

## Dereotundan (*Anethum graveolens*) Saflaştırılan Polifenol Oksidaz (PFO) Enziminin Bazı Killerle İmmobilizasyonu\*

Nuran AKBULUT<sup>1</sup>, Halis ŞAKİROĞLU<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada dereotundan (*Anethum graveolens*) Polifenol oksidaz enzimi (PFO) kısmi saflaştırılarak bazı killere immobilize edilerek bazı özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla önce dört farklı substrat için, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet belirlendi. Daha sonra belirlenen optimum şartlarda bu substratlar için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edildi. İmmobilizasyon işlemi için farklı miktarlarda killer alınıp, 1 ml tampon çözelti içerisine 0.5 ml enzim ilave edilerek bir karışım oluşturulmuş daha sonra vortexlenerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PFO enzim aktivitesi, katekol substratı varlığında 420 nm de spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Bu aktivitelere dayanarak  $IC_{50}$  değerleri ve  $K_i$  sabitleri hesaplanmıştır.

Konsantrasyona bağlı olarak kil içindeki enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Buna göre; 0.066 g mL<sup>-1</sup>; 0.040 g mL<sup>-1</sup>; 0.020 g mL<sup>-1</sup>; 0.0133 g mL<sup>-1</sup>; 0.0066 g mL<sup>-1</sup> ve 0.0033 g mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında üç farklı kilden numuneler hazırlanmıştır. İmmobilize edilen enzim aktiviteleri, serbest enzim aktivitelerine göre yukarıdaki kil konsantrasyonlarında yeşil kil ile sırasıyla; %92, %86, %80, %75, %70 ve %68, sarı kil ile sırasıyla ; %80, %79, %76, %75, %70 ve %69 kırmızı kil ile sırasıyla; %84, %81, %77, %72, %66 ve %65 inhibisyona uğradıkları ve yeşil kilin dereotu PFO enzimini diğer kırmızı ve sarı killere göre daha kuvvetle immobilize olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Dereotu, polifenol oksidaz, katekol, immobilizasyon, saflaştırma.

## Purification and immobilization by certain clays of Poliphenol Oxidase (PFO) from Dill (*Anethum graveolens*)

**ABSTRACT:** In this study, certain properties of Poliphenol oxidase enzyme (PFO) was investigated after the enzyme was purified from dill and immobilized by certain clays. Optimum pH, temperature and ionic strength for four different substrates were determined.  $K_M$  and  $V_{max}$  values for the substrates at optimum conditions were established. Immobilization was achieved by vortex after adding 0.5 mL enzyme to different amounts of clay and 1 mL buffer. PFO activity was measured spectrophotometrically at 420 nm using chatecol as the substrate. From the measurements the  $IC_{50}$  ve  $K_i$  values for the activity was calculated.

The percentage inhibition of the enzyme isolated from dill was calculated from various concentrations. The concentrations for three different clay samples were as follow: 0.066 g mL<sup>-1</sup>; 0.040 g mL<sup>-1</sup>; 0.020 g mL<sup>-1</sup>; 0.0133 g mL<sup>-1</sup>; 0.0066 g mL<sup>-1</sup> ve 0.0033 g mL<sup>-1</sup>. Activity for the immobilized enzyme for the selected concentrations of the three various clays are as follow: green clay; 92%, 86%, 80%, 75%, 70% , 68% yellow clay; 80%, 79%, 76%, 75%, 70%, 69% ve red clay; 84%, 81%, 77%, 72%, 66%, 65%. These results suggest that PFO from dill are stronger immobilized by green clay compared to PFO immobilized by red and yellow clay.

**Keywords:** Dill, poliphenol oxidase, chatecol, immobilization, purification.

<sup>1</sup> Nuran AKBULUT (0000-0002-2250-9663), Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup> Halis ŞAKİROĞLU (0000-0002-5742-5953), Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Ağrı, Türkiye  
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Halis ŞAKİROĞLU, hsakiroglu@agri.edu.tr

\* Bu çalışma Nuran AKBULUT'un Yüksek Lisans tezinin bir bölümüdür.

## GİRİŞ

Polifenol oksidaz; meyve ve sebzelerin zedelemeleri, hasar görmeleri sırasında kararmalarından sorumlu önemli bir enzimdir. Bu enzim, moleküler oksijeni içeren ortamlarda monofenollerin o-hidroksilasyonu ve o-difenollerin; o-kinonlara oksidasyonunu katalizler (Shi ve ark., 2002). Bitki dokularının renklerinin esmerleşmesi ve koyu renkler alması meyve ve sebzelerin albenisini kaybetmekte bu durum ise üreticiler ve tüketiciler için önemli bir sorun oluşturmaktadır (Yang ve ark., 2008; Aydemir, 2010). Enzimatik esmerleşme olarak bilinen bu reaksiyonlar genellikle gıda endüstrisi için arzu edilmez. Zarar gören bitki dokularında meydana gelen kararma PFO enzimi katalizörlüğü eşliğinde gerçekleşen kimyasal bir reaksiyondur ve fenolik bileşiklerin oksijen varlığında kinonlara yükseltgenmesidir (Lee ve Withaker, 1995; Halim ve Montgomery, 1978; Heimdal ve ark., 1997; Hermann, 1974). PFO enzimi bitkilerde, kabuklu deniz hayvanlarında, mikroorganizmalarda ve funguslarda yaygın olarak bulunmaktadır (Pomerantz, 1963; Whitaker, 1972; Simpson ve ark., 1988).

Bitki hücrelerindeki PFO enzimi bulunduğu yerlere göre farklılık göstermekle birlikte genellikle hücrelerde renk maddelerini taşıyan plastitlerinde bulunur. Bu yüzden fenolik substratlar vakuollerde yer alır (Vaughn ve ark., 1988; Aydemir, 2010).

Günümüzde meyve ve sebzelerin raf ömrünün uzatılması ve esmerleşmelerinin engellenmesi konusunda PFO inhibisyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Demirbaş, 2006). Ancak inhibitör olarak kullanılan kimyasalların zararlı etkileri oldukça tehlikelidir. Bu yüzden zararlı kimyasalları inhibitör olarak kullanmanın yerine enzimin immobilize edilmesi ve enzimlerden maksimum şekilde yararlanmak için immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Enzimlerin çözünmeyen destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri immobilizasyondur (Telefoncu, 1997). Enzim immobilizasyonunda; adsorbsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlanma ile tutuklama yöntemleri kullanılan metotlardan bazılarıdır. Enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla selüloz, sefadeks, agaroz, poliakrilamid, porlu seramik gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar. Doğada en yaygın bulunan kil grupları kaolin, illit ve montmorollit (semektit) kil mineralleridir (Alkan, 1999).

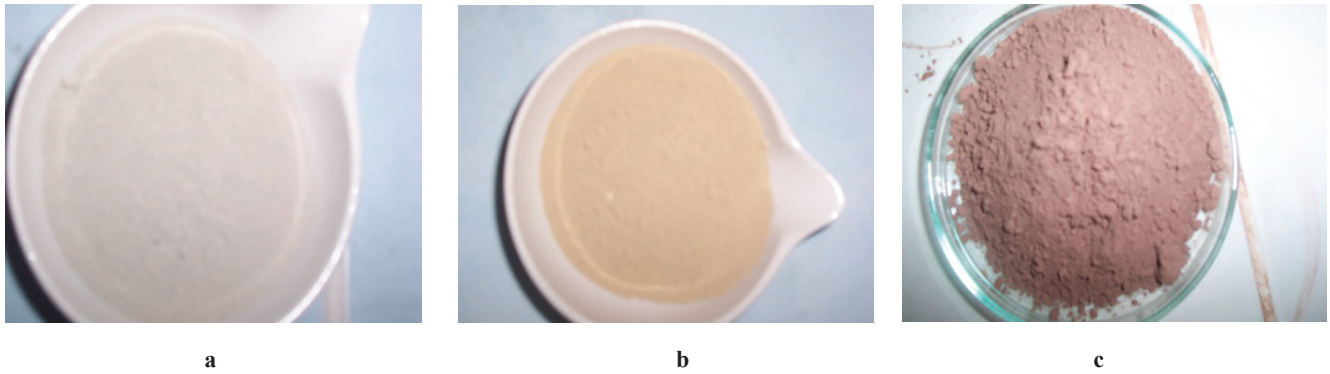
Khan ve arkadaşları (2006), amonyum sülfatla çöktürdükleri patates proteinlerinden bir adsorbant olan celite 545 üzerinde PFO'yu direkt immobilize etmişlerdir. Uruç (2007) tarafından katalaz enziminin lifli yapıda olmayan montmorillonit analsim kili üzerine immobilizasyonu araştırılmıştır. Yağar ve Sağiroğlu (2001), ayvadan elde ettikleri PFO enzimini Bentonit kiline immobilize etmişlerdir. Çalışmada termal ve depo kararlılığı araştırılmıştır. Bir yıllık zaman süresinde depo kararlılığı tespit edilmiş fakat yeniden kullanıma sahip olmadığını gözlemişlerdir. Demir ve arkadaşları (2007), Iğdır kayısısından Aktifleşmiş Sepharose 4-B-L Tirozin p-Amino Benzoik asit afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış PFO enzimini kile immobilize etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında PFO enzimi açısından zengin ve dört mevsim kullanılan dereotu, çadır ve allium sp. gibi otlu peynir yapımında kullanılır (Arslan, 1997; Erat ve ark., 1998; Şakiroğlu ve ark., 2008). Özellikle dereotunun fosfor, bakır, magnezyum, A ve C vitaminleri ile potasyum, kalsiyum, demir ve çinko yönünden çok zengin olması; ayrıca mide bulantısı, karın ağrılarının giderilmesi, sindirimi düzenleme, balgam çözücü ve idrar söktürücü olma, gaz sancılarının giderilmesi, süt artışı ve genel düzenleyici özelliklerine ek olarak zengin antioksidan kaynağı (Zheng ve ark., 1992; Al-Ismael ve Aburjai, 2004; Lisiewska ve ark., 2006) olması bakımından dereotu bitkisinden izole edilen PFO enziminin bazı kinetik özellikleri incelenerek kil immobilizasyonu amaçlanmıştır. Immobilizasyon montmorillonit killerle gerçekleştirilerek, immobilize enzimin inhibisyon türü,  $K_i$  sabitleri,  $IC_{50}$  değerleri ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmalarımızda kullanılan dereotu (*Anethum Graveolens*) taze olarak manavdan temin edildi. Kullanım anına kadar +4°C de muhafaza edildi. Kimyasallar ticari olarak Sigma Chemical Comp'dan, killer ise Anka Nano Teknoloji firmasından temin edildi. Deneysel çalışmalarda kullanmak üzere üç farklı kil numunesi (Yeşil, Kırmızı ve Sarı renkte) (Şekil 1.). Firmadan temin edilen kil (nanokil) örnekleri ( $d < 0.002$  mm) etüvde (105 °C de ) kurutulmuş ve daha sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 1. (a) yeşil, (b) sarı ve (c) kırmızı kil örnekleri (Anka nanoteknoloji firmasından alınan kil örnekleri)

Kil numuneler bünyelerinde farklı kil mineraller (montmorillonit, kaolin, illit ve klorit) bulundurmaktadır. Kırmızı, yeşil ve sarı renkte doğal kil numunelerin kil mineral içerikleri analiz sonuçlarından kil numunelerinde en fazla Semektit minerali (%60 Sarı Kilde, %45 Kırmızı Kilde, % 34 Yeşil Kilde), sonra sırası ile Klorit minerali (Kırmızı Kilde %27, Yeşil Kilde % 26), İllit minerali (Kırmızı Kilde %10, Yeşil Kilde % 22, Sarı Kilde %3) ve Kaolin minerali (Sarı Kilde %37, Kırmızı Kilde %18, Yeşil Kilde % 18) olduğu görülmektedir.

### Yöntem

#### Homojenatın hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi

Ham ekstra hazırlamak amacıyla yaprak kısımlarından alınan 12 g dereotu parçalandı ve sıvı azot ile muamele edilerek toz haline getirildi. 25 ml % 0.05 PEG ihtiva eden 0.5 M fosfat tamponu (pH=6.3) içine alındı. Homojenat iki kat tülbentten süzülerek süzüntü +4°C, 13.500×g'de 30 dakika süre ile soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant diğer saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere ayrıldı. Amonyum sülfat ile %70 doygunluğa getirildi. 13.500×g de +4°C de 50 dakika santrifüj edildi.

Çökelek (yaklaşık 6 ml kadar) pH=6.5 olan 0.2 M fosfat tamponunda çözüldü ve bu çözeltiden 100 µl kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi, enzimin içinde bulunduğu tampona karşı iki defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi buzdolabı içinde (+4°C), magnetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirildi.

#### PFO'nun killerle immobilizasyonu

Belli miktarlarda (0.10, 0.06, 0.05, 0.03, 0.025, 0.02, 0.01, 0.0125, 0.006 ve 0.005 gram) killer (yeşil, sarı ve kırmızı) alınarak 1.0 ml fosfat tampon (pH=6.5, 0.2 M) çözeltisi ilave edilerek 30 dakika vortex ile karıştırıldı (Coşkun, 2007).

Bu tamponlu kil çözeltisi üzerine 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edildi ve 10 dakika daha karıştırıldı. PFO enzimi ile kil immobilizasyonu bu şekilde gerçekleştirildi.

#### PFO enzim aktivitesi tayini

PFO enziminin aktivite ölçümlerinde spektrofotometrik metot kullanıldı ve absorbans ölçümleri 420 nm dalga boyunda yapıldı (Ponting ve ark., 1976). Aktivite ölçümü için 0.1 ml enzim + 2.8 ml tampon + 0.1 ml substrat (+ inhibitör) çözeltisi ilave edildi. Substratların en az yedi farklı konsantrasyonunda çalışıldı.

Tampon olarak 0.2 M pH= 5.5-9.0 aralığında fosfat tamponu ve pH= 3.5-5.0 aralığında 0.1 M sitrat / 0.2 M fosfat tamponu kullanıldı. Aktivite birimi olarak "1 ml enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişim" kullanıldı.

#### Dereotu PFO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalar

Dereotu polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere önce dört farklı substrat için, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet ve katekol substratı için stabil pH belirlendi.

Daha sonra belirlenen optimum şartlarda bu substratlar için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edildi. Üç farklı kil çeşidi için katekol substratı ile inhibisyon türü,  $K_i$  sabitleri ve  $IC_{50}$  değerleri tespit edildi.

### Optimum pH çalışmaları

Optimum pH çalışması, katekol, klorogenik asit, 3,4 dihidroksi fenil alanin ve gallik asit substratları kullanılarak yapıldı, pH=3.5-9.0 aralığındaki değerler için sitrat/fosfat, fosfat ve Tris/HCl tamponlarından oluşan bir dizi tampon çözelti hazırlandı. Enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü ve optimum pH değerleri Çizelge 1. de verildi.

### Optimum sıcaklık çalışması

Optimum sıcaklık çalışmaları yine aynı substratlarla gerçekleştirildi. Substratların optimum pH'larında 5°C - 85°C sıcaklık aralığında çalışıldı. Tespit edilen optimum sıcaklık değerleri Çizelge 1.'de verildi.

### İyonik şiddet etkisi çalışmaları

İyonik şiddet etkisi çalışmaları; katekol, klorogenik asit, 3,4 dihidroksi fenil alanin ve gallik asit substratlarıyla 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1.0 M seri fosfat tamponlarıyla yapıldı. Bu esnada her substratın kendi optimal pH'sında çalışıldı. 2.8 ml tampon + 0.1 ml substrat küvete konulduktan sonra 0.1ml enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

### Enzimin stabil olduğu pH'sının belirlenmesi çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı belirlemek için 0.1 M sitrat / 0.2 M fosfat (pH=5.0-8.0) tamponları hazırlandı. Bu tamponların her birinden 0.6 ml alındı ve üzerlerine 0.4 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 4 °C'de muhafaza edildi. Aktivite ölçümleri katekol substratı ile optimum şartlarda üç hafta boyunca ölçüldü. Sonuçlar inkübasyon süresine karşılık % Aktivite grafiği halinde verildi.

### Farklı substratlar için optimal şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; optimum şartlar (pH, sıcaklık ve iyonik şiddet)'da katekol ve klorogenik asit substratları için 0.41; 0.83; 1.67; 2.50; 3.33; 5.00 ve 6.66 mM, dopamin için 3.33; 6.67; 8.33; 10.00; 11.67; 13.33; 15.00 ve 16.67 mM ve gallik asit için 3.33; 6.67; 10.00; 11.67; 13.33; 15.00; 16.67 ve 18.33 mM substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı.

420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı ( $E.Ü \text{ mL}^{-1} \times \text{dak}^{-1}$ ) olarak alındı.  $1/V-1/[S]$  değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk

grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerin doğru değerleri yardımıyla  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı ve Çizelge 1. de verildi.

### Farklı killer için $K_i$ sabitleri ve $IC_{50}$ değerlerinin bulunması

Killerin polifenol oksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla üç farklı kil çeşidiyle altı farklı konsantrasyonda iki ayrı grup numuneler hazırlandı. 1.Grup numuneler de saptanan oranlarda kil tartılarak 1 ml tampon (0.2 M fosfat tamponu) ile iyice karıştırıldı, daha sonra 0.5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek karıştırılmaya devam edildi. Üstte kalan süpernatant ile aktivite ölçümü yapıldı. 2. Grup numuneler içine enzim konulmayıp ölçüm sırasında küvete ilave edildi.  $IC_{50}$  değerleri hesaplanırken 0.1 M katekol substratında çalışıldı. Kil konsantrasyonlarına karşılık absorpsiyon 420 nm'de köre karşı okundu (Kör olarak enzimin içinde bulunduğu 2.9 ml 0.2 M fosfat tamponu +0,1ml katekol kullanıldı).

Elde edilen absorpsiyon değerlerinden % Aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyonun %50 civarında olduğu üç farklı konsantrasyon değerleri tespit edildi. Bu grafik ve denklemlerden yararlanılarak her bir kil için  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı.

Kil konsantrasyonlarından  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri belirlenerek Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafikler kullanılarak  $K_i$  değerleri tespit edildi. Enzim-kil adsorpsiyonunun depolama süresini belirlemek için; her üç kil içinde üç hafta boyunca aktivite tayin miktarları belirlendi.

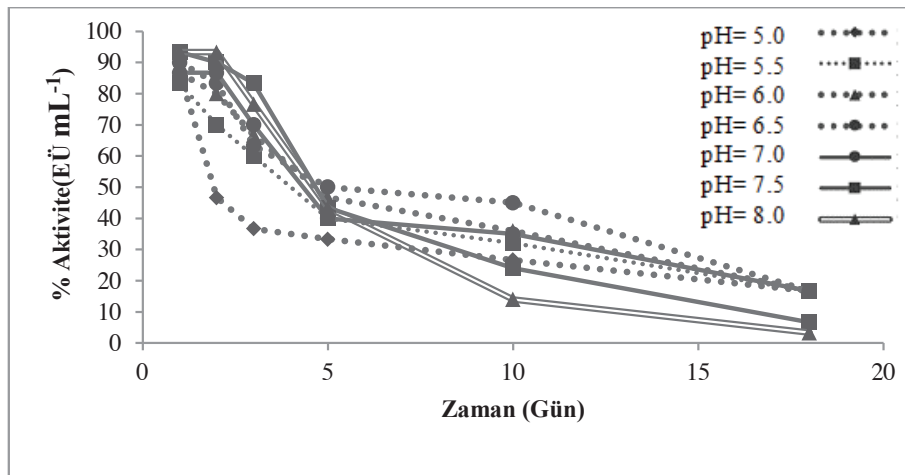
## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Dereotu PFO Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar

Dereotu PFO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere önce dört farklı substrat için, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet belirlendi. Daha sonra belirlenen optimum şartlarda bu substratlar için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edildi. Çizelge 1'de gösterildi. Enzimin stabil olduğu pH çalışması sonuçları belirli zaman aralıklarında (1. ,2., 3. ,5. ,10. ve 18. günlerde) 0.1 M katekol substratı ile optimum şartlarda (0.2 M fosfat tamponu pH=6.5 ve 10 °C de) belirlendi. Elde edilen değerler Şekil 2. de grafik halinde gösterildi ve stabil pH'nın 6.5 olduğu bulundu.

Çizelge 1. Dereotu PFO enziminin substrat spesifitesi ile ilgili bulunan sonuçlar

Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık °C	$K_M$ (M)	$V_{max}$ (EÜ mL <sup>-1</sup> ×dak <sup>-1</sup> )	$V_{max}/K_M$ (EÜ mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Katekol	6.5	10	$1.57 \times 10^{-3}$	526.31	5 587.15
Klorogenik asit	5.5	10	$2.91 \times 10^{-4}$	416.66	23 863.68
3,4 dihidroksi fenil alanin	5.0	55	$6,10 \times 10^{-2}$	204.08	55.76
Gallik asit	9.0	45	$7.10 \times 10^{-2}$	70.92	16.64



Şekil 2. Dereotu PFO enzimi için 0.1 M katekol substratı ile elde edilen stabil pH grafiği

$IC_{50}$  değerleri hesaplanırken 0.1 M katekol substratında çalışıldı. Kil konsantrasyonlarına karşılık absorbans 420 nm'de köre karşı okundu (Kör olarak enzimin içinde bulunduğu 2.9 ml 0.2 M fosfat tamponu +0,1ml katekol kullanıldı). Elde edilen absorbans değerlerinden % Aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. % 50 inhibisyona sebep olan kil konsantrasyonları belirlenmiştir.

Elde edilen  $IC_{50}$  değerleri Çizelge 2-3'de verildi. Farklı killerin  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çalışmalarda katekol substratı kullanıldı. Önce kilsiz ortamda farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra aynı substrat konsantrasyonlarıyla üç farklı sabit kil konsantrasyonlarında çalışıldı

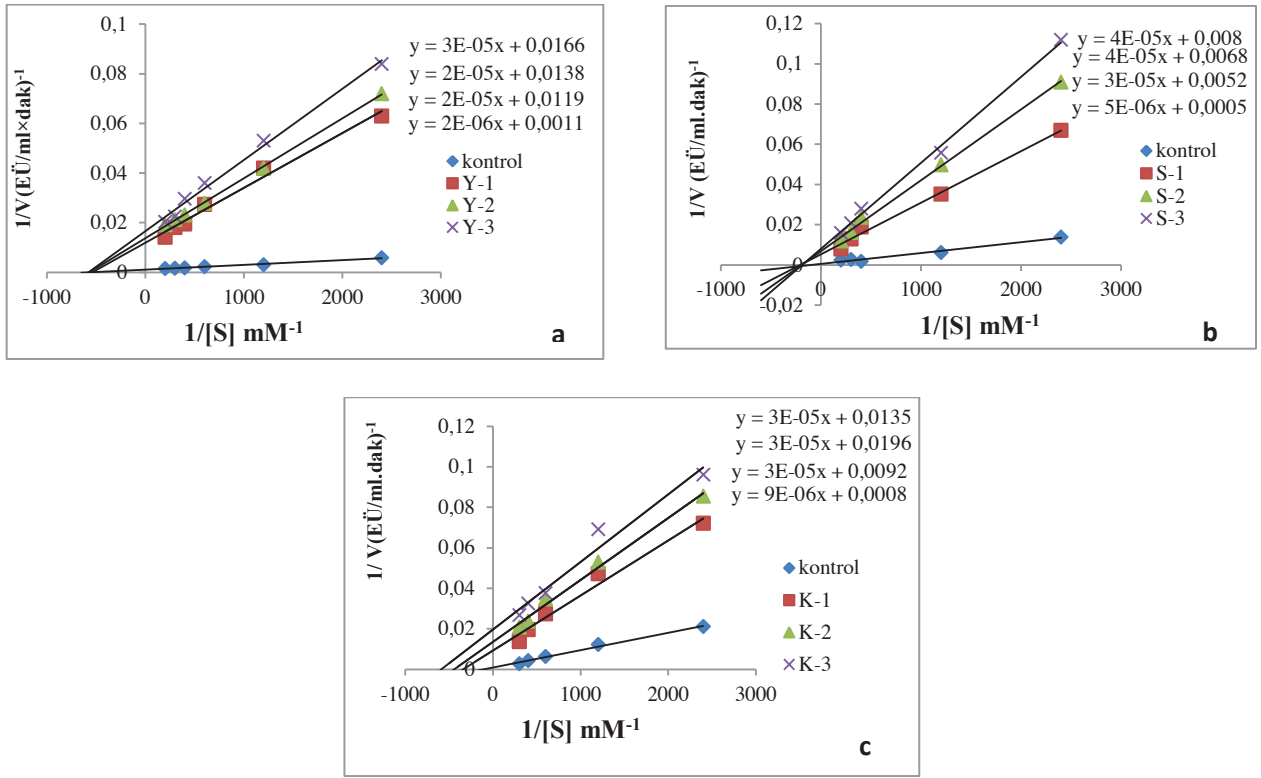
Elde edilen sonuçlardan  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. bu grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri ve inhibisyon

türleri belirlendi. Elde edilen değerler Çizelge 2. de verildi.

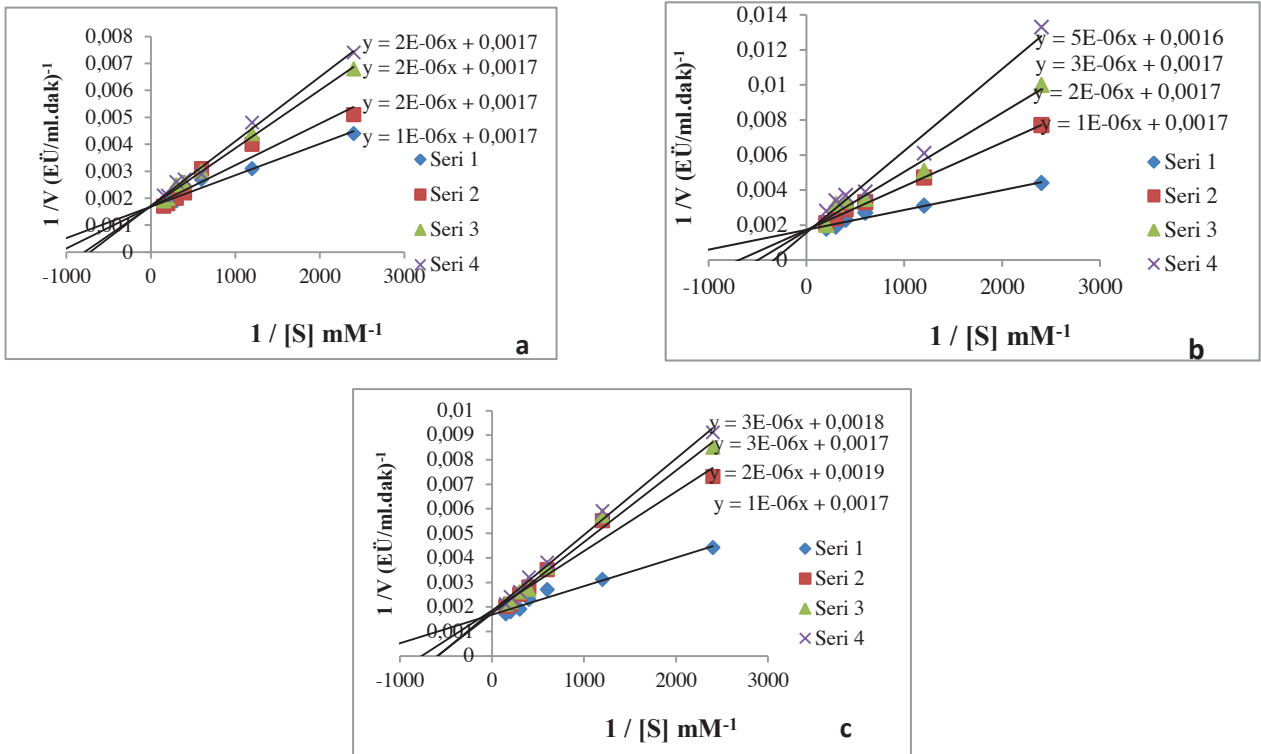
Aynı işlemler enzimi ölçüm sırasında katılan tampon içinde bulunan kil çözeltisi içinde uygulandı. İmmobilize killerin  $K_i$  sabitlerini bulmak için; substrat konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivite belirlendi.

Aktivite değerlerine bağlı olarak %50 inhibisyona sebep olan kil İmmobilize edilen PFO enziminin  $K_i$  sabitlerinin bulunması amacıyla; immobilize olmayan serbest enzim ortamında farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı.

Aynı substrat konsantrasyonlarıyla üç farklı sabit immobilize kil konsantrasyonlarında çalışıldı. Elde edilen sonuçlardan  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Hesaplanan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri Çizelge 3'de verildi.



Şekil 3. a)Yeşil, b)Sarı, c)Kırmızı kil ile immobilize edilen dereotu PFO enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4. a)Yeşil, b)Sarı, c)Kırmızı kil ile Dereotu PFO enzimi ölçüm sırasında katılan killer için inhibisyon etkisi

**Çizelge 2.** Dereotu PFO enziminin kil immobilizasyonu sonucu elde edilen  $IC_{50}$  ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan ortalama  $K_i$  değerleri

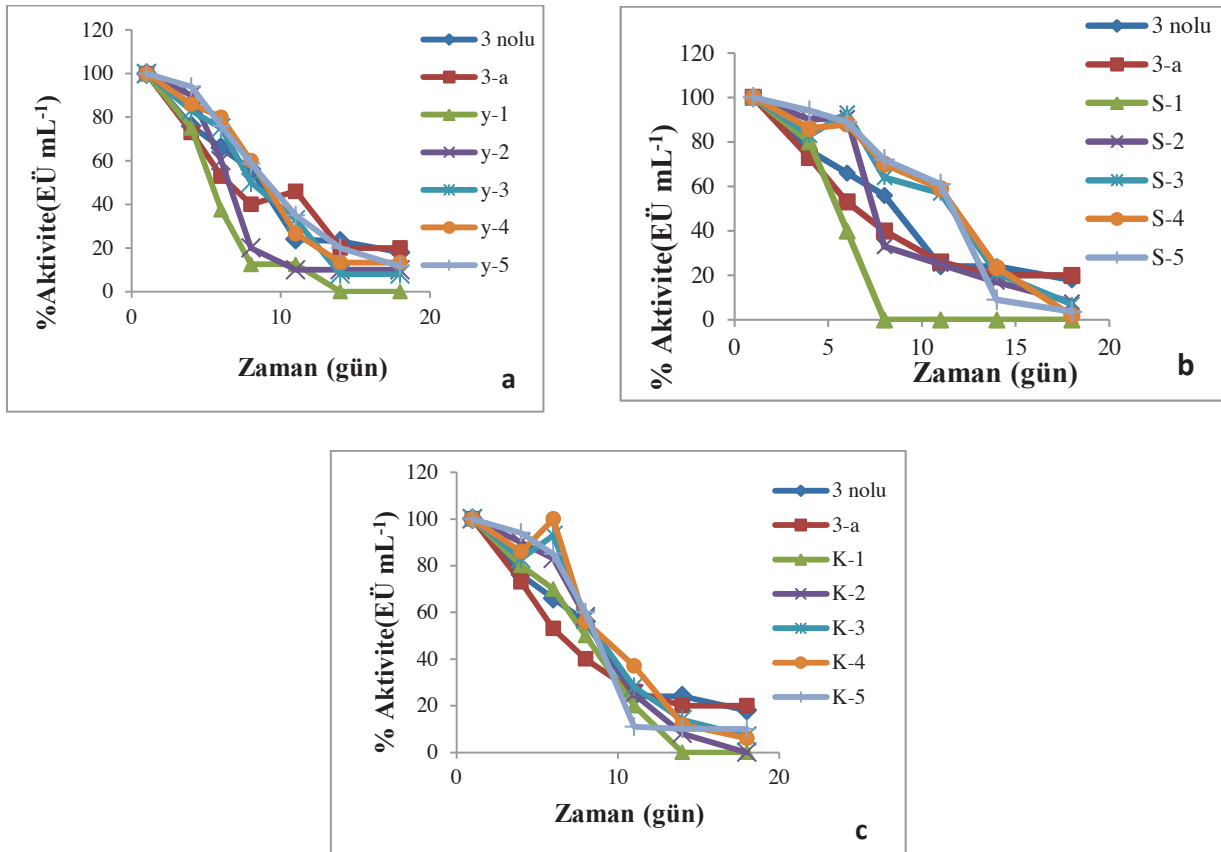
Kil Cinsi	İmmobilize enzim için $[I]_{50}$ değerleri (M)	$K_i$ Ortalama Değerleri	İnhibisyon Türü
Yeşil kil	$2.9 \times 10^{-2}$	$1.46 \times 10^{-2}$	Yarışmasız
Sarı kil	$7.2 \times 10^{-2}$	$8.9 \times 10^{-4}$	Yarışmasız
Kırmızı kil	$4.9 \times 10^{-2}$	$7.57 \times 10^{-4}$	Yarı yarışmalı

**Çizelge 3.** Dereotu PFO enziminin immobilize olmamış durumu için elde edilen  $IC_{50}$  ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri

Kil Cinsi	İmmobilize olmamış enzim için $[I]_{50}$ değerleri (M)	Ortalama $K_i$ Değerleri (M)	İnhibisyon Türü
Yeşil kil	$6.04 \times 10^{-1}$	$4.83 \times 10^{-3}$	Yarışmalı
Sarı kil	$2.32 \times 10^{-1}$	$2.76 \times 10^{-3}$	Yarışmalı
Kırmızı kil	$2.63 \times 10^{-1}$	$2.27 \times 10^{-3}$	Yarışmalı

Depolama kararlılığı için; yine üç farklı kil çeşidi farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak askorbik asit katılan(3-a) ve normal hazırlanan numune(3 nolu) ile üç hafta boyunca aktivite ölçümü yapıldı.

Grafikler Şekil 5’de gösterildi. İmmobilize enziminin killerle inhibisyon dereceleri hesaplanarak Çizelge 4’te verildi.

**Şekil 5. a)** Yeşil, b) Sarı, c) Kırmızı kil ile immobilize edilen dereotu PFO enziminin %Aktivite-zaman (depo kararlılığı) grafiği

Çizelge 4. İmmobilize enzimin üç farklı kildeki inhibisyon dereceleri

Kil konsantrasyonu (g.L <sup>-1</sup> )	İnhibisyon Derecesi (%)				
	0.066	0.040	0.020	0.0133	0.0066
Yeşil kil	92	86	80	75	70
Sarı kil	80	79	75	75	70
Kırmızı kil	84	81	77	72	66

## SONUÇ

Dereotu her mevsim soframızda bulunan tadı ve kokusu ile tercih edilen antioksidan kaynağı bir sebzedir. Bunun yanında PFO enzimi açısından oldukça zengindir. PFO enzimi herhangi bir sebeple zarar gören dokulardaki esmerleşmenin kaynağı olarak bilinmektedir. Dereotundaki hızlı kararın, istenmeyen renk değişimi bizi bu konuda çalışmaya sevk etmiştir. Çalışmamızda dereotundan elde ettiğimiz PFO enziminin belirlediğimiz bazı özellikleri incelenerek, kil ile immobilizasyonunu gerçekleştirildi. Dereotu PFO enzimi ile ilgili kinetik çalışmalardan önce uygun bir substrat ve bu substrat için optimum şartların belirlenmesi gerekiyordu. Bu amaçla pH, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisi incelendi.

Optimum pH çalışması, optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla katekol, klorojenik asit, 3,4 dihidroksi fenil alanin ve gallik asit substratları kullanılarak yapıldı.

İmmobilize kil çalışmalarında ise; yeşil, sarı ve kırmızı kil numuneleri kullanıldı. Bu immobilize enzimler için elde edilen Ki değerleri sırasıyla  $1.46 \times 10^{-2}$ ,  $8.9 \times 10^{-4}$ ,  $7.57 \times 10^{-5}$  M olarak bulundu. İmmobilize enzimlerden yeşil kil ve sarı kil ile yapılan immobilizasyonların yarışmasız, kırmızı kil ile yapılan immobilizasyonun ise yarı yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi (Çizelge 2,3). Elde edilen değerlere göre immobilizasyon sonucu dereotundan elde edilen PFO enzimi için en etkili inhibitör etkisini kırmızı kilin gösterdiği belirlendi. Dereotundan elde edilen PFO enzimi için 10 mM katekol substratı ile %50 inhibisyona sebep olan immobilize enzim

konsantrasyonları Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelgede verilen IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla yeşil kil için  $2.99 \times 10^{-2}$  M, kırmızı kil için  $4.90 \times 10^{-2}$  M, sarı kil için  $7.2 \times 10^{-2}$  M’dir. İmmobilize olmamış enzim çözeltilerinde ise, PFO enzimi spektrofotometrik ölçüm esnasında kil çözeltisine karıştırıldı. Burada da yine substrat olarak katekol kullanıldı. %50 inhibisyona sebep olan enzim konsantrasyonları Çizelge 2’de verilmiştir. Buna göre IC<sub>50</sub>-değerleri yeşil kil için  $6.04 \times 10^{-1}$  M, sarı kil için  $2.32 \times 10^{-1}$  M ve kırmızı kil için  $2.63 \times 10^{-1}$  M’dir. İmmobilize olmayan enzimler için elde edilen Ki değerleri sırasıyla (yeşil, sarı ve kırmızı kil)  $4.83 \times 10^{-3}$ ,  $2.76 \times 10^{-3}$ ,  $2.27 \times 10^{-3}$  M olarak bulundu. İnhibisyon etkileri her üç tür içinde yarışmalıdır. (Çizelge 3.). Elde edilen değerlere göre kırmızı kilin diğer killere oranla daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak; Enzimin optimum pH’sı katekol substratı için pH=6.5, Optimum sıcaklık çalışması katekol substratı için 10°C bulunmuştur. Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmaları; en etkili substrat olarak klorojenik asit olarak bulunmasına rağmen katekol substratı ile yapılmış ve daha etkili sonuçlar alınmıştır.

İmmobilizasyon çalışmalarında ise; kırmızı kil ile yapılan immobilizasyonun diğer killere yapılan immobilizasyona göre daha fazla inhibitör etkisi gösterdiği anlaşılmıştır. İmmobilizasyon çalışmaları sonucuna göre; immobilize edilen enzimin aktiviteyi korumadığı gözlemlendi. Ancak inhibitör görevi gördüğü, sebze ve meyvelerin killere muhafaza edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi ve kimyasal işlemlere oranla insan sağlığı açısından daha uygun olacağı kanaatine varıldı.



**KAYNAKLAR**

- Al-Ismael KM, ve Aburjai T, 2004. Antioxidant activity of water ve alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds ve dill seeds. *Jouurnal science food agriculture*, 84 (2): 173-178.
- Alkan S, 1999. Katalaz enziminin sepiolit, bentonit ve kaolin killeri üzerine adsorpsiyonu ve kinetiğinin incelenmesi. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van
- Arslan O, Temur A, Tozlu I, 1997. Polyphenol Oxidase from *Allium* sp. *Journal of Agriculture ve Food Chemistry*, 45: 2861-2863.
- Aydemir T, 2010. Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus Officinalis* L. *International Journal of Food Properties*, 13: 475-485.
- Coşkun G, 2007. Glutatiyon-S-Transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Ege Üniversitesi Doktora Tezi, İzmir, 118s
- Demir H, Gür A, Yıldız, Gür T, 2007. Iğdır Kayısısından Polifenol Oksidaz Enziminin Kil İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. 21. Ulusal Kimya Kongresi. BIY0 24 P, Malatya
- Demirbaş Ö, 2006. Kil Mineralleri Yüzeyine Bazı Biyomakromoleküllerinin İmmobilizasyonu ve Elektrokinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir
- Erat M, Sakiroglu H, Kufrevioglu O. I, 2006. Purification ve Characterization of Polyphenol Oxidase from *Ferula* sp., *Food Chemistry*, 95: 503-508.
- Halim DH ve Montgomery MW, 1978. Polyphenol oxidase of d'anjou pears (*Pyruse communis*, L.). *J. Food Sci.*, 43: 603-606.
- Heimdal, H, Bro, R, Larsen, LM ve PFO II, L, 1997. *J. Agric. Food. Chem.*, 45: 2399-2406.
- Hermann K, 1974. Über die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Erwerbsastbau*, 16: 1.
- Khan, AA, Akhtar S, Husain, Q, 2006. Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractioned proteins of potato (*Solanum tuberosum* ), *Journal of Molecular Catalysis*, 40: 58-63.
- Lee C, Yve Withaker JR, 1995. Enzymatic Browning ve Its Prevention. American Chemical Society, Washington, DC.
- Lisiewska Z, Kmiecik W, Korus A, 2006; Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls ve polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *Journal of Food Composition ve Analysis*, 19: 134-140
- Pomerantz, SH, 1963. Separation, purification ve properties of two tyrosinases from Harmster Melanoma. *J. Biol. Chem.*, 238: 2351.
- Ponting JD, 1960. The control of enzymatic browning of fruits, food enzymes. H.W., Schultz, ed., Avi Publ. Co., Inc, Westport, c.t.
- Shi, C, Liu Q, Dai Y, Xie Y, Xu X, 2002. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochimica Polonic*, 49 (4): 1029-1035.
- Simpson BK, Marshall MR, Otwell SW, 1988. Polyphenol oxidases from pink ve white shrimp: kinetic ve other properties. *J. Food Biochem.*, 12: 205-217.
- Şakiroğlu H, Öztürk AE, Pepe AE, Erat M, 2008. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from dill (*Anethum Graveolens*) J.O. *Journal of Enzyme İhibition and Medicinal Chemistry*, 23 (3): 380-385.
- Telefoncu A, Ed., 1997. Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir
- Uruç H, 2007. Katalaz Enziminin (E.C.1.11.1.6) Montmorilonit Analsim Kili Üzerine İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van
- Vaughn KC, Lax AR, Duke SO, 1988. Polyphenol oxidase:the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol Plant*, 72: 659-665.
- Whitaker JR, 1972. Principles of Enzymolgy for the Food Sciences, Marcel Dekker. New York, Chapters, 22-24.
- Yağar H, Sağıroğlu A, 2002. Non-Covalent İmmobilization Of Quince (*Cydonia oblonga*) Polyphenol Oxidase on Alumina. *Acta Chim. Slov.* , 49: 893-902
- Yang CP, Fujita S, Ashrafuzzaman MD, Nakamura N, Hayashi N, 2008. Purification ve characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agriculture ve Food Chemistry*. 48: 2732-2735.
- Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK. 1992, Anethofuran, carvone, ve limonene: potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil ve caraway oilm *Planta Medica*, 58(4): 338-41.