

Eflatun çiçekli ballıbaba (*lamium purpureum*) polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve inhibisyonu

Elif Cerrahoğlu¹, Gülnur Arabacı^{2*}

25.04.2014 Geliş/Received, 03.02.2016 Kabul/Accepted

ÖZ

Bu çalışmada, *Lamium purpureum* (eflatun çiçekli ballıbaba) bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz (PPO) enziminin kinetik özellikleri incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında substrat olarak 4-metil katekol kullanılmıştır. 4-metil katekol için Michaelis-Menten sabiti (KM) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) hesaplanmıştır. Enziminin optimum pH değeri 7,5, optimum sıcaklık değerleri ise 10 °C bulunmuştur. V_{max} ve KM değerleri ise sırasıyla 2,9977 mM ve 0,0087 EU/dak olarak hesaplanmıştır. PPO enzimi için sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkaptetanol ile inhibisyon çalışması yapılmış, her bir inhibitör için I50 değeri hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *lamium purpureum*, polifenol oksidaz, inhibisyon

Characterization of polyphenol oxidase from red deadnettle (*lamium purpureum*) and its inhibition

ABSTRACT

In this work, it is investigated the kinetic properties of polyphenol oxidase (PPO) obtained from *Lamium purpureum* (red deadnettle). 4-methylcatechol was used as substrate in the characterization studies. Michaelis-Menten constant (KM) and maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated. Enzyme's optimum pH value was found 7,5; optimum temperature value was found 10 °C. KM and V_{max} values were calculated 2,9977 mM and 0,0087 EU/min respectively. PPO activity substantially was inhibited from sodium azide, thiourea, L-cysteine, ascorbic acid, benzoic acid, citric acid, 2-mercaptoethanol and I50 values were calculated each inhibitor.

Keywords: *lamium purpureum*, polyphenol oxidase, inhibition

* Sorumlu Yazar /Corresponding Author

¹ Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü - elif.cerrahoglu@kocaeli.edu.tr

² Sakarya Üniversitesi, FEF, Kimya Bölümü, Sakarya – garabaci@sakarya.edu.tr

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir [1]. Meyve ve sebzelerde ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden mavimsi-siyaha kadar olan bu renk değişimlerine “esmerleşme” denir [2].

Meyve ve sebzelerde görülen enzimatik esmerleşme, esas olarak, organizmada var olan fenolik bileşiklerin kinona dönüşmesi, kinonların polimerleşmesi ve bunun sonucu kahverengi, kırmızı, siyah pigmentlerin oluşmasından kaynaklanır.

Bu olaylardan sorumlu olan enzimler genellikle Polifenol oksidazlar [EC 1.14.18.1; difenol: oksijen oksidoredüktaz; polifenol oksidaz (PPO)] ismiyle bilinir fakat ayrıca bu enzimler tirozinazlar, katekolazlar, krezolazlar ve fenolazlar olarak da isimlendirilir. Esmerleşme, fenolik substratlar, PPO enzimi ve oksijen pH, sıcaklık ve su aktivitesi açısından uygun koşullar altında bir araya geldiklerinde meydana gelir [3].

PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir [2].

Termal uygulamalar, oksijenin uzaklaştırılması, esmerleşmeyi engelleyen ajanların kullanılması ve kimyasalların eklenmesi en etkin metodlar arasındadır. Gıda endüstrisinde PPO'nun termal yolla inhibisyonu sayesinde enzimatik esmerleşme engellenebilir fakat geleneksel ısı uygulamaları renk bozulmaları, tat hasarı, vitamin ve besin değeri kayıpları gibi kötü etkilere neden olabilir. Oksijen, meyve ve sebzelerin su, şurup ya da tuzlu suya daldırılması veya vakumlanması yoluyla uzaklaştırılabilir ancak bu tür uygulamalar kesin sonuç vermez, vakumlanan paketler açıldığında oksijenin tekrar içeri girmesi ile esmerleşme yeniden başlar. Esmerleşme karşıtı ajanların kullanılması ise gıda endüstrisinde tat, lezzet, renk, doku ve maliyet üzerine etkileri ve toksisite düşüncesiyle kısıtlanmaktadır. Kimyasal katkı maddeleri (bisülfid, askorbik asit ve analogları) enzimatik esmerleşmeyi engellemek için kullanılabilir.

Esmerleşmenin kontrolünde en genel yöntem herhangi bir formdaki süfitlerin (kükürtdioksit, sodyum/potasyum metabisülfid, sodyum/potasyum bisülfid) kullanımınıdır. Süfitler antimikrobiyal ajanlar, beyazlatma ajanları, indirgeyici ajanlar ve antioksidan ajanlar olarak fonksiyon göstererek hem enzimatik hem de enzimatik olmayan esmerleşmeyi kontrol edebilirler. Ancak sağlık üzerine olumsuz etkilerinden dolayı Food and Drug Administration gerek müşterilere servis edilen gerekse ham halde satılan sebze ve meyvelerde kullanılmasını yasaklamıştır. Asitlendiriciler (sitrik asit, malik ve fosforik asit), şelatlayıcılar (EDTA) ve indirgeyici ajanlar (askorbik asit ve kombinasyonları) gibi kimyasal bileşikler kullanılmaktadır [3].

2. MATERYAL VE METOD (MATERIALS AND METHODS)

Çalışmada eflatun çiçekli ballıbabası (*Lamium purpureum*) bitkisi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bitki, Sakarya Üniversitesi yerleşkesinden toplanmıştır. Yapılan çalışmada ekstraksiyon işlemi için polivinil piroolidon (PVP), askorbik asit ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfat kimyasalları kullanılmıştır. 4-metil katekol substrat olarak; sodyum azid, tiyüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit ve 2-merkapt etanol inhibitör olarak kullanılmıştır. Kimyasallar Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

2.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu (Isolation of Polyphenol Oxidase (PPO))

Toplanıp dondurucuda depolanmış olan eflatun çiçekli ballıbabası bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarından 10 gram alınarak, % 0,5 polivinil piroolidon (PVP) ve 0,0001 M askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti içerisinde blender yardımıyla 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Elde edilen homojenat 3 kat tülbetten süzülüş ve 5.000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Bu işlemler sonucunda ham enzim ekstraktı olarak elde edilen süpernatant çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu (Characterization of Polyphenol Oxidase (PPO))

PPO enziminin kinetik özelliklerinin araştırılmasında optimum pH, optimum sıcaklık ve çeşitli inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

2.2.1. PPO Aktivite Tayini (Activity Assays of PPO)

PPO enziminin aktivitesi, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 3 mM 4-metil katekol çözeltisi ve ham enzim ekstraktı toplam reaksiyon hacmi 3 mL olacak şekilde karıştırılarak, oda sıcaklığında 420 nm'de 60 sn süre ile absorbanstaki artışı ölçülerek belirlenmiştir.

2.2.2. pH etkisi (Effect of pH)

PPO enzimi aktivitesine pH etkisi, 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH değerlerinde hazırlanmış tamponlar ile belirlenmiştir. pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M tris tamponu kullanılmıştır.

2.2.3. Sıcaklık Etkisi (Effect of Temperature)

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C' lere enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosunda çalışılmıştır.

4-metil katekol substratı 3 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

2.2.4. Enzim Kinetiği (Enzyme Kinetics)

Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için kinetik çalışmalarda konsantrasyonları 0,05 mM ile 20 mM arasında değişen substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Yapılan işlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.5. İnhibitör Etkisi (Effect of Inhibitor)

Yapılan çalışmada sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkapt etanol olmak üzere toplam 7 adet inhibitör kullanılmıştır. Her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır.

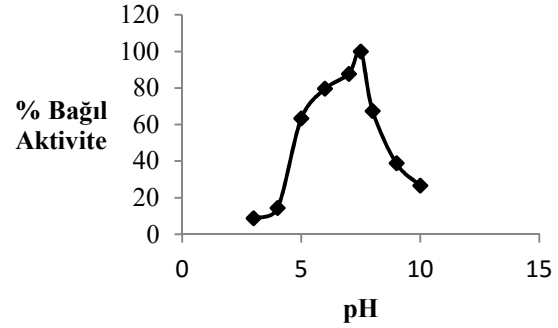
Çalışmada kullanılan inhibitörlerin etkilerini tespit etmek için sabit enzim miktarı ve 3 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri belirlenmiştir. Sonra her bir inhibitör için % Bağlı Aktivite - $[I]$ grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden enzim aktivitesini yarıya indiren substrat konsantrasyonu olan

I_{50} değerleri hesaplanmıştır. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. pH Etkisi (Effect of pH)

PPO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 3,0 ve 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tampon ortamında 4-metil katekol ile aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

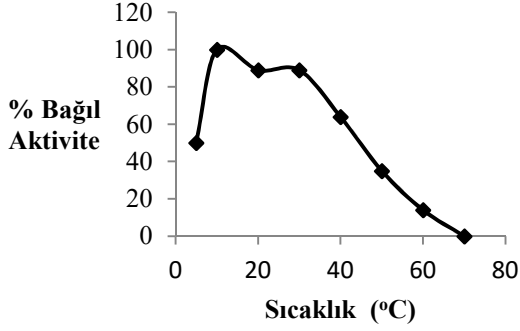


Şekil 1. PPO enzimi için optimum pH grafiği (Graphic of optimum pH for PPO)

Yapılan pH çalışmasına göre PPO enziminin optimum pH değeri 7,5'dur. Anamur muzundan (*Musa cavendishii*) elde edilen PPO enziminin optimum pH'ı 7,0 [4], marula ağacındaki (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*) PPO enziminin 7,0 [5], patates (*Solanum tuberosum*) PPO enziminin optimum pH 6,0 [6], nane yapraklarından (*Mentha piperita*) elde edilen PPO enziminin optimum pH değerleri 7,0 bulunmuştur [7]. Bu sonuçlara göre yapılan çalışmanın literatürdeki benzer çalışmalar ile paralellik gösterdiği söylenebilir.

3.2. Sıcaklık Etkisi (Effect of Temperature)

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Çalışmada substrat konsantrasyonu 3 mM olarak kullanılmıştır.

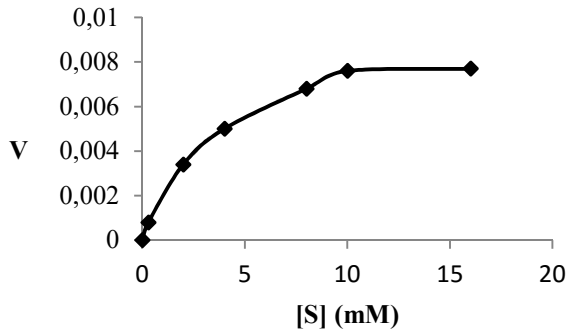


Şekil 2. PPO enzimi için optimum sıcaklık grafiği (Graphic of optimum temperature for PPO)

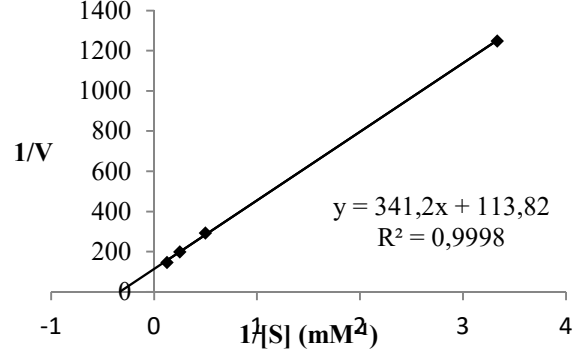
Çalışma sonucuna göre PPO enziminin optimum sıcaklık değeri 10 °C bulunmuştur. Literatürde enzimin optimum sıcaklık değerinin 30-50 °C olarak bildirildiği görülmektedir [8]. Vanilya çekirdeğinde bulunan PPO enziminin optimum sıcaklık değeri 37 °C [9], muz (*Musa sapientum* L.) PPO için 30 °C [10], çin lahanası PPO için 40 °C [11], ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) PPO enzimi için 30 °C'dir [12]. Bu sonuçlara göre, bitki kaynağına göre optimum sıcaklık değerinin değişiklik gösterdiği söylenebilir.

3.3. Enzim Kinetiği (Enzyme Kinetics)

Eflatun çiçekli ballıbababa bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz enzimi ile yapılan kinetik çalışmada, enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik olarak değişen substrat varlığında, 420 nm'de yapılmıştır. Michealis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerinin belirlenmesi için önce substrat doygunluk eğrisi çizilmiştir ve bu grafikten Lineweaver-Burk grafiğine geçilip hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 3. PPO enzimi için substrat doygunluk eğrisi (Graphic of substrate saturation for PPO)

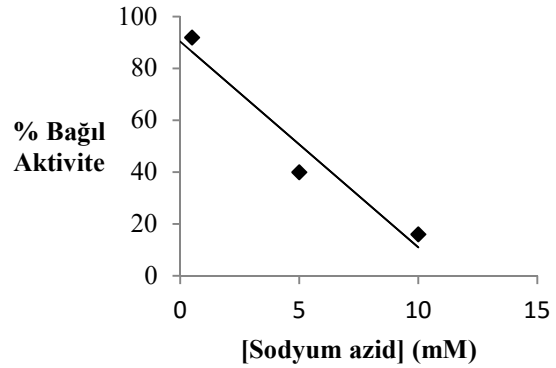


Şekil 4. PPO enzimi için Lineweaver-Burk grafiği (Graphic of Lineweaver-Burk for PPO)

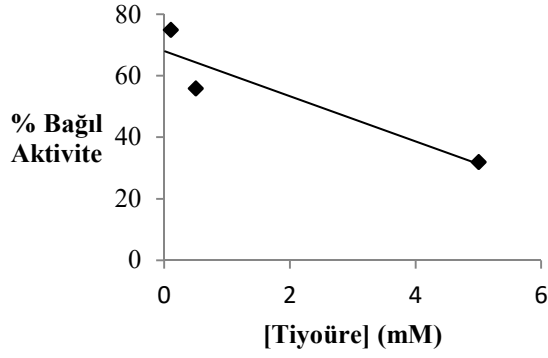
Enzim kinetiği çalışması sonucuna göre, serbest enzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 2,9977 mM ve 0,0087 EU/dk olarak hesaplanmıştır. Patlıcan (*Solanum melongena*) bitkisi PPO için K_M değeri 0,34 mM'dir [13]. Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) PPO için K_M değeri 0,79 mM, V_{max} değeri ise 11290 EU/mL [12], marula ağacı (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra) PPO enzimini için ise K_M değerleri 1,43'dür [5].

3.4. İnhibitör Etkisi (Effect of Inhibitor)

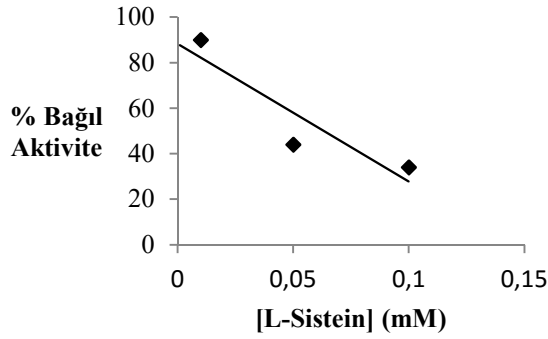
Yapılan çalışmada substrat olarak 4-metil katekol kullanılarak sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkapt etanol olmak üzere toplam 7 adet inhibitörün etkisi incelenmiştir. Elde edilen grafiklerden her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler ve hesaplanan değerlerin tablosu aşağıda verilmiştir.



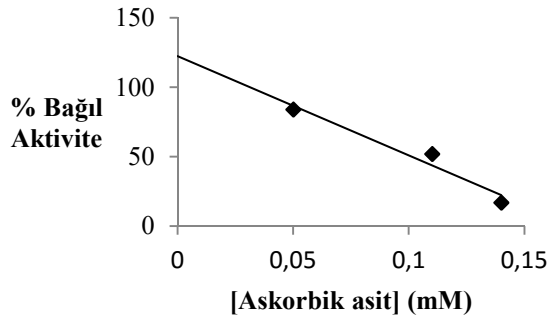
Şekil 5. PPO enzimi üzerine sodyum azid etkisi (Effect of sodium azide on PPO)



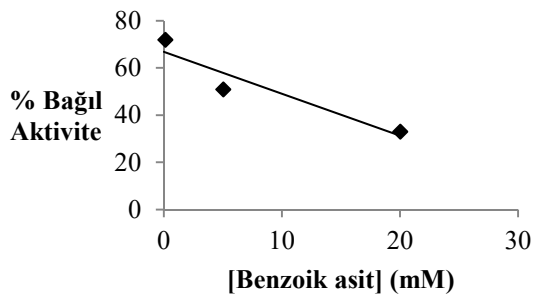
Şekil 6. PPO enzimi üzerine tiyoüre etkisi (Effect of thiourea on PPO)



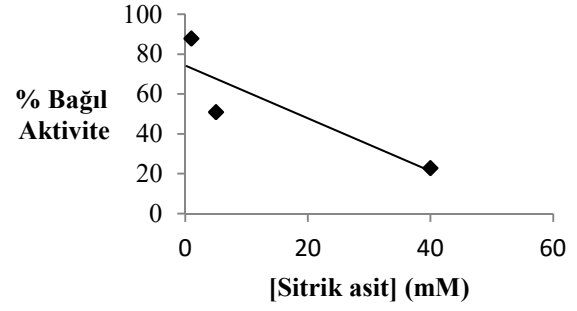
Şekil 7. PPO enzimi üzerine L-Sistein etkisi (Effect of L-cysteine on PPO)



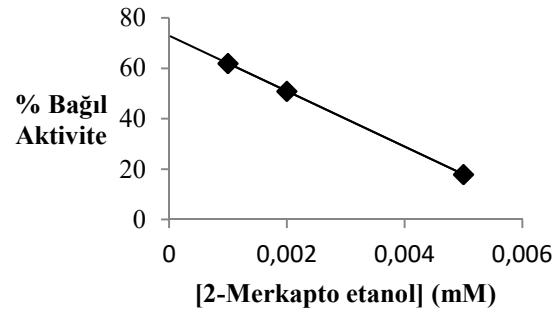
Şekil 8. PPO enzimi üzerine askorbik asit etkisi (Effect of ascorbic acid on PPO)



Şekil 9. PPO enzimi üzerine benzoik asit etkisi (Effect of benzoic acid on PPO)



Şekil 10. PPO enzimi üzerine sitrik asit etkisi (Effect of citric acid on PPO)



Şekil 11. PPO enzimi üzerine 2-Merkapto etanol etkisi (Effect of 2-Mercapto ethanol on PPO)

Tablo 1. PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I₅₀ değerleri (I₅₀ values of inhibitors effects on PPO)

İnhibitör	I ₅₀ (mM)
Sodyum azid	5.4742
Tiyöüre	3.4650
L-Sistein	0.0663
Askorbik asit	0,0966
Benzoik asit	13.3836
Sitrik asit	24.3629
2-Merkapto etanol	0.00275

Sonuçlara göre en fazla inhibitör etkisi gösteren 2-Merkapto etanol, L-Sistein ve askorbik asittir. Enginar (*Cynara scolymus* L.) PPO enzimi üzerine sodyum metabisülfid ve askorbik asidin en etkili inhibitörler olduğu [14], nane yapraklarındaki (*Mentha piperita*) PPO enzimine glutatyon, askorbik asit, potasyum siyanür, tiyoüre, sodyum azid, sodyum metabisülfid, β -merkapto etanol inhibitörlerinin etkisi çalışılmış, en yüksek inhibisyona sodyum metabisülfidin sebep olduğu [7], Çin lahanasından PPO enzimi üzerine en etkili inhibitörlerin β -merkaptoetanol, askorbik asit, glutatyon ve L-sistein olduğu belirlenmiştir [11]. Buna göre sonuçların literatürdeki benzer çalışmalar ile paralellik gösterdiği söylenebilir.

Bu çalışma ile eflatun çiçekli ballıbabası bitkisinden ekstrakte edilen PPO enzimi karakterize edilerek optimum çalışma şartları belirlenmiş; inhibisyon çalışmaları yapılarak ürünlerin renginde kararlamaya neden olmanın yanı sıra lezzet ve kalitesinde düşüşlere yol açan PPO enziminin aktivitesi azaltılmıştır.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] M. Erzen, 'Farklı kaynaklardan afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerin incelenmesi', Balıkesir University, Phd Dissertation, Balıkesir, Turkey, 2002.
- [2] Z. Önez, 'Üzüm (vitis vinifera l.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi', Ankara University, Master's Thesis, Ankara, Turkey, 2006.
- [3] E.H. Alıcı, 'Kaldırık (trachystemon orientalis) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu', Sakarya University, Master's Thesis, Sakarya, Turkey, 2012.
- [4] Ü.M. Ünal, 'Properties of polyphenol oxidase from anamur banana (musa cavendishii)', Food Chemistry, cilt 100, no. 3, pp. 909-913, 2007.
- [5] K.M. Mdluli, 'Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (sclerocarya birrea subsp. caffra)', Food Chemistry, cilt 92, no.2, pp. 313-323, 2005.
- [6] A. A. Khan, S. Akhtar ve Q. Husain, 'Direct immobilization of polyphenol oxidases on celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (solanum tuberosum)', Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, cilt 40, no. 1-2, May, pp. 58-63, 2006.
- [7] D. Kavrayan ve T. Aydemir, 'Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from peppermint (mentha piperita)', Food Chemistry, cilt 74, no. 2, August, pp.147-154, 2001.
- [8] K. Güngör, 'Çağla badem (prunus dulcis) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu', Sakarya University, Master's Thesis, Sakarya, Turkey, 2008.
- [9] K.N. Waliszewski, O. Marquez ve V.T. Pardo, 'Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean', Food Chemistry, cilt 117, no. 2, November, pp.196-203, 2009.
- [10] C. Yang, S. Fujita, K. Kohno, A. Kusubayashi, MD. Ashrafuzzaman ve N. Hayashi, 'Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (musa sapientum l.) peel', Journal of Agricultural and Food Chemistry, cilt 49, no. 3, February, pp. 1446-1449, 2001.
- [11] T. Nagai ve N. Suzuki, 'Partial purification of polyphenol oxidase from chinese cabbage brassica rapa L.', Journal of Agricultural and Food Chemistry, cilt 49, no. 8, July, pp. 3922-3926, 2001.
- [12] İ. Gülçin, Ö.İ. Küfrevioğlu ve M. Oktay, 'Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (urtica dioica l.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity', Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, cilt 20, no. 3, Jun, pp. 297-302, 2005.
- [13] B.B. Mishra, S. Gautam ve A.Sharma, 'Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (Solanum melongena)', Food Chemistry, cilt 134, no. 4, October, pp.1855-1861, 2012.
- [14] T. Aydemir, 'Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.) heads', Food Chemistry, cilt 87, no 1, August, pp. 59-67, 2004.