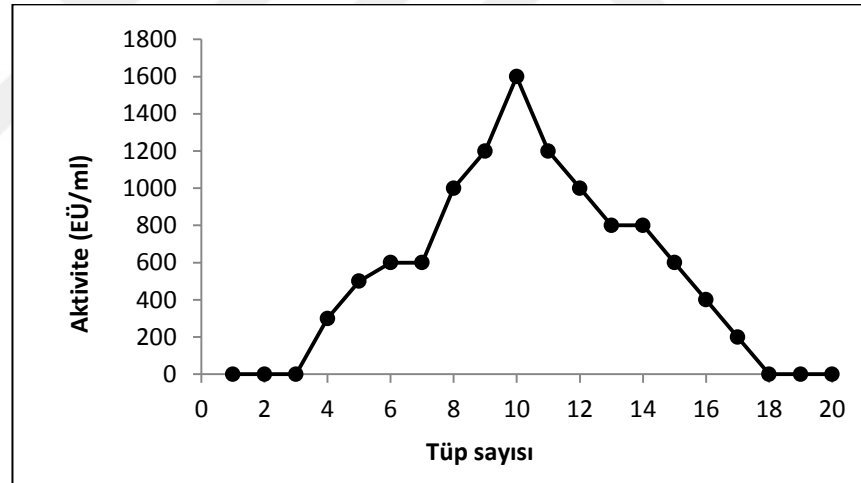
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Çay Yaprağı PFO Enziminin Saflaştırması İle İlgili Sonuçlar

4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları

Çay yaprağı homojenatı hazırlanarak doğrudan afinite kolonuna tatbik edildi. Önceden hazırlanmış olan elüsyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri şekil 4.2’de gösterildi.

Çay yaprağı homojenatı, afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterildi.



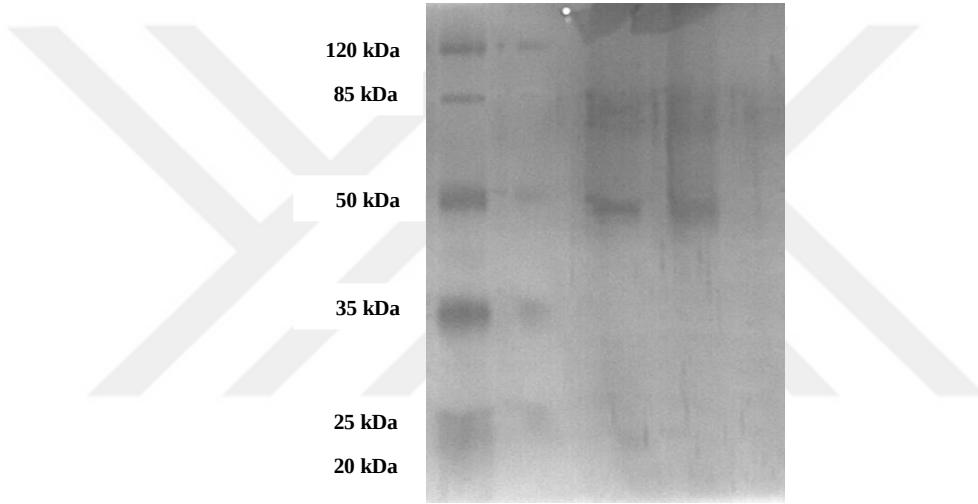
Şekil 4.2. Çay yaprağı PFO enziminin afinite kolonundan elüsyon grafiği

Çizelge 4.1. Çay yaprağı afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Aktivite (EÜ)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg prot.)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	15	8000	120000	0,3894	5,841	20544	100	1,00
Afinite Kromatografisi	2	1600	3200	0,00394	0,00788	406091	2,67	19,77

4.3. SDS-poliakrilamid Jel Elektrofrezisi İle PFO Enzim Saflığının Kontrolü

Çay yapraklarından PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.5’de izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri ve standart proteinler sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3’de verildi.



Şekil 4.3. Çay yaprağı PFO enzimi SDS-PAGE fotoğrafı

*1: Standart proteinler 2 ve 3: Saf enzim elüatları

4.4. Çay Yaprağı PFO Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

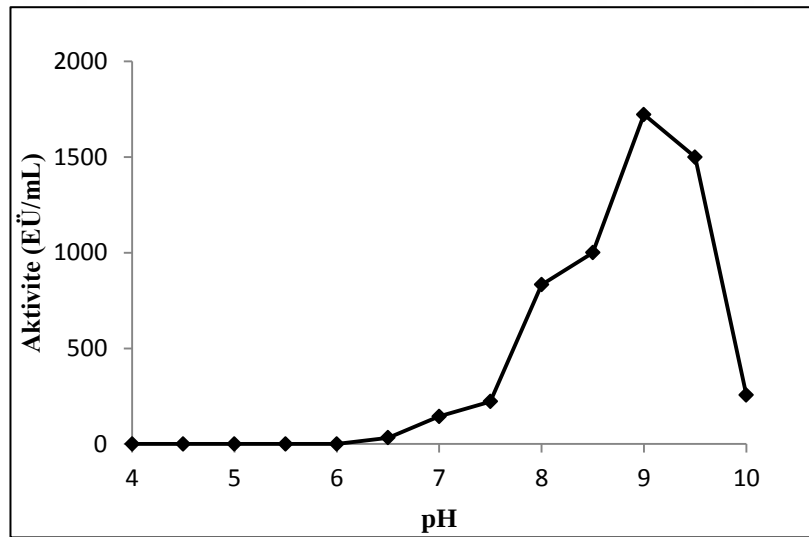
4.4.1. Optimum pH’nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

Çay yapraklarından saflaştırılan PFO enziminin optimum pH’sını tespit etmek için bölüm 3.3.1’de belirtildiği gibi iki ayrı substrat için pH değeri 4-5,5 arasında değişen 0,05 M’lık asetat tamponu, pH değeri 6-7,5 arasında değişen 0,05 M’lık fosfat tamponu, pH değeri 8-9,5 arasında değişen 0,05 M’lık Tris-HCl ile pH değeri 10 olan 0,05 M’lık glisin tamponlarından oluşan çözeltiler kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki

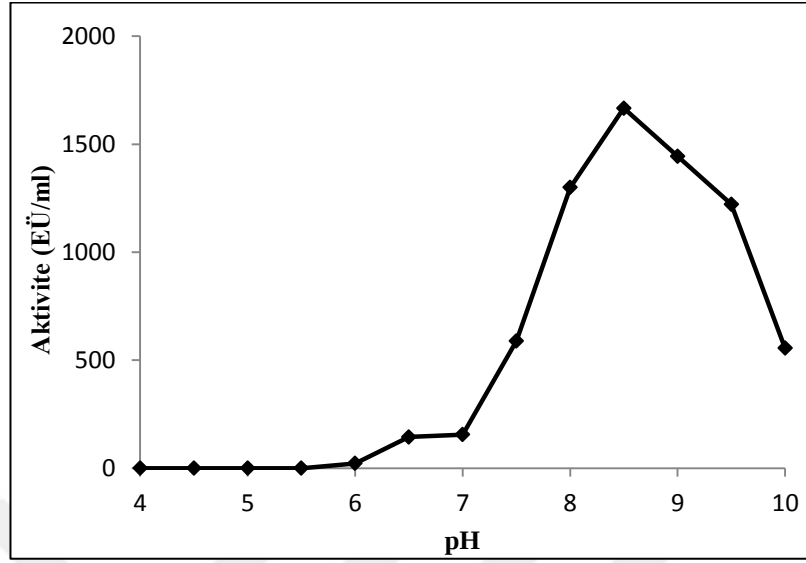
absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçölerek enzim aktiviteleri hesaplandı. Çay bitkisi PFO enziminin optimum pH değeri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5 ile 4,6'da gösterildiği gibi 4-metil katekol substratı için Tris/HCl tamponunda pH 8,5, katekol substratı için ise pH 9,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. Çay yaprağı PFO enzimi için iki farklı substrat için farklı pH'larda elde edilen aktivite değerleri

pH \ Substrat	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0
Katekol	0	0	0	0	0	33,33	144,44	222,22	833,33	1000,00	1722,22	1500,00	255,56
4-metil katekol	0	0	0	0	22,22	144,44	155,56	588,89	1300,00	1666,67	1444,44	1222,22	555,56



Şekil 4.4. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM katekol substratıyla elde edilen aktivite-pH grafiği



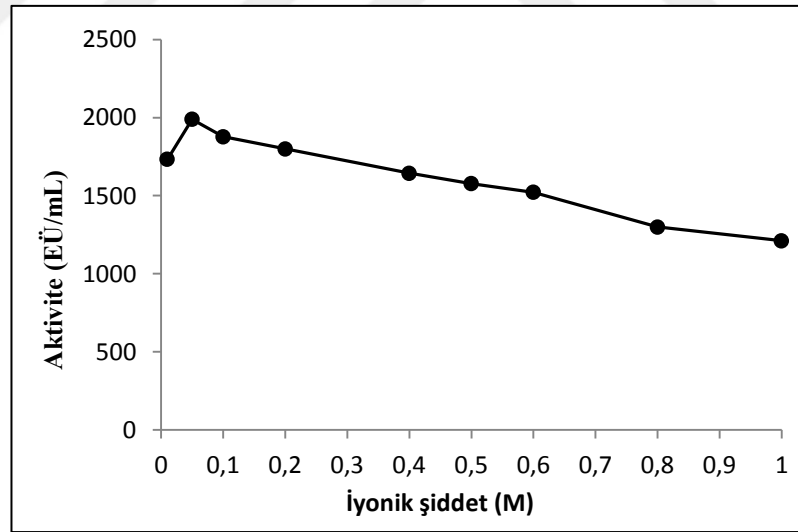
Şekil 4.5. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-pH grafiği

4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

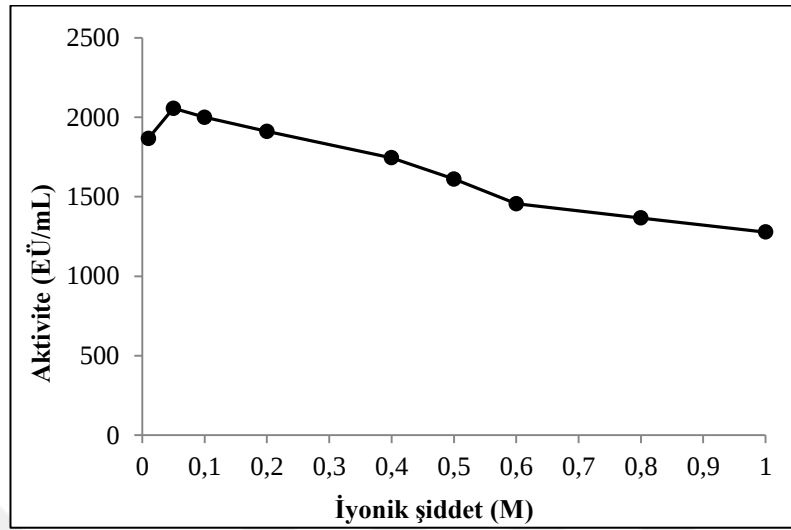
Çay yaprağı PFO enziminin aktivite ölçümünde en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi için bölüm 3.3.2’de bahsedildiği gibi değişik konsantrasyonlarda Tris-HCl tamponu hazırlandı. Çalışılan substratların optimum pH’larında ve 100 mM substrat konsantrasyonu kullanılarak enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra her bir tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.3’de ve Şekil 4.6 ile 4.7’de gösterildiği gibi her iki substrat içinde 0,05 M olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. Çay yaprağı PFO enziminin için, iki farklı substrat için farklı konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerleri

Tris/HCl Tamponu Konsantrasyonu (M)	Katekol	4-metil katekol
	Aktivite (EÜ/mL)	Aktivite (EÜ/mL)
0,01	1733,33	1866,67
0,05	1988,89	2055,55
0,1	1877,78	2000,00
0,2	1800,00	1911,11
0,4	1644,44	1744,44
0,5	1577,78	1611,11
0,6	1522,22	1455,56
0,8	1300,00	1366,67
1,0	1211,11	1277,78



Şekil 4.6. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-konsantrasyon grafiği



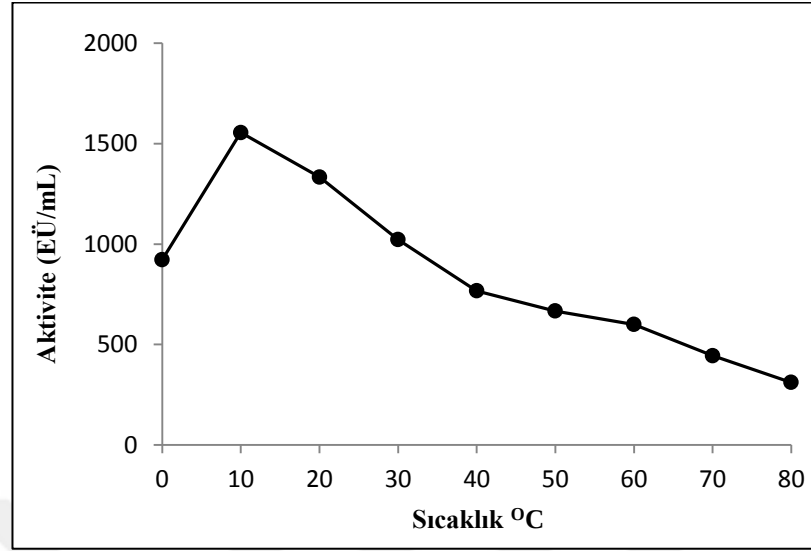
Şekil 4.7. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-konsantrasyon grafiği

4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

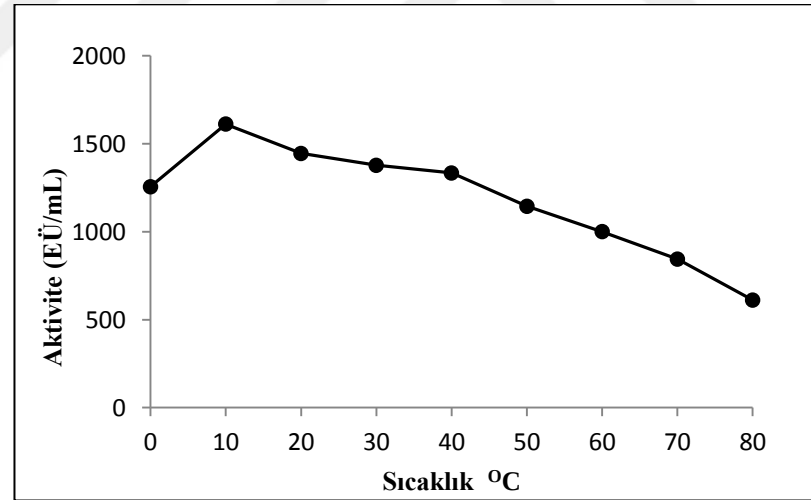
Farklı substratların optimum sıcaklığını tespit etmek amacıyla; substratların optimum pH'larında, 0°C'de ile 80°C arasında sıcaklıklarda bölüm 3.3.3.'de anlatıldığı gibi her 10°C'de enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra enzim aktiviteleri hesaplandı. PFO enziminin optimum sıcaklık değeri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8 ve 4.9'da gösterildiği gibi her iki substrat için 10°C olarak belirlendi.

Çizelge 4.4 Çay yaprağı PFO enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Katekol	4-metil katekol
	Aktivite (EÜ/mL)	Aktivite (EÜ/mL)
0	922,22	1255,56
10	1556,56	1611,11
20	1333,33	1444,44
30	1022,22	1377,78
40	766,66	1333,33
50	666,67	1144,44
60	600,00	1000,00
70	444,44	844,44
80	311,11	611,11



Şekil 4.8. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM katekol substratıyla elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği



Şekil 4.9. Çay yaprağı PFO enzimi için, 100 mM 4-metil katekol substratıyla elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği

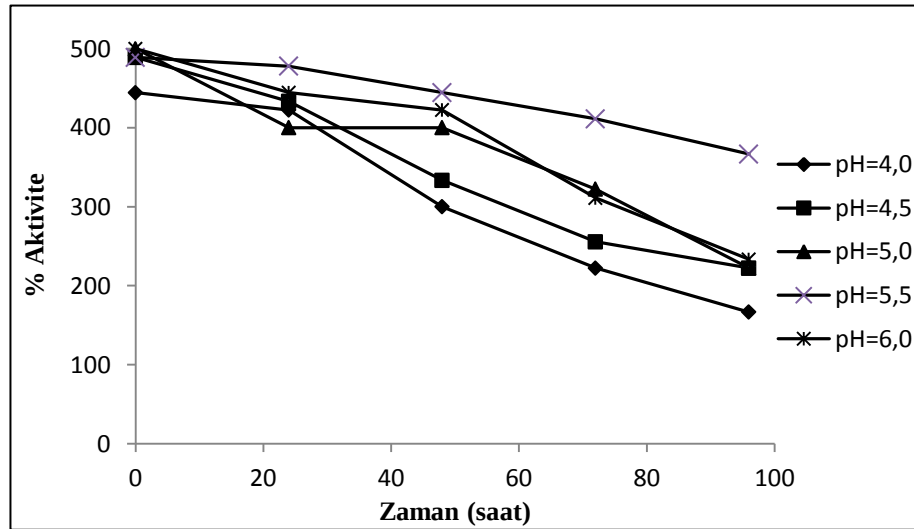
4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Çay yaprağı PFO enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için uygun iyonik şiddete sahip değişik pH değerlerinde tampon çözeltileri bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi hazırlandı. 1/1 oranında saf enzim ile tampon karıştırılarak 24 saatte bir aktivite

ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH değeri Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve Şekil 4.10, 4.11, 4.12’de gösterildiği gibi asetat tamponu ile pH 5,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Çay bitkisi PFO enziminin stabil pH’nın belirlenmesi için asetat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

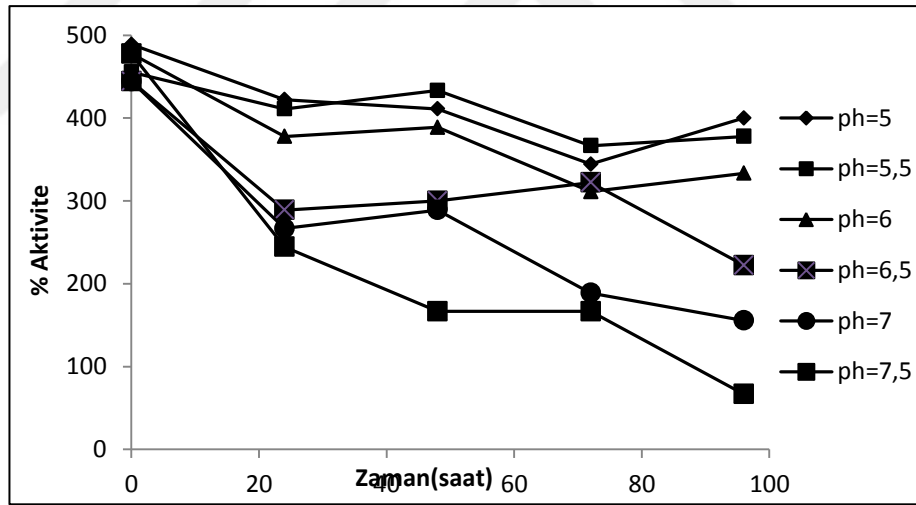
Zaman (saat)	0	24	48	72	96
pH	Aktivite (EÜ/mL)				
4,0	444,44	422,22	300,00	222,22	166,67
4,5	488,89	433,33	333,33	255,56	222,22
5,0	500,00	400,00	400,00	322,22	222,22
5,5	488,88	477,77	444,44	411,11	366,67
6,0	500,00	444,44	422,22	311,11	233,33



Şekil 4.10. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH’sını belirlemek için asetat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği

Çizelge 4.6. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

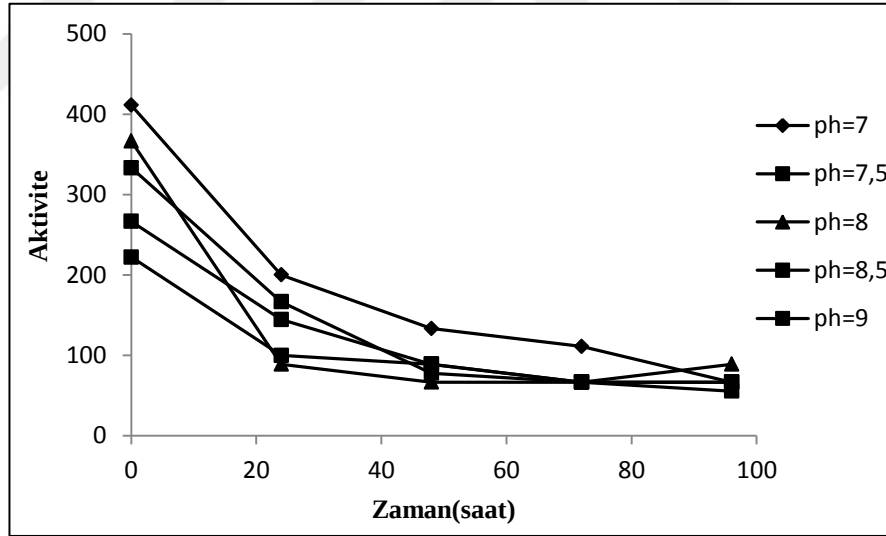
Zaman (saat)	0	24	48	72	96
pH	Aktivite (EÜ/mL)				
5,0	488,89	422,22	411,11	344,44	400
5,5	455,46	411,11	433,33	366,66	377,78
6,0	477,78	377,78	388,89	311,11	333,33
6,5	444,44	288,89	300,00	322,22	222,22
7,0	444,44	266,66	288,89	188,89	155,56
7,5	477,78	444,44	166,67	166,67	66,67



Şekil 4.11. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'sını belirlemek için fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği

Çizelge 4.7. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

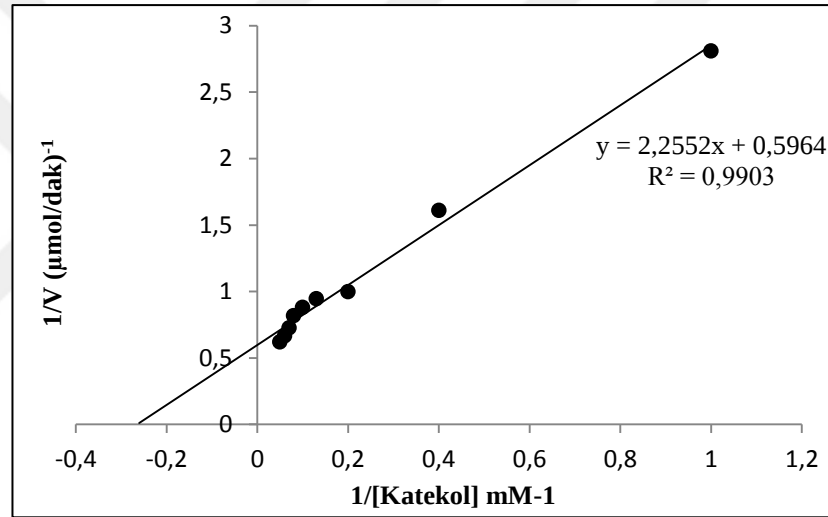
Zaman (saat)	0	24	48	72	96
pH	Aktivite (EÜ/mL)				
7,0	411,11	200	133,33	111,11	66,67
7,5	266,67	144,44	88,89	66,67	66,67
8,0	366,67	88,89	66,67	66,67	88,89
8,5	222,22	100,00	88,89	66,67	66,67
9,0	333,33	166,67	77,78	66,67	55,56



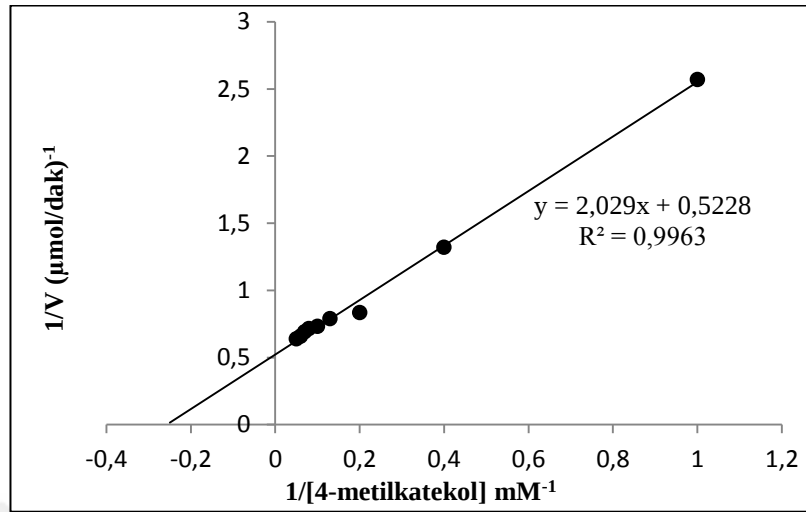
Şekil 4.12. Çay yaprağı PFO enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği

4.4.5. Farklı substratlar için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Çay yaprağı PFO enziminin iki farklı susbstrat için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5’de anlatıldığı gibi substratların optimum şartlarında en az 5 farklı konsantrasyonda enzim aktivite değerleri belirlendi. Sonuçta elde edilen değerler ile $1/[S]$ - $1/V$ grafiği çizilerek reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.13-4.14).



Şekil 4.13. Çay yaprağı PFO enzimi için katekol substratı ile elde edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği



Şekil 4.14. Çay yaprağı PFO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.8. Çay yaprağı PFO enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

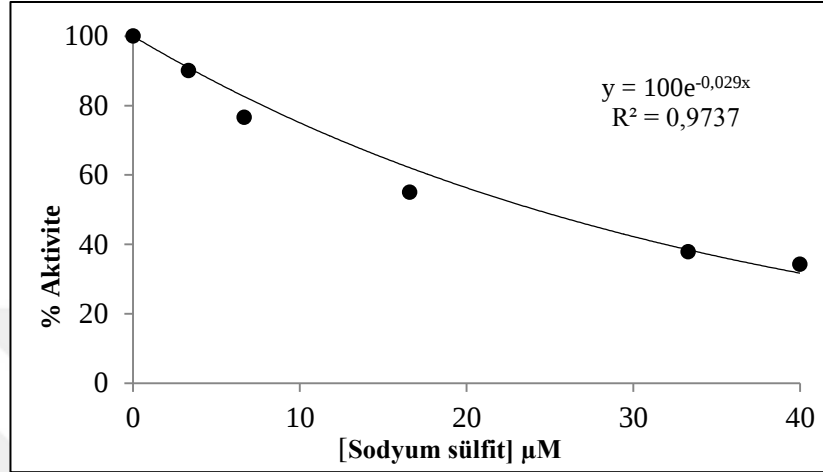
Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (μmol/dk)
PFO	Katekol	3,782	1,676
	4-metil katekol	3,881	1,912

4.5. Çay Yaprağı PFO Enzimi Üzerine Bazı Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

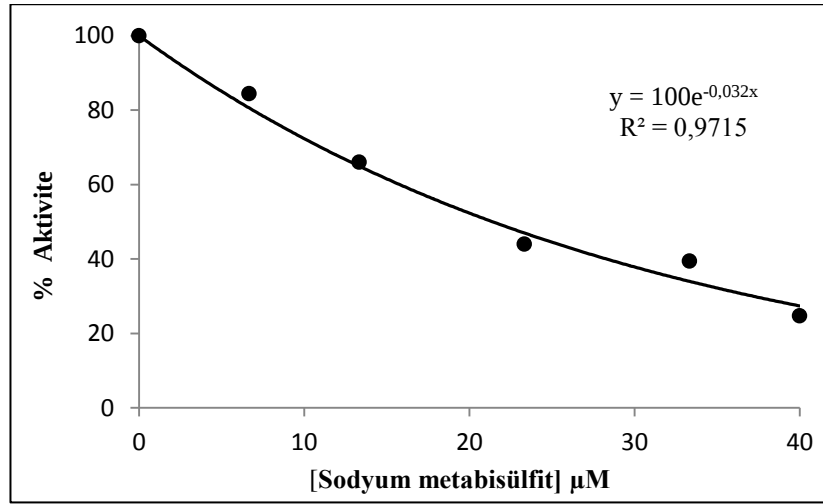
4.5.1. Çay yaprağı PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

IC_{50} değerlerinin tespitinde, bölüm 3.3.6'da açıklandığı gibi 100 mM sabit katekol konsantrasyonunda en az beş uygun inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Elde edilen aktivite değerlerinden yararlanarak %aktivite-[I] grafikleri çizilip

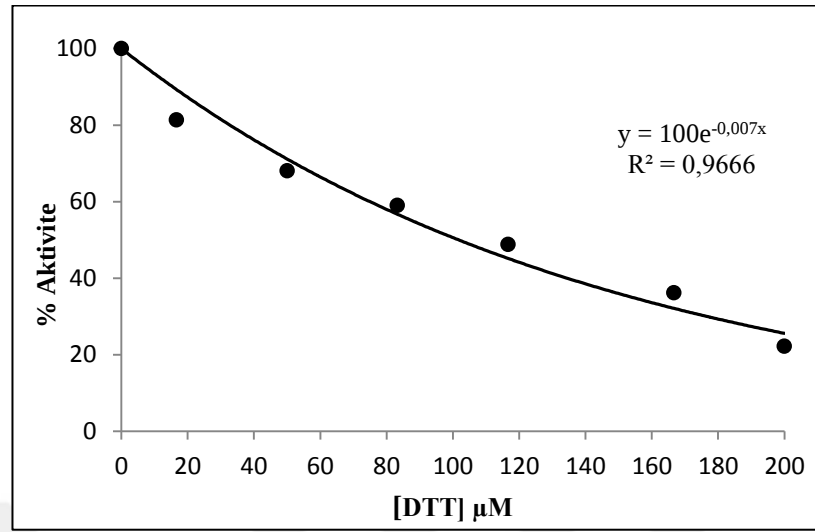
(Şekil 4.15-4.19) enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.



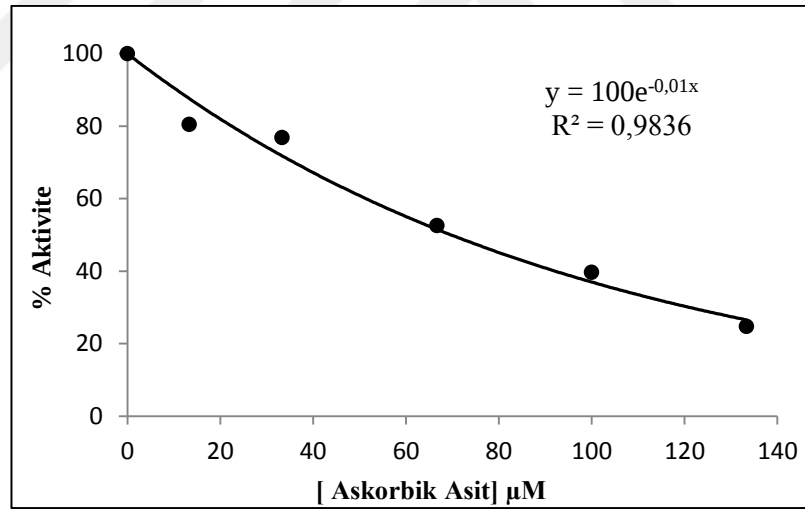
Şekil 4.15. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfite’in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Sodyum sülfite] grafiğı



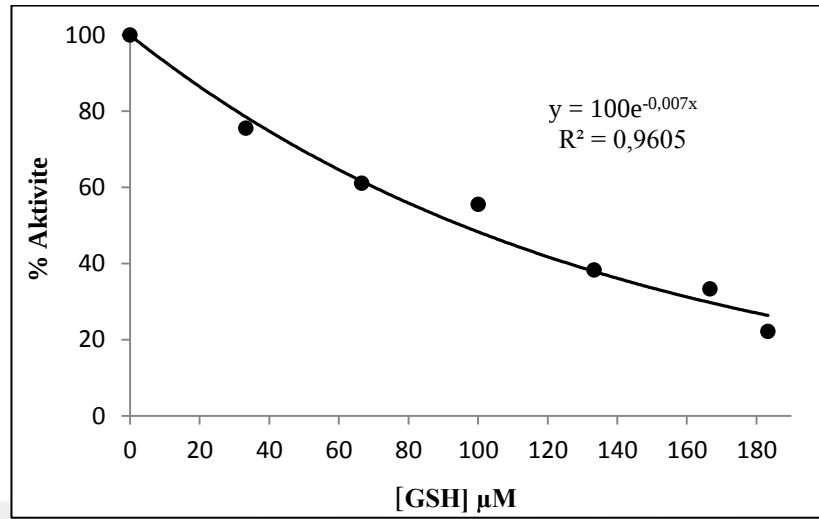
Şekil 4.16. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfite farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Sodyum metabisülfite] grafiğı



Şekil 4.17. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine ditiyoeritritol farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [DTT] grafiği



Şekil 4.18. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asit farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [Askorbik asit] grafiği



Şekil 4.19. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine Glutasyon farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- [GSH] grafiği

Çizelge 4.9. Çay PFO enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Kullanılan İnhibitör	IC ₅₀ (µM)
Sodyum sülfıt	23,90
Sodyum metabisülfıt	21,65
Ditiyoeritritol	99,02
Askorbik asit	69,31
Glutasyon	99,02

4.5.2. Çay yaprağı PFO enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması yönelik çalışmada katekol substratı kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal bileşikler için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen kimyasal bileşik konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra çay yapraklarından saflaştırılan PFO

enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği çizilip K_i değeri ve inhibisyon tipleri tayin edilerek Şekiller 4.20-4.24 ve Çizelge 4.10'da gösterildi.

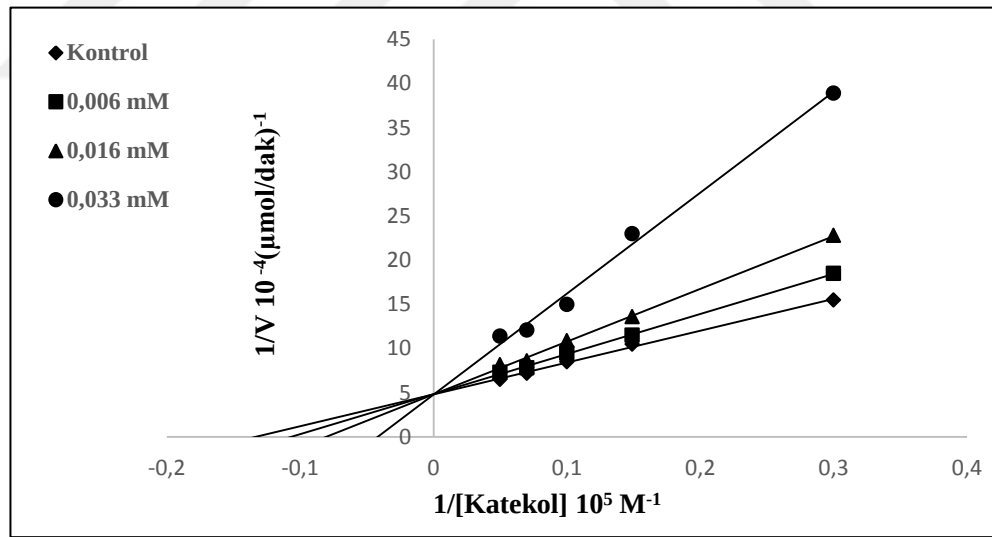
PFO enzimi için inhibitör olarak kullanılan tüm maddeler için inhibisyon tipleri (yarışmalı inhibitör, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Yarışmasız için ve Yarı Yarışmalı için:

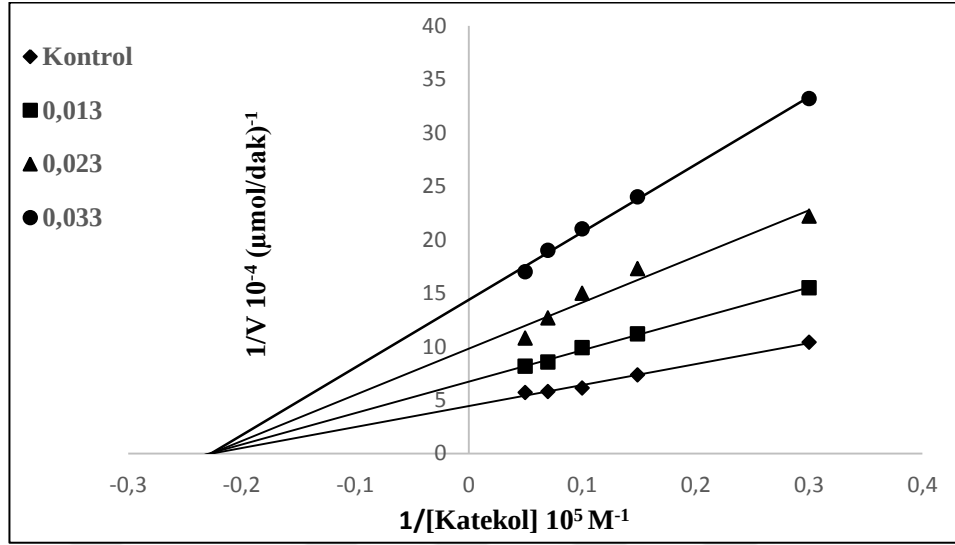
$$V_{max}^I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Yarışmalı için:

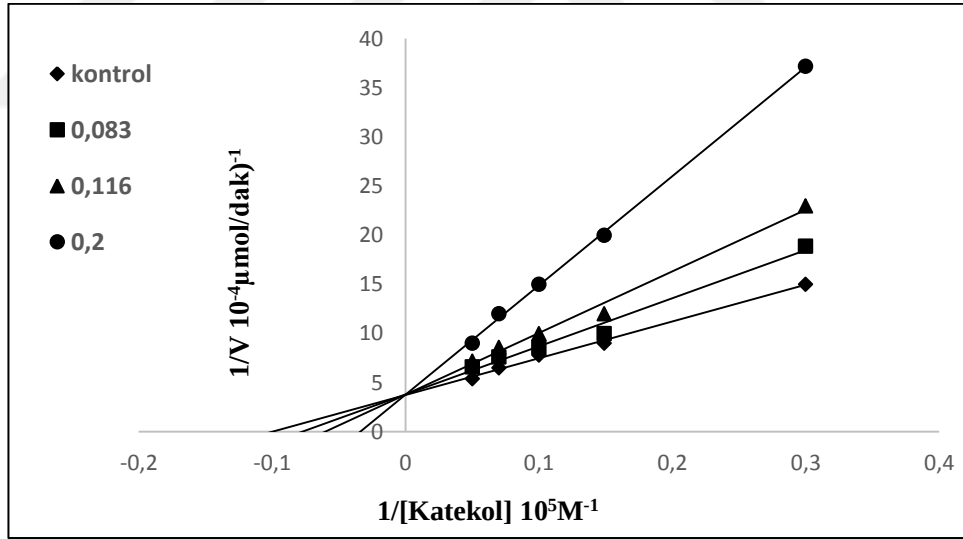
$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$



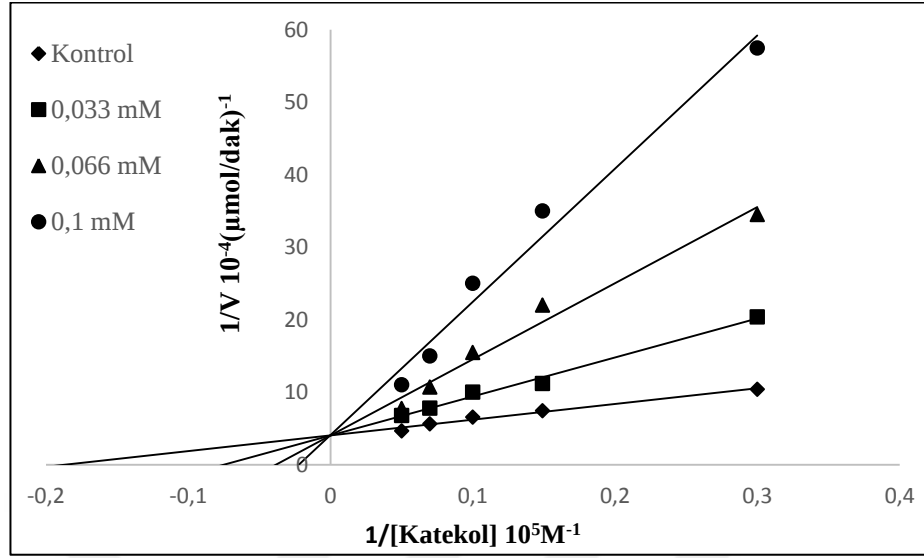
Şekil 4.20. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfid'in inhibisyon etkisi



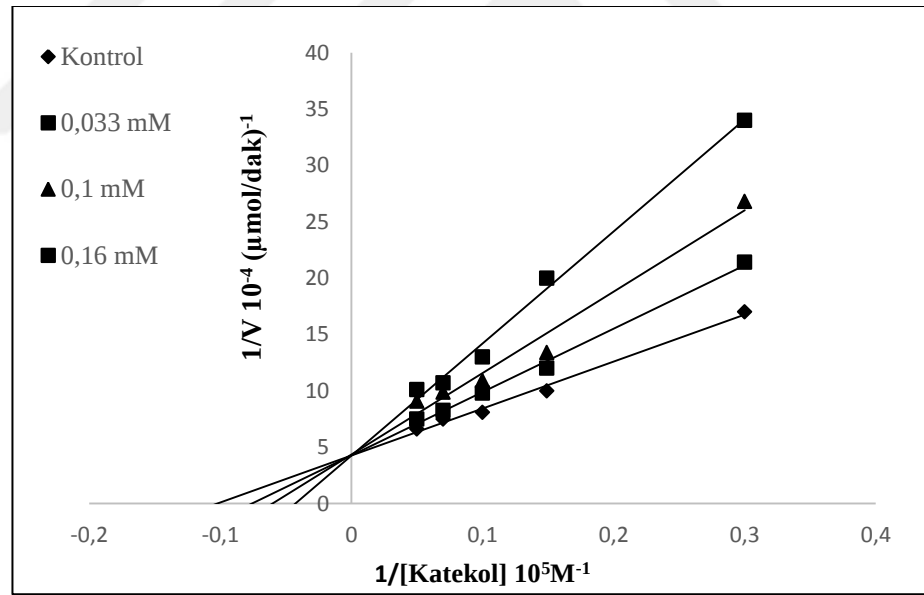
Şekil 4.21. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine sodyum metabisülfıt'in inhibisyon etkisi



Şekil 4.22. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine ditiyoeritritol'ün inhibisyon etkisi



Şekil 4.23. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine askorbik asit'in inhibisyon etkisi



Şekil 4.24. Çay yaprağı PFO enzim aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi

Çizelge 4.10. Çay yaprağı PFO enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan kimyasal bileşikler

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
Sodyum Sülfid	0,006	0,024	0,021±0,005	Yarışmalı
	0,016	0,024		
	0,033	0,015		
Sodyum metabi sülfid	0,013	0,025	0,019±0,005	Yarışmasız
	0,023	0,019		
	0,033	0,014		
Ditiyoeritritol	0,083	0,296	0,192±0,097	Yarışmalı
	0,116	0,178		
	0,200	0,102		
Askorbik asit	0,033	0,051	0,033±0,016	Yarışmalı
	0,066	0,029		
	0,100	0,018		
Glutatyon	0,033	0,097	0,119±0,024	Yarışmalı
	0,100	0,144		
	0,160	0,115		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Polifenol oksidaz (PFO) enzimi bitki hücrelerinin plastit ve kloroplastlarında bulunur. Ham meyve hücrelerinde membrana bağlı olarak olgunlaşmış ve depolama sürecinde parçalanmış veya çözünmüş halde bulunabilir. Dolayısıyla polifenol oksidaz enzimi bitki hücrelerinde aynı anda her iki formda da bulunabilir (Concellon *et al.* 2004). Bitkilerde bu enzimin katalizlediği reaksiyonlar meyvenin ham veya olgun olmasına bağlı bir unsurdur. Enzim özütü enzim olmayan protein karışımı ve birçok izoenzim içerebilir (Duangmal and Owusu-Apenten 1999).

Gıda işletmeciliğinde üzerinde araştırma yapılması gereken önemli bir faktör polifenol oksidaz enzimidir. Çay bitkisi ise, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen önemli bir içecek kaynağıdır. Diğer bitkisel ürünler gibi çayın da temini, işlenmesi ve depolanması için gerekli şartların sağlanması amacıyla bazı kimyasal özelliklerinin araştırılması gerekir. Polifenol oksidaz enzimi, bitki dokularındaki esmerleşme kaynağı olarak bilinmektedir. Meyve ve sebzelerdeki kararma yani renk değişikliği istenmeyen bir durumdur. Enzimatik kararma esnasında polifenollerin o-kinonlara oksidasyonu ve o-kinonların da esmer renk maddelerine veya melanin polimerizasyonuna cereyanı meydana gelir. Fakat yeşil çay yapraklarından siyah çay üretiminde enzimatik kararma istenen bir olaydır. Çünkü kinonlar, çaya içim tadı ve kalitesini kazandıran teaflavin ve tearubijinlerin ön maddeleridir. Bu durum bizi bu konuda çalışmaya sevk etmiştir. Bu çalışmada, Rize yöresinden temin ettiğimiz çay bitkisinden PFO enzimi afinite kromatografisi yardımı ile saflaştırılmıştır. Saflaştırmada kullanılan afinite jeli tez kapsamında tarafımızdan sentezlenmiştir. Enzimin varlığı, saf enzim elüatından elektroforetik olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin kinetik ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada kalitatif protein tayini elde edilen elüatların 280 nm'de absorbanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayinde protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanır (Segel 1968). Kantitatif

protein tayinleri ise, Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde; fosforik asitli ortamda proteinlerin coomassie brillant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmaya esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorptans gösterir. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden fazla tercih edilmesinin nedeni, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerinin az olması, protein-boya kompleksinin çözeltilerinde uzun süre kalması ve hassasiyetinin 1-100 µg arasında olmasıdır (Bradford 1976).

Enzim aktivitesi; substratın kaybolma veya ürünün oluşma hızını ölçme ile belirlenebilir. Substratın kaybolma hızının belirlenmesinde O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresi ile manometrik ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülür. Ürünün oluşma hızı, kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluklarının spektrofotometrik metotla ölçülmesiyle tayin edilir. Bu metod çok basit ve diğer yöntemler kadar hassas olduğundan dolayı tercih edilir ve bu yüzden çalışmamızda spektrofotometrik metod kullanılarak 420 nm dalga boyunda aktivite ölçümleri yapıldı (Vamos-Vigyazo 1981).

PFO enziminin çay yapraklarından izolasyonunda tampon ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Fakat bu yöntem yapılırken oluşan en büyük problem bitki materyalinin ekstraksiyonu sırasında pigment oluşumunun ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler enzimin üzerine çökebilir ve çözünürlüğün azalmasına sebep olabilir ve pigmentler enzimin inaktivasyonuna da sebep olabilir. Bu problemleri minimuma indirmek için ekstraksiyon işlemi mümkün olduğunca düşük sıcaklıklarda yapılmıştır. Enzimatik polifenol oksidasyonundan ekstraksiyonu korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri, indirgeyici bileşikler yada kinon bağlayıcıları eklenebilir. Askorbik asit enzimatik kararma inhibitörlerinden en fazla kullanılanlarından birisidir.

Askorbik asit hem kinonların indirgeyicisi hem de bakırı şelatlama reaktifi olarak görev yapar (Fujita *et al.* 1991). Askorbik asit, oluşan o-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir ve sonuçta kendisi oksitlenir. Askorbik asidin tamamı oksitlendikten sonra esmerleşme

reaksiyonu devam eder. Bu nedenle askorbik asitin kinonları indirgeme kapasitesi, kullanıldığı konsantrasyona bağlıdır. Bu inhibitör düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında indirgenme işleminde çabucak tükenebilir ve bundan dolayı renkli polimerlerin oluşumunu sınırlı bir süre için engeller. Eğer askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda kullanılırsa oluşan kinonları indirgeyerek enzimin substratlarına dönüştürebilir ve enzimatik kararmaya karşı kalıcı koruma sağlayabilir (Euclides *et al.* 1990). Çalışmamızda bu amaçla kinonları indirgeyici reaktif olarak ekstraksiyon tamponu olarak kullanılan asetat tamponuna (pH:6,0) 10 mM askorbik asit ilave edilmiştir.

Substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdan uzaklaştırılması enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonunun önlenmesinin etkili yollarından biridir. Polivinil pirrolidin (PVP) fenol bağlamada en yaygın kullanılan maddedir. PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral yada asidik pH'da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVP, PFO'nun kısmi yarışmalı inhibitörüdür. PVP'nin inhibisyon etkisi ekstraktın yıkanması ile giderilebilmesine rağmen bu aşamada fenollerin bağlanmasında polietilen glikol (PEG) daha çok tercih edilir (Murao *et al.* 1993). Araştırmamızda da bu amaçla fenolleri bağlayıcı olarak PEG kullanılmıştır.

Çalışmamızda PFO enzimini saflaştırmak amacıyla afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Afinite kromatografisi ligand takılabilmesi koşulu ile uygulanması kolay bir tekniktir ve saflaştırılacak molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak bağlanan liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir yöntemdir. Genelde matriks olarak polimer madde olan Sefadex, Sefarohose ve biyojeller tercih edilir. Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi, genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Saflaştırılması istenen molekülün liganda bağlanması çoğu durumda matriks ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zorlaşmakta ve kolon verimi düşmektedir. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlamayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar. Ligand ve matriks arasına uzantı kolu takıldığında daha iyi bağlanma ve elüsyon yapılabilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Bu çalışmada Arslan *et al.* (2004) jel sentezleme yöntemi kullanılarak, Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jeli sentezlenmiştir. Tampon ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edilen homojenat sentezlenen bu jele tatbik edildi ve bu sayede çay bitkisi PFO'sunun afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirildi. Homojenattaki enzimin spesifik aktivitesi 20544 EÜ/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 406091 EÜ/mg protein olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, enzim çay bitkisinden 19,77 kat, %2,97 verimle saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Enzimi saflaştırmak için homojenata önce nötral tuz (amonyum sülfat) çöktürmesi ve sonrasında diyaliz uygulandı. Ancak her bir aralıktaki tuz konsantrasyonunda hem çökelekteki hem de süpernatanttaki enzim aktivitelerinin tutarsızlığı ve bu işlem sırasında enzim aktivitesinin çok büyük bir kısmını kaybetmesi nedeniyle saflaştırma işleminde bu aşama uygulanmadı. Literatürde de bizim karşılaştığımız bu duruma benzer problemle karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Erat 1998).

Daha önce aynı afinite jeli sentezlenip, yapılan afinite kromatografisi yöntemi ile PFO'nun *L.piperatus* mantarından 13,9 kat (Öz 2010), *Agaricus bisporus* mantarından 1,93 kat, %39 verimle (Dedeoğlu 2009), Dut meyvesinden 74 kat (Arslan *et al.* 2004), *Boletus erythropus* mantarından ise 28,5 kat (Özel *et al.* 2010) saflaştırılması yapılmıştır. Afinite kromatografisinden farklı olarak, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi, PFO'nun çeşitli kaynaklardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Taze fasulyenin yeşil kabuğundan iki PFO izoenzimi, Sephadex G-100 kolonu ile 17 kat ve 9,4 kat (Guo *et al.* 2009), aynı fasulyenin tanelerinden yine iki PFO izoenzimi, DEAE- selüloz kolonu ile 6,6 kat ve 3,8 kat (Guo *et al.* 2009), Çay bitkisi PFO'sundan DEAE-selüloz kolonu ile 3,32 kat, %5,11 verim ile (Yabacı 2008), Çadır bitkisinin yaprak ve gövdesinden iyon değişim kromatografisi ile 2.7 kat ve 2,2 kat, %148 ve %129 verimle saflaştırılmıştır (Erat 1998).

Afinite kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra, elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edilmiştir. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

PFO enziminin saflığını kontrol etmek için yapılmıştır ve işlemin sonunda tek bant elde edilmiştir. Bu bantın ağırlığı yaklaşık 50 kDa'dur (Şekil 4.3).

Polifenol oksidaz enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sı katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak yapıldı. Katekol için 0,05 M Tris-HCl tamponunda optimum pH'sı 9 (Şekil 4.4) ve 4-metil katekol substratı için ise 0,05 mol Tris-HCl tamponunda optimum pH 8,5 olarak bulundu (Şekil 4.5). Literatür çalışmalarında *Boletus erythropus* mantarından saflaştırılan PFO enzimi için optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenmiştir (Özel *et al.* 2010). Yapılan başka bir çalışmada kuşburnu PFO enzimi için optimum pH değeri 8,5 olarak belirlenmiştir (Şakiroğlu 1994).

İyonik şiddet çalışmasında; 0,01-1 M arasında konsantrasyonlarında bir seri Tris-HCl tamponu hazırlandı. Katekol ve 4-metil katekol substratlarının ikisi içinde kendi optimum pH'larında aktivite ölçümü yapıldı. Bu çalışma sonucunda her iki substratta 0,05 M tampon konsantrasyonunda yüksek aktivite göstermiştir. Bu yüzden aktivite ölçümlerinde bu konsantrasyon kullanıldı. Ancak farklı konsantrasyonlardaki aktivite farkları çok az olduğundan iyonik şiddetin enzim aktivitesini etkileyen ciddi bir faktör olmadığını söylemek mümkündür (Şekil 4.6-4.7), (Çizelge 4.3).

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık aralığı vardır. Çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklarda enzimin üç boyutlu yapısı bozulur ve enzim aktivitesi kaybolur. Çalışmamızda çay yapraklarından saflaştırılan PFO enziminin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek yine aynı substratlarla 0°C ve 80°C sıcaklık aralığında her 10°C'de bir enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optimum sıcaklar, katekol ve 4-metil katekol için 10°C olarak belirlendi (Şekil 4.8-4.9), (Çizelge 4.4).

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla enzim pH'sı 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 olan 0,05 M asetat tamponlarına alınarak 4°C'de muhafaza edildi. Belli zaman periyotlarında katekol substratı ile aktivite ölçümü yapıldı ve aktivitedeki düşüşün en az

olduğu pH'nın 5,5 olduğu tespit edildi. Sonuçlar spektrofotometrik olarak 24 saatte bir yapılmak üzere 5 gün tekrarlandı (Şekil 4.10).

Enzim kinetiğinde K_M değeri, enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonu ve enzimin subsrata olan ilgisinin bir göstergesi şeklinde iki farklı anlamı vardır. Araştırmamızda çay yapraklarından saflaştırdığımız PFO enzimi için katekol ve 4-metil katekol substratları için 5 farklı substrat konstrasyonlarında enzim aktivite değerleri belirlendi. $1/V-1/[S]$ değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.13-4.14), (Çizelge 4.8). Katekol için K_M sabiti 3,782 mM, V_{max} değeri ise 1,676 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı. 4-metil katekol için ise K_M sabiti 3,881 mM, V_{max} değeri ise 1,912 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre çay yaprağı PFO enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan katekol substratına ilgisinin daha fazla olduğu görüldü. Çünkü düşük K_M yüksek bağlanmayı; yüksek K_M düşük bağlanmayı ifade eder.

Kuşburnu meyvası PFO enzimi için yapılan çalışmalarda katekol ve 4-metil katekol substratı için K_M değeri sırasıyla $7,41 \times 10^{-3} \text{M}$ ve $8,64 \times 10^{-3} \text{M}$ (Şakiroğlu 1994), yine benzer çalışmada PFO enzimi aktivitesi için K_M değerleri *L.piperatus* PFO'su için K_M ve V_{max} değerleri katekol substratı varlığında, sırasıyla 1 mM ve 25000 EÜ/mg protein olarak belirlendi (Öz 2010).

Çay yaprağı PFO enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC_{50} değerlerini belirlemek için % aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.15-4.19). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplandı. Kimyasal bileşiklerin IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında sodyum metabisülfid < sodyum sülfid < askorbik asit < ditiyoeritritol = glutatyon şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.9).

Çay yaprağı PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanıldı. Sonuçların hassas bulunabilmesi amacıyla her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit

inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.20-4.24). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisinin fazla olduğu düşünüldüğünde bu tür inhibitörlerin enzimi çok daha fazla inhibe edeceği açıktır. Çay yaprağı, PFO enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin ortalama K_i sabitleri hesaplandı. En düşük K_i değerleri sodyum metabisülfite (0,019), bunu sırasıyla sodyum sülfite (0,021), askorbik asit (0,033), glutatyon (0,118) ve ditiyoeritritol (0,192) takip etmektedir. Bu etki sırası IC_{50} değerleri ile çoğunlukla uyumaktadır. Görüldüğü gibi enzim için sodyum metabisülfite oldukça küçük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi göstermiştir ve böylece bu molekülün PFO enzimi için potansiyel inhibitör oldukları görülmektedir. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak; çay bitkisi PFO enzimi ile ilgili yapılan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- a) Enzimin optimum pH'sı katekol substratı için pH:9,0, 4-metil katekol substratı için pH:8,5 bulunmuştur.
- b) Optimum sıcaklık çalışması katekol ve 4-metil katekol substratları için 10°C bulunmuştur.
- c) Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu en iyi substratın katekol olduğu görülmüştür.
- d) Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak ilk kez saflaştırılmıştır.
- e) Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve yaklaşık olarak 50 kDa olarak bulunmuştur.
- f) İnhibisyon çalışmalarında elde edilen I_{50} ve K_i sabitleri en etkili inhibitörün sodyum metabisülfite olduğu görülmüştür.

Bu çalışmamıza benzer olarak;

Yabacı (2008) çay bitkisi PFO enzimi ile ilgili yapılan çalışmalarda aşağıda bulguları elde etmiştir.

- a) Enzimin optimum pH değeri 6,02 olarak belirlenmiştir.
- b) Enzimin optimum sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir.
- c) Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu en iyi substratın 4-metil katekol olduğu görülmüştür.
- d) DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi yöntemi ile enzim saflaştırılmıştır.
- e) İnhibisyon çalışmalarında elde edilen I_{50} ve K_i sabitlerine göre L-sistein'in en düşük inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında bulgular arasındaki farkın çay bitkisinin çeşidindeki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Arnaud, Y., 1965. Era de par untracentrifugation analytique d'un systems enzyniatique monomere-polymere (polyhenoloxydase). J. Polym.Sci. Part C., 167, 4103.
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S. ve Ozensoy, O., 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. Food Chemistry, 88, 479-484.
- Astill, C., Birch, M.R., Dacombe, C., Humphrey, P.G. and Martin, P.T., 2001. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5340-5347.
- Aydemir, T., Kavrayan, D. ve Çınar, S., 2003. Isolation and Characterisation of Polyphenoloxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 21, 115-125, Konya.
- Baruah, P. and Swain, T., 1959. The action of patato phenolose compounds. J. Sci. Food Agr., 10,125.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitie of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-25
- Cabrera, C., Gimenez, R. and Lopez, M.C., 2003. Determination of tea components with antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4427-4435.
- Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L. and Rintoul, G., 2004. Developing an index of quality for Australian tea. RIRDC Publication No. 04/033, Project No. UQ-88A, Publication of Rural Industries Research and Development Corporation, 192 pp., Australia.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:24, Ankara.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Chew, Y.L., 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. Food Chemistry. 102, 1214-1222.
- Chen, M., 2002. Tea and Health-An Overview. Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential . Taylor & Fancis. London. Edited by Young-su Zhen p:1-17.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J. and Tumer, N., 2001. Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenoloxidase. J.Agric. Food Chem, 49, 652- 657.
- Concellon, A., Anon, M. C. and Chaves, A. R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. Food Chemistry, 88, 17-24.
- Cuatracasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. J. Biol. Chem., 245, 3059.
- Dedeoğlu, N., 2009. Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karekterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

- Doğan S., Ayyildiz Y., Doğan M., Alan Ü., Diken M.E. (2013): Characterisation of polyphenol oxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm). *Czech J. Food Sci.*, 31: 156–165.
- Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R.K., 1999. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, 64, 351-359.
- Epsin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Canovas, F. G., 1995. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from verdedoncella apple. *J.Agric. Food Chemistry*, 43, 2807-2812.
- Erat, M., 1998. Çayır bitkisinden izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Euclides, J.L., Souza, L.J. and Valdir, A.N., 1990. Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenol Oxidase from Palmito. *J. Sci. Food Agric.*, 52, 249-259.
- FAO, 2008. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental Group on Tea, Current Situation And Medium-Term Outlook, Eighteenth Session, Hangzhou, China, 14-16.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office of Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenton, D.E., 1995. Dioxygen management-involvementin enzymes Biocoordination Chemistry, Oxford Science Publications, Oxford, Great Britan, 52-53.
- Fernández, P.L., López, A., Pablos, F., González, A.G. and Martín, M.J., 2003. The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages. *Microchimica Acta*, 142, 79-84.
- Fisunoğlu, M., Besler, H.T., 2008. Çay ve Sağlık İlişkisi, 727: 7-15.
- Frudenberg, K. and Weinges, K., 1962. Catechins and flavonoid compounds in the chemist of flavonoid compounds. Pergamon Press, 197.
- Fujita, S., Tono, T. and Kawahara, H., 1991. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 55, 643-651.
- Geissman, T.A., 1963. Leucoanthocyanins in aspects of plant phenolic chemistry (V.C.Reneekles ed.). *Plant Phenolic Group of North America*, Toronto, p 1.
- Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M. and Nagashima, H., 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography A*, 749, 295-299.
- Gökkaya, Ö., 2009. Beyaz Kiraz Meyvesi (Starks Gold) Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Gregory, R. P. F. and Bendall, D. S., 1966. The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis* L.), *Biochemichal Journal*, 101: 569-581.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. and Xue, S., 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 117, 143-151.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Oktay, M., 2005. Purification and Characterization of Polyphenol oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3), 297-302.

- Güngör, K., 2008. Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi). Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Halder, J., Tamuli, P. and Bhaduri, A.N., 1998. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*), *Nutritional Biochemistry*. 9: 75-80.
- Hammer, F.E., 1993. Oxidoreductases in Enzymes in Food Processing, T.Nagodawithana and G. Reed (ed.s). Academic Pres, San Diego, pp 221- 222.
- Harborne, J.B., 1964. Biochemistry of phenolic compounds , Academic Press, London.
- Hayashi, K., 1962. The anthocyanins in the chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press, 248.
- Hermann, K., 1974. Über die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Erwerbsastbau*, 16,1
- Hilton, P.J., 1973. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis, Interscience Publishers, John Wiley and Sons, U.S.A., 18, 457-513.
- Ishiguro, R. and Aoyama, Y., 1970. Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in Radist (*Raphanus sativus* L.). *Eiyo To Shakuryo*. 23, 13.
- İçen, H., 2001. Çay Fabrikası Atıklarından Kafein Eldesi ve Optimum Şartların Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jolley, R.L. and Mason, H.S., 1965. The multiple forms of mushroom tyrosinase interconversion., *J. Biol. Chem.*, 240, 1459.
- Juneja, L.R., Chu, D., Okubo, T., Nagato, Y. and Yokogoshi, H., 1999. L-theanine-a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 199-204.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya, Aktif Yayınları*, Erzurum, s. 97.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, Sirkeci/İstanbul.
- Keskin, H., Erkmen, G., 1987. *Besin Kimyası*. T.C..İstanbul Üniversitesi Sıra no: 3450, Mühendislik Fakültesi No:72. Güryay Matbaacılık Tic. Lmt. Sti., İstanbul, 270-274.
- Kirk-Othmer., 1983. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd Ed., 22, 628-643.
- Kuroda, Y. and Hora, Y., 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research*, 436, 69-97.
- Labuza, T. P., Lillemo, J. H. and Taoukis, P. S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes, *Fruit Processing*, 2, 9-13.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Langdon, T.T., 1987. Prevention of browning in prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technology*, 41, 64-67.
- Laurila, E., Kervinen R. and Ahvenainen, R., 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News and Information* , 9(4), 53-66.
- Lerner, H.R., Mayer. A.H. and Harel. E., 1972. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, 11, 2415.
- Lin, Y.L., Juan, I.M., Chen, Y.L., Liang, Y.C. and Lin, J.K., 1996. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-

- absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1387-1394.
- Lin, Y.S., Tsai, Y.J., Tsay, J.S. and Lin, J.K., 2003. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1864-1873.
- Lopez, S.J., Thomas, J., Pius, P.K., Kumar, R.R. and Muraleedharan, N., 2005. A reliable technique to identify superior quality clones from tea germplasm. *Food Chemistry*, 91, 771-778.
- Mahanta, P.K., Boruah, S.K., Baruah, H.K. and 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.
- Mathewson, P.R., 2000. *Enzymes*, Eagen Press Handbook Series, 37-38.
- Matsui, Y., 2004. The origin of oolong tea. *International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science*, 669-672, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- Mayer, A.M. and Harel, E., 1979. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*, 193-215.
- Mayer, A.M., 1987. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, S., 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*, 45, 80-86.
- Mcweeny, D.J., 1974. The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 735.
- Mehra, A. and Baker, C.L., 2007. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 100, 1456-1463.
- Murao, S., Oyama, H., Namura, Y., Tono, T., and Shin, T., 1993. Purification and Characterization of Edible Burdock Polyphenol Oxidase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(2), 177-180
- Nabors, M.W., 2004. *Introduction to Botany*. San Francisco: Benjamin Cummings, Chapter 1.
- Nishitani, E. and Sagesaka, Y.M., 2004. Simultaneous determination of catechins caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 675-685.
- Obanda, M., Owuor, P.O. and Mang'oka, R., 2001. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chemistry*, 75, 395-404.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Kocaçalışkan, İ. and Şakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. *J. Food Sci.*, 60, 3494-496.
- Öksüz, M., 1987. Ülkemizde Klon Çayların Verimi ve Mamül Çay Kalite Özelliklerinin Tespiti, Çay-Kur yayını, No:8, DSİ Basımevi, Ankara, 1-84.
- Öz, F., 2010. *Lactarius Piperatus Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. and Yildirim, M., 2010. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its

- catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chemistry*, 119, 1044-1049.
- Palmer, J. K. and Roberts. J. B., 1967. Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2 mercaptobenzthiazole. *Science*, 157, 200.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisi Uygulamaları. Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara.
- Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. and Grüner, S., 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96, 597-605.
- Pomerantz, S.H., 1963. Separation, purification and properties of two tyrosinases from *Harmster Mclanoma*. *J. Biol. Chem.*, 238, 2351.
- Ponting, J.D. and Joslyn, M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and the browning in apple-tissue extracts., *Arch. Biochem.*, 19, 47-63.
- Ravichandran, R., 2004. The impact of pruning and time from pruning on quality and aroma constituents of black tea. *Food Chemistry*, 84, 7-11.
- Rio, D.D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E.J., Brighenti, F. and Crozier, A. 2004. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2807-2815.
- Sabancılar, İ., Emre, Ö., Baycan, Y.S., Demir, H. ve Erge, H., 2007. Denizli Narından Afinite Kromatografisi Yardımı ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi ABD, VAN. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edb. Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, Van
- Sandheimer. E., 1964. Chlorogenic acids and related depsides. *Bot. Rev.*, 30, 667.
- Sapers, G. M., Garzarella, L. and Pilizato, V., 1990. Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. *J. Food Sci.*, 55,4, 1049-1053.
- Sato, M., 1962. The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. *Phytochemistry*, 8, 353.
- Satoh, E., Tohyama, N. and Nishimura, M., 2005. Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56, 551-559.
- Segel, I.H and Woodin, T.S., 1968. Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine- S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys., Acta* 167(1), 78-88.
- Segel, I.H., 1975. Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. University of California, Davis, New York.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. and Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.
- Shahidi, F. and 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.
- Shahidi, F. and 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.
- Siddiq, M., Sinha, N.K., and Cash, J.N., 1992. Caracterization of polyphenol oxidase from stanley plumps. *J. Food Sci.*, 57 (5), 1177-1179.

- Simpson, B. K., Marshall, M.R., Otwell, S. W., 1988. Polyphenol oxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties. *J. Food Biochem.*, 12, 205-217.
- Singh, K. and Ahlawati, T.R., 1974. Effect of ascorbic acid on tyrosinase of dwarf Mexican wheats. *Food Sci Technol. Abstr.*, 6 (10), 136.
- Spille, G.A., 1997. Caffeine, Chapter 3. Tea: The Plant and Its Manufacture. Chemistry and Consumption of the Beverage, CRC Press, 1-38.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. and Riberio, S., 1972. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel. *Phytochemistry*, 11, 575.
- Swain. T., 1962. Economic importance of flavonoid compounds. In the chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press, 513.
- Şakiroğlu, H., 1994. Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şakiroğlu, H., Öztürk, A.E., Pepe, A.E. and Erat, M., 2008. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from dill (*Anethum Graveolens*). *J.O. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23 (3), 380-385.
- Taş, C., 2009. Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Taufel, K. and Voigt, J., 1964. Zur Inhibierenden Wirkung von Ascorbins Auer Gegenüber der Polhenol Oxidase des Apfels. *Z. Lebensm. Unters. For.*, 126, 19.
- Tüfekci, M. and Güner, S., 1997. The determination of optimum fermentation time in Turkish black tea manufacture. *Food Chemistry*, 60, 53-56.
- Ünal, M.Ü. and 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.
- Ünal, M.Ü., 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14, 44-123.
- Venkatesan, S., Senthurpandian, V.K., Murugesan, S., Maibum, W. and 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.
- Vyas, D. and Kumar, S., 2005. Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 383-388.
- Walker, J.R.L., 1964. Studies on the enzymic browning of apples II. Properties of apple polyphenol oxidase., *Aust. J. Biol. Sci.*, 17, 360.
- Walker, J. R. L., 1975. Enzymic browning in food a review., *Technol. Deg.*, 4(3), 89.
- Wang, H. and Helliwell, K., 2000. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, 337-344.
- Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K., 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 152-160.
- Weaver, M.L., Bron. R. C., and Steen. H. A., 1968. The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes. *Am. Potato J.*, 45, 132.

- Weisburger, J.H., 1997. Tea and Health: a historical perspective. *Cancer Letters*, 114: 315- 317.
- Wheeler, D.S. and Wheeler, W.J., 2004. The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research*, 61, 45-65.
- Whitaker, J. R., 1972. Polyphenol Oxidase of In : Principles of enzymology for the food sciences (Fennema, O.R.,Ed.). Marcel Dekker, pp. 571-582, New York.
- Wilson, J.E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. *Arch. Biochem. Biophys*, 147, 471-474
- Yabacı, S., 2008. Çay Bitkisi Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yağar, H. and Sağiroğlu A., 2000. Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince, Trakya University, Department of Chemistry, 22030 Edirne-TURKEY.
- Yağar, H., 2004. Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, (4) 34: 378-397.
- Yao, L., Liu, X., Jiang, Y., Caffin, N., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N. and Xu, Y., 2006. Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. *Food Chemistry*, 94, 115-122.
- Yılmaz, E., 2007. İspir şeker fasulyesinden elde edilen polifenoloksidaz enziminin bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yoshida, Y., Kiso, M. and Goto, T., 1999. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chemistry*, 67, 429-433.
- Zhan, Z. and Xu, B., 2004. The origin of oolong tea. *International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science*, 673-675, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- Zhang X. and Shao X., 2015. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in brown-ing of loquat fruit. *Czech J. Food Sci.*, 33: 109-117.
- Zhen, Y., 2002. Tea: bioactivity and therapeutic potential. Taylor and Francis. 257 pp., 11 New Fetter Lane, London.
- Ziyan, E. and Pekyardımcı, Ş., 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27:217-225.
- Zuo, Y., Chen, H. and Deng, Y., 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, 307-316.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2009 yılında girdiği Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisansa başladı ve halen devam etmektedir.

