

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**



**FARKLI PATATES (*Solanum tuberosum* L.) ÇEŞİTLERİNDEN  
AFİNİTE TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILAN POLİFENOL OKSİDAZ  
ENZİMLERİNİN TERMAL DENATÜRASYONU**

**MEHTAP CEREN CAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Tez Danışmanı)**  
                          **Prof. Dr. Serap BEYAZTAŞ UZUNOĞLU**  
                          **Dr. Öğr. Üyesi Başak GÖKÇE**

**BALIKESİR, HAZİRAN-2022**



## **ETİK BEYAN**

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Farklı Patates (*Solanum tuberosum* L.) Çeşitlerinden Afinite Tekniğı ile Safılaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Termal Denatürasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değışiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Mehtap Ceren CAN**

## ÖZET

**FARKLI PATATES (*Solanum tuberosum* L.) ÇEŞİTLERİNDEN AFİNİTE  
TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMLERİNİN  
TERMAL DENATÜRASYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MEHTAP CEREN CAN  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)  
(EŞ DANIŞMAN: ÖĞR. GÖR. DR. ADEM ERGÜN)  
BALIKESİR, HAZİRAN - 2022**

Patates yumruları (*Solanum tuberosum* L.), dünya genelinde yaygın olarak tüketilen en önemli besin kaynaklarından birisidir. Bu çalışmada Agria, Bamba, Marabel, Medeleine ve Melody'den PPO enzimleri, Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli kullanılarak afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Enzimlerin katalitik güçleri saptanmış ve termal denatürasyon koşulları araştırılmıştır. Ayrıca söz konusu kaynaklardan elde edilen enzimler için  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri, Linewear-Burk yöntemi ile belirlenerek katalitik güçleri hesaplanmıştır. Agria PPO enziminin katekol substratına karşı afinitesinin diğer enzimlere göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak Medeleine PPO enziminin katalitik gücünün diğer tüm türlere göre yüksek olduğu bulunmuştur. Son olarak çalışmamızda, enzimlerin termal denatürasyonu araştırılmış ve 85 °C'de 20 dakika sonra enzimlerin tamamen inaktive olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışılan tüm sıcaklıklarda ilk 10 dakika sonucunda enzimlerin aktivitelerinde önemli kayıplar tespit edilmiştir.

Araştırmamızda elde edilen sonuçların, endüstri için uygun patates yumrularının seçimi ve önemli bir sorun olan enzimatik kararmanın önlenmesi konusunda önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Afinite kromatografisi, polifenol oksidaz, patates yumruları, termal denatürasyon

## ABSTRACT

**THERMAL DENATURATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYMES  
PURIFIED BY AFFINITY TECHNIQUE FROM DIFFERENT POTATO (*Solanum  
tuberosum* L.) VARIETIES**

**MSC THESIS**

**MEHTAP CEREN CAN**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**CHEMISTRY**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)**

**(CO-SUPERVISOR: ÖĞR. GÖR. DR. ADEM ERGÜN)**

**BALIKESİR, JUNE - 2022**

Potatoes tubers (*Solanum tuberosum* L.) are one of the most important food sources widely consumed around the world. In this study, PPO enzymes from Agria, Bamba, Marabel, Medeleine and Melody were purified by affinity chromatography method using Sepharose 4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid gel. The catalytic activities of the enzymes were determined and thermal denaturation conditions were investigated. In addition, the  $V_{max}$  and  $K_M$  values for the enzymes obtained from these sources were determined by the Lineweaver-Burk method and their catalytic activities were calculated. It was determined that the affinity of the Agria PPO enzyme against the catechol substrate was much higher than the other enzymes. However, the catalytic activity of the Medeleine PPO enzyme was found to be higher than all other species. Finally, in our study, thermal denaturation of enzymes was investigated and it was determined that the enzymes were completely inactivated after 20 minutes at 85 °C. In addition, significant losses were detected in the activities of the enzymes as a result of the first 10 minutes at all temperatures.

We think that the results obtained in our research will make important contributions to the selection of potato tubers suitable for industry and the prevention of enzymatic browning, which is an important problem.

**KEYWORDS:** Affinity chromatography, polyphenol oxidase, potato tubers, thermal denaturation

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Polifenol Oksidazlar ve Kararma .....	4
1.1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri .....	4
1.1.2 Gıda Ürünlerinde ve İşlenmesinde Enzimatik Kararma .....	5
1.1.3 Enzimatik Kararmanın Önlenmesi İçin Teknolojik Stratejiler .....	6
1.1.4 Polifenol Oksidaz Enziminin Fizyolojik Önemi .....	7
1.1.5 Polifenol Oksidazın Yapısı ve Etki Mekanizması .....	7
1.2 Enzim Kaynağı Olarak Kullanılan Patateslerle İlgili Genel Bilgiler .....	9
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>16</b>
2.1 Materyaller .....	16
2.1.1 Kullanılan Maddeler.....	16
2.1.2 Kullanılan Ekipmanlar .....	16
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	17
2.2 Kullanılan Yöntemler.....	19
2.2.1 PPO Enziminin Saflaştırılması.....	19
2.2.1.1 Ham Ekstraktın Elde Edilmesi .....	19
2.2.1.2 Tuzla Çöktürme İşlemi .....	20
2.2.1.3 PPO'nun Saflaştırılması.....	20
2.2.1.4 PPO'nun Afinite Kolonuna Uygulanması ve Adsorbe Olmuş PPO'nun Elüsyonu	20
2.2.2 Protein Ölçümü .....	21
2.2.2.1 Kalitatif Protein Ölçümü .....	21
2.2.2.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Miktarının Belirlenmesi .....	21
2.2.3 SDS-PAGE ile Enzimin Saflığının Kontrolü .....	22
2.2.4 Termal Denatürasyon .....	23
2.2.5 PPO Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	24
2.2.6 Katekol Substratı için Kinetik Sabitlerin ( $K_M$ ve $V_{max}$ ) Tespit Edilmesi.....	24
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>25</b>
3.1 PPO Enziminin Saflaştırılma İşlemi .....	25
3.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Eğri .....	29
3.3 Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Elektroforezi .....	30
3.4 Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Kinetik Sabitlerinin Saptanması .....	30
3.5 Farklı Patates Çeşitlerinden Elde Edilen PPO'ların Termal Denatürasyonu .....	34
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>38</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>49</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Enzimatik kararırma sürecinin şematik olarak gösterimi.....	4
Şekil 1.2: <i>I. batatas</i> katekol oksidaz enziminin kristal yapısı.....	8
Şekil 1.3: o-difenol oksidaz enziminin etki mekanizmasının özet gösterimi.....	9
Şekil 1.4: Bamba patates çeşidi.....	12
Şekil 1.5: Melody patates çeşidi.....	13
Şekil 1.6: Medeleine patates çeşidi.....	14
Şekil 1.7: Agria patates çeşidi.....	14
Şekil 1.8: Marabel patates çeşidi.....	15
Şekil 2.1: İlgili boya- protein kompleksleri.....	22
Şekil 2.2: PPO enzimlerinin saflığının kontrolü için uygulanan elektroforez işlemi.....	23
Şekil 3.1: aaPPO'ya ait saflaştırma grafiği.....	25
Şekil 3.2: baPPO'ya ait saflaştırma grafiği.....	26
Şekil 3.3: mePPO'ya ait saflaştırma grafiği.....	26
Şekil 3.4: mlPPO'ya ait saflaştırma grafiği.....	27
Şekil 3.5: myPPO'ya ait saflaştırma grafiği.....	27
Şekil 3.6: Kantitatif protein analizi için gerekli grafik.....	29
Şekil 3.7: Patates yumrularından saflaştırılan PPO enzimleri için SDS poliakrilamid jel elektroforezi.....	30
Şekil 3.8: Katekol substratı kullanılarak aaPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.....	31
Şekil 3.9: Katekol substratı kullanılarak baPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.....	31
Şekil 3.10: Katekol substratı kullanılarak mlPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.....	32
Şekil 3.11: Katekol substratı kullanılarak mePPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.....	32
Şekil 3.12: Katekol substratı kullanılarak myPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.....	33
Şekil 3.13: Farklı patates çeşitlerinden elde edilen PPO'lar için hesaplanan $K_M$ ve $V_{max}$ oranları.....	34
Şekil 3.14: baPPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.....	34
Şekil 3.15: mePPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.....	35
Şekil 3.16: myPPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.....	35
Şekil 3.17: baPPO, mePPO ve myPPO için 45 °C'de termal denatürasyonu.....	36
Şekil 3.18: baPPO, mePPO ve myPPO için 65 °C'de termal denatürasyonu.....	36
Şekil 3.19: baPPO, mePPO ve myPPO için 85 °C'de termal denatürasyonu.....	37

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1:</b> Bamba'ya ait özellikler. ....	12
<b>Tablo 1.2:</b> Melody'e ait özellikler. ....	13
<b>Tablo 1.3:</b> Medeleine'ye ait özellikler. ....	14
<b>Tablo 1.4:</b> Agria'ya ait özellikler. ....	15
<b>Tablo 1.5:</b> Marabel'e ait özellikler. ....	15
<b>Tablo 2.1:</b> Elektroforezde kullanılan jellerin sentezi için gerekli maddeler ve miktarları. ....	19
<b>Tablo 3.1:</b> baPPO için saflaştırma derecesi tablosu. ....	28
<b>Tablo 3.2:</b> mePPO için saflaştırma derecesi tablosu. ....	28
<b>Tablo 3.3:</b> myPPO için saflaştırma derecesi tablosu. ....	29
<b>Tablo 3.4:</b> Patates PPO enzimleri için katekol substratı kullanılarak hesaplanan kinetik sabitler. ....	33



## SEMBOL LİSTESİ

<b>aaPPO</b>	: Agria polifenol oksidaz enzimi
<b>baPPO</b>	: Bamba polifenol oksidaz enzimi
<b>CNBr</b>	: Siyanojen bromür
<b>EU</b>	: Enzim ünitesi
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>kDa</b>	: Kilo dalton
<b>K<sub>M</sub></b>	: V <sub>max</sub> 'ın yarısındaki substrat konsantrasyonu
<b>mlPPO</b>	: Marabel polifenol oksidaz enzimi
<b>mePPO</b>	: Medeleine polifenol oksidaz enzimi
<b>myPPO</b>	: Melody polifenol oksidaz enzimi
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PEG</b>	: Polietilen glikol
<b>PPO</b>	: Polifenol oksidaz enzimi
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>TEMED</b>	: N, N, N, N, -tetrametil etilendiamin
<b>V<sub>max</sub></b>	: En yüksek reaksiyon hızı

## **ÖNSÖZ**

Yüksek lisans eğitim sürecimin ilk gününden itibaren anlayışı, ilgi ve yardımları ile her daim yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyip bilgileriyle yolumu aydınlatan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN' a,

Tez çalışmalarım boyunca her zaman bana destek veren engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli eş danışmanım Sayın Öğr. Gör. Dr. Adem ERGÜN'e,

Değerli bilgileri ile yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri emekler için Sayın Prof. Dr. Nahit GENÇER ve Sayın Doç. Dr. Semra IŞIK hocama,

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2022**

**Mehtap Ceren CAN**

# 1. GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.), dünya çapında 100-180 farklı türü ve binlerce çeşidi ile dünyanın ana besin kaynaklarından biridir. Kısa büyüme süreleri ve kullanım potansiyellerinin yanı sıra farklı iklim koşullarına uyum sağlama yetenekleri nedeniyle 160'tan fazla ülkede yetiştirilen dünyanın en popüler gıda maddelerindendir. Türkiye'de patates ekimi 1872'den beri resmi olarak teşvik edilmektedir ve 2012 yılında yaklaşık 4.8 milyon tonluk üretim ile Ortadoğu'nun İran'dan sonra en büyük üreticisi durumunda olduğu bildirilmektedir. Patates yumruları, nişasta, proteinler, askorbik asit, karbohidratlar, mineraller, vitaminler ve lif içeriği ile sağlıklı bir besin maddesi olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle açlık sorunu yaşayan ülkeler için önemli bir enerji kaynağı oluştururken, diğer ülke insanları için sağlıklı bir besin olarak önemini sürdürmektedir [1-4].

Patateslerin yüksek kalite ve besinsel avantajlarının yanı sıra esansiyel amino asit indeksi nedeniyle gıda bileşeni olarak işlev görebilecek proteinler içerdiği bilinmektedir. Bu proteinler alerjik olmadığı gibi gluten içermemektedir. Bu nedenle peynir ve meyve suları gibi her zevke uygun gıda ürünlerinin imalatında kullanılabilecek potansiyele sahiptir. Patatin, proteaz inhibitörleri ve yüksek molekül ağırlıklı proteinler olmak üzere üç grup patates proteini vardır. Patateslerin protein içeriği, taze taze yaklaşık % 2 olmasına rağmen kurutma işlemi sırasında bu miktarlar artmaktadır. Kurutulmuş patateslerdeki toplam protein içeriği, yüksek besin kalitesine sahip tahıllar ile eşdeğer olduğu saptanmıştır [4].

Patates üretiminden kaynaklanan atıkların çoğu, işlenmiş patateslerin kabukları ve zarar görmüş patateslerden oluşur. Bu atıklar ağırlıklı olarak hayvan yemi veya biyoyakıt üretimi için kullanılmaktadır. Ancak büyük oranda değerli bileşikler içermeleri, biyoekonomi prensipleri dikkate alındığında eczacılık, gıda üretimi, ilaç uygulamalarında kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Biyoekonomi, mevcut pazar için yeni ve katma değerli ürünler ortaya çıkarmak için yerel kaynakların rasyonel ve etkin kullanımını analiz eden bilime dayalı bir yöntemdir) [4].

İşlenmiş meyve sebze tüketimi, pratikliği ve çekici duyuşsal ve besleyici özellikleri nedeniyle son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Ancak, taze kesilmiş meyve ve sebzeler çok çabuk bozulur. Bu nedenle, pazarlama süresi yaklaşık 7-20 gün ile sınırlıdır. Daha uzun süre ürünün kalitesini korumak için çeşitli kimyasal işlemlerin kullanılması, bu tür

ürünlerin başarılı ticari dağıtımı için ana stratejilerdir. İşlenmiş meyve ve sebzelerin kalitesi ve raf ömrü, sebze veya meyve hammaddesinin fizyolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine bağlıdır [5], [6].

Minimum düzeyde işlenmiş ürünler arasında en popülerleri patatestir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaşam tarzı değişikliğinin bir sonucu olarak çoğu ülkede patates kızartması ve cips gibi patates ürünlerinin tüketimi artmaktadır. Genel olarak zevkli tatları ve dokuları nedeniyle, dünya çapında çok sayıda tüketici tarafından beğenilmektedir. Nüfusun genç üyeleri çoğunlukla kentsel alanlarda daha fazla tercih etmektedir. Üstelik bu ürünler kendi yemeklerini hazırlamayan genç nesiller için de uygundur [6]. Patateslerin işlenmesi sırasındaki en önemli değişiklik olan enzimatik kararın, ürünün kalitesi üzerinde en büyük etkiye sahiptir. Tüketici için belirleyici bir kalite indeksi olan görsel çekicilik, temel problemlerden birisidir. Enzimatik kararın, ürünün görsel çekiciliği azaltmanın yansın besinsel özelliklerinin düşmesine de neden olmaktadır. Bu nedenle enzimatik kararın konusuna odaklanmış çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür [5], [7-9].

İşlenmiş meyve ve sebzelerde enzimatik kararın ana nedeni melanin oluşumudur. Melaninler, fenollerin oksidasyonu sonucu oluşan reaktif bileşiklerin, proteine ya da karbohidratlara bağlanarak yüksek molekül ağırlıklı kahverengi, kırmızı ve siyah bileşikler kapsamaktadır. Fenollerin oksidasyonunu katalizleyen polifenol oksidaz, melanin oluşumuna neden olduğundan dolayı enzimatik kararın başlıca sorumlusudur. Bu nedenle meyve ve sebzedeki PPO miktarı ve özellikleri konusunda yapılan çalışmaların enzimatik kararın önlemede önemli katkılar sağlayacağı açıktır [5], [7-9].

Polifenolik bileşikler, patatesler de dahil olmak üzere çok sayıda bitki türünde bulunan sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşiklerin oksidasyon ürünleri, bakteriler, mantarlar ve virüsler gibi birçok patojenlere karşı bitkilerin savunmasında önemli fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Polifenol oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan polimerizasyon ürünleri, tıpkı insanlarda fibrin kan pıhtısına benzer şekilde bitki yüzeyini kapatmaya önemli katkılar sağlar. Ancak hasat sonrası bu polimerizasyon ürünleri, gıdanın lezzet, renk ve besin kalitesinin bozulmasına neden olur [10], [11].

Bu istenmeyen reaksiyonların dışında PPO enzimi, çeşitli endüstrilerde oluşan atık suların fenollerin uzaklaştırılması ve ekmek, kuru meyve, çay, kakao, kanola küspesi ve kahve üretiminde kalitenin korunması gibi çeşitli sahalarda uygulama alanı bulmuştur. PPO'nun yüksek substrat spesifikliğı, çok etkili biyosensör tasarımlarına izin vermektedir. Ayrıca PPO tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan katekoller, birçok kimyasal ve farmasötik bileşimin sentezi için anahtar role sahip maddelerin olması, bu enzimin önemini daha da artırmaktadır [9], [10].

Doku hasar gördüğünde, hem PPO'nun bulunduğu hücrel kompartman olan plastidlerin yırtılması, hem de fenolik bileşiklerin bulunduğu vakuolün parçalanması, fenollerle enzimin temasını sağlamaktadır. PPO aktif bölgesi, iki bakır atomundan oluşur ve enzim moleküler oksijen varlığında oksidasyon reaksiyonunu katalizleyerek melanin oluşumuna neden olur [9–14].

Enzimatik kararmanın önlenmesi temel olarak, PPO ve katalizlediğı reaksiyonla ilgili faktörlerin kontrol edilmesi ile gerçekleşir. PPO enzimini inhibe etmek, reaksiyondaki iki substrattan birini ortamdan uzaklaştırmak, oluşan kinonların melanin oluşumunu engellemek gibi birçok yolla enzimatik kararma önlenir. Patates çeşidinin seçimi, enzimatik kararma reaksiyonunun etkisini veya kararmayı önleyici işlemlerin etkinliğini de azaltabilir. Örneğin, Agria, Marabel, Arinda veya Marable çeşitleri, minimum düzeyde işlendiklerinde kararmaya karşı en dirençli oldukları bilinmektedir [12–15].

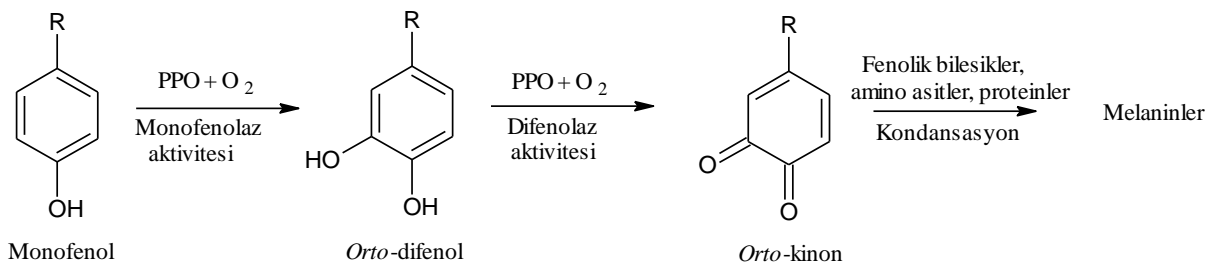
Patatesteki kararma reaksiyonları sadece görsel kaliteyi azaltmakla kalmaz, aynı zamanda besin maddelerinin kaybına ve lezzetin bozulmasına neden olarak tüketici tarafından tolere edilebilirliğin azalmasına ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle, depolama veya işleme sırasında patatesi oksidasyona karşı koruma, prosteşte öncelikli bir endişe konusu haline gelmektedir [12–15].

Yüksek lisans tezi kapsamında farklı patates çeşitlerinde polifenol oksidaz aktivitesinin nasıl değiştiğı saptanacaktır. Ayrıca araştırma grubumuz tarafından tasarlanan afinite jeli kullanılarak bazı patates çeşitlerinden, PPO'ların saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Son olarak enzimlerin ısı işlemlere karşı davranışları incelenecektir. Araştırmamızdan elde edilen sonuçların, endüstri için bu açıdan doğru patates çeşidinin seçilmesine ve enzimatik kararmanın önlenmesine önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

## 1.1 Polifenol Oksidazlar ve Kararma

### 1.1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

Fenolik substratların PPO'lar tarafından o-kinonlara dönüştürülmesi, iki oksidasyon aşaması ile gerçekleşir. İlki, mevcut bir hidroksil grubuna komşu orto-pozisyonun hidroksilasyonudur. Buna "monofenol oksidaz" veya "monofenolaz" aktivitesi, ayrıca hidroksilaz veya kresolaz aktivitesi de denilir. İkinci aşamada ise, o-dihidroksibenzenlerin o-benzokinonlara oksidasyonudur. Bu aşamaya da "difenoloksidadaz" veya "difenolaz aktivitesi", ayrıca katekolaz veya oksidaz aktivitesi de denilir. İlgili reaksiyon şemaları, şekil 1.1' de gösterilmiştir [16], [17].



Şekil 1.1: Enzimatik kararma sürecinin şematik olarak gösterimi.

Substrat spesifikliğı ve etki mekanizmalarına bağılı olarak, PPO'lar: tirozinazlar, katekol oksidazlar ve lakkazlar olmak üzere üç farklı tipte sınıflandırılır. Tirozinazlar, hem kresolaz hem de katekolaz aktivitelere sahiptir [18]. o-difenoloksidadazlar olarak da bilinen katekol oksidazlar, o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalize ederler. Son olarak, lakkazlar ise, radikalik mekanizma ile geniş bir aromatik bileşik yelpazesini yükseltgeme reaksiyonunu katalizlerler [19].

PPO'lar, fizikokimyasal özellikler [17], [20] açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. PPO izoenzimleri, elektroforetik hareketlilikleri, optimum sıcaklıkları, optimum pH'ları ve substrat spesifikliğıne göre farklı şekillerde sınıflandırılmıştır [21], [22]. PPO aktivitesi, gerek substratların bağlanması ve gerekse kataliz işleminde ortamın pH'ına bağılı olduğu saptanmıştır [23], [24]. Genel olarak, PPO'ların optimum pH'ı 4.0 ile 8.0 arasında değişir. Birkaç Prunoideae'de (badem, kayısı, şeftali ve erik), PPO'ları pH 5.0 civarında maksimum aktivite gösterdikleri bulunmuştur [25]. Benzer şekilde, elma PPO'ları 4.5 ile 5.0 arasında bir optimum pH'a sahiptir [26]. Kiraz ve çilek PPO'ları, yaklaşık 4.5 gibi

[25–27] dar bir aralıkta optimum pH'a sahip olduğu belirlenmiştir. Otsu ürünlerle ilgili olarak, patates ve buğday PPO'larının, enzim-substrat kompleksinin iki farklı iyonizasyon durumu nedeniyle iki optimum pH'a sahiptirler (patates PPO'su 4.5 ve 5.0; buğday PPO'su 5.3 ve 6.9) [28], [29]. Tatlı patatesten, iki farklı PPO izoformu, biri pH 5.4 ve diğeri 6.7'de olmak üzere farklı optimum pH'lara sahip olduğunu gösteren çalışmaya rastlanmıştır [30]. Marul PPO'ları 5.0 ile 8.0 arasında geniş bir optimum pH'a sahipken [31], ıspanak PPO'larının 8.0 civarında optimum pH'a sahip oldukları bulunmuştur [32].

Sıcaklık, oksijenin çözünürlüğünü etkilediği ve enzim denatürasyonuna yol açabileceği için PPO'nun katalitik aktivitesini önemli ölçüde etkileyen bir diğer faktördür [23–27]. Optimum PPO sıcaklık aralığı, farklı bitki kaynaklarına göre değişir. Örnek olarak; marul PPO'su 25–35°C, üzüm PPO'su 25–45°C ve zeytin PPO'su 30–50°C şeklindedir [24], [31–35]. Çilek ve salatalıktan elde edilen PPO'ların 50°C'de maksimum aktivite gösterdikleri bulunmuştur [28], [36]. Üzüm PPO'ları, 65°C'de 20 dakika sonra yaklaşık % 50'lik bir aktivite azalması ve 75°C'de 15 dakika sonra tam bir inaktivasyon gösterdikleri tespit edilmiştir [24]. 60°C'de elmadan elde edilen PPO'ların yarılanma ömrünün 30 dakika olduğunu gösteren çalışmaya rastlanmıştır [26].

### **1.1.2 Gıda Ürünlerinde ve İşlenmesinde Enzimatik Kararma**

Kararmanın, elma [37], muz [38], salatalık [28], üzüm [39], mango [40], armut [41], şeftali, kayısı [25], marul [31], patates [28] ve tahıllar [42], [43] gibi birçok tarımsal ürünün ticari değerini olumsuz yönde etkiledikleri bilinmektedir. Bunun yanında, siyah çay [42], kahve [44] ve kakao [45] gibi ürünlerin işlenmesinde kaliteyi olumlu yönde etkileyen aromatik bileşiklerin oluştuğu saptanmıştır.

PPO aktivitesi ve fenolik bileşikler, kaynaklara göre farklılık gösterdiği için farklı ürünlerde farklı şekilde kararına gerçekleştiği bilinmektedir. Katekin, üzüm ve çaydaki [42], [44–46] başlıca fenolik substrat iken klorojenik asitin elma [38], patates [28], ayçiçeği [47], tatlı patates [30], [48] ve patlıcanda [49] bol miktarda bulunduğu saptanmıştır. Son olarak katekin, epikatekin ve kafeik asit türevleri, birçok meyve PPO'sunun ortak substratları olduğu belirlenmiştir [50].

Kararma, enzimatik ve enzimatik olmayan oksidasyon şeklinde gerçekleşebilir. Her ikisi de o-kinonların oluşumuna sebep olurlar [51]. Genel olarak, prosiyanidinler ve monomerik

katekinler, diğ er fenoliklere göre daha yüksek kararmaya sebep olur [52]. Buğ dayda ki, PPO'ların kepekli un [53], hamur [42], [54], eriş te gibi çeşitli son ürünlerin kararmasından sorumlu olduğunu gösteren çalışmalara rastlanmıştır [55], [56].

### **1.1.3 Enzimatik Kararmanın Önlenmesi İçin Teknolojik Stratejiler**

Gıda endüstrisi tarafından enzimatik kararmayı önlemek veya sınırlandırmak için birçok stratejiler vardır. Bunlardan; inhibitörlerin kullanımı, ortam koşullarını PPO aktivitesini azaltacak şekilde değış tirme ve modifiye atmosferin kullanımı da dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Tüm bu yöntemler tek başına veya kombinasyon halinde kullanılmaktadır [57]. İndirgeyiciler (Askorbik asit ve sülfidler), ř elatlayıcılar (EDTA), asitler (sitrik asit ve malik asit) ve kompleks oluş turucu bileş ikler (siklodekstrinler) gibi farklı etkili kimyasal inhibitörler, o-kinonların birikmesini önleyerek veya stabilize oluş turarak melanin oluş umunu engelledikleri bilinmektedir [17], [57], [58]. Sodyum sülfid, bisülfid ve metabisülfid düşük fiyatları nedeniyle meyve ve sebze işleme endüstrisinde bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır [57–59]. Bununla birlikte, sağı k üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle bazı ülkelerde [25], [60] ticari kullanımları yasaklanmıştır [61]. Alternatif olarak askorbik asit ve 4-heksilresorsinol sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca siklodekstrinlerin, patates ve meyve sularındaki enzimatik kararmanın önlenmesinde umut verici bir işlem olduğı saptanmıştır [62], [63].

Isı, dehidrasyon, ışınlama ve yüksek basınç gibi fiziksel işlemler, kararmayı en aza indirmek için diğ er bir strateji olarak kullanılmaktadır [64]. Buhar, sıcak su, asit ya da tuzlu su çözeltileri ve mikrodalga ile ağı rtma işlemleri de enzimatik kararmanın önlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [65], [66]. Ancak, PPO'ların aktivasyon derecesini ve son ürünlerin kalitesi üzerindeki etkisini dengelemek için ısıl işlemlerin süresi ve sıcaklık derecesi dikkatli bir şekilde ayarlanması gerektiğı bildirilmektedir [67].

Enzimatik kararma reaksiyonu, oksijen gerektirdiğ inden işlenmiş meyve ve sebzelerin düşük geçirgenliğ e sahip spesifik filmlerle sarılması enzimatik kararmayı büyük ölçüde önleyeceğı düşünölmektedir. Bu sayede bu ürünlerin raf ömrünün uzatılması sağı lanacaktır [67].



#### 1.1.4 Polifenol Oksidaz Enziminin Fizyolojik Önemi

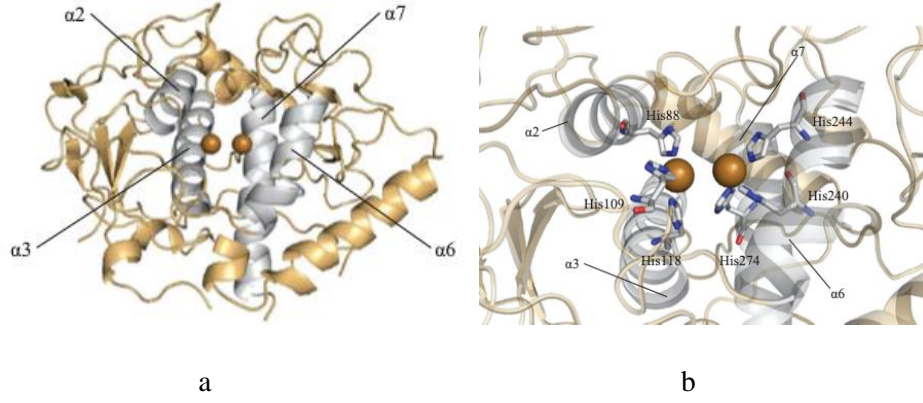
Enzimatik kararmanın ticari önemi nedeniyle bu olayın başlıca sorumlusu olan PPO'lar üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmıştır [26–31], [33], [34]. Bununla birlikte, bitki fizyolojisindeki rolleri hakkında literatürde oldukça sınırlı çalışmalar vardır. Birçok çalışmada, PPO aktivitesi ile bitkinin streslere karşı dayanıklılığı arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Örneğin, PPO aktivitesi yüksek patates çeşitlerinin, hastalıklara karşı direncinin diğer çeşitlere göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Bitkilerdeki PPO'ların koruyucu fizyolojik rolünü gösteren doğrudan kanıtlarda elde edilmiştir. Li ve Steffens [68], PPO aktivitesi yüksek bir patates çeşidinin *Pseudomonas syringae*pv'ye karşı direncinin yüksek olduğunu rapor etmiştir. Aksine, antisens PPO cDNA ile transforme edilmiş bitkilerde, PPO aktivitesinde önemli bir azalma ve bunun sonucu olarak, hastalıklara karşı duyarlılığının artmasıyla sonuçlandığı saptanmıştır [68].

PPO'ların bu etkiyi nasıl gösterdiği hakkında farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlardan en önemlileri; kinonların doğrudan toksitesi, patojenlere karşı biyoyararlılığın azaltılması, kinonların protein veya diğer fenoliklerle çapraz bağlanması sonucu fiziksel engeller oluşturması ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu şeklinde özetlenebilir [69].

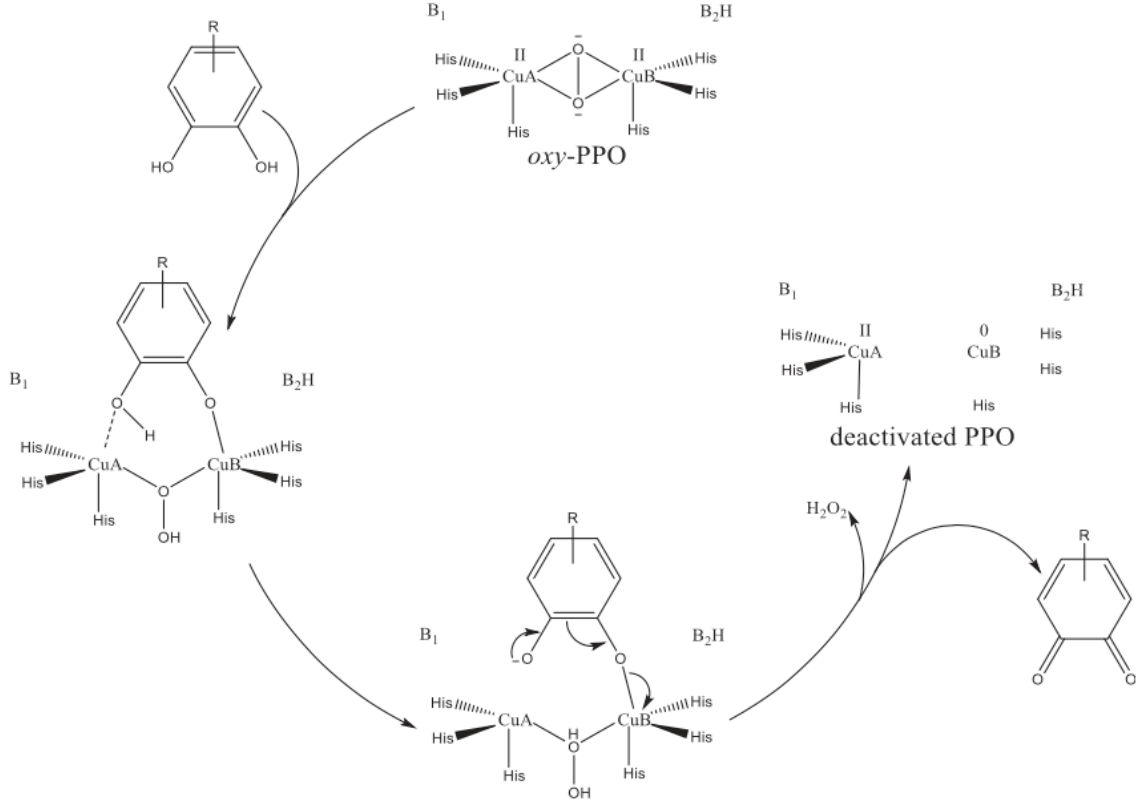
#### 1.1.5 Polifenol Oksidazın Yapısı ve Etki Mekanizması

Farklı organizmalar arasındaki PPO'ların, amino asit sayısı (yaklaşık 300-700 civarında) ve dolayısıyla üç boyutlu yapılarının çok yüksek oranda değiştiği görülmektedir [70]. Ancak, yapılarının çok farklı olmasına rağmen C-terminal ve N-terminal kısımlarını da içeren benzer domeinlere sahip olduğu dikkat çekmektedir. Birçok PPO enzimi yüksek oranda saflaştırılıp kristal yapıları açıklanmıştır. İlk defa aydınlatılan *I. batatas* katekol oksidaz enziminin kristal yapısı şekil 1.2'de gösterilmiştir. Aktif bölge, her biri üç histidin rezidüsü ile koordine edilen iki bakır iyonu ile karakterize edilir. Söz konusu histidinler, PPO'lar ve bakır enzimlerinde dört alfa sarmal yapılar ile çevrelenmiştir [71]. Aktif bölge civarındaki kritik rezidüleri, substrat spesifikliğinin de ve katalizde vazgeçilmez fonksiyonlara sahiptir. Diğer bir kritik yapı, bir sistein rezidüsü ve bir bakır iyonu ile koordine olan histidin arasında meydana gelen bir tıyoeter köprüsünün varlığıdır [72].



**Şekil 1.2:** *I. batatas* katekol oksidaz enziminin kristal yapısı (a). Söz konusu enzimin aktif bölgesinin detaylı gösterimi (b). Bakır iyonları kırmızı renkte, kritik histidin rezidüleri mavi renkte gösterilmiştir[73].

PPO'ların etki mekanizmaları konusunda yapılan kinetik çalışmalarla desteklenmiş birçok strateji önerilmiştir. Özellikle o-fenollerin oksidasyonu reaksiyonu için kinetik verilere dayalı olarak Garcia-Canovas [74] grubu tarafından önerilen alternatif bir mekanizma şekil 1.3'te gösterilmiştir. Öncelikle oksijen molekülü histidin rezidüleri ile koordine olmuş bakır iyonlarına bağlanarak oksî-PPO oluşmuştur. Daha sonra enzimin ikinci substratı olan difenol yapısındaki molekül, oksî-PPO ile koordine olduğu belirtilmektedir. Proton transferi ile peroksit köprüsü kısmen yıkılmaktadır. Daha sonra elektron transferi ile oluşan peroksit ve kinon yapısında ürünlerin aktif bölgeden ayrıldıkları görülmektedir [74].



Şekil 1.3: o-difenoloksidaz enziminin etki mekanizmasının özet gösterimi.

## 1.2 Enzim Kaynağı Olarak Kullanılan Patateslerle İlgili Genel Bilgiler

Patates, tüm enlemlerde ve farklı iklim koşullarında yüzden fazla ülkede yetiştirilir. Kuzey Kutup Dairesi'ne yakın bölgelerden Güney Amerika kıtasının güney ucuna kadar hemen her bölgeye yayılmıştır. Patates, birçok ülkenin yemek geleneklerinin vazgeçilmez bir bileşeni ve tahıllardan (mısır, pirinç ve buğday) sonra en çok yetiştirilen türdür. Patates tüketimi, farklı iklim koşullarına iyi uyum sağlaması ve yüksek besin değerine bağlı olarak daha kolay yetiştirilmesi nedeniyle giderek artmaktadır [75], [76].

Patates, sadece insan beslenmesinde önemli bir karbohidrat kaynağı değil, aynı zamanda mineraller, protein, vitaminler gibi sağlıklı diyetle bulunması gereken bileşikler içinde nispeten ucuz bir kaynaktır [76]. Ayrıca patates, içerdiği biyoaktif maddeler ile de öne çıkmaktadır. Nitekim patatesin kabuğunda ve etinde yüksek oranda fenolik asit, antosiyanin ve karotenoid içerdiği rapor edilmiştir [77]. Bu fotokimyasalların, ateroskleroz ve kanser gibi birçok kronik hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynadığını yapılan kapsamlı araştırmalar ile gösterilmiştir [78]. Günlük yüksek tüketimi nedeniyle

patateslerin, portakal ve elmadan sonra insan diyetine en yüksek üçüncü toplam fenolik içeriği ile katkı yaptığı saptanmıştır [79].

Patatesin faydalarının yanında bazı olumsuz etkileri de rapor edilmiştir. Pişmiş patatesin en hızlı sindirilen nişastaya sahip olduğunu ve bunun insan vücudunda hızla emildiğini ve yüksek tokluk kan şekeri seviyeleri ile sonuçlandığını hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak saptanmıştır. Uzun sürede bu durum, obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere diyetle ilgili hastalık risklerinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir [10]. Yüksek glisemik indeks dışında, patateste bulunan alerjiye neden olan proteinler ve glikoalkaloidler de insan sağlığına zararlı olarak kabul edilmişlerdir [80].

Patates, çeşitli ev pişirme koşullarından etkilenebilecek birçok mineral içerir. Su eklenmemiş ev tipi pişirme sırasında patates mikro yapısının tahrip olmasına rağmen minerallerini önemli düzeyde korunduğu belirlenmiştir. Ancak su söz konusu olduğunda, mineral kaybının yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Patateslerin kaynatma, fırınlama ve kızartma sonrası mineral içerikleri belirlenmiştir. Söz konusu mineral kaybının patatesin yağda kızartma işleminde en az, kaynatma işleminde ise en fazla olduğu saptanmıştır. Kabuklu fırınlanmış patateslerde potasyum, fosfor ve magnezyum içerikleri 100 g patateste sırasıyla 550 mg, 71 mg ve 30 mg iken, kaynatma bu mineralleri sırasıyla 379 mg, 44 mg ve 22 mg'a düşürdüğü belirlenmiştir [81].

Patates, başta C vitamini, niasin ve tiamin olmak üzere çok çeşitli vitaminler içerir. Isıya duyarlılıkları nedeniyle pişirme, kullanılan yöntemlere göre önemli bir vitamin kaybına neden olur. Suda veya yağda pişirme, hidrofilik veya lipofilik vitaminlerin çözeltiye geçişi nedeniyle ciddi vitamin kaybına neden olduğu saptanmıştır [82].

Patatesler, içerdiği düşük protein miktarına rağmen bu proteinlerin biyolojik değeri oldukça yüksektir [83]. Ek olarak, patates proteini, diğer bitki kaynaklı proteinlere kıyasla daha yüksek bir esansiyel amino asit içeriği ile karakterize edilir. Patates, genellikle sebze ve tahıl kaynaklarında eksik olan en önemli esansiyel amino asit olan lizin en iyi bitkisel kaynağı olarak kabul edilir. Genel olarak, pişmiş patateslerdeki protein içeriği, suyun buharlaşmasından sonra kuru madde içeriğindeki artış nedeniyle herhangi bir kayıp yaşanmadığı gibi arttığı saptanmıştır. Pişirmenin patates proteinlerini denatüre ettiği için

proteinlerinin sindirimini kolaylaştırdığı gibi aynı zamanda alerjik reaksiyonlar gibi bazı olumsuz durumları önlediği belirlenmiştir [80].

Özellikle kabuklu patatesler, selüloz, hemiselüloz, pektin, zamklar, müsilağlar ve lignin gibi lifli yapılar içerirler. Enzimatik sindirime dirençli bitki materyalinin bir parçası olan bu yapılar, sağlıklı diyetlerin vazgeçilmez bileşenleridir [84]. Patates, tam tahıllı mısır unundan daha az ancak beyaz pirinçten ve tam buğday tahılından daha fazla lifli yapı içerdiği bulunmuştur. Pişirme işleminin, patatesin lif içeriğini artırdığı saptanmıştır. Evde pişirme sonrasında diyet lifindeki artış, polisakkaritler ve protein gibi gıdadaki diğer bileşikler arasındaki komplekslerin oluşmasının en önemli neden olarak sunulmaktadır. Ayrıca pişmiş patateslerde dirençli nişasta oluşumunun arttığı bu olayın diğer bir nedeni sayılmaktadır [85].

Patates, karbohidrat, mineral ve vitamin sağlamanın yanı sıra, sağlıklı yaşam için gerekli birçok bitkisel maddeler içerir. Fitokimyasallarda denen bu bileşikler, meyveler, sebzeler, tahıllar ve diğer bitkisel gıdalarda bulunan biyoaktif, besleyici olmayan bitki bileşikleridir. Genel olarak karotenoidler, fenolikler, alkaloidler ve organosülfür bileşikleri olarak sınıflandırılır [86]. Fitokimyasalların alımı ile kronik hastalıklar arasında negatif bir ilişki olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür [87]. Günlük yüksek tüketimi nedeniyle patates, tüm sebzeler içerisinde diyetle toplam fenolik içeriğin katkısı yaklaşık % 25 olduğu tahmin edilmektedir. Patateslerdeki fitokimyasalların içeriği, farklı pişirme yöntemlerinde değişerek farklı antioksidan özelliklere yol açar. Bu nedenle, antioksidan potansiyeli en yüksek düzeyde tutabilen en iyi pişirme yöntemlerini belirlemek önemlidir [86].

Pişmiş patateslerdeki toplam fenolik içeriğin, kullanılan pişirme yöntemine bağlı olarak korunabileceğini ve hatta artırılabilirliğini ortaya koyan çalışma vardır. Kaynatma, buharda pişirme ve mikrodalgada pişirme sonrası toplam fenolik içeriği karşılaştırmış ve fenolik içeriğin sırasıyla % 81,4, % 22,8 ve % 80,81 olduğu bulunmuştur [88].

Patates sadece yemeklik olarak değil aynı zamanda endüstriyel nişasta, ilaç, tekstil ve kâğıt sanayisinde tutkal olmak üzere çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır [75]. İnsan tüketiminde iyi bir tercih sebebi olan patatesin çeşitli alanlarda kullanımının artmasıyla birlikte tüketimi de aynı oranda artış göstermektedir [78]. Patates bitkisinin yüksek verimi tüketim talebinin

fazla olmasına ve bu sebeple patates yetiştiriciliğinin ön plana çıkmasına sebep olmaktadır. Patatesin verim ve kaliteyi etkileyen birçok çeşidi bulunmaktadır [89].

Araştırmamızda ülkemizin farklı yerlerinden temin edilen farklı çeşitlerdeki patateslerde bulunan polifenol oksidaz enziminin katalitik gücü ve termal denatürasyonu araştırılmıştır. Enzim kaynağı olarak ülkemizde tescillenmiş Bamba, Melody, Medeleine, Agria ve Marabel patates çeşitleri kullanılmıştır.

Bamba, sarı renkte ve oval görünümündedir. Kızartılabilir ve yemeklik olarak kullanılan bamba patatesin besin değeri yüksek olmakla beraber oldukça lezzetlidir. Ekildiğinde çok geç olgunlaşan Bamba, ülkemizde pazarlama alanı geniş olan bir patates çeşididir (Tablo 1.1 ve Şekil 1.4).



**Şekil 1.4:** Bamba patates çeşidi [90].

**Tablo 1.1:** Bamba'ya ait özellikler [90].

Olgunlaşma Süreci	Geç
Yumru Şekli	Oval
Verimi	Çok iyi
Kuru Madde	Orta
Pazar Kalitesi	Cips üretimine uygun, sanayilik

Melody, Hollandalı yetiştiriciler tarafından geliştirilmiştir. Melody patatesin olgunlaşma süresi 100-120 gündür. Açık sarı, yassı ve iri özelliklerine sahip olan melody aynı zamanda yüksek adaptasyon özelliği göstermektedir. Zor şartlar da yetişmesine karşın hastalıklara karşı direnci yüksektir. Endüstriyel alanda Melody patates çeşidi, farklı yemeklerin pişirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo1.2 ve Şekil 1.5).

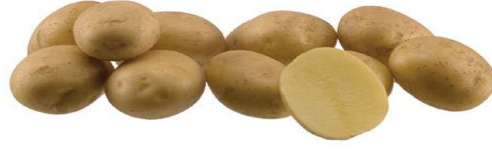


Şekil 1.5: Melody patates çeşidi [90].

Tablo 1.2: Melody'e ait özellikler [90].

Olgunlaşma Süreci	Geç
Yumru Şekli	Oval
Verimi	Çok iyi
Kuru Madde	Orta
Pazar Kalitesi	Yemeklik

Medeleine, açık sarı kabuklu ve et renginde yemeklik patates çeşididir. Yumruları uzun oval ve homojen boyuttadır. Medeleine patates çeşidi yumru sayısı ve verimi yüksektir. Tüm toprak çeşitlerinde yetişebilir ve tüm iklim tiplerine uyum sağlar (Tablo1.3 ve Şekil 1.6).

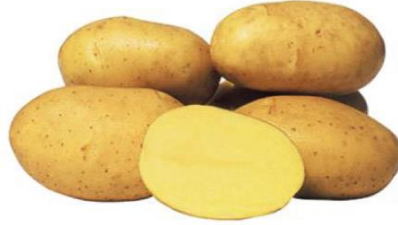


**Şekil 1.6:** Medeleine patates çeşidi [90].

**Tablo 1.3:** Medeleine'ye ait özellikler [90].

Olgunlaşma Süreci	Erkenci
Yumru Şekli	Oval
Verimi	İyi
Kuru Madde	Orta
Pazar Kalitesi	Yemeklik

Agria, oval yumru şeklinde, kuru madde içeriği yüksek bir patates çeşididir. Daha çok cips sanayisi olmakla birlikte yemeklik olarak da kullanımı mevcuttur. Kızartmalık için de oldukça uygun bir patates çeşididir. Agria uzun süreli depolamada kalitesini korumaktadır (Tablo1.4 ve Şekil 1.7).



**Şekil 1.7:** Agria patates çeşidi [90].



**Tablo 1.4:** Agria'ya ait özellikler [90].

Olgunlaşma Süreci	Orta erkenci
Yumru Şekli	Büyük
Verimi	Çok iyi
Kuru Madde	Orta
Pazar Kalitesi	Cips üretimine uygun.

Marabel, kabukları sarı ve oval renkte, erkenci yemeklik patatestir ve pişme kalitesi oldukça yüksektir. Tadı oldukça lezzetlidir. Marabel tohumu, makineli hasada ve ön paketlemeye uygundur. Aynı zamanda iyi derecede depolama özelliğine sahiptir (Tablo1.5 ve Şekil 1.8).



**Şekil 1.8:** Marabel patates çeşidi [90].

**Tablo 1.5:** Marabel'e ait özellikler [90].

Olgunlaşma Süreci	Erkenci
Yumru Şekli	Oval
Verimi	Yüksek
Kuru Madde	Orta
Pazar Kalitesi	Yemeklik

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Maddeler

Bu çalışmada kullanılan patates çeşitleri, Afyon, Balıkesir, Erzurum, Konya ve Nevşehir illerinden yerel marketlerden temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler;

- Sepharose-4B,
- Siyonejen bromür (CNBr),
- p-amino benzoik asit (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>),
- L-tirozin,
- Standart serum albumin,
- Amonyum persülfat((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>),
- SDS (sodyum dodesil sülfat),
- Bromtimol mavisi,
- Bisakrilamid,
- N,N,N,N' tetrametil etilendiamin (TEMED).
- Polietilen glikol (PEG),
- Trihidroksi metilamino metan (Tris),
- Sodyum hidroksit (NaOH),
- Coomassie brillant blue G-250,
- Hidroklorik asit (HCl),
- Etil alkol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH),
- Sodyum klorür (NaCl),
- Katekol,
- Akrilamid,

Yukarıda belirtilen tüm kimyasal maddeler Merck ve Sigma'dan satın alınmıştır.

#### 2.1.2 Kullanılan Ekipmanlar

- **Soğutmalı santrifüj** : Hettichzentrifugen
- **pH metre** : Orion- model 920A
- **UV-Spektrofotometre** : Biotek UV-Visible Spectrophotometer
- **Manyetik karıştırıcı** : IKA Combimag RCO
- **Çalkalayıcı** : Clifton
- **Vorteks** : Fisons Whirli Mixer
- **Peristaltik Pompa** : Pharmacia Fine Chemicals
- **Otomatik pipetler** : Eppendorf, Brand
- **Derin dondurucu** : Beko buzdolabı
- **Etüv** : Elektromag

- **Kronometre** : Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
- **Elektroforez tankı** : Hoefler, HIS
- **Terazi** : Libror, AEG-220 (Shimadzu)
- **Homojenize Edici** : Felix ev tipi blender
- **Kromatografi Kolonu** : Pharmacia Fine Chemicals

### 2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**1 M NaOH çözeltisi:** NaOH' dan 40 g tartıldı. Saf su ile çözdürüldü ve çözelti saf su ile istenilen hacime tamamlandı.

**1 M HCl çözeltisi:** Derişik HCl' den 8.35 mL alınıp 80 mL saf su üzerine ilave edilerek çözeltinin son hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

**Ekstraksiyon Tamponu:** 43.5 M (0.25 mol) g  $K_2HPO_4$ , 2.5 g polietilen glikol (PEG) 400 mL behere alınarak manyetik karıştırıcıda saf su yardımıyla çözdürüldü. Çözelti pH 7.3'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

**Afinite jeline ait dengelenme ve yıkanma tamponu:** 0.05 M sodyumfosfat tamponu, pH: 5.00; 7.1 g (0.05 mol)  $Na_2HPO_4$  tartılarak behere alındı ve 950 mL destile suda çözelti haline getirilerek pH' sı 5.00'a pH metre yardımıyla ayarlanarak son hacim destile su ile 1 L' ye tamamlandı.

**PPO'ların elüsyonu için kullanılan çözelti:** 0.05 M  $Na_2HPO_4$  / 1 M NaCl tamponu, pH: 8.00; 10.65 g (0.075 mol)  $Na_2HPO_4$  ve 87.75 g (1.5 mol) NaCl tartıldı. 500 mL saf su yardımıyla çözdürülerek pH'sı 8.00'a getirildi. Çözelti hacmi saf su ile 1500 mL'ye tamamlandı.

**Afinite jeline ait aktivite tamponu:** 0.1 M fosfat tamponu, pH: 6.80; 14.2 g  $Na_2HPO_4$  tartıldı ve 470 mL destile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 6.80'e ayarlanarak hacmi destile su ile 1 L' ye tamamlandı.

**Substrat olarak kullanılan katekol çözeltisi:** 0.5 M katekol 0.55 g hassas terazide tartılarak bir miktar saf su içerisinde çözdürülerek son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

**Coomassie brilliant blue çözeltisinin hazırlanması:** 100 mL % 95'lik etanol de, 200 mg boya çözülerek, % 95'lik fosforik asit ilavesinden (200 mL) sonra çözeltinin hacmi destile su ile 2 litreye tamamlandı.

**Standart olarak albumin çözeltisi (BSA):** 100 mg albumin proteini (BSA) 100 mL'de destile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

**Elektroforezde kullanılan numune tamponu miktarları:**

- 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) 5 mL
- SDS (% 10'luk) 8.0 mL
- Gliserol 4.0 mL
- $\beta$ -merkapto etanol 2.0 mL
- Bromfenol mavisi 0.02 g
- Saf su 1 mL

**Elektroforezde yürütme için kullanılan tampon miktarları:**

- Tris-HCl 6.0 g
- Glisin 28.8 g
- SDS 2.0 g
- Hacim saf su ile 1 Lt'ye tamamlanır.

**Elektroforezde kullanılan ortamın hazırlanması:**

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan ayırma-yığıma jelleri için pipetlenmesi gereken maddeler Tablo 2.1'de özetlenmiştir [91].

**Tablo 2.1:** Elektroforezde kullanılan jellerin sentezi için gerekli maddeler ve miktarları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Ayırma Jeli (% 10)</b>	<b>Yığıma Jeli (% 3)</b>
<b>Akrilamid/Bis (% 30)</b>	33.3 mL	5.2 µL
<b>Destile Su</b>	40.2 mL	24.4 mL
<b>1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)</b>	25 mL	-
<b>1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</b>	-	10 mL
<b>SDS (% 10'luk)</b>	1 mL	400 µL
<b>TEMED</b>	50 µL	40 µL
<b>Amonyum persülfat (% 10'luk)</b>	1500 µL	800 µL

### **Elektroforezde kullanılan boya süspansiyonu:**

1.32 g boya reaktifi tartıldıktan sonra 240 mL metanol de çözdürülerek, 48 mL asetik asit ile beraber 240 mL destile su edilerek karışım hazırlandı.

### **Elektroforezde kullanılan yıkama karışımı:**

Elektroforez sonucun da protein bantlarını görüntülemek için kullanılan yıkama çözeltisi, % 7.5 CH<sub>3</sub>COOH, % 5 CH<sub>3</sub>OH ve % 87.5 mL saf su içermektedir. Behere 100 mL CH<sub>3</sub>OH (metanol) ve 150 mL CH<sub>3</sub>COOH (asetik asit), 1750 mL saf su ilave edilerek karıştırıldı.

## **2.2 Kullanılan Yöntemler**

### **2.2.1 PPO Enziminin Saflaştırılması**

#### **2.2.1.1 Ham Ekstraktın Elde Edilmesi**

Ham ekstraktı hazırlamak amacıyla her bir patates numunesinden 25 g tartıldı ve 50'şer mL 0.5 M pH: 7.30 (% 0.5 PEG) sodyumfosfat tamponu içerisine alınarak parçalayıcı yardımıyla yaklaşık 3 dakika boyunca ekstrakte edildi. Elde edilen homojenat, tülbent bezi ile süzüldü ve +4°C'de 15000 rpm' de 45 dakika boyunca santrifüje konuldu. Santrifüj

sonrası çökmüş olan başta bitki duvarları olmak üzere diğer yapılardan süpernatant alınarak bundan sonraki saflaştırma basamakları için kullanıldı [91].

### 2.2.1.2 Tuzla Çöktürme İşlemi

% 0-80 doygunlukta yapılan çöktürme prosesi esnasında kullanılacak olan katı amonyum sülfatın kullanım miktarlarını belirlemek için 2.1’de verilen formül kullanıldı.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2} \quad (2.1)$$

**V:**Çözeltinin hacmi

**S<sub>1</sub>:**Başlangıç durumundaki doygunluk

**S<sub>2</sub>:**Arzu edilen doygunluk

Yapılan hesaplamaların ardından tuz, çözeltiliye manyetik karıştırıcı da buz banyosu ile azar azar amonyum sülfat yavaşça ilave edilerek % 80 doygunluğa getirildi. Bu işlemde sonra elde edilen süspansiyon 15000 rpm’de 45 dakika boyunca +4°C’de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen ekstraktın üzerindeki süpernatant alınıp altta kalan çökelek kısmı 0.05 M sodyumfosfat tamponunda (pH: 6.3) çözüldü [91].

### 2.2.1.3 PPO'nun Saflaştırılması

Polifenol oksidaz enzimini saflaştırmak için afinite tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla daha önce çalışma grubumuzca [91], [92] sentezlenen “Sepharose-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit” ilgili jel ile her bir kaynaktan PPO enzimleri saflaştırılmıştır [92]. Söz konusu jelde matriks olarak iyi akış özelliğine sahip ve kısmen stabil Sepharose-4B kullanılmıştır. Enzimin kompetitif inhibitörü olan p-amino benzoik asit bileşiği ligant olarak seçilmiştir. Enzim ligant etkileşmesini arzu edilir düzeye getirmek için L-tirozin uzantı kolu olarak tercih edilmiştir [91–93].

### 2.2.1.4 PPO'nun Afinite Kolonuna Uygulanması ve Adsorbe Olmuş PPO'nun Elüsyonu

Çalışmada kullanılan söz konusu jel, uygun ölçülerde afinite kolonuna paketlenmiştir. Dengeleme 5 mM sodyumfosfat tamponu (pH: 5.0) kullanılarak yapıldı. İşleminin

kontrolü, kolona tatbik edilen dengeleme tamponu ve kolondan alınan tamponun absorbans değerleri ölçülerek gerçekleştirildi. Bu işlemde sonra enzim çözeltisi kolona tatbik edilerek, spesifik olmayan proteinleri ayırmak için aynı tampon ile yıkama işlemi yapıldı. Son olarak liganta spesifik olarak bağlanmış enzimin elüsyonu, 0.05 M pH:7 tamponu kullanılarak 2 mL fraksiyonlar şeklinde toplandı. Her bir fraksiyonda 280 nm'de protein tayini yapıldı. Protein içeren fraksiyonlarda ise aktivite tayini yapılarak elde edilen sonuçlar grafik halinde gösterildi. Ayrıca saflaştırma derecesini hesaplamak amacıyla Coomassie blue yöntemi kullanılarak elde edilen elüatlar da kantitatif protein tayini yapıldı.

## **2.2.2 Protein Ölçümü**

### **2.2.2.1 Kalitatif Protein Ölçümü**

Bu tayin, proteinlerde bulunan triptofan ve tirozin rezidülerinin spektrofotometrede 280 nm'de absorbansına dayanmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda Warburg metodu olarak da bilinmektedir. Kalitatif protein tayini, afinite kromatografisi sonrasında eşit hacimde elde edilen bütün elüatların kuvarz küvetlere alınarak absorbanslarının spektrofotometrede 280 nm'de köre karşı ölçülmesi ile yapıldı [91].

### **2.2.2.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Miktarının Belirlenmesi**

Ham ekstrakta ve afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı Bradford metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla yapılan metotta kullanılan boya proteine 2 dakika gibi kısa bir sürede bağlanır ve kararlı bir yapı oluşur. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [91].

1mg/mL BSA (sığır serum albumin) içeren stok çözeltiden 10-100 µL alınıp son hacimler 100 µL'ye tamamlandı ve 5 mL boya çözeltisi tüplere aktarılarak vortekslendi. 10 dakika sonucunda 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak ilgili boya reaktifi kullanıldı. Her bir ölçüm en az 2 kez yapılarak ortalamaları alınmıştır. Ölçülen absorbans ve karşılık gelen protein konsantrasyonları grafik halinde sunulmuştur. Söz konusu grafik tüm protein ölçümleri için standart olarak kullanılmıştır.



**Şekil 2.1:** İlgili boya- protein kompleksleri.

### **2.2.3 SDS-PAGE ile Enzimin Saflığının Kontrolü**

Patates yumrularından saflaştırılan enzimlerin elektroforez işlemi ayırma jeli % 10, yığma jeli % 3 oranlarında olacak şekilde farklı akrilamid konsantrasyonların da yapılmıştır. Öncelikli olarak elektroforezde kullanılacak olan cam plakalar saf su ile yıkanarak, ardından etil alkol kullanılarak temizlendi. Daha sonra iyice temizlenen cam yüzeyler elektroforez cihazına sabitlendikten sonra ayırma jeli camlar arasında üstten bir miktar boşluk kalacak şekilde dikkat edilerek jel mikropipet yardımı ile tatbik edildi. Daha düzgün bir jel yüzeyi elde etmek için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturularak, polimerizasyon aşamasına geçildi. Polimerizasyon işlemi sonucunda n-bütanol ortamdaki uzaklaştırıldı. Ayırma jelinden (% 10) sonra % 3'lük yığma jeli eklenerek dikkatli bir şekilde tarak yerleştirildi. Daha sonra yığma jelinin polimerleşmesi için belirli bir süre beklendi ve ardından tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak oluşan kuyular saf su ve ardından tank tamponuyla yıkandı. Tüm polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankına uygun şekilde yürütme tamponu ilave edildi [91].

Saflaştırılan proteinler ve standart olarak kullanılan proteinler 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. 3 dakika boyunca kaynatılan numunelerin soğuması beklendi. Soğuyan numuneler dikkatli bir şekilde jele yüklendi ve elektroforez voltajı ayarlandı. Akımla beraber başlayan yürütme işlemi mavi bant jelin mesafesi azalana kadar devam ettirildi. İşlem sonunda akım kesilerek yürütme işlemi sonlandırıldı. Ardından protein bantlarını içeren jel dikkatli bir şekilde camlardan alınarak renklendirme çözeltisi içine



konuldu. Yaklaşık olarak 2 saat çalkalayıcı da bekletildi. Ardından renksizleştirme çözeltilisine alınan jelin son halinin fotoğrafı çekildi.



**Şekil 2.2:** PPO enzimlerinin saflığının kontrolü için uygulanan elektroforez işlemi.

#### **2.2.4 Termal Denatürasyon**

Birçok enzim gibi polifenol oksidaz enzimleri de protein yapısındadır. Söz konusu 3 boyutlu yapılar sıcaklığın yükselmesi ile denatürasyona uğrarlar. Bunun sonucu olarak aktivite de büyük kayıplar gerçekleşir. Bu nedenle enzimlerin aktivitesinin kontrolünde termal denatürasyon önemli bir işlemdir [94].

Bu çalışmada kullanılan beş patates çeşidi içerisinde aktivitesi yüksek olan 3 patates çeşidine termal denatürasyon yapıldı. Termal denatürasyon da 45°C, 65°C ve 85°C sıcaklıklarda 10 dakika aralıklarla patates çeşitlerinde bulunan enzim denatüre edildi ve denatürasyon sonrası her bir numunenin aktivitesi spektrofotometre yardımı ile mümkün olan en kısa sürede hızlıca ölçüldü.

### **2.2.5 PPO Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi**

PPO enziminin aktivitesi, aktivite tamponu, substrat (10<sup>-1</sup> M katekol) ve enzim, çözeltilerinden sırasıyla 40, 880 ve 80 µL alınarak elde edilen reaksiyon karışımının 420 nm'de 1 dakikada köre karşı okunan absorbans değişikliğinin ölçülmesiyle belirlendi. 1 EU (Enzim Ünitesi) 1 dakika sonundaki 0.001 artış olarak tanımlanıp, aktivite birimi olarak absorbansın 1 dakikada 1 mL enzim çözeltisinde meydana gelen 0.001 birimlik değişim olarak kullanıldı [91].

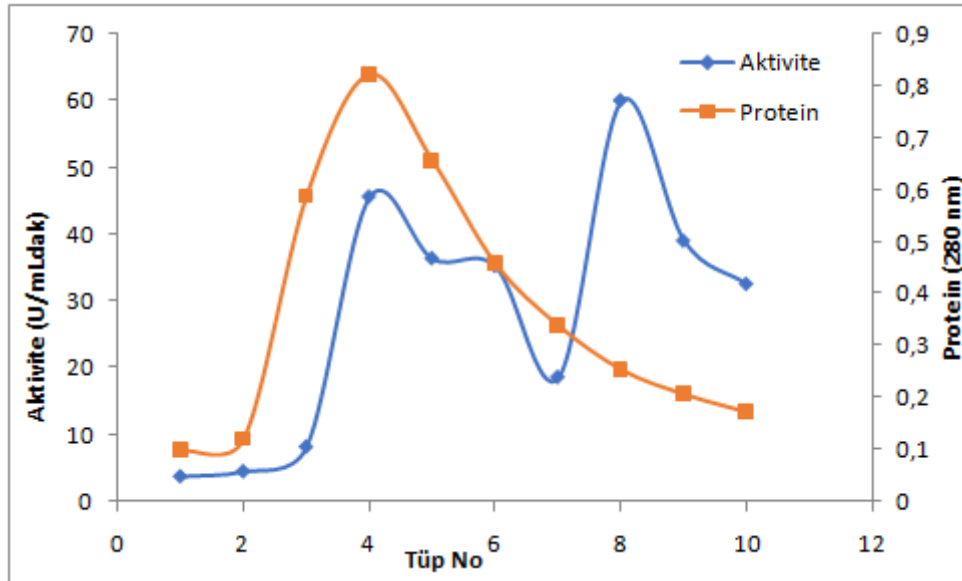
### **2.2.6 Katekol Substratı için Kinetik Sabitlerin ( $K_M$ ve $V_{max}$ ) Tespit Edilmesi**

Kinetik sabitlerin belirlenmesi için uygun şartlar altında, farklı derişimlerde katekol substratı ile PPO enziminin aktivite tayinleri yapıldı. Tüm substrat derişiminde ölçümler en az 2 defa tekrarlanarak ortalamaları kaydedildi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri ile çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden (Şekil 3.8-12) elde edilen denklemler yardımıyla  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.  $V_{max}/K_M$  oranı her bir patates çeşidi için belirlendi ve grafiksel olarak belirtildi (Şekil 3.13).

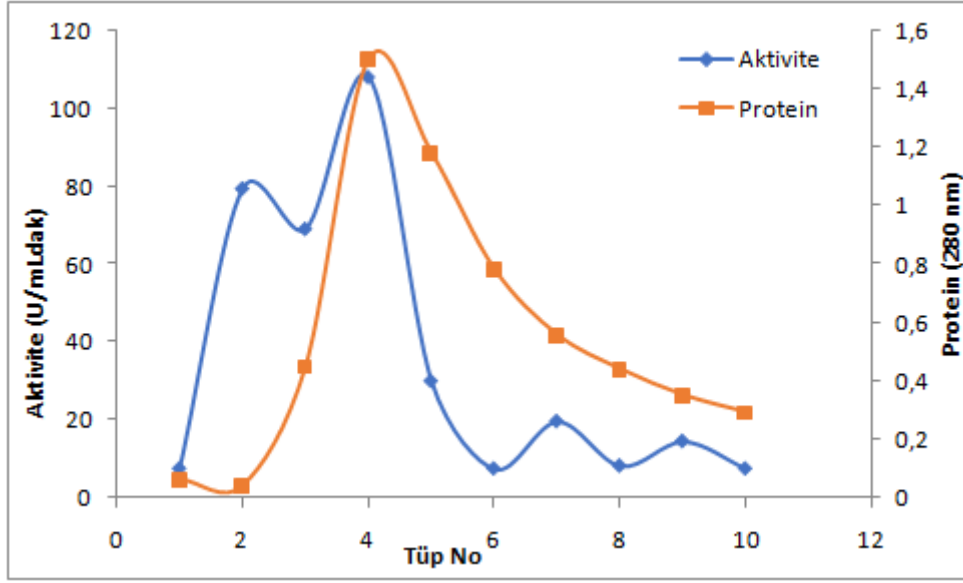
### 3. BULGULAR

#### 3.1 PPO Enziminin Saflaştırılma İşlemi

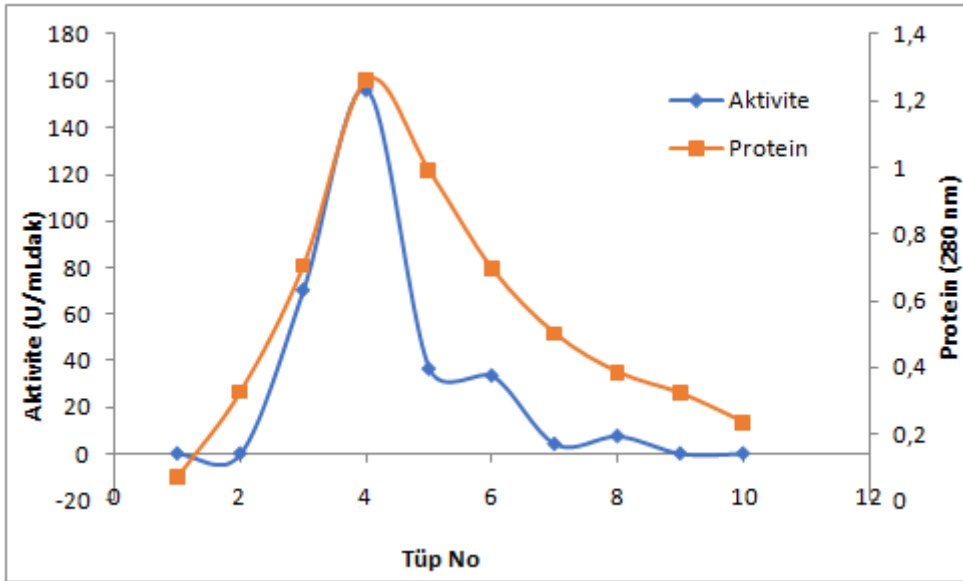
Afinite kromatografisinde kullanılan Sepharose 4-B-L-tirozin-p-amino benzoik asit kimyasal yapısına sahip jel, kolona paketlenerek 5 mM fosfat tamponu (pH 5.0) kullanılarak dengeleme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından farklı patates çeşitlerinden elde edilen enzim çözeltileri ayrı ayrı kolona tatbik edildi. Nonspesifik bileşikleri uzaklaştırmak için  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 5.0) tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra elüsyon tamponu olarak 5 mM fosfat tamponu 1 M sodyum klorür (pH 7.0) çözeltisi kullanılarak, 2 mL olacak şekilde fraksiyonlar alınmıştır. Her bir tüpte 280 nm'de protein tayini yapılmıştır. Protein içeren tüm tüplerde PPO'ların aktivite tayini yapılarak aktivite gösteren tüpler birleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1-5'te grafik şeklinde verilmiştir.



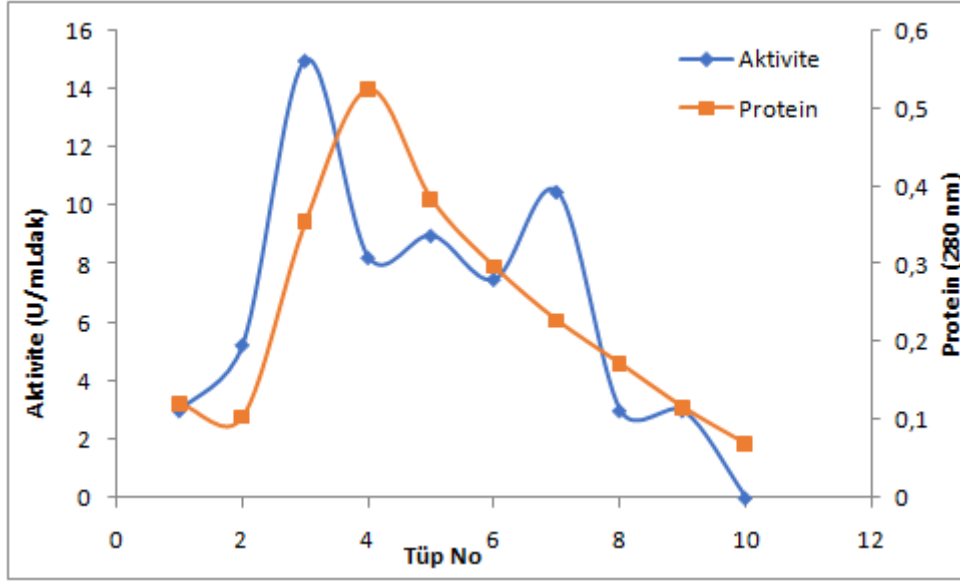
Şekil 3.1: aaPPO'ya ait saflaştırma grafiği.



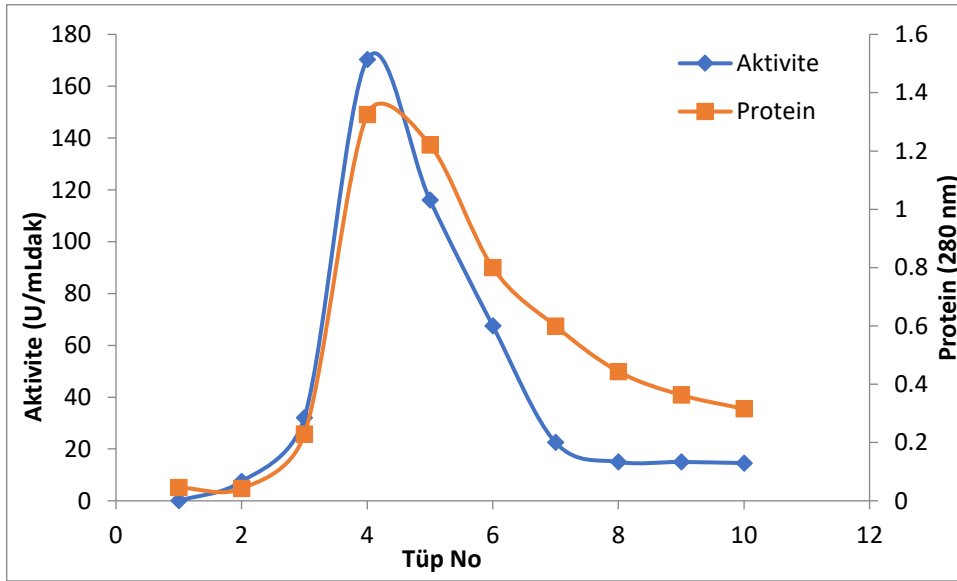
Şekil 3.2: baPPO'ya ait saflaştırma grafiği.



Şekil 3.3: mePPO'ya ait saflaştırma grafiği.



Şekil 3.4: mlPPO'ya ait saflaştırma grafiği.



Şekil 3.5: myPPO'ya ait saflaştırma grafiği.

**Tablo 3.1:** baPPO için saflaştırma derecesi tablosu.

Saflaştırma İşlemi	Çözelti Hacmi (mL)	Enzim Ünitesi (U/mLdak)	Toplam Enzim Ünitesi	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Verimi (%)	Saflaştırma Derecesi
<b>Tuzla Çöktürme</b>	38	250	9500	0.003	0.114	83333.3	-	-
<b>Afinite Tekniği ile Saflaştırma</b>	2	3600	7200	0.0059	0.0118	610169	75.79	7.32

**Tablo 3.2:** mePPO için saflaştırma derecesi tablosu.

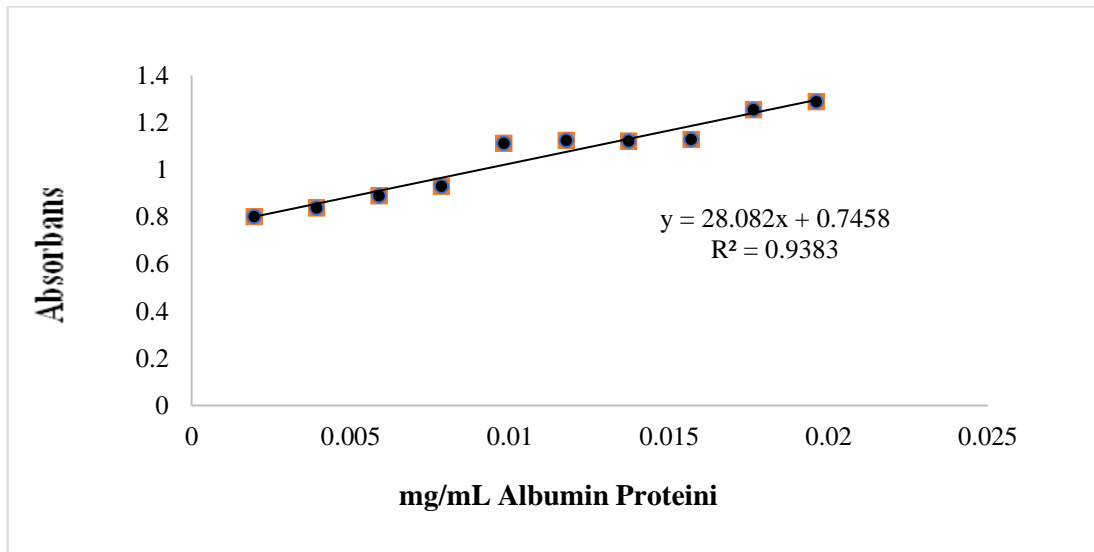
Saflaştırma İşlemi	Çözelti Hacmi (mL)	Enzim Ünitesi (U/mLdak)	Toplam Enzim Ünitesi	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Verimi (%)	Saflaştırma Derecesi
<b>Tuzla Çöktürme</b>	40	500	20000	0.0081	0.324	61728.4	-	-
<b>Afinite Tekniği ile Saflaştırma</b>	2	5200	10400	0.0037	0.0074	1405405	52.00	22.76

**Tablo 3.3:** myPPO için saflaştırma derecesi tablosu.

Saflaştırma İşlemi	Çözelti Hacmi (mL)	Enzim Ünitesi (U/mLdak)	Toplam Enzim Ünitesi	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Verimi (%)	Saflaştırma Derecesi
Tuzla Çöktürme	35	2250	78750	0.0433	1.5155	51963	-	-
Afinite Tekniği ile Saflaştırma	2	5677.5	11355	0.0022	0.0044	2580682	14.42	49.66

### 3.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Eğri

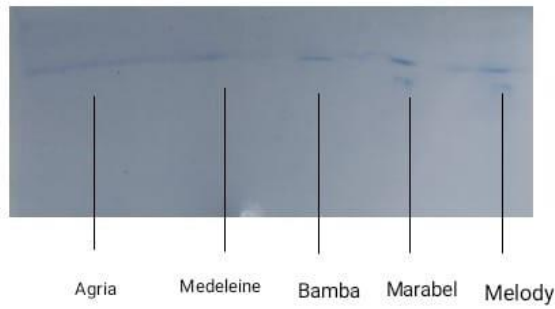
Saflaştırma derecelerini belirlemek amacıyla ham ekstrakt ve saflaştırılmış polifenol oksidaz enzim numunelerinde protein tayini için Bradford metodu kullanılmıştır. Bunun için kullanılan standart eğri şekil 3.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.6:** Kantitatif protein analizi için gerekli grafik.

### 3.3 Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Elektrofrez

Afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan enzim çözeltilerinin SDS-poliakrilamid jel elektrofrez bölüm 2 de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez sonucu çekilen fotoğraf şekil 3.7’de gösterilmiştir.

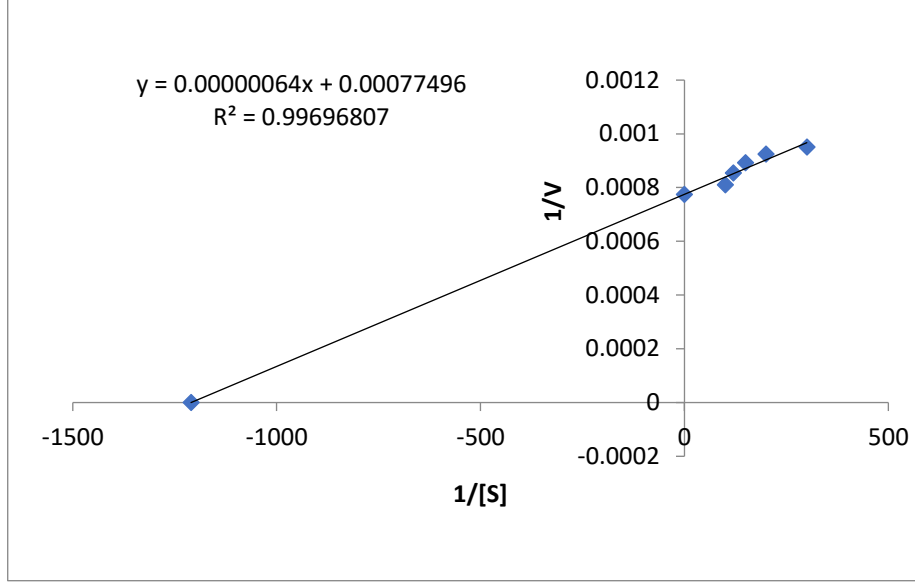


Şekil 3.7: Patates yumrularından saflaştırılan PPO enzimleri için SDS poliakrilamid jel elektrofrez.

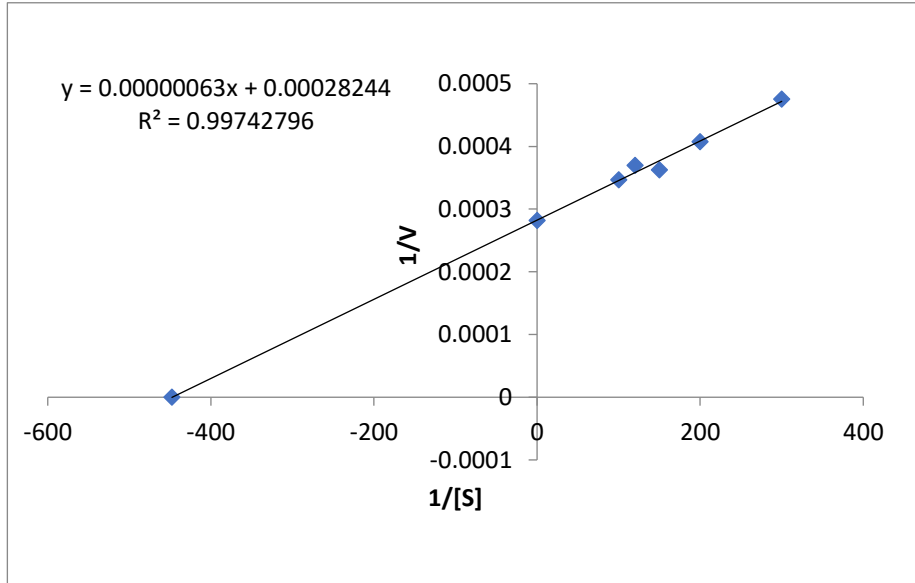
### 3.4 Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Kinetik Sabitlerinin Saptanması

Farklı patates çeşitlerinden elde edilen PPO'ların katekol substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlemek amacı ile farklı substrat konsantrasyonlarının da enzim aktivitesi ölçümleri 420 nm’de gerçekleştirilmiştir. Ölçümler en az iki defa tekrarlanarak sonuçların ortalaması alınmıştır. Her bir patates çeşidinden elde edilen enzimler için hesaplanan  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerlerinin Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.8-12). Bahsedilen grafiklerden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Tablo 3.4’de verilmiştir. Ayrıca her bir patates çeşidi PPO'ları için bulunan  $V_{max}/K_M$  oranları Şekil 3.13’te grafik olarak sunulmuştur [91].

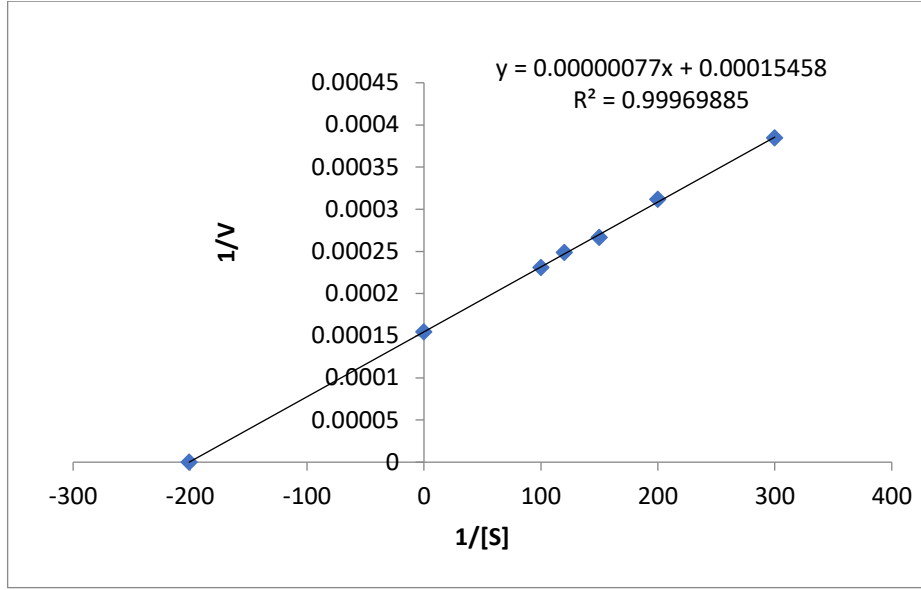




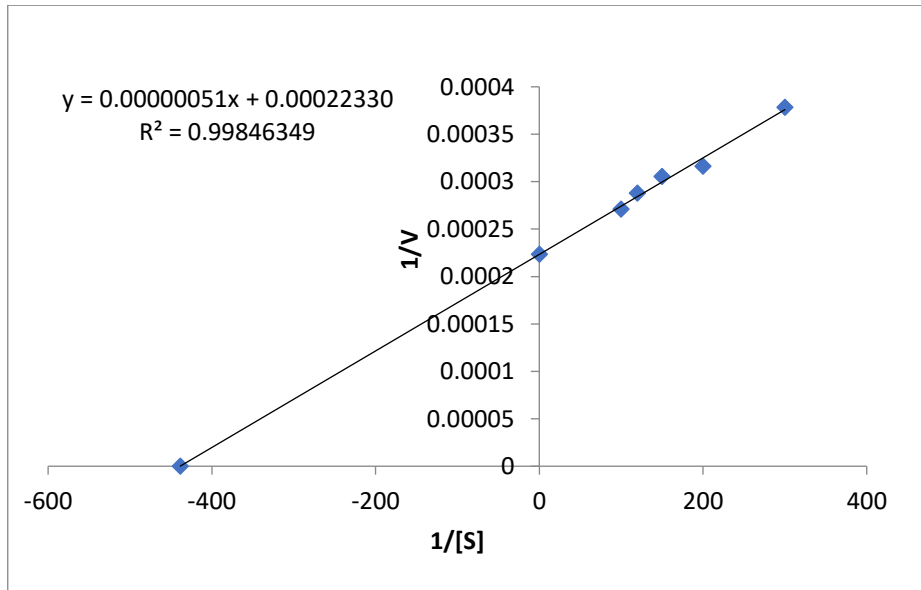
Şekil 3.8: Katekol substratı kullanılarak aaPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.



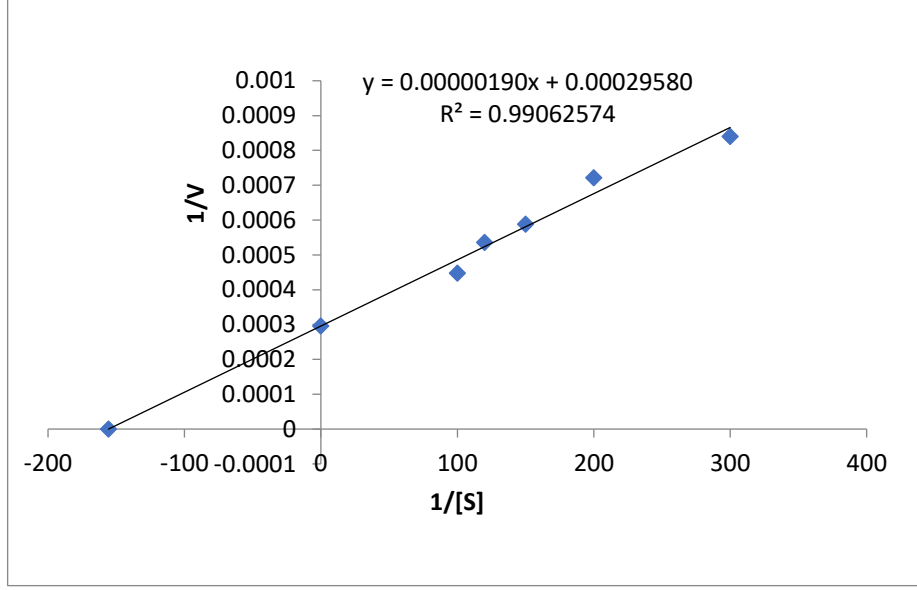
Şekil 3.9: Katekol substratı kullanılarak baPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.



Şekil 3.10: Katekol substratı kullanılarak mlPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.



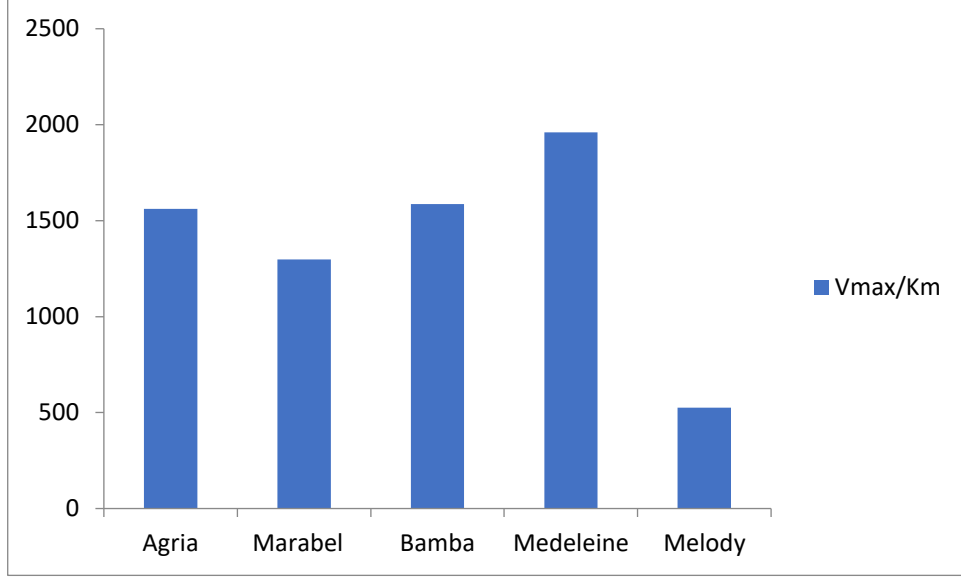
Şekil 3.11: Katekol substratı kullanılarak mePPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.



Şekil 3.12: Katekol substratı kullanılarak myPPO'nun kinetik sabitlerinin saptandığı grafik.

Tablo 3.4: Patates PPO enzimleri için katekol substratı kullanılarak hesaplanan kinetik sabitler.

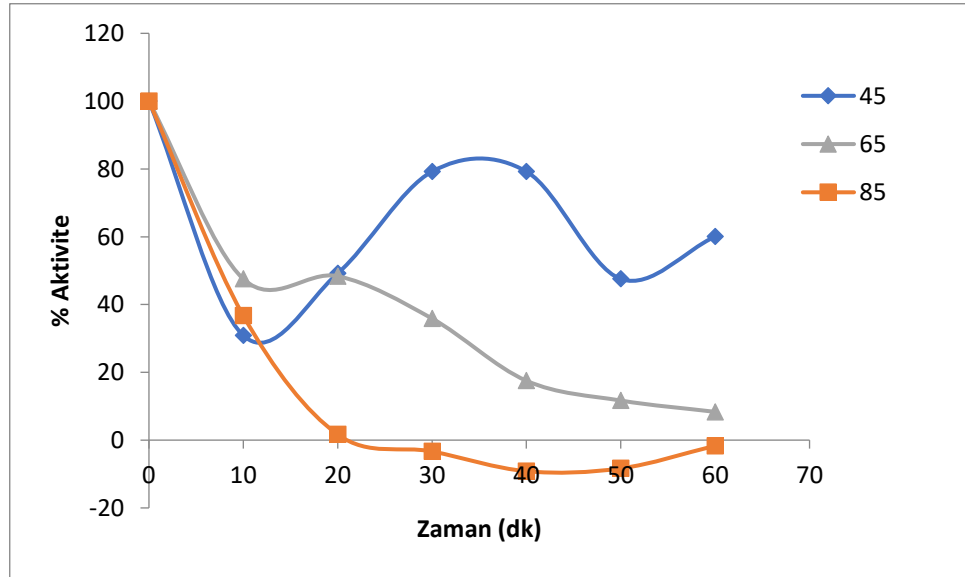
Patates Çeşidi	Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (U/mLdak)	$V_{max}/K_M$
aaPPO	Katekol	0.826	1291	1562
baPPO	Katekol	2.234	3546	1587
mlPPO	Katekol	4.981	6469	1298
mePPO	Katekol	2.281	4472	1960
myPPO	Katekol	6.424	3381	526



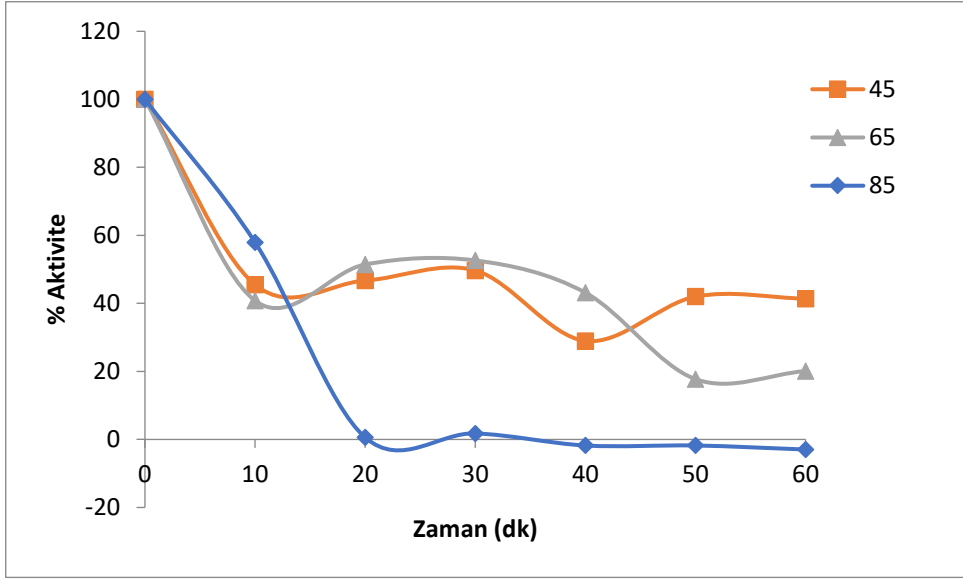
Şekil 3.13: Farklı patates çeşitlerinden elde edilen PPO'lar için hesaplanan K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> oranları.

### 3.5 Farklı Patates Çeşitlerinden Elde Edilen PPO'ların Termal Denatürasyonu

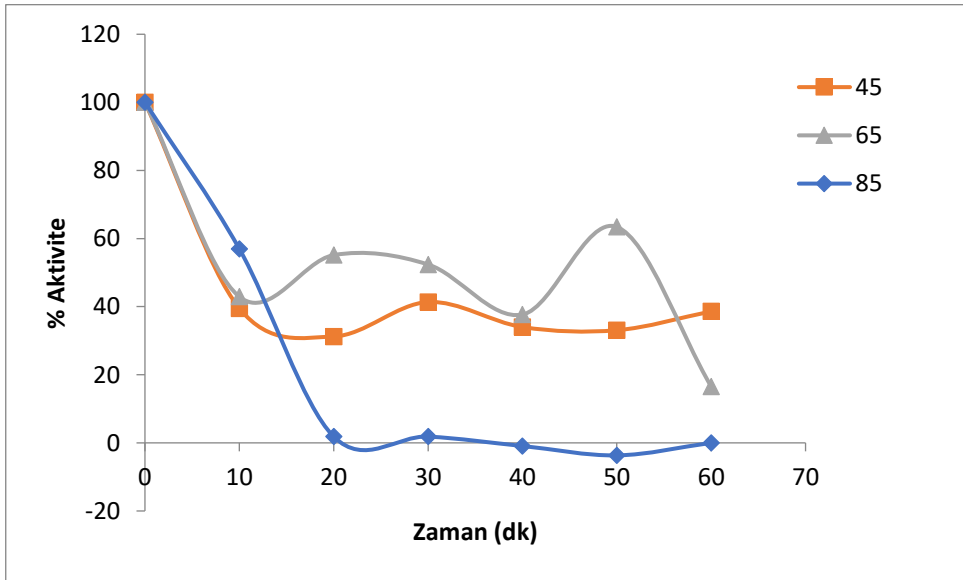
Araştırmada kullanılan ve yüksek aktivite gösteren patates çeşitlerinden elde edilen enzimler (baPPO, mePPO ve myPPO), 45°C, 65°C ve 85°C'de farklı zamanlarda ısıl işlemlere tabi tutularak termal denatürasyon süreçleri gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucu elde edilen veriler Şekil 3.14 -19'da grafikler şeklinde sunulmuştur.



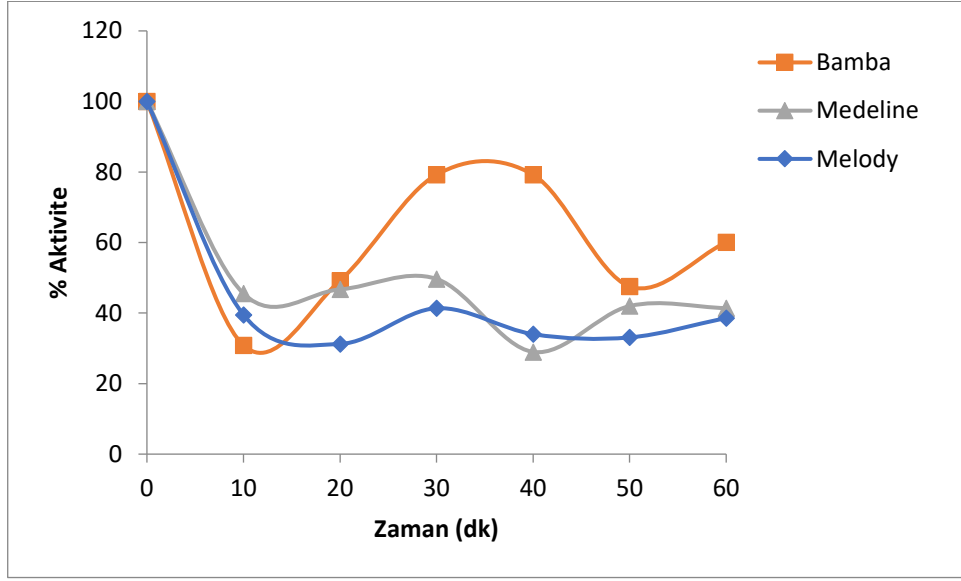
Şekil 3.14: baPPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.



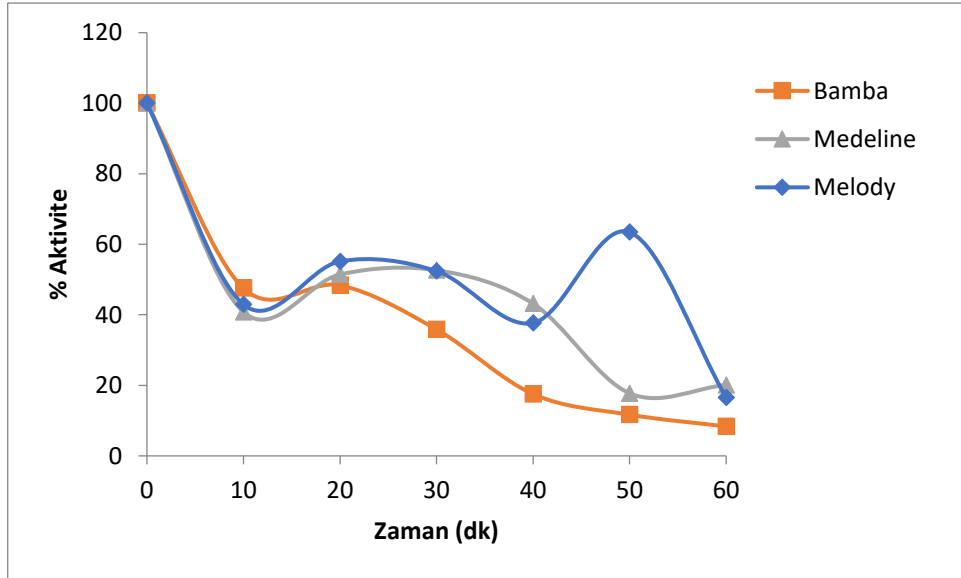
Şekil 3.15: mePPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.



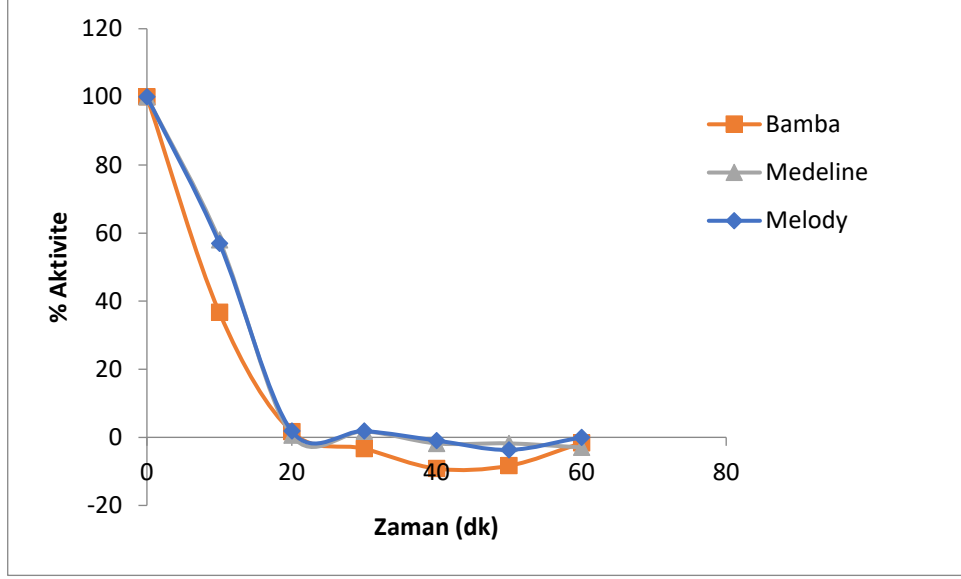
Şekil 3.16: myPPO için farklı sıcaklıklardaki termal denatürasyonu.



Şekil 3.17: baPPO, mePPO ve myPPO için 45°C'de termal denatürasyonu.



Şekil 3.18: baPPO, mePPO ve myPPO için 65°C'de termal denatürasyonu.



Şekil 3.19: baPPO, mePPO ve myPPO için 85°C'de termal denatürasyonu.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

2020 verilerine göre yıllık 374 milyon tonluk üretimiyle patates, dünyanın en önemli üçüncü mahsulü arasındaki yerini korumaktadır. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi patates yumruları, nişasta, proteinler, askorbik asit, karbohidratlar, mineraller, vitaminler ve lif içeriği ile sağlıklı bir besin maddesi olarak öne çıkmaktadır [1–4]. Ayrıca patates proteinlerinin kalitesinin de yüksek, diğer bir deyişle esansiyel amino asitlerce zengin olması patates yumrularının önemini artırmaktadır. Ancak birçok meyve ve sebze de bulunan polifenol oksidaz enzimi, patates yumrularında da bol miktarda bulunmaktadır. Bu durum patates yumrularının endüstride kullanımları açısından önemli sorunları ortaya çıkarmaktadır. Ürünün renginin bozulması, fenolik maddelerin azalması ve en önemlisi protein kalitesinin önemli ölçüde düşmesi bu problemlerden sadece birkaçıdır. Bu nedenle polifenol oksidaz enziminin katalitik gücünün saptanması ve aktivitesinin kontrol altına alınması son derece önemli bir konudur.

Araştırmamızda bu amaçla ülkemizde ve dünyada önemli patates çeşitlerinden Agria, Bamba, Marabel, Medeleine ve Melody'den PPO enzimleri elde edilerek kinetik sabitleri saptanmış ve termal denatürasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Polifenol oksidaz enziminin istenmeyen reaksiyonları dışında çeşitli endüstrilerde oluşan atık sulardan fenollerin uzaklaştırılması ve ekmek, kuru meyve, çay, kakao, kanola küspesi ve kahve üretiminde kalitenin korunması gibi çeşitli uygulama alanları da vardır. Aynı zaman da PPO'nun yüksek substrat spesifikliği, çeşitli biyosensör tasarımı için de bu seçkin enzimi önemli hale getirmektedir. Tüm bunların dışında PPO'nun parkinson hastalığı, vitiligo, kanser ve değişik enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği düşüncesi büyük heyecan oluşturmaktadır. Bu nedenle söz konusu enzimin saflaştırılması konusunda literatürde birçok çalışmaya rastlamak mümkündür [95].

Bu amaçla araştırmamızda 5 farklı patates çeşidinden PPO enzimleri afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla Sepharose 4-B-L-tirosin-p-amino benzoik asit formundaki afinite jeli kullanılmıştır. Bu jel araştırma grubumuz tarafından ilk defa sentezlenmiş ve birçok türden PPO enzimleri saflaştırılmıştır [91], [96], [97]. Bu çalışmada söz konusu afinite jeli kullanılarak ilk defa patates PPO'larının saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimlerin saflığı SDS-PAGE elektroforez jeli ile kontrol edilmiştir. Farklı patates çeşitlerinden PPO enzimlerinin saflaştırılması konusunda



literatürde çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Saflaştırmalar, genel olarak jel filtrasyon ve iyon değişim teknikleri şeklinde birden fazla basamaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu tekniklerin uygulanmasının nispeten kolay olmasına rağmen tarafımızdan aynı amaç için kullanılan afinite tekniğine göre rezilüsyonun daha düşük olması çalışmamızın önemini artırmaktadır. Örneğin, Rasmussen ve arkadaşları [95] patatesten PPO enzimini jel filtrasyon kromatografisi de dahil olmak üzere 4 farklı aşamada saflaştırma işlemini gerçekleştirmiştir. Bilindiği gibi saflaştırma basamaklarının sayısının artması saflaştırma derecesini artırabilir. Ancak bu işlemler, maliyeti arttırdığı gibi saflaştırma verimini de önemli ölçüde düşürür. Tarafımızdan sadece tek basamakta PPO enzimlerinin saflaştırılmasının bu açıdan önemli bir başarı olduğu düşüncesindeyiz [96], [99–103].

Araştırmamızda aaPPO, baPPO, mePPO, mlPPO ve myPPO enzimlerinin katekol oksidaz aktiviteleri saptandı. Ayrıca  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile belirlenerek katalitik güçleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar tablo 3.4'te özet olarak verilmiştir. Bu sonuçlara göre aaPPO enziminin katekol substratına karşı afinitesinin diğer enzimlere göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. myPPO ise ilgili substrata karşı en düşük afiniteye sahip olmasıyla dikkat çekmektedir. Ancak mePPO enziminin katalitik gücünün diğer tüm türlere göre yüksek olduğu rahatlıkla görülmektedir. Bu durum da Medeleine patates çeşidinde enzimatik kararmanın daha etkili olacağı söylenebilir. Ancak myPPO enziminin katalitik gücünün tüm türlere göre çok daha düşük olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla çalışılan türlerde enzimatik kararmanın en az olduğu patates çeşidi myPPO olduğu görülmektedir. Bu durumun, endüstriyel kullanım için patates yumrusu seçimi konusunda önemli bir tercih sebebi olacağı düşüncesindeyiz.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin gerek substrat gerekse enzim kaynağına göre büyük oranda değiştiği literatürden anlaşılmaktadır. Tatlı patates PPO'su için en düşük aktivite, substrat olarak pirogallol ile elde edilmiştir. PPO'nun substrat afinitesi genellikle enzimin kaynağına bağlı olarak değişir. Örneğin, Amasya elma PPO [12], diğer substratlara göre 4-metil katekol için daha fazla afiniteye sahiptir. Daha önceki bir çalışmada [16], substrat olarak katekol ile kokoyam yumrularının PPO'sunun  $K_M$  değeri için 40 mM bulmuştur. Barthelet ve Veronique [103], manihot esculenta c.'nin PPO enziminin katekol ve katekin için  $K_M$  değerleri sırasıyla 28.1 mM ve 5.27 mM  $K_M$  değerlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca substrat olarak 4-metil katekol ve katekol kullanan Lourenco ve ark. [48] tatlı patates PPO'su için aynı substratları kullanarak

sırasıyla 26.0 mM ve 96.0 mM'lik  $K_M$  değerleri bulduklarını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlarla belirli ölçüde uyum içerisindedir.

Enzimatik kararmanın önlenmesinde en etkili metodlardan birisi PPO enziminin termal inaktivasyonudur. Bu nedenle çalışmamızın bu bölümünde katalitik gücü en yüksek, en düşük ve ortalama değere sahip olan sırasıyla mePPO, myPPO ve baPPO enzimlerinin termal inaktivasyon çalışmaları farklı zamanlarda ısı işlemler (45°C, 65°C ve 85°C) uygulayarak araştırılmıştır. Genel olarak çalışılan enzimlerin aktivitelerinin sıcaklık arttıkça azaldığı görülmüştür. mePPO enziminin çalışılan tüm sıcaklıklarda 10 dakika inkübasyon sonucunda yaklaşık % 40'lık bir aktivite kaybı gözlemlenmiştir. 85°C' de ise 20 dakika inkübasyondan sonra mePPO, aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. Ayrıca 65°C' de 50 dakikalık bir inkübasyon sonucunda yaklaşık % 80'lik bir aktivite kaybı gözlemlenmiştir.

myPPO enziminin farklı sıcaklıklardaki ısı işlemlerinde mePPO'da olduğu gibi ilk 10 dakikada tüm sıcaklıklarda önemli bir aktivite kaybı gözlemlenmiştir. 20 dakikalık inkübasyon zamanından sonrası periyotlarda 45°C ve 65°C'ler de mePPO aktivitesinde dalgalı seyirler gözlemlenmiştir. Ancak 85°C'de 20 dakikalık bir inkübasyon sonucunda enzimin tamamen inaktive olduğu saptanmıştır.

Çalışılan patates çeşitleri arasında ortalama katalitik güce sahip baPPO'nun termal denatürasyon çalışmalarında diğer enzimlerden farklı olarak ilk 10 dakikada daha fazla aktivite kaybı bulunmuştur. Bu enzimin, mePPO ve myPPO'da olduğu gibi 85°C'de 20 dakikalık bir inkübasyon sonucunda tamamen inaktive olduğu saptanmıştır. 65°C'de 60 dakikalık bir inkübasyon sonucunda enzimin büyük ölçüde inaktive olduğu görülmüştür.

PPO enziminin termal denatürasyonu ile ilgili literatürde çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Örnek olarak, tatlı patatesin PPO'sunun ısı işlemleri sonucu 60°C'de 10 dakika süreyle aktivitesinin % 62'sini kaybettiği ve 70°C'de 10 dakika sonra neredeyse tamamen inaktive olduğu saptanmıştır [104]. Stauffer [104], denatürasyonun enzimin sekonder ve tersiyer yapısının geri dönüşümsüz bir şekilde bozulduğunu belirtmektedir. Birçok türden elde edilen polifenol oksidaz enzimlerinin termal stabilitesinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Genel olarak PPO'lar 70 ile 80°C'ler de tamamen inaktive

olduğu belirtilmektedir. Bu alışmalar araştırmamızda elde edilen sonuçlarla uyum halindedir.

Araştırmamızda elde edilen sonuçların, endüstri için uygun patates yumrularının seçimi ve önemli bir sorun olan enzimatik kararmanın önlenmesi konusunda önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] V. Priedniece, K. Spalvins, K. Ivanovs, J. Pubule, and D. Blumberga, “Bioproducts from Potatoes. A Review,” *Environ. Clim. Technol.*, vol. 21, no. 1, pp. 18–27, Dec. 2017, doi: 10.1515/rtuct-2017-0013.
- [2] D. G. Barceloux, “Potatoes, tomatoes, and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.),” *Disease-a-Month*, vol. 55, no. 6, pp. 391–402, 2009.
- [3] A. Kita, A. Bąkowska-Barczak, K. Hamouz, K. Kułakowska, and G. Lisińska, “The effect of frying on anthocyanin stability and antioxidant activity of crisps from red- and purple-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.),” *J. food Compos. Anal.*, vol. 32, no. 2, pp. 169–175, 2013.
- [4] N. Yardımcı, H. Ç. Kılıç, and Y. Demir, “Detection of PVY, PVX, PVS, PVA, and PLRV on Different Potato Varieties in Turkey Using DAS-ELISA,” 2018.
- [5] G. Bobo-García, C. Arroqui, G. Merino, and P. Vírveda, “Antibrowning compounds for minimally processed potatoes: A review,” *Food Rev. Int.*, vol. 36, no. 5, pp. 529–546, 2020.
- [6] G. Oms-Oliu *et al.*, “Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 57, no. 3, pp. 139–148, 2010.
- [7] F. Artes, P. Gomez, and F. Hernandez, “Physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *International Food Science and Technology*. 13: 177–188.” 2007.
- [8] T. Ohlsson, “Minimal processing-preservation methods of the future: an overview,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, no. 11, pp. 341–344, 1994.
- [9] T. Y. Hwang, S. M. Son, and K. D. Moon, “Screening of effective browning inhibitors on fresh-cut potatoes,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 11, no. 4, pp. 397–400, 2002.
- [10] K. Zaheer and M. H. Akhtar, “Potato production, usage, and nutrition—a review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 5, pp. 711–721, 2016.
- [11] D. Panadare and V. K. Rathod, “Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 14, pp. 431–437, 2018.
- [12] G. Özkan and S. E. Bilek, “Microencapsulation of natural food colourants,” *Int. J. Nutr. Food Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 145–156, 2014.
- [13] B. B. Mishra and S. Gautam, “Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control,” *Enzym. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 141–149, 2016.
- [14] K. A. Batista, G. L. A. Batista, G. L. Alves, and K. F. Fernandes, “Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 102, pp. 211–217, 2014.
- [15] B. K. Vaidya, H. K. Suthar, S. Kasture, and S. Nene, “Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system,” *Biochem.*

- Eng. J.*, vol. 28, no. 2, pp. 161–166, 2006.
- [16] L. Vámos-Vigyázó and N. F. Haard, “Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 15, no. 1, pp. 49–127, 1981.
- [17] R. Yoruk and M. R. Marshall, “Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1,” *J. Food Biochem.*, vol. 27, no. 5, pp. 361–422, 2003.
- [18] Á. Sánchez-Ferrer, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, and F. García-Carmona, “Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1247, no. 1, pp. 1–11, 1995.
- [19] P. Fronk *et al.*, “Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase,” *Food Chem.*, vol. 183, pp. 49–57, 2015.
- [20] K. C. Vaughn and S. O. Duke, “Function of polyphenol oxidase in higher plants,” *Physiol. Plant.*, vol. 60, no. 1, pp. 106–112, 1984.
- [21] H. R. Lerner, A. M. Mayer, and E. Harel, “Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase,” *Phytochemistry*, vol. 11, no. 8, pp. 2415–2421, 1972.
- [22] W. H. FLURKEY and J. J. JEN, “PURIFICATION OF PEACH POLYPHENOL OXIDASE IN THE PRESENCE OF ADDED PROTEASE INHIBITORS 1,” *J. Food Biochem.*, vol. 4, no. 1, pp. 29–41, 1980.
- [23] J. R. Whitaker, *Principles of enzymology for the food sciences*. Routledge, 2018.
- [24] E. Valero and F. García-Carmona, “pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, no. 7, pp. 2447–2451, 1998.
- [25] M.-P. Fraignier, L. Marques, A. Fleuriet, and J.-J. Macheix, “Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, no. 9, pp. 2375–2380, 1995.
- [26] P. Zhou, N. L. Smith, and C. Y. Lee, “Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 4, pp. 532–536, 1993.
- [27] P. WESCHE-EBELING and M. W. MONTGOMERY, “Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization,” *J. Food Sci.*, vol. 55, no. 5, pp. 1320–1324, 1990.
- [28] A. Sanchez-Ferrer, F. Laveda, and F. Garcia-Carmona, “Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 8, pp. 1219–1224, 1993.
- [29] F. S. Interesse, P. Ruggiero, G. D’Avella, and F. Lamparelli, “Partial purification and some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 31, no. 5, pp. 459–466, 1980.
- [30] M. Nozue, M. Souri, D. Arakawa, and M. Kojima, “Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture,” *J. Plant Physiol.*, vol. 153, no. 5–6, pp. 552–557, 1998.

- [31] H. Heimdal, L. M. Larsen, and L. Poll, "Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 7, pp. 1428–1433, 1994.
- [32] Y. G. Sheptovitsky and G. W. Brudvig, "Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase," *Biochemistry*, vol. 35, no. 50, pp. 16255–16263, 1996.
- [33] M. Ü. Ünal, C. Taş, and A. Şener, "Determination of biochemical properties of polyphenol oxidase from domat olives," *Gıda*, vol. 36, no. 1, pp. 185–192, 2011.
- [34] K. A. Segovia-Bravo, M. Jarén-Galán, P. García-García, and A. Garrido-Fernández, "Characterization of polyphenol oxidase from the Manzanilla cultivar (*Olea europaea pomiformis*) and prevention of browning reactions in bruised olive fruits," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 16, pp. 6515–6520, 2007.
- [35] A. Taticchi, S. Esposto, G. Veneziani, S. Urbani, R. Selvaggini, and M. Servili, "The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil," *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 975–983, 2013.
- [36] M. de los A. Serradell, P. A. Rozenfeld, G. A. Martínez, P. M. Civello, A. R. Chaves, and M. C. Añón, "Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and partial purification," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 80, no. 9, pp. 1421–1427, 2000.
- [37] A. Reinkensmeier, K. Steinbrenner, T. Homann, S. Bußler, S. Rohn, and H. M. Rawel, "Monitoring the apple polyphenol oxidase-modulated adduct formation of phenolic and amino compounds," *Food Chem.*, vol. 194, pp. 76–85, 2016.
- [38] P. S. Gooding, C. Bird, and S. P. Robinson, "Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase," *Planta*, vol. 213, no. 5, pp. 748–757, 2001.
- [39] A. H. Rathjen and S. P. Robinson, "Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant," *Plant Physiol.*, vol. 99, no. 4, pp. 1619–1625, 1992.
- [40] S. P. Robinson, B. R. Loveys, and E. K. Chacko, "Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit," *Funct. Plant Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 99–107, 1993.
- [41] M. K. Saba and S. Moradi, "Internal browning disorder of eight pear cultivars affected by bioactive constituents and enzyme activity," *Food Chem.*, vol. 205, pp. 257–263, 2016.
- [42] F. Taranto, L. N. Delvecchio, G. Mangini, L. Del Faro, A. Blanco, and A. Pasqualone, "Molecular and physico-chemical evaluation of enzymatic browning of whole meal and dough in a collection of tetraploid wheats," *J. Cereal Sci.*, vol. 55, no. 3, pp. 405–414, 2012.
- [43] A. Pasqualone, L. N. Delvecchio, G. Mangini, F. Taranto, and A. Blanco, "Variability of total soluble phenolic compounds and antioxidant activity in a collection of tetraploid wheat," *Agric. Food Sci.*, vol. 23, no. 4, pp. 307–316, 2014.
- [44] H. V Amorim and M. Melo, "Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage," *BARNETT, HL HUNTER, BB Illus. genera imperfect fungi*, vol. 3, 1989.

- [45] P. M. Lee, K. Lee, M. Ismail, and A. Karim, "Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 55, no. 2, pp. 251–260, 1991.
- [46] A. W. Jaworski and C. Y. Lee, "Fractionation and HPLC determination of grape phenolics," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 35, no. 2, pp. 257–259, 1987.
- [47] J. Raymond, N. Rakariyatham, and J. L. Azanza, "Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds," *Phytochemistry*, vol. 34, no. 4, pp. 927–931, 1993.
- [48] E. J. Lourenco, V. A. Neves, and M. A. Da Silva, "Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 40, no. 12, pp. 2369–2373, 1992.
- [49] J. R. Stommel and B. D. Whitaker, "Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset," *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, vol. 128, no. 5, pp. 704–710, 2003.
- [50] L. de S. Mendes, E. Aguayo, C. de O. Pessoa, B. T. Nastaro, and R. A. Kluge, "Enhancement of the antioxidant capacity and reduction of chilling injury in 'Douradão' peaches refrigerated under pre-storage and modified atmosphere," *Acta Sci. Agron.*, vol. 41, 2018.
- [51] C. M. Oliveira, A. C. S. Ferreira, V. De Freitas, and A. M. S. Silva, "Oxidation mechanisms occurring in wines," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 5, pp. 1115–1126, 2011.
- [52] C. Y. Lee and A. W. Jaworski, "Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 39, no. 4, pp. 337–340, 1988.
- [53] R. Singh and I. S. Sheoran, "Enzymic browning of whole wheat meal flour," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 23, no. 1, pp. 121–125, 1972.
- [54] B. K. Baik, Z. Czuchajowska, and Y. Pomeranz, "Discoloration of dough for oriental noodles," *Cereal Chem.*, vol. 72, no. 2, pp. 198–204, 1995.
- [55] D. M. Miskelly, "Flour components affecting paste and noodle colour," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 35, no. 4, pp. 463–471, 1984.
- [56] C. F. Morris, H. C. Jeffers, and D. A. Engle, "Effect of processing, formula and measurement variables on alkaline noodle color—Toward an optimized laboratory system," *Cereal Chem.*, vol. 77, no. 1, pp. 77–85, 2000.
- [57] M. Landi, E. Degl'Innocenti, L. Guglielminetti, and L. Guidi, "Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa* var. *capitata* (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 8, pp. 1814–1819, 2013.
- [58] J. J. Nicolas, F. C. Richard-Forget, P. M. Goupy, M. Amiot, and S. Y. Aubert, "Enzymatic browning reactions in apple and apple products," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 34, no. 2, pp. 109–157, 1994.
- [59] N. A. M. Eskin, "Biochemistry of food spoilage: enzymatic browning," *Biochem. foods*, vol. 2, pp. 401–432, 1990.
- [60] M. V. Martinez and J. R. Whitaker, "The biochemistry and control of enzymatic browning," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 6, pp. 195–200, 1995.

- [61] F. Gultekin and D. K. Doguc, “Allergic and immunologic reactions to food additives,” *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 45, no. 1, pp. 6–29, 2013.
- [62] N. Fayad, L. Marchal, C. Billaud and J. Nicolas, Comparison of Beta-Cyclodextrin Effect on Polyphenol Oxidation Catalyzed by Purified Polyphenol Oxidase from Different Sources,” *J. Agri. Food Chem.*, vol. 45, pp. 2442–2446, 1997.
- [63] V. Singh, S. B. Jadhav, and R. S. Singhal, “Interaction of polyphenol oxidase of *Solanum tuberosum* with  $\beta$ -cyclodextrin: Process details and applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 469–474, 2015.
- [64] I. N. A. Ashie, B. K. Simpson, and J. P. Smith, “Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 36, no. 1–2, pp. 1–30, 1996.
- [65] M. González-Fésler, D. Salvatori, P. Gómez, and S. M. Alzamora, “Convective air drying of apples as affected by blanching and calcium impregnation,” *J. Food Eng.*, vol. 87, no. 3, pp. 323–332, 2008.
- [66] C. Severini, T. De Pilli, A. Baiano, D. Mastrocola, and R. Massini, “Preventing enzymatic browning of potato by microwave blanching,” *Sci. Aliments*, vol. 21, no. 2, pp. 149–160, 2001.
- [67] A. De Leonardis, G. Lustrato, V. Macciola, and G. Ranalli, “Application of chemical and physical agents in model systems to controlling phenoloxidase enzymes,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 231, no. 4, pp. 603–610, 2010.
- [68] L. Li and J. C. Steffens, “Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance,” *Planta*, vol. 215, no. 2, pp. 239–247, 2002.
- [69] P. Castanera, J. C. Steffens, and W. M. Tingey, “Biological performance of Colorado potato beetle larvae on potato genotypes with differing levels of polyphenol oxidase,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 22, no. 1, pp. 91–101, 1996.
- [70] N. Fujieda *et al.*, “Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 30, pp. 22128–22140, 2013.
- [71] M. Pretzler and A. Rompel, “What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 481, pp. 25–31, 2018.
- [72] H. F. Son *et al.*, “Structural basis for highly efficient production of catechol derivatives at acidic pH by tyrosinase from *Burkholderia thailandensis*,” *ACS Catal.*, vol. 8, no. 11, pp. 10375–10382, 2018.
- [73] M.-A. McLarin and I. K. H. Leung, “Substrate specificity of polyphenol oxidase,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 55, no. 3, pp. 274–308, 2020.
- [74] J. L. Muñoz-Muñoz *et al.*, “Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols, o-aminophenols and o-phenylendiamines: Potential use in industrial applications,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 91, pp. 17–24, 2013.
- [75] J. Tian, J. Chen, X. Ye, and S. Chen, “Health benefits of the potato affected by domestic cooking: A review,” *Food Chem.*, vol. 202, pp. 165–175, 2016.



- [76] V. Romanucci *et al.*, “Toxin levels in different variety of potatoes: Alarming contents of  $\alpha$ -chaconine,” *Phytochem. Lett.*, vol. 16, pp. 103–107, 2016.
- [77] R. Ezekiel, N. Singh, S. Sharma, and A. Kaur, “Beneficial phytochemicals in potato—a review,” *Food Res. Int.*, vol. 50, no. 2, pp. 487–496, 2013.
- [78] D. J. Williams *et al.*, “Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 52, no. 1, pp. 323–333, 2013.
- [79] W. Song, C. M. Derito, M. K. Liu, X. He, M. Dong, and R. H. Liu, “Cellular antioxidant activity of common vegetables,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 11, pp. 6621–6629, 2010.
- [80] S. Seo, L. L’Hocine, and S. Karboune, “Allergenicity of potato proteins and of their conjugates with galactose, galactooligosaccharides, and galactan in native, heated, and digested forms,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 16, pp. 3591–3598, 2014.
- [81] P. M. Finglas and R. M. Faulks, “Nutritional composition of UK retail potatoes, both raw and cooked,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 35, no. 12, pp. 1347–1356, 1984.
- [82] J. Tian *et al.*, “Domestic cooking methods affect the phytochemical composition and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes,” *Food Chem.*, vol. 197, pp. 1264–1270, 2016.
- [83] A. Waglay, S. Karboune, and I. Alli, “Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties,” *Food Chem.*, vol. 142, pp. 373–382, 2014.
- [84] J. L. Slavin, “Carbohydrates, dietary fiber, and resistant starch in white vegetables: Links to health outcomes,” *Adv. Nutr.*, vol. 4, no. 3, pp. 351S–355S, 2013.
- [85] D. Dhingra, M. Michael, H. Rajput, and R. T. Patil, “Dietary fibre in foods: a review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 3, pp. 255–266, 2012.
- [86] B. Nayak, *Effect of thermal processing on the phenolic antioxidants of colored potatoes*. Washington State University, 2011.
- [87] B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Urbe, and S. O. Serna-Saldívar, “Bound phenolics in foods, a review,” *Food Chem.*, vol. 152, pp. 46–55, 2014.
- [88] A. L. K. Faller and E. Fialho, “The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 1, pp. 210–215, 2009.
- [89] B. Burlingame, B. Mouillé, and R. Charrondiere, “Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes,” *J. food Compos. Anal.*, vol. 22, no. 6, pp. 494–502, 2009.
- [90] SelanikTohumculuk. “www.selaniktohumculuk.com.” [Online]. Available: <https://www.selaniktohumculuk.com/wp-content/uploads/2019/12/slide003.jpg>. Erişimtarihi: 17Şubat2022
- [91] A. ERGÜN, “Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı bileşiklerin bu enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması,” Doktora tezi, Balıkesir Üniv., Balıkesir, 2016.
- [92] O. Arslan, M. Erzen, S. Sinan, and O. Ozensoy, “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of

- its kinetic and electrophoretic properties,” *Food Chem.*, vol. 88, no. 3, pp. 479–484, 2004.
- [93] P. Cuatrecasas, “Protein purification by affinity chromatography: derivatizations of agarose and polyacrylamide beads,” *J. Biol. Chem.*, vol. 245, no. 12, pp. 3059–3065, 1970.
- [94] Y. Semra, “Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığına ilişkin incelenmesi Purification of invertase by three-phase partitioning systems and determination of thermal stability,” vol. 17, no. 2, pp. 291–294, 2013.
- [95] C. Bøjer Rasmussen, J. J. Enghild, and C. Scavenius, “Identification of polyphenol oxidases in potato tuber (*Solanum tuberosum*) and purification and characterization of the major polyphenol oxidases,” *Food Chem.*, vol. 365, no. June, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130454.
- [96] O. Arslan and M. Erzengin, “Purification of polyphenol oxidase from different sources by affinity chromatography,” *Euroanal. XII*, 2002.
- [97] O. Arslan, A. Temur, and İ. Tozlu, “Polyphenol oxidase from *Allium* sp.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 2861–2863, 1997.
- [98] J.-J. Kim and W.-Y. Kim, “Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng,” *J. Ginseng Res.*, vol. 37, no. 1, p. 117, 2013.
- [99] S. S. Niphadkar, M. D. Vetal, and V. K. Rathod, “Purification and characterization of polyphenol oxidase from waste potato peel by aqueous two-phase extraction,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 45, no. 7, pp. 632–649, 2015.
- [100] A. E. Derardja, M. Pretzler, I. Kampatsikas, M. Barkat, and A. Rompel, “Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.),” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 37, pp. 8203–8212, 2017.
- [101] S. Cheema and M. Sommerhalter, “Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango,” *Food Chem.*, vol. 171, pp. 382–387, 2015.
- [102] C.-P. Yang, S. Fujita, M. D. Ashrafuzzaman, N. Nakamura, and N. Hayashi, “Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 7, pp. 2732–2735, 2000.
- [103] V. J. Barthet, “Polyphenol oxidases from cassava (*Manihot esculenta* C.) root: extraction, purification and characterization,” 1997.
- [104] D. Manohan and W. Wai, “Characterization of Polyphenol Oxidase in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* (L.).),” *J. Adv. Sci. Arts*, vol. 3, no. 1, pp. 14–31, 2012, [Online]. Available: <http://www.ucsiuniversity.edu.my/cervie/pdf/ijasa/paperV3N1-2.pdf>

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Mehtap Ceren CAN  
Doğum tarihi ve yeri : Ardahan-Göle / 23.09.1993  
e-posta : ceren.can656@gmail.com

## Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Biyokimya Bölümü	2022
Lisans	Gümüşhane Üniversitesi/ Gıda Mühendisliği	2017
Lise	Bahçelievler Lisesi	2012