



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ISIL İZLENİM SONUCUNDA EFTAL SUYUNDA BULUNAN
POLİFENOL OKSİDAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN YAPISAL
DEĞİŞİMLERİNİN FTİR SPEKTROSKOPİ İLE BELİRLENMESİ

KATİBE SENE CORUK

T.C.
N DE ÖMER HAL SDEM R ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ
GIDA MÜHEND SL ANAB L M DALI

ISIL LEM SONUCUNDA EFTAL SUYUNDA BULUNAN
POL FENOL OKS DAZ VE PEROKS DAZ ENZ MLER N N YAPISAL
DE MLER N N FTIR SPEKTROSKOP S LE BEL RLENMES

KAT BE S NEM CORUK

Yüksek Lisans Tezi

Danı man

Dr. Ö r. Üyesi Hande BALTACIO LU

A ustos 2018

Katibe Sinem CORUK tarafından **Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU** danışmanlığında hazırlanan **“Isıl İşlem Sonucunda Şeftali Suyunda Bulunan Polifenol Oksidaz Ve Peroksidaz Enzimlerinin Yapısal Değişimlerinin FTIR Spektroskopisi İle Belirlenmesi”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hasan TANGÜLER

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ezgi DEMİR ÖZER

Kapadokya Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.


Katibe Sinem CORUK

ÖZET

ISIL İLEME SONUCUNDA EFTALİ SUYUNDA BULUNAN
POLİFENOL OKSİDAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN YAPISAL
DEĞİŞİMLERİNİN FTIR SPEKTROSKOPİSİLE BELİRLENMESİ

CORUK, Katibe Sinem

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU

Ağustos 2018, 48 sayfa

Bu çalışmada ısıl işlem uygulamasının Ülkemizde en fazla tüketilen meyve sularından biri olan eftali suyunda bulunan PPO ve POD enzimlerinin aktivite ve yapısal değişimlerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla farklı sıcaklık (40, 50, 60 ve 70 °C) ve süreler (10, 20 ve 30 dakika) tercih edilmiştir. PPO enzimi için 70 °C sıcaklıkta 10 dakika sonunda % 99'luk inaktivasyon sağlanırken, POD enzimi için aynı inaktivasyon 70 °C sıcaklıkta 20 dakika sonunda elde edilmiştir. PPO ve POD için D₇₀ de erisi sırasıyla 23,91 ve 31,50 dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca z de erisi PPO ve POD için sırasıyla 3,35 ve 23,15 °C olarak gözlemlenmiştir. Eftali POD enziminin PPO'ya göre ısıya daha dirençli olduğu bulunmuştur. PPO enziminin ikincil yapısında sıcaklık artışı ile birlikte α-sarmal ve β-yaprak yapının miktarı azalmış, α-dönü ve toplanmış β-yaprak yapının miktarları artmıştır. POD enziminin sıcaklık artışı ile tesadüfi kıvrımlar ve β-yaprak yapı miktarı azalmış toplanmış β-yaprak yapının miktarı artmıştır. Buna karşın POD enzimi α-sarmal yapısında artış gözlemlenmiştir. Bu durumun POD enzimi rejenerasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: eftali suyu, ısıl işlem, polifenol oksidaz, peroksidaz, enzim inaktivasyonu, Fourier Değişim Kızıl Ötesi spektroskopisi, FTIR, infrared spektroskopisi, protein ikincil yapısı, konformasyonel değişiklik.

SUMMARY

DETERMINATION OF STRUCTURAL CHANGES OF POLYPHENOL OXIDASE AND PEROXIDASE ENZYMES IN PEACH JUICE DURING THERMAL TREATMENT USING FTIR SPECTROSCOPY

CORUK, Katibe Sinem
Ni de Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Hande BALTACIO LU
August 2018, 48 pages

In this study, the effect of heat treatment on the activity and structural changes of PPO and POD enzymes in peach juice, one of the most consumed fruit juices in our country, was investigated. For this purpose different temperatures (40, 50, 60 and 70 °C) and times (10, 20 and 30 minutes) are preferred. The same inactivation for the POD enzyme was obtained at 70 °C for 20 minutes, whereas for the PPO enzyme, 99% inactivation was obtained after 10 minutes at 70 °C. The D_{70} values for PPO and POD were 23.91 and 31.50 minutes, respectively. The z values for PPO and POD were also found to be 3.35 and 23.15 °C, respectively. Peach POD enzyme was found to be more resistant to heat than PPO. With the temperature increase in the secondary structure of the PPO enzyme, the amount of α -helix and β -sheet decreased, and the amounts of β -turn and aggregated β -sheet increased. By increasing the temperature, the amount of random coil and β -sheet of POD enzyme decreased, while the amount of aggregated β -sheet structure increased. In contrast, an increase in α -helix structure of POD enzyme was observed. This condition is thought to be effective in POD enzyme regeneration.

Keywords: Peach juice, thermal treatment, polyphenol oxidase, peroxidase, enzyme inactivation, Fourier TransformInfrared spectroscopy, FTIR, Infrared spectroscopy, protein secondary structure, conformational changes.

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmamın her a amasında bana yol gösteren, ara tırmamın gerçeikle tirilmesi ve de erlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen; bana her konuda destek olan ve bilimsel bir bakı açısı kazanmamı sa layan de erli danı man hocam Sayın Dr. Ö r. Üyesi Hande BALTACIO LU' na

Çalı mam sırasında öneri ve bakı açılarıyla önemli katkılarda bulunan Tez jürisinin de erli üyeleri Sayın Doç. Dr. Hasan TANGÜLER ve Sayın Dr. Ö r. Üyesi Ezgi DEM R ÖZER' e

Çalı malarım sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen sayın bölüm hocalarıma,

Her zaman beraber çalı maktan keyif alaca ım tüm laboratuvar çalı ma arkada larıma,

Çalı mamın her a amasında beni te vik ederek destekleyen arkada ım Elif Betül APAYDINA'a

Beni her konuda destekleyen ve sevgileri ile hep yanımda olan canım aileme, en içten te ekkürlerimi sunarım.

Ç İNDEK İLER D Z İN

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
Ç İNDEK İLER D Z İN	vii
Ç İZELGELER D Z İN	ix
EK İLLER D Z İN	x
S İMGE VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM I G İR	1
BÖLÜM II KAYNAK ARA İTİRMASI.....	2
2.1 İftali	2
2.2 Enzim	5
2.2.1 Polifenol oksidaz (PPO) enzimi	5
2.2.2 Peroksidaz (POD) enzimi.....	7
2.3 Isıl İlemin İftali PPO ve POD Enzimlerine Etkisi	9
2.4 Fourier Dönü İm Kıızıl Ötesi (FTIR) Spektroskopisi.....	12
2.4.1 Spektroskopi.....	12
2.4.2 Elektromanyetik spektrum	12
2.4.3 Kıızıl ötesi (Infrared, IR) spektroskopisi	13
2.4.4 Fourier dönü İm kıızılötesi (FTIR) spektroskopisi	15
BÖLÜM III DENEYSEL ÇALI İMALAR	22
3.1 Materyal	22
3.2 Yöntem.....	22
3.2.1 Enzim ekstraktının hazırlanması	22
3.2.2 Isıl İlemin uygulaması	23
3.2.3 Kalan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	23
3.2.3.1 Kalan PPO aktivitesinin belirlenmesi	23
3.2.3.2 Kalan POD aktivitesinin belirlenmesi	23
3.2.3.3 D ve z de İerinin hesaplanması	24

3.2.4 Enzim inaktivasyon mekanizmasının FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi	24
3.2.5 statiksel analiz	25
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTI MA	26
4.1 Isıl İ lemler Sırasında İ ftali PPO İ naktivasyonu	26
4.2 Isıl İ lemler Sırasında İ ftali POD İ naktivasyonu	30
4.3 FTIR Çalı şmaları	32
4.3.1 Isıl İ lemler İ ftali PPO enzimi ikincil yapısı üzerine etkisi.....	34
4.3.2 İ ftali PPO ikincil yapı bile nlerinin e ri uydurma yöntemi ile analizi	36
4.3.3 Isıl İ lemler İ ftali POD enzimi ikincil yapısı üzerine etkisi	37
4.3.4 İ ftali POD ikincil yapı bile nlerinin e ri uydurma yöntemi ile analizi	40
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇM	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de meyve suyuna i lenen ba lıca meyvelerin üretimi (bin ton)....3	
Çizelge 2.2. MIR bölgesinde belirlenen ba tıpi ve belirlendi i dalga sayısı.....15	
Çizelge 2.3. Protein ikincil yapısı ve amid I – amid II bandlarının dalga sayısı.....18	
Çizelge 4.1. Isıl i lem ile PPO inaktivasyonu için D ve z de erleri.....29	
Çizelge 4.2. Isıl i lem ile POD inaktivasyonu için D ve z de erleri.....31	
Çizelge 4.3. E ri uydurma analizi ile belirlenen eftali PPO enziminin ikincil yapısındaki de i im (%).....37	
Çizelge 4.4. E ri uydurma analizi ile belirlenen eftali POD enziminin ikincil yapısındaki de i im (%).....41	

EKLER DİZİNİ

ekil 2.1. 2010 yılında meyve suyuna ilenilen meyve miktar dağılımı (%).....	4
ekil 2.2. 2010 yılında üretilen meyve suyu pürelerinin çeşit dağılımı (%).....	4
ekil 2.3. Elektromagnetik spektrum.....	12
ekil 2.4. Doğrusal triatomik moleküller (A) ve doğrusal olmayan triatomik moleküllerdeki bazı titremlerininematik gösterimi (B).....	14
ekil 2.5. Amid-I bandının orjinal, dekonvülasyon ve türevlendirilmiş spektrumları...	19
ekil 2.6. Kızılötesi bandın e ri uydurma gösterimi	20
ekil 4.1. Farklı katyon konsantrasyonlarına karşı reaksiyon hızı grafi i.....	27
ekil 4.2. Isıl ilim süresince e ftali PPO enziminin kalan enzim aktivitesi.....	28
ekil 4.3. Isıl ilim süresince e ftali POD enziminin kalan enzim aktivitesi.....	30
ekil 4.4. Örnek (A), tampon çözelti spektrumu (B), ve protein bantlarının çıkarılmış spektrumu (C).....	33
ekil 4.5. 25-70 °C sıcaklık aralında PPO'ın absorbans spektrumları.....	34
ekil 4.6. 25-70 °C sıcaklık aralında PPO'ın ayrı tırılmış spektrumları (25 °C (), 40 °C (), 50 °C (), 60 °C () ve 70 °C ()).....	35
ekil 4.7. e ftali PPO enzimi için Amid I bandının e ri uydurma analizi.....	36
ekil 4.8. 25-70 °C sıcaklık aralında PPO'ın absorbans spektrumları.....	38
ekil 4.9. 25-70 °C sıcaklık aralında POD'ın ayrı tırılmış spektrumları (25 °C (), 40 °C (), 50 °C (), 60 °C () ve 70 °C ()).....	39
ekil 4.10. e ftali POD enzimi için Amid I bandının e ri uydurma analizi.....	40

S MGE VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
FA	Faktör Analizi
FDA	Food Drug Administration
FSD	Fourier Self Dekonvülyasyon
FTIR	Fourier Transform Infrared
LOX	Lipoksigenaz
NN	Yapay Sinir A ları
PLS	Kısmi En Küçük Kareler
POD	Peroksidaz
PPO	Polifenol Oksidaz

BÖLÜM I

G R

Fenolik bileşikler ve C vitamini gibi biyoaktif bileşiklerin önemli kaynağı olan meyve sularının üretiminde uygulanan işlemler sırasında enzimatik esmerleşme meydana gelen renk değişimleri, meyve suyunda kaliteyi etkileyen önemli bir problem olarak görülmektedir. Polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) renk kalitesini etkileyen en önemli enzimlerdir. Meyve suyu üretiminde kalite kayıplarına neden olan enzimleri inaktif hale getirmek amacıyla genelde ısı işlemleri uygulanmaktadır. Meyvelerin ve sebzelerin işlenmesi sırasında gıda kalitesinin sağlanması için enzimlerin inaktive edilmesi oldukça önemlidir. Isı işlemleri sırasında seçilen parametrelere göre enzimlerin üç boyutlu yapısı bozulmakta ve aktivitelerinde azalmalar olmaktadır. Bu değişimler kalıcı olabildiği gibi geri dönüşümlü de olabilmektedir.

Literatürde genellikle enzimlerin inaktivasyonu aktivite ölçümü ile incelenmektedir. Uygulanan tekniklerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin tam olarak belirlenmesi için enzimdeki yapısal değişikliklerin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Proteinlerin konformasyonel değişimini belirlemek için son zamanlarda çok popüler hale gelen tekniklerden biri de Fourier Değişim Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopidir. Proteinlerin ve polipeptidlerin kızılötesi spektrumunda bulunan karakteristik (özellikle Amid I) bant bölgeleri analiz edilerek α -sarmal, β -yapılar ve tesadüfi kıvrılmaların yüzde dağılımları belirlenebilmektedir. Böylece enzimin ikincil yapısı aydınlatılmakta ve uygulanan prosesin ikincil yapı üzerine etkileri gözlemlenebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, enzimatik esmerleşmenin önemli olduğu, Türkiye’de üretilen meyve suyu pürelerinin büyük bir bölümünü oluşturan (%59) ve en çok tüketilen meyve sularından biri olan elmalı suyunda bulunan PPO ve POD aktivitesi ve ikincil yapısı üzerine ısı işlemlerinin etkilerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada ısı işlemleri sonucunda elmalı suyunda renk üzerine etkili olan PPO ve POD enzimlerinin aktivitesindeki azalmalar belirlenmiştir; termal inaktivasyon ile oluşan yapısal değişiklikler FTIR spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir.

BÖLÜM II

KAYNAK ARA TIRMASI

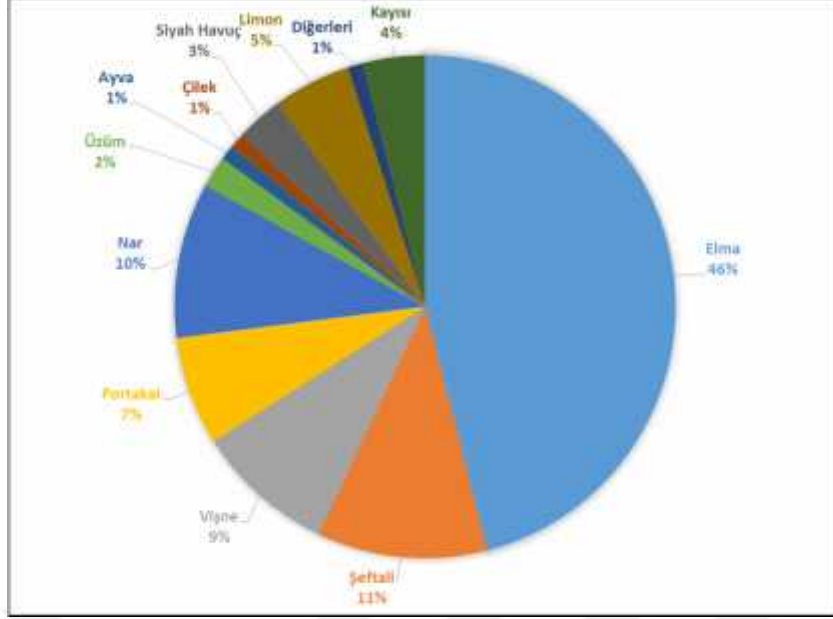
2.1 eftali

Lezzetli ve cazip görünümü nedeniyle popüler meyvelerden biri olan eftali (*Prunus persica* L.), Rosaceae ailesine mensup, yapısında bulunan yüksek besin değerine sahip Vitaminler (A, C, E), karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi antioksidan maddeleri içeren önemli bir meyvedir (Durst ve Weaver, 2013). Ayrıca bileşiminde bulunan şekerler arasında sakkorozun miktarı (3,1-5,5 gr/100 gr) glukoz ve früktozdan daha fazladır. Organik asitlerden baskın olan malik asittir (310-470 mg/100 gr) bunu sitrik asit (120-430 mg/100 gr) ve kuinik asit (160-290 mg/100 gr) izlemektedir (Erol, 2007). 3000 yıldan beri yetiştirilmekte olan eftalinin anavatanının Doğu Asya ve Çin olduğu belirtilmiştir (Lurie ve Crisosto, 2005). Değişik iklim koşullarına uyum sağlayabilmesi ve Mayıs ayı ortalarından, Eylül ayı ortalarına kadar süren geniş hasat dönemi gibi avantajlarından dolayı dünyanın her yerinde yayılmıştır. İngiltere ve Kuzey ülkeleri hariç tüm Avrupa'da yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye'de sert çekirdekli meyve türleri içinde kayısıdan sonra en fazla yetiştiriciliği yapılan eftalinin büyük çoğunluğu iç piyasada tüketilmektedir. İç piyasada tüketilen eftalinin %15'nin iğleme sanayinde kullanıldığı öngörülmektedir. Eftali taze olarak tüketilebildiği gibi, farklı kullanım alanlarında (pulp konsantresi, pulp ve kurutulmuş olarak) uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Ayrıca meyve nektarı, reçel, marmelat gibi ürünlere dönüştürülmesinde ham madde kaynağı olarak kullanılır. Kullanım alanı eftalinin cinsine göre değişim göstermektedir. Eftaliler çekirdeksiz meyve etine bağlı olup olmamasına göre; çekirdeksiz ete tam bağlı olanlar, yarıbağlı olanlar ve çekirdeksiz serbest olmak üzere üç farklı grupta incelenmektedir ve çekirdeksiz ete bağlı olanlar genelde konserve sanayinde kullanılmaktadırlar. Türkiye meyve suyu sanayinde kullanılan hammadde kaynağı olarak kullanılan eftali üretiminde önemli üretim payına sahiptir (Anonim, 2011). Türkiye'de meyve suyuna katılan bağıca meyvelerin üretimi Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye’de meyve suyuna i lenen ba lıca meyvelerin üretimi (bin ton)
(Anonim, 2011)

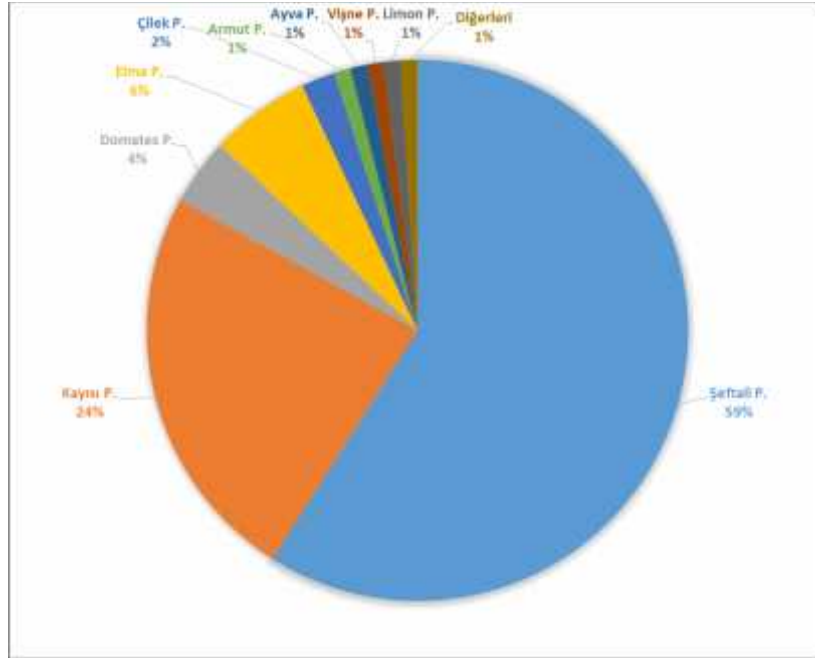
MEYVE	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Elma	2.570	2.002	2.458	2.505	2.782	2.600
Kayısı	894	483	590	751	695	476
eftali	510	553	539	552	547	539
Vi ne	140	122	180	185	192	195
Portakal	1.445	1.536	1.441	1.427	1.690	1.710
Üzüm	3.850	4.000	3.613	3.918	4.265	4.255
Nar	80	91	107	128	171	208
Limon	600	710	651	672	784	787
Çilek	200	211	251	261	292	300
Ayva	100	106	95	95	96	121
Domates	10.050	9.855	9.937	10.985	10.746	10.052
Armut	360	318	356	356	384	380
Sarı Havuç	370	371	544	549	566	487
Siyah Havuç	18	24	98	42	28	46
Greyfurt	150	180	163	168	190	214
Mandalina	715	791	744	756	846	859
TOPLAM	22.052	21.353	21.767	23.350	24.274	23.229

Ülkemizde meyve suyuna i lenen meyveler arasında elmadan sonra % 11’lik pay ile eftali takip etmektedir (Anonim, 2011). 2010 yılında meyve suyuna i lenen meyve miktar da ılımı ekil 2.1’de gösterilmektedir.



ekil 2.1. 2010 yılında meyve suyuna i lenen meyve miktar da ılımı (%) (Anonim, 2011)

Aynı zamanda eftali meyve püresi üretiminde en büyük paya (% 59) sahip meyvedir (Anonim, 2011). 2010 yılında üretilen meyve suyu pürelerinin çe it da ılımı ekil 2.2.’ de gösterilmektedir.



ekil 2.2. 2010 yılında üretilen meyve suyu pürelerinin çe it da ılımı (%) (Anonim, 2011)

2.2 Enzim

Enzimler, protein yapısında olan ve birçok biyokimyasal olayda görev alan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler gıdalarda minör bile en olarak bulunmalarına rağmen, gıdalarda önemli bir rol oynamaktadır. Enzimler, genel olarak gıdalarda istenenden de i iklikleri yapanlar ve arzu edilmeyen kalite de i ikliklerine neden olanlar olarak iki gruba ayrılabilir (Damodaran vd., 2008). Enzimler hasat sonrası bile aktif kalabilmektedir. Bu durum meyvelerin olgunlaşması için avantaj sayılabilirse de, doku, renk, flavor, besin de eri gibi kalite özelliklerinde istenmeyen de i ikliklere yol açarak dezavantaj konumuna gelebilmektedir. Birçok enzim sayılabilece i gibi kalitede renk de i imine katılan iki enzim meyveler için çok önemlidir. Bunlar, Polifenol oksidaz ve Peroksidazdır. Bu enzimler i leme sırasında renk de i imine neden olarak ürünün raf ömrünü kısaltmaktadır.

2.2.1 Polifenol oksidaz (PPO) enzimi

Meyve ve sebzelerde bulunan doğal enzimlerden, i leme teknolojisi açısından en önemlisi PPO enzimidir. Bu enzim doğrama, parçalama, ezme ve başka bir mekanik etki ile zedelenen yerlerinde renkte hızlı bir esmerleşme reaksiyonunun nedenidir (Terefe vd., 2014). PPO, Uluslararası Biyokimya Birliğinin sınıflandırılmasında monofenol monooksijenaz (EC 1.14.18.1) ve katekol oksidaz (EC 1.10.3.1) olarak yer almıştır. PPO enziminin substratları fenolik bileşiklerdir. Bu enzim, fenolik bileşiklere oksijen e li inde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu reaksiyon “enzimatik esmerleşme” olarak bilinmektedir. PPO’ ın neden olduğu enzimatik esmerleşme genellikle fenol bileşiklerince zengin bitkilerde görülür. Özellikle meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşme sonucu önemli renk sorunları ortaya çıkmaktadır. PPO enzimi hayvansal dokularda ve küf mantarlarında bulunmamaktadır. Bitkilerde dokunun hastalıklı olması veya çeyitli i lemler (kabuk soyma, boyut küçültme, ezme, dondurma, kurutma) sırasında zarar görmesi kolaylıkla esmerleşmeye neden olur. Ayrıca esmerleşme reaksiyonları sonucu meyvelerin yarısından fazlasının kaybedildi i dü ünülmektedir. Bu durum elma, armut, kayısı, efsali, muz, patates ve mantar gibi çeyitli ürünler için söz konusu olabilir. Ancak, limon ve turunçgiller kahverengiye dönüşmez, çünkü içerdikleri sitrik asit nedeniyle oksitlenme renksiz gerçekleşmektedir (Önez, 2006).

PPO pek çok reaksiyon katalizleyebilmektedir. Bir monofenol olan p-kresolü, difenol 4-metil kateol okside ederlerken, bir o-difenol olan kateol ise o-benzokinone parçalarlar. Bakır içeren bir enzim olan PPO iki farklı reaksiyon katalizler:

- i) monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu
- ii) o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonu

Bu aktivitelerden ilki monofenolaz (hidroksilaz veya kresolaz) ve ikincisi ise difenolaz (kateolaz veya oksidaz) aktivitesi olarak adlandırılır. Her iki reaksiyonda da oksijen yardımcı substrat olarak kullanılır. Oluşan o-kinonlar daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu kahverengi-siyah renkteki melanin pigmentlerine dönüşür. Bitki ve funguslardan elde edilen PPO'lar hem monofenolleri (p-kresol, tirosin gibi) hem de difenolleri (kateol ve o-dihidroksifenilalanin gibi) okside ederler. Ancak, bu etki PPO'nun elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterir. Meyvedeki bütün fenolik bileşiklere etki etmez, substrat spesifikliği vardır ve elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterir (Önez, 2006).

PPO aktivitesi meyvenin derinlik bölümlerinde daha fazladır, özellikle meyvenin kabuk kısmında yüksek aktivite görülür. Sulu meyve ve sebzelerin dokularında PPO ve substratları olan fenolik bileşiklerin teması neredeyse hiç yoktur, bunun sebebi substratların ve enzimlerin bitkisel hücrelerin farklı kısımlarında yer almalarıdır. PPO enzimlerinin bir kısmı stoplazmada serbest halde bulunurken, büyük bir kısmı kloroplast ve tilakoidlerde unsurlarında membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Fenolik bileşikler ise vakuollerde yoğunlaşmıştır. Normal şartlarda bu durum böyle olduğunda hiçbir sıkıntı olmazken, ardından müdahaleler hasat, taşıma, zedelenme ve uygulanan çitli işlemler sonucunda doku bütünlüğü bozulmaktadır. Böylece enzimler kendi substratları olan fenolik bileşiklerle ve havadaki oksijenle bir araya gelerek enzimatik esmerleme reaksiyonu gerçekleştirmektedir. Ürünün işlenmesi sırasında kesme, doğrama, dilimleme, işleme, soyma gibi durumlarda, bu reaksiyonun oluşmasını engellemek için bir takım tedbirler alınmalıdır (Cemeroğlu vd., 2001).

Bu önlemlerden bir kaçına dayanmak gerekirse, Isıl işleme uygulayarak bazı meyve ve sebzelerde (özellikle meyve sularında) PPO'ları inaktive etmek yaygın bir uygulamadır. Genel olarak, PPO'nun 70-90 °C sıcaklıklara maruz kalması katalitik aktivitelerini yok eder, ancak inaktivasyon için gerekli olan zaman ürüne bağlıdır. Çitli zaman – sıcaklık kombinasyonu denemeleriyle, istenilen maksimum iki norm belirlenir.

Diğer önlemlerden biri ise kesilmiş meyve ve sebzelerde kahverengilemeyi önlemek için askorbik asit, tiyol bileşikleri ve sülfidler gibi bazı bileşiklerin ilavesidir. Gıdaların esmerleşmesi, oksijenin uzaklaştırılması, asitlendirme, siklodekstrin ve polivinilpirolidon gibi kompleks oluşturan maddelerle fenollerin uzaklaştırılması ile de önlenir (Önez, 2006).

Enzimatik esmerleşmeyi önleyici olarak kullanılan en etkin kimyasal hiç kuşkusuz ülkemizde de yaygın olarak kullanılan SO_2 'dir. Ancak, özellikle son yıllarda bu kimyasalın bazı astımatik reaksiyonlara neden olduğu belirlenmesiyle, kullanımına FDA tarafından önemli sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle, SO_2 'ye alternatif kimyasalların bulunması çalışmaları büyük bir önem kazanmıştır. Halen SO_2 kadar etkin bir kimyasal bulunamamış olsa da, özellikle askorbik asit ve türevlerinin ısı uygulamaları ve birtakım başka kimyasallarla kombine edilerek SO_2 'ye alternatif olarak kullanılması üzerinde durulmaktadır (Cemerolu vd., 2001).

2.2.2 Peroksidaz (POD) enzimi

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), peroksidaz enzimlerinin de dâhil olduğu, büyük bir enzim sınıfı olan oksidoredüktazlar grubundan bir enzim topluluğudur. Yüksek yapılı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Özellikle bitkiler âleminde çok yaygındır ve bitkilerin gelişmesinde çok önemli rollere sahiptirler. Meyve ve sebzelerin işlenmesinde önemle dikkate alınan enzimlerden birisidir. Sebzeler, meyvelere göre daha fazla peroksidaz aktivitesine sahiptirler. Bitkisel dokularda kısmen stoplazmada çözünmüş formda, kısmen de hücre duvarına bağlı olarak çözünmez formda bulunan bu enzim peroksidasyon, hidroksilasyon veya oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyebilir. (Cemerolu vd., 2001).

Peroksidazların optimum sıcaklıkları ve optimum pH dereceleri, başta kökenine bağlı olarak çeşitli faktörlere göre değişmektedir. Örneğin optimum sıcaklığı patateslerde $55^{\circ}C$, karnabaharda $35-40^{\circ}C$ olduğu belirtilmektedir. Aynı ekilde optimum pH derecesinin yeşil fasulye kökenli olanlarda 5,0, muz kökenli olanlarda ise 5,0-6,0 arasında değiştiği saptanmıştır (Cemerolu vd., 2001).

Peroksidazlar a a ıda verilen tipteki reaksiyonları katalize ederler;



Bu peroksidatik reaksiyonda;

R: H⁺, CH₃, C₂H₅

AH₂: indirgenmi formda hidrojen donörü

A: Oksitlenmi formda hidrojen donörü

Bu açıklamaya göre; POD enzimleri bir hidrojen donörü e li inde, peroksitleri parçalayan reaksiyonu katalize ederler. u halde temel substratı peroksitlerdir ve bunların ba ında hidrojen peroksit gelir. Yukarıda de inildi i gibi, metil veya etil hidrojen peroksit gibi organik peroksitler de substrat olarak kullanılmaktadır. Di er taraftan çok sayıda çe itli bile ikler hidrojen donörü olarak görev alabilmektedir. Bunlar arasında askorbat, fenoller, aminler veya benzer organik bile ikler sayılabilir. Donör substratlar arasında bulunan bazı maddeler bu enzim e li inde belirli amaçlarla kullanılabilir. POD, hidrojen peroksit varlı ında fenolik bile iklerin oksidasyonunu katalizleyerek kahverengi bozunma ürünlerinin olu umuna öncülük eder (Cemero lu vd., 2001).

POD enzimi yukarıda belirtilen ve ba lıca aktivitesi olan “peroksisatif etki” yanında birtakım yan aktivitelere de sahiptir. Bunlardan en önemlisi hiç ku kusuz H₂O₂ olmadan da yürüeyebilen “oksidatif etki” dir. Ancak bu defa O₂ ve Mn⁺² veya fenol gibi birtakım kofaktörlere ihtiyaç vardır. POD enzimi, H donörü bulunmayan ortamlarda adeta katalaz enzimi gibi davranarak hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanması reaksiyonunu da katalize edebilmektedir. Bu etki ekli ise “ katalitik etki” olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimin bir di er ve sonuncu aktivitesi ise “hidroksilatif etki” eklidir. Bu etki yoluyla;O₂ veya monofenolik bile iklerden aynen polifenol oksidaz enzimlerinin yaptı ı gibi difenolik bile ikler olu turulmaktadır. Ancak farklı olarak POD enzimi hidroksilasyon yetene ini gösterebilmek için bir hidrojen donörüne ihtiyaç duymaktadır (Cemero lu vd., 2001).

Peroksidaz ısıya en dirençli enzim olması dolayısıyla, ısı lı i lem sonucunda e er inaktive olmu ise di er enzimlerin hepsinin inaktive oldu u dü ünülür. Bundan dolayı sebzele rin ha lanma yeterlili inde peroksidaz enziminin inaktivasyonu bir kriterdir

(Cemero lu vd., 2001). Isıya en direçli enzim olmasının yanında enzimin kökenine, bulundu u meyve ve sebzeye göre direnci de i iklik gösterebilir. Örne in, patates POD' ı 95°C' de 10 dakikada tamamen inaktive oldu u halde, lahana kökenli olanlar 120°C' de 10 dakika sonunda ba langıç aktivitesinin %0,3' ünü koruyabilmektedir (Bahçeci, 2003).

2.3 Isıl İleme ve Depolama Sırasında Sorun Yaratan Mikroorganizmaları ve Kaliteyi Olumsuz Etkileyen Çe itli Enzimleri İnaktive Etmek İçin Bazı Uygulamalara Maruz Kalmaktadır. Hama, Pastörizasyon veya Sterilizasyon Gibi Isıl İlemler Enzimleri İnaktive Etmek İçin En Çok Kullanılan Yöntemlerdir. Esmerlemeden Sorumlu Olan PPO ve POD İnaktivasyonu İçin Meyve Suları Genellikle Isıl İleme Tabi Tutulmaktadır (Lewis ve Heppel 2000). Bununla Birlikte, Farklı Meyvelerden Elde Edilen PPO' ın Termostabilitesi Çe itlidir. Ananas PPO Aktivitesi, 30 Dakika Boyunca 40-60 °C'ye Maruz Kaldıktan Sonra Yaklaşık %60 Azalmıştır, Kalan Aktivite, 85 °C'de 5 Dakika Sonunda Yaklaşık %7 İken, 90 °C'de 5 Dakika Sonunda %1,2 Olmuştur (Chutintrasri ve Noomhorm 2006). Victoria Üzüm PPO' ında 70 °C' de 10 Dakika Sonra Tam İnaktivasyon Bildirilmmiştir (Rapeanu vd., 2006). Çilekten Elde Edilen PPO ısıya daha duyarlıdır. Aktivitesi, 55 °C'de 10 Dakika Isıtılmadan Sonra %50 Azalmıştır ve Enzim, 65 °C' de 10 Dakika Sonunda Neredeyse Tamamen Etkisiz Hale Getirilmmiştir (Dalmadi ve ark. 2006).

Meyve ve sebze ürünleri, ileme ve depolama sırasında sorun yaratan mikroorganizmaları ve kaliteyi olumsuz etkileyen çe itli enzimleri inaktive etmek için bazı uygulamalara maruz kalmaktadır. Hama, pastörizasyon veya sterilizasyon gibi ısıl i lemler enzimleri inaktive etmek için en çok kullanılan yöntemlerdir. Esmerlemeden sorumlu olan PPO ve POD inaktivasyonu için meyve suları genellikle ısıl i leme tabi tutulmaktadır (Lewis ve Heppel 2000). Bununla birlikte, farklı meyvelerden elde edilen PPO' ın termostabilitesi çe itlidir. Ananas PPO aktivitesi, 30 dakika boyunca 40-60 °C'ye maruz kaldıktan sonra yaklaşık %60 azalmıştır, kalan aktivite, 85 °C'de 5 dakika sonunda yaklaşık %7 iken, 90 °C'de 5 dakika sonunda %1,2 olmuştur (Chutintrasri ve Noomhorm 2006). Victoria üzüm PPO' ında 70 °C' de 10 dakika sonra tam inaktivasyon bildirilmmiştir (Rapeanu vd., 2006). Çilekten elde edilen PPO ısıya daha duyarlıdır. Aktivitesi, 55 °C'de 10 dakika ısıtılmadan sonra %50 azalmıştır ve enzim, 65 °C' de 10 dakika sonunda neredeyse tamamen etkisiz hale getirilmmiştir (Dalmadi ve ark. 2006).

Isıl i lem sırasında enzim inaktivasyonu üzerine birçok çalı ma, çe itli ara tırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Yemenicio lu vd. (1997) elmadan elde edilen PPO' ın ısıl parametrelerini belirlemek için, 6 çe it elma ve üç farklı sıcaklık (68, 73, 78 °C) kullanmışlardır. 78 °C' de Amasya elması PPO' ı ısıya en dirençsiz, Starking Delicious çe idi PPO' ı ısıya karşı en dirençli enzim olarak bulunmuştur. Isıl inaktivasyon kineti i birinci dereceden bulunmuş ve hız sabitleri 78 °C' de $15,99-28,27 \times 10^{-2}/\text{dak}$, aktivasyon enerjisi 54,7-77,2 kcal/mol, z de eri 7,1-10,0 °C arasında bulunmuştur. Elmadan elde edilen PPO' ın diğer meyvelerden elde edilene göre ısıya karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir.

eftali PPO' ın niteliklerinin araştırıldı ı bir çalı mada olgunlu una göre ham, yarı ham ve olgun eftalilerden aseton tozu hazırlanmı tır. Aseton tozundan elde edilen enzim zeltisinde optimum pH, K_m , V_m ve enzim aktivitesinin termal inaktivasyonu incelenmi tir. Olgunluk a amasına göre enzimin optimum pH de eri 6,0-6,5 arasında bulunmu tur. Tam olgun eftalilerden elde edilmi enzimde pH 6,2'de K_m 14,3 mM kate ol ve V_m (maksimum hız) 1,25 Abs/dak.mL olarak saptanmı tır. Enzimin termal inaktivasyon kineti i 70 °C'de araştırılmı tır. Her enzim ekstraktının termal inaktivasyon kurvesi, ba langıçta dik bir do ru, sonra daha yatık bir do ru olmak üzere iki bölümden olu tu unu belirlemi lerdir. Bu nedenle eftali PPO enziminin ısıya direnci farklı iki izoenzimden olu u u sonucuna varmı lardır. Ba langıtaki hat, ısıya duyarlı enzimin inaktivasyonunu, ikinci hat ise ısıya dirençli enzimin inaktivasyonunu temsil etmektedir. Isıya dirençli fraksiyonun 70 °C'de inaktivasyonu birinci dereceden reaksiyon kineti ine uymaktadır. . Reaksiyon hız sabitleri (k_d) ham, yarı olgun ve tam olgun eftalilerde sırasıyla 20,36, 23,17 ve 19,66 x 10⁻²/dak olarak hesaplanmı tır. Toplam enzim aktivitesinde ısıya dirençli kısmın oranı, ham, yarı olgun ve olgun meyveler için sırasıyla %83, %48 ve %55 oldu u belirlenmi tir (Yemenicio lu ve Cemero lu 1998).

Bir ba ka çalı mada ise yine bir eftaliden (*Prunus persica* L. Batsch) elde edilen PPO enziminin ısıl inhibisyonunda, pH' nın etkisi incelenmi tir. Optimum sıcaklık de erleri pH' ya göre de i mektedir. Örne in 6,8'de optimum sıcaklık 40 °C iken, pH4'de optimum sıcaklık 30 °C'dir. PPO enzimi 4 °C' de pH 6-8 aralı ında depolama süresi boyunca stabil kalmı tır. Fakat termal kinetik de erleri ($z-D-k-E_a$) pH 6.0 ve pH 8.0 de erlerine göre pH 6,8 de erinde daha stabil kalmı tır. pH 6,8'de D60, D70, D80 ve D90 de erleri sırasıyla 68,97; 12,82; 1,98; 0,83 olarak belirlenmi tir. Bu pH' da z de eri 15,2 olarak bulunmu tur. pH 6,8'de enzim aktivite 70 °C' de önemli derecede azalmı ve 9 dakikalık inkübasyondan sonra kalan aktivitesi %20,36 olarak belirlenmi tir. 60 ° C'de ise 10 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitenin yakla ık %82,99'u kaldı ı tespit edilmi tir. Enzimin 80 °C ve 90 °C'de çok kararsız oldu u ve enzim aktivitesinin keskin bir ekilde azaldı ı gözlenmi tir. 80 °C'de 2,3 dakika inkübasyondan sonra kalan aktivite sadece %8,90 iken 90 °C'de 1 dakika inkübasyondan sonra %7,73 olarak belirlenmi tir (Liu vd., 2015a).

Neves (2002), eftali (*Prunus persica* L.var. Rei da Conserva) suyundan iyonik olarak ba lı POD enzimini safla tırıp 60, 65, 70, 75 °C olmak üzere dört farklı sıcaklık de erindeki inaktivasyon miktarlarını belirlemi tir. POD enzimi 60 °C’de stabil iken, 65 °C’de 60 saniyede %45’lik aktivite belirlenmi , 70°C’de 15 sn ve 75 °C’de 30 sn’de bu aktivite de eri saptanmı tir. 65 °C’de 4 dakika sonunda kalan aktivite %20 olarak belirlenirken, 70°C’de 3 dakikada ve 75°C’de 1 dakikada POD enzim aktivitesinin %95’nin kayboldu u belirlenmi tir.

Bir ba ka çalı mada Jubileu cinsi et eftalisinden elde edilen PPO ve POD enziminin termal inaktivasyonu incelenmi tir. 70 °C’de 550 sn’de PPO enzim aktivitesinin %95’nin kayboldu u ve POD aktivitesinin termal inaktivasyon sırasında 50°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla azaldı ı tespit edilmi tir. 65 °C’de 150 sn’de POD aktivitesinin % 95’i kaybolmu tur. Sonuç olarak PPO enziminin POD’ dan daha dayanıklı oldu u tespit edilmi tir. Bu çalı maya göre Jubileu cinsi eftalilerin PPO enziminin inaktivasyonu için 4 dakika sürenin uygun oldu u bildirilmi tir (Lopes vd., 2014).

Granada cinsi et eftalisinden ekstrakte edilen PPO ve POD enziminin özelliklerinin incelendi i bir çalı mada, termal inaktivasyon de erleri tespit edilmi tir. PPO enziminin kate ol varlı ında yapılan 55°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesinin hızlıca dü tü ü gözlemlenmi tir. 60°C’de 540 sn’de aktivitesinin %80’nin kayboldu u gözlemlenmi tir. Bu durumun nedeni olarak da enzimin yapısının kovalent ba içermeyip, hidrojen wader wals gibi zayıf ba lardan olu ması gibi yorum getirilmi tir. Benzer bir durum POD enzimi için gözlemlenmi tir. Fakat POD aktivitesi 45 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla azalmaktadır. Bu durum POD enziminin termal stabilitesinin PPO’dan daha az oldu unu göstermektedir. Normalde POD enziminin meyve ve sebzelerde ısıya kar ı en dirençli enzimlerden bir tanesi oldu u ve ısıl inaktivasyonda yaygın kullanılan bir indikatör olarak kullanıldı ı belirtilirken, bu durumun eftali için geçerli olmadı mı ortaya koymaktadır (Toralles vd., 2005).

Görüldü ü gibi ısıl i lemler sırasında belirlenen PPO ve POD aktiviteleri farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar meyveye, meyvenin çe idine, ekstrakte edilen çözeltinin pH’ sına göre farklılık göstermektedir.

2.4 Fourier Dönü üm Kızıl Ötesi (FTIR) Spektroskopisi

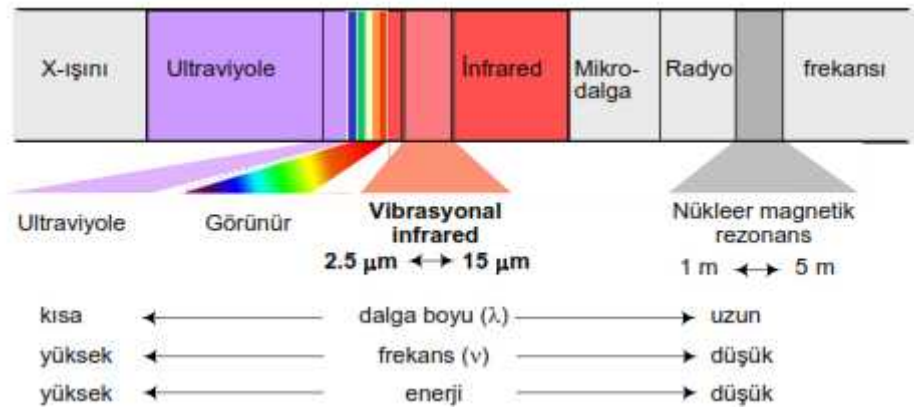
Meyve ve sebze ürünlerinde, proses ve depolama süresince kalite üzerine olumsuz etki gösteren enzimleri inaktive etmek için ba ta ısıl i lem olmak üzere birçok farklı teknik kullanılmaktadır. Uygulanan bu i lemler sırasında enzimin yapısı bozulmakta ve inaktive olmaktadır. Kullanılan bu tekniklerden son yıllarda öne çıkan ve enzim invaktivasyon mekanizmasının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisi de FTIR Spektroskopisidir (Haris ve Severcan 1999; Carbonaro ve Nucara 2010; Severcan vd., 2001; Barth 2007).

2.4.1 Spektroskopi

Bir örnekteki atom, molekül ya da iyonların, bir enerji seviyesinden düzeyinden di erine geçi i sırasında absorplanan ya da yayılan elektromanyetik ı ımanın ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Bu amaçla kullanılan tüm tekniklere spektroskopi teknikleri adı verilir (Freifelder, 1982).

2.4.2 Elektromanyetik spektrum

Elektromanyetik spektrum, dalga boyları 10^{-14} cm'den ba layan kozmik ı ınlardan yüzlerce metreyi bulan radyo dalgalarına kadar sayısız miktarda ı ın ihtiva eden bir sistemdir. Görünür ı ık, X-ı ınları, ultraviyole, infrared, mikrodalga ve radyo dalgaları elektromanyetik ı ımanın çe itleridir. Elektromanyetik ı ımanın türlerini gösteren elektromanyetik spektrum ekil 2.3' de gösterilmektedir.



ekil 2.3. Elektromagnetik spektrum

infrared (IR) ışınlarının enerjileri, UV ve görünür bölge ışınlarının enerjilerine göre oldukça düşüktür. Bu enerji moleküllerin elektronlarını uyaracak ve bunları bir üst enerji seviyesine geçirecek kadar büyük değildir. Yalnızca molekül içi titreşimler ve dönme olmaktadır. Moleküller içerdikleri atomların cinsi ve bağ yapılarına göre de çok çeşitli titreşimsel hareketler sergilemektedirler. Moleküllerin IR ışınlarını absorptlaması veya absorptlamamasına göre elde edilen IR spektrumu analiz edilen bileşiklerin moleküler yapısı ile ilgili bilgiler vermektedir (Freifelder, 1982).

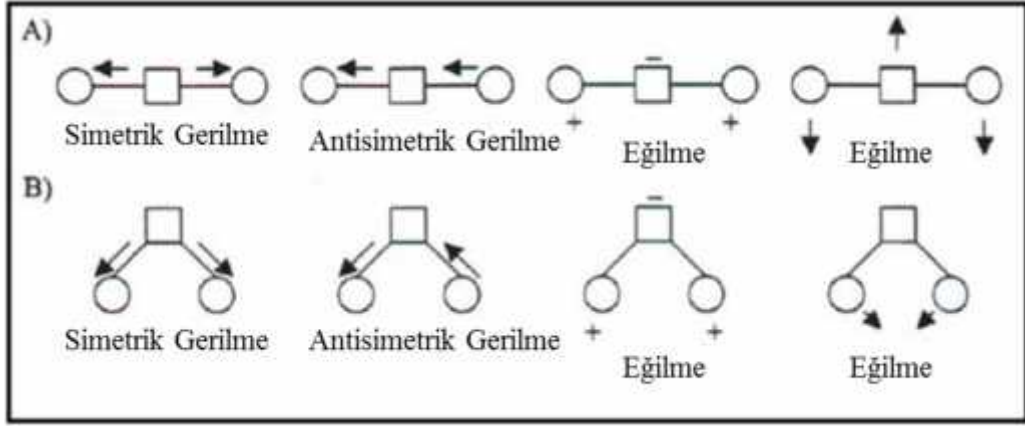
2.4.3 Kızılötesi (infrared, IR) spektroskopisi

"Kızılötesi" terimi, dalga sayısı $12800-10\text{ cm}^{-1}$ veya $0,78$ ve $1000\text{ }\mu\text{m}$ arasındaki elektromanyetik spektrum aralığını kapsamaktadır. Kızılötesi dalgalamında, dalga boyu yerine "dalga sayısı" kullanılmaktadır. Titreşim frekansı sayısal olarak ölçeklendirmeye uygun olmadığı için dalga sayısı kullanımı tercih edilir. Kızılötesi spektroskopisi, moleküldeki atomların titreşimlerini temel alan bir tekniktir. Moleküllerdeki kimyasal bağlar, enerji seviyelerine karşılık gelen, titreşimleri belirli frekanslara sahiptir. Bu titreşim frekansları atomların kütlesi, molekülün şekli (geometrisi) ve bağların gücü tarafından belirlenmektedir (Karoui vd., 2008).

Moleküllerin oluşturan atomlar sürekli bir hareket içinde olduklarından, molekülün öteleme hareketleri, bir eksen etrafında dönme hareketleri ve bir kimyasal bağın uzunluğunun periyodik olarak azalışına veya moleküldeki açılarının periyodik olarak değişmesine neden olan titreşim hareketleri vardır. Bu molekül içi kompleks olaylar fonksiyonel grupları (metil, metilen, karbonil, amid, hidroksil gibi) tarafından karakterize edilir. Moleküllerde ortaya çıkan titreşimler, gerilme ve ekleme hareketlerini oluşturur.

Titreşim hareketleri:

- 1) Gerilme (Stretching): iki atom arasındaki bağ eksenini boyunca atomlar arası uzaklığının değiştiği titreşimler
- 2) Ekleme (Bending, düzlem içi ve dışı): iki bağ arasındaki açılarının en az birinin değiştiği titreşimler olarak tanımlanmaktadır. Temel titreşim hareketleri şekil 2.4'de gösterilmektedir.



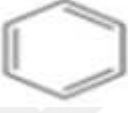
ekil 2.4. Do rusal triatomik moleküller (A) ve do rusal olmayan triatomik moleküllerdeki bazı titre imlerinin ematik gösterimi (B) (Arrondo vd., 1993).

IR spektrum üç gruba bölünür:

- Yakın nfrared (NIR): NIR bölgesi 12.500 ila 4000 cm^{-1} ($0,8-2,5 \mu\text{m}$) arasındadır. NIR spektroskopisi, numunenin, öncelikle OH, CH, NH ve CO gruplarının molekülünün titre im geçi lerinin a ırı tonlarına ve kombinasyon bantlarına kar ılık gelen spesifik frekansları emdi i bir ık kayna ı ile çalı ır.
- Orta nfrared (MIR): Elektromanyetik spektrumun MIR bölgesi 4000 ve 400 cm^{-1} ($2,5-50 \text{ mm}$) arasındadır ve temel moleküler gerilme ve bükme titre im frekansı ile ili kilidir.
- Uzak nfrared (FIR): FIR bölgesi 200 ila 10 cm^{-1} ($50-1000 \mu\text{m}$) arasındadır.

Analitik uygulamalarda en çok kullanılan bölge, orta IR ının bir bölümü olan $4000-670 \text{ cm}^{-1}$ veya $2,5-15 \mu\text{m}$ aralı ındaki kısımdır. Orta kızılötesi spektrumu ($4000-400 \text{ cm}^{-1}$) yakla ık olarak dört bölgeye bölünebilir ve bir grup frekansının do ası genel olarak bulundu u bölge ile belirlenebilir. Bölgeler; X-H (O-H, C-H ve N-H) gerilme bölgesi ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$), üçlü ba (C C, C N) bölgesi ($2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$), çift ba (C=C, C=O ve C=N) bölgesi ($2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) ve parmak izi bölgesi ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$) olarak adlandırılmı tır (Stuart, 2004). MIR bölgesinde belirlenen ba tipi ve belirlendi i dalga sayısı Çizelge 2.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. MIR bölgesinde belirlenen ba tıpi ve belirlendi i dalga sayısı (Stuart, 2004).

Ba tıpi	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)
O-H	3600-3200
N-H	3500-3200
C-H	~3000
C C	2250
C N	2250
C=O	1800-1650 (Genellikle 1700)
C=C	1650
	1600-1500

Infrared spektroskopisinin en çok kullanıldı ı alan organik bile iklerin tanımlanmasıdır; bu maddelerin spektrumlarında maximum ve minumumların oldu u absorpsiyon bantları bulunur ve bunlar, maddelerin birbirleriyle kıyaslanmasına olanak verir. Gerçekte bir organik maddenin spektrumu onun fiziksel özelliklerinden biridir ve optik izomerler dı nda teorik olarak aynı absorpsiyon spektrumu verebilen iki farklı madde yoktur. Bu nedenle her bir molekülün IR spektrumu kendine hastır ve o molekülün tanınması veya tanımlanmasında kullanılır. Bu sebeple her bile ik için IR ile elde edilen spektruma IR parmak izi (Finger print) adı verilir.

IR spektrometreleri temel olarak 2 grupta toplanır.

1. IR bölgenin belirli bölgelerinde analiz imkânı veren spektrometreler
2. Yapısında bulunan interferometreler sayesinde IR bölgenin tamamında analiz yapabilen Fourier transform spektrometreler.

2.4.4 Fourier dönü üm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

FTIR spektrometresi, IR spektrometrenin geli mi bir eklidir. IR spektrometrisi çift ı ın yollu olarak dizayn edilmi tir. FTIR da ise IR kayna ından gelen ı ın tıpkı güne ı ınlarının kırınımına u rayarak gökku a ını olu turması gibi difraksiyon prizmaları ile

farklı frekansta IR 1 ılarına dönü türülmektedir. Örnek hücresinden geçen her bir frekanstaki IR 1 ını dedektörde kaydedilerek analiz edilen örne e ait IR spektrumu elde edilir.

FTIR spektrometresi geleneksel IR spektrometrelere göre;

- Çok daha hızlı analiz imkânı sunmaktadır. Geleneksel IR spektrometrelerinde dakikalar süren analizler FTIR ile saniyeler içinde gerçekleştirilmektedir.
- Bu cihazların optik dizaynı gere i sinyal gürültü düzeyi çok düşük ve hassasiyeti de çok yüksektir.
- nterferometreleri içinde sadece bir tane hareketli parçası (hareketli ayna) bulunduğu için mekanik olarak basittir ve arıza yapma olasılığı düşüktür.
- Diğer birçok cihazın sıhhatli çalışması için gerekli olan ve belli aralıklarla yapılması gereken kalibrasyon i lemine FTIR da gerek duyulmaz.
- Aynı materyalden yapılmı 1 ın kayna 1 ı hem IR hem de FTIR spektrometresinde kullanılmaktadır. Ancak IR spektrometresindeki monokromatörün yerini FTIR spektrometresinde interferometre almı tır.

FTIR spektroskopisi incelenmek istenen örnek makromolekülleri fonksiyonel gruplarının titre imlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu spektroskopik teknik, boyama, i aretleme gibi ek maddelerin kullanımını içeren uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, örne e zarar vermeden, hızlı, hassas ve etkin sonuçların göreceli olarak daha ucuz bir biçimde elde edilmesini sağlaması bakımından diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır.

FTIR spektroskopisi, elde edilen parmak izi benzeri bilgileri 1 ında moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi ve dolayısıyla farklı doku yapılarının ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknik kullanılarak, doku ve hücrelerde lipit, protein, DNA, RNA gibi biyomoleküllerdeki fiziksel, örne in yapısal, de i imlerin izlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler, öncelikle do ru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların bant pozisyonu, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği de erlerinin hesaplanması ile elde edilebilir.

FTIR spektrumlarından kimyasal konsantrasyon, kompozisyon, konformasyon ve içerilen fonksiyonel gruplar gibi pek çok kalitatif ve kantitatif bilgi elde etmek mümkündür. Buna ilaveten, bir örnekteki moleküllerin kompozisyonu sinyal şiddeti ya da ilgili bantların alanlarının oranlarının hesaplanması ile (doymamış lipidlerin doymuş lipidlere ya da lipidlerin proteinlere oranı gibi) hızla analiz edilebilir. Bunun yanı sıra, kontrole karşı olarak yapılan ölçümlerde ana protein bantlarının (amid I) frekans değerlerindeki kaymalar ise proteinlerin yapılarında oluşabilecek değişimleri işaret eder. FTIR spektroskopisinin diğer önemli bir avantajı ise protein ikincil yapılarında oluşan bu değişimlerin 1650 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} civarında gözlenen sırasıyla amid I ve amid II ana protein bantları kullanılarak detaylı olarak incelenebilmesidir (Mantsch 2001).

Amid I bandı, proteinlerin ikincil yapısının analizi için en yararlı kızılötesi banttır. $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ arasında meydana gelir. Amid I bandı, düzlemde N-H gerilme ve C-N gerilme modlarına bağlı olarak, amid grubunun C = O gerilme titreşiminin %80'ini temsil eder. Bu titreşimin tam frekansı, C = O ve N-H gruplarını içeren hidrojen bağının niteliğine bağlıdır ve bu, protein tarafından benimsenen belirli ikincil yapı ile belirlenir. Proteinler genellikle farklı konformasyonlarda polipeptit fragmanları içeren çeşitli alanlara sahiptirler. Amid I bandı, α -sarmal, β -yapıları, dönmeler ve rastgele yapılardan oluşur.

Amid II bantları esasen N-H bükülmesini (%60) ve bazı C-N gerilimi (%40) temsil etmektedir. Amid I bandında olduğu gibi, amid II bandına proteinin ikincil yapısına bağlı bileşenlere ayrılmak mümkündür. Amid II bandı 1550 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Stuart ve Ando 1997, Stuart 2004).

FTIR spektroskopisinin en önemli dezavantajı suyun kızılötesi dalga boyunda kuvvetli bir sinyal vermek suretiyle FTIR spektrumunda baskın olması ve biyolojik sistemlerde bazı protein bantları olmak üzere bazı bantları maskeleyesidir. Buna karşılık örneklerdeki pikleri elde edebilmek için sulu ortamda çekilen örnek spektrumlarından kullanılan tampon çözelti spektrumunun dijital olarak çıkarılması ile uygulanan fark spektroskopisi yöntemi uygulanmaktadır.

Fark spektroskopisi yöntemi uygulandıktan sonra Amid I ve Amid II bantları elde edilmektedir. Absorbans spektrumunda, 1653 cm^{-1} 'de pik veren bileşen Amid I, 1550

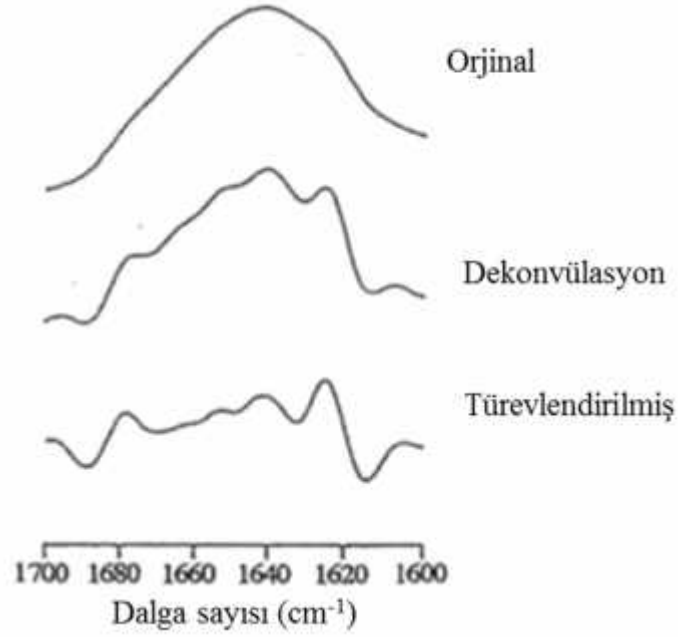
cm^{-1} ' de pik veren ise Amid II olarak belirlenmektedir. Sulu ortamda proteinlerin ikincil yapısının analizi için en yararlı kızılötesi bant, yaklaşık 1700 ila 1600 cm^{-1} arasında bulunan amid I bandıdır. Proteinler genellikle farklı konformasyonlarda polipeptit fragmanları içeren çeşitli alanlar içerir. Sonuç olarak, gözlemlenen Amid I bandı genellikle, sarmalları, α -yapılarını, dönüşlerini ve rastgele yapıları içeren kompleks bir yapıdır (Stuart 2004).

Amid I ve / veya amid II band bölgelerini analiz ederek, α -sarmal, β -yapısı ve rasgele bobin yapısı gibi her yapı elemanının yüzdesini hesaplayabiliriz. Çizelge 2.3, proteinlerin sekonder yapıları ile I ve II amidlerinin frekansları arasındaki ilişkileri göstermektedir.

Çizelge 2.3. Protein ikincil yapısı ve amid I – amid II bandlarının dalga sayısı (Stuart 2004).

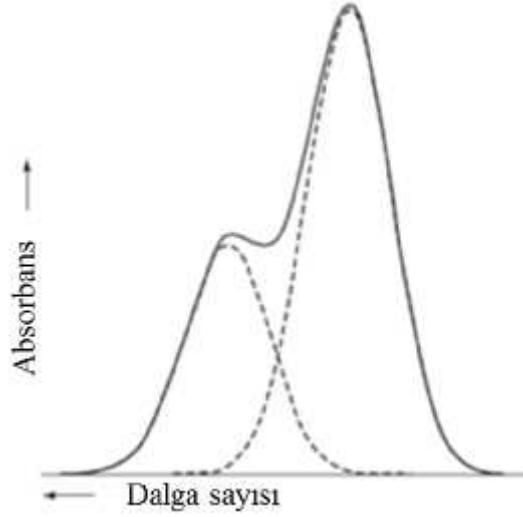
ikincil yapı	Infrared	
	Amid I	Amid II
α -sarmal (α -helix)	1655~1650	~1540
β -yaprak yapısı (β -sheet)	~1690, 1680~1675, ~1640, ~1630	~1550
Tesadüfi kıvrımlar (random coil)	1655~1645	1535~1530
γ -dönü (γ -turn)	~1680, ~1660, ~1640	
Toplanmamış β -yaprak yapısı (aggregated β -sheet)	~1620	

Bununla birlikte, amid I ve amid II bantlarının detaylı kantitatif analizi için çeşitli spektral analiz yöntemleri önerilmiştir. Çoğu, ikinci türev veya dekonvüle edilmiş spektrumlarda zirve atamalarına dayanan frekans tabanlı yöntemlerdir. İkinci türev ve dekonvülasyon bant çözünürlüğünü artırır, bir proteindeki farklı yapıları tanımlamayı ve protein denatürasyonu ile oluşan yapısal değişiklikleri izlemeyi sağlar. Çizelge 2.5'de bir amid I bandının orijinal, dekonvüle edilmiş ve türev spektrumlarını gösterilmektedir (Stuart ve Ando 1997).



ekil 2.5. Amid-I bandının orjinal, dekonvülyasyon ve türevlendirilmiş spektrumları (Stuart and Ando 1997).

Farklı protein sekonder yapılarının (α -sarmal, β -yaprak vb.) niceliksel miktarlarını belirlemek için e ri uydurma, kısmi en küçük kareler analizi, faktör analizi ve sinir a ları (NN) kullanılır. Kantitatif analiz için e ri uydurma sıklıkla kullanılır. ekil 2.6, e ri uydurma i lemini göstermektedir (Severcan vd., 2001, Stuart 2004, Carbonaro ve Nucara 2010). Kısmi en küçük kareler (PLS) yöntemleri matris i lemleri içerir ve faktör analizi (FA) yöntemleri, bir veri kümesindeki varyansı modellemek için fonksiyonları kullanır (Stuart 2004). Yapay sinir a ları (NN), FTIR spektrumlarından proteinlerin ikincil yapısını tahmin etmenin etkili bir yolu olarak bildirilmektedir (Severcan vd., 2001).



ekil 2.6. Kızılötesi bandın e ri uydurma gösterimi (Stuart 2004).

Literatürde protein ve enzimlerin ikincil yapısına de i ik faktörlerin etkisinin FTIR spektroskopisi kullanılarak incelendi i birçok çalı ma bulunmaktadır (Severcan ve Haris, 2003; Gülseren vd., 2007; Jung 2008; Huang vd., 2011). Fakat gıda kaynaklı enzimlerin yapısal de i iminin FTIR spektroskopisi kullanılarak incelendi i ara tırmalar sınırlı sayıdadır. Weemaes vd. (1997) mantar kaynaklı PPO enziminin sıcaklık ve basınç etkisi ile de i imini FTIR spektroskopisi kullanarak incelemi lerdir. Termal inaktivasyonun aktif bölgedeki küçük bir de i iklikten mi yoksa genel bir konformasyon de i iminden mi kaynaklandı nı belirlemek için FTIR spektroskopisi genel bir konformasyon de i iminden kaynaklandı nı yani geri dönü ümsüz oldu unu belirlemi lerdir. Ayrıca FTIR spektroskopisi çalı maları sonucunda sıcaklık ve basıncın neden oldu u denatürasyonun birbirinden farklı oldu unu rapor etmi lerdir.

Benzer ekilde lipoksigenaz enzimine basıncın etkisi FTIR kullanarak belirlenmi tir (Heinisch vd., 1995). Soya fasülyesinden ekstrakte edilen lipoksigenaz enzimi üzerinde 1,2 Gpa'a kadar çe itli basınç de erleri uygulanıp, amid I bandındaki de i iklikler saptanmı tır. Yapılan çalı malarda 600 Mpa'da amid I bandının kayması proteinin ikincil yapısında anlamlı bir de i iklik oldu u yorumunu getirmi tir. Bant geni li i üzerinde yapılan çalı malar bu anlamlı de i ikli in geri dönü ümsüz oldu unu ortaya koymu tur. 600 Mpa 30 dk 40 °C' da yapılan çalı ma ile lipoksigenaz enzim aktivitesinin belirgin ekilde azaldı nı do rulanmı tır. Bu bantların incelenmesi ve çalı manın do rulanmasında FTIR yönteminin oldukça etkili bir yöntem oldu u belirtilmi tir.

Yi vd. (2012) mantar kaynaklı PPO enzimine yüksek hidrostatik basıncın etkisini incelemek için FTIR kullanılmı ve e ri uydurma (curve fitting) yöntemini kullanarak ikincil yapı içeri ini yüzde olarak belirlemi lerdir. PPO'ın ikincil yapısında belirleyici olan -sarmal miktarında, uygulanan yüksek basınç sonucunda önemli miktarda azalma olmu tur. Yüksek basınç uygulanan ve uygulanmayan enzimin ikincil yapıları arasındaki önemli farkın, basınç, farklı sıcaklık, PPO'ın konsantrasyonu ve spektrum analiz metot yönteminden kaynaklanabilece i gibi yorumlar yapılmı tur. Sonuç olarak mantar PPO' sunun yo unlu u yüksek basınç sonucunda azalmı , enzimin üçüncül yapısının de i ti inin göstergesi olan, e ride kırmızı bir kayma gözlemlenmi tir.

Yine mantar PPO enzimine ısı ve termosonikasyonun etkisinin incelendi i çalı malarda enzimin yapısal de i imi FTIR kullanılarak belirlenmi ve uygulanan ısıl i lem ve termosonikasyonun enzimin ikincil yapısı üzerinde geri dönü ümsüz bir inaktivasyona neden oldu u gözlenmi tir(Baltacıo lu vd., 2015; Baltacıo lu vd., 2017). Termal inaktivasyon sonucunda önemli yapısal de i iklikler 40 °C'den sonra gözlenmi ve sıcaklık arttıkça -sarmal ve -yaprak yapıların azaldı ı, -dönü ve tesadüfi kıvrımlar protein denatürasyonunu gösteren topaklanmı yapıların arttı ı gözlenmi tir (Baltacıo lu vd., 2015).

Süt pıhtıla tırıcı enzimler üzerinde yüksek basıncın etkisinin incelendi i bir ba ka çalı mada enzimin ikincil yapısındaki de i im FTIR kullanılarak belirlenmi tir (De Castro Leite Junior vd., 2017). Bu çalı mada farklı kaynaklı süt pıhtıla tırıcı enzimlerin (deve kimosini, dana renneti, domuz renneti, domuz pepsini, Rhizomucor miehei'den proteaz) aktif oldukları artlarda ve tüm enzimler için inaktivasyon ko ullar altında (600 MPa/10-min/25 °C) yüksek basıncın enzimlerin yapısal de i iklikleri üzerinde etkisi incelenmi tir. Bunun sonucunda genel olarak, aktivasyon ko ullarında yüksek basıncın etkisinin bulundu u tespit edildi. Enzimlerin ikincil yapısında önemli de i iklikler gözlenmi tir. Enzimlerin Amid I bölgesinin ikincil türevinin incelenmesinde ana de i ikli in -sarmalda oldu u sonrasında tesadüfi kıvrımlar, -dönü ve yapılarında oldu u belirtilmi tir. Sonuç olarak, yüksek basınç aktivasyon ko ulları altında bile süt pıhtıla ma enzimlerinin etkilendi i belirtilmi tir.

BÖLÜM III

DENEYSEL ÇALI MALAR

3.1 Materyal

Bu çalı mada kullanılan taze eftali (*Prunus persica* L. var. Monroe) Ni de Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Ara tırma ve Uygulama Bahçesinden sa lanmı tır. Meyveler, enzim ekstraktı eldesinden önce 4°C sıcaklıkta depolanmı tır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Enzim ekstraktının hazırlanması

eftaliden enzim ekstraktı elde etmek amacıyla, PPO ve POD enzimleri için iki farklı ekstrakt hazırlanmı tır. Öncelikle bir miktar eftali (tüm halde) iyice yıkandıktan sonra çekirdekleri çıkarılmı ve be -altı parçaya bölünmü tür. Bundan yakla ık 200 g kadar tartılıp beher içine aktarılmı tır. PPO için üzerine daha önce buzdolabında so utulmu 50g/L PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) içeren 50 mM (pH=6,5) potasyum fosfat tamponu 400 mL olarak eklenmi tir. POD için üzerine daha önce buzdolabında so utulmu 50g/L PVPP içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH = 6) 400 mL olarak eklenmi tir. El blender (Arnica orbital mix, Türkiye) çalı tırılarak eftaliler bu so uk tampon çözelti içinde parçalanmı tır. Elde edilen karı ım sekiz katmanlı tülbentten süzölmü ve süzöntü 2057 × g, 15 dakika ve 4°C' de santrifüj (Nüve marka NR 800R model, Türkiye) edilmi tir. Santrifüj sonunda katı kısım atılmı , geriye kalan ham protein ekstraktını içeren sıvı enzim ekstraktı olarak kullanılmı tır. Elde edilen ekstraktların bir kısmı kontrol olarak ayrılmı ve analizlerin yapılması için hava almayacak ekilde a zı sıkıca kapatılan bir i e içinde -18°C sıcaklıkta analiz anına kadar depolanmı tır. Geri kalan enzim ekstraktlarına ısıl i lem uygulanmı ve sonrasında aktivite ve yapısal analizler gerçekte tirilmi tir (Liu vd., 2015b).

3.2.2 Isıl i lem uygulaması

Elde edilen enzim ekstraktları farklı sıcaklık ve sürenin etkisini belirlemek için ısıl i leme tabi tutulmu tur. Enzim ekstraktları 50 ml hacme sahip santrifüj tüpü içine konularak, su banyosu (Yüksel Kaya Makine, YKM-AS209, Türkiye) içine yerle tirilmi tir. Örneklere farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60 ve 70°C) ve farklı sürelerde (10, 20, 30 dakika) ısıl i lem uygulanmı tur. lem boyunca örnek sıcaklı ı dijital sıcaklık ölçer kullanılarak kontrol edilmi tir. Örnek sıcaklı ı istenen de ere ula tı ında ısıl i lem ba latılmı tur. Örnekler enzim aktivitelerinin ölçümü için ısıl i lemin hemen sonrasında buzlu su banyosuna alınmı tur. Her bir uygulama üç kez tekrarlanmı tur. kincil yapı analizi için hava almayan bir i e içinde -18°C sıcaklıkta analiz anına kadar depolanmı tur.

3.2.3 Kalan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.3.1 Kalan PPO aktivitesinin belirlenmesi

naktivasyon sonunda PPO enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmi tir. Bu amaçla Thermo Scientific marka Evolution 300 model (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) spektrofotometre kullanılmı tur. PPO enzim aktivitesi 420 nm dalga boyunda absorbans artı ı ölçülerek belirlenmi tir. Enzim aktivitesi tayini için, 2 ml 50 mM (pH=6,5) potasyum fosfat tamponu ve 0,3 ml fosfat tamponu (pH=6,5) içinde çözünmü 0,25 M kate ol (Sigma) solüsyonu karı ımına 0,3 ml ekstrakt eklenmi , vorteks ile karı tırdıktan sonra absorbans de erleri 3 dakika boyunca 5 saniyede bir kaydedilmi tir. Aktivite ölçüm sıcaklı ı $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'dir. PPO enzim aktivitesi zamana kar ı çizilen A_{420} grafi inin ilk do rusal kısmının e iminin belirlenmesiyle, birim zamanda absorbanstaki 0,001'lik de i im olarak ifade edilmi tir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmi tir (Sun ve Song, 2003).

3.2.3.2 Kalan POD aktivitesinin belirlenmesi

naktivasyon sonunda POD enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmi tir. Bu amaçla Thermo Scientific marka Evolution 300 model

spektrofotometre kullanılmı tır. Peroksidaz aktivitesi substrat olarak pirogallol kullanılarak belirlenmi tır. 1 mL örnek, 1,52 mL 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.0), 0,32 mL %5 pirogallol ve 0,16 mL 0,147 M H₂O₂ karı tırılmı tır. Reaksiyon H₂O₂ ilavesi ile ba latılmı ve absorbandaki artı 3 dakika boyunca 5 saniyede bir kaydedilmı tır. Aktivite ölçüm sıcaklı ı $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'dir. Enzim aktivitesi zamana kar ı çizilen A₄₂₀ grafi inin ilk do rusal kısmının e iminin belirlenmesiyle, birim zamanda absorbanstaki 0,001'lik de i im olarak ifade edilmı tır. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmı tır (Abid vd., 2014).

3.2.3.3 D ve z de erinin hesaplanması

Farklı sıcaklıklarda uygulanan ısıl i lem süresinin PPO ve POD enzimlerine etkisini de erlendirmek ve PPO ve POD enzimlerinin ısıl dirençlerini kar ıla tırmak için D ve z de eri hesaplanmı tır. D de eri, desimal azalma zamanı olarak da adlandırılmakta ve sabit bir sıcaklıkta enzim aktivitesinde % 90'lık bir azalma elde etmek için gerekli olan süre olarak tanımlanmaktadır. D de eri, $\log (E_t/E_0)$ 'ın zamana kar ı çizilen grafi inin e iminden hesaplanmaktadır. Bu grafi in e imi $1/D$ 'ye e ittir. z de eri, desimal azalma süresinin (D) sıcaklı a ba ımlılı nı ifade eden ve enzimin ısıl direncini yansıtan bir parametredir. z de eri, D de erinde bir log'lık azalma sa lamak için (% 90 oranında) gerekli olan sıcaklık artı ıdır. Sıcaklı a kar ı LogD grafi i çizilerek elde edilen do runun e imi $1/z$ 'yi vermektedir.

3.2.4 Enzim inaktivasyon mekanizmasının FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi

Enzim inaktivasyon mekanizması Fourier Dönü üm Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak belirlenmi tır. Örneklerin absorbsiyon spektrumu Ni de Ömer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında bulunan ATR hücreesine sahip FTIR spektroskopisi (Bruker, Almanya) kullanılarak, 2 cm^{-1} çözünürlükte 128 tarama yapılarak $1400\text{-}2200 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde elde edilmı tır. Havanın spektrumu arka plan olarak kaydedilmı ve spektrumlardan otomatik olarak çıkarılmı tır. Örneklerdeki suyun protein bantlarını kapatmasından dolayı tampon çözelti ahit olarak kullanılmı ve OPUSNT (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) programı kullanılarak örnek spektrumlarından bu spektrum çıkarılarak protein bantları elde edilmı tır. Çıkarma

ileminde 2125 cm^{-1} civarında bulunan su bandı düzleştirildi. Protein bantlarında kırılma yapının analizi için bantlara Fourier self dekonvolüsyon (FSD) uygulanmıştır. Fourier self dekonvolüsyonda absorban spektrumu için yarım bant genişliği 8 cm^{-1} ve çözünürlük artırma faktörü $k = 2,4$ olarak kullanılmıştır. Ayrı ayrı spektrumlar Lorentz bant profillerine göre düzenlenmiştir. Enerji uydurma analizi Grams 32 (Galactic Industries, Salem, NH, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Altındaki grupların eğrileri Gaussian olarak seçilmiştir. Yinelemeler korelasyon 0.995'ten daha iyi olana kadar gerçekleştirilmiştir (Baltacıoğlu vd., 2015).

3.2.5 Statiksel Analiz

Veriler Minitab 16 (Minitab Inc.State College, PA, ABD) paket program kullanılarak % 95 güvenlik aralığında analiz edilmiştir, verilerin analizinde tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için Tukey's çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Her bir deney üç kez tekrarlanmıştır.

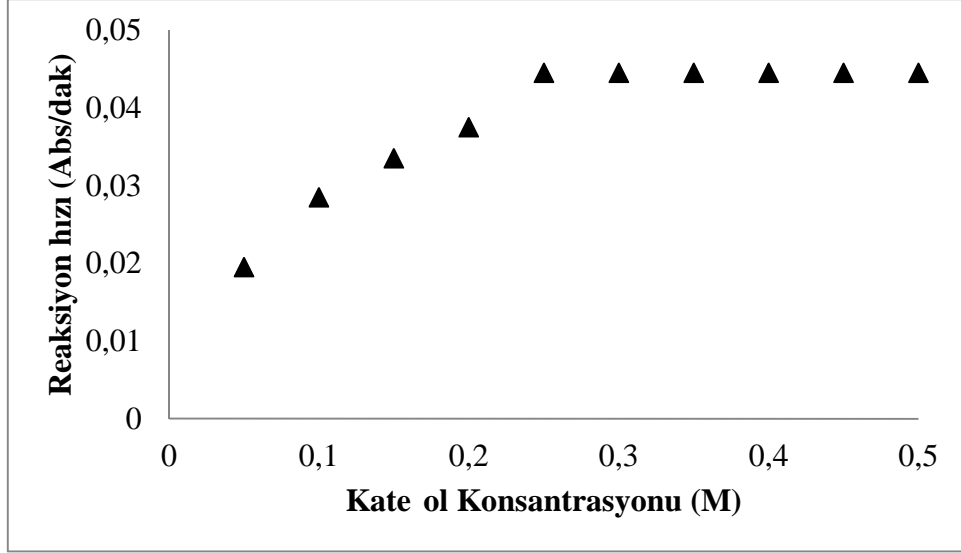
BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTI MA

4.1 Isıl İlemler Sırasında Etkili PPO Aktivasyonu

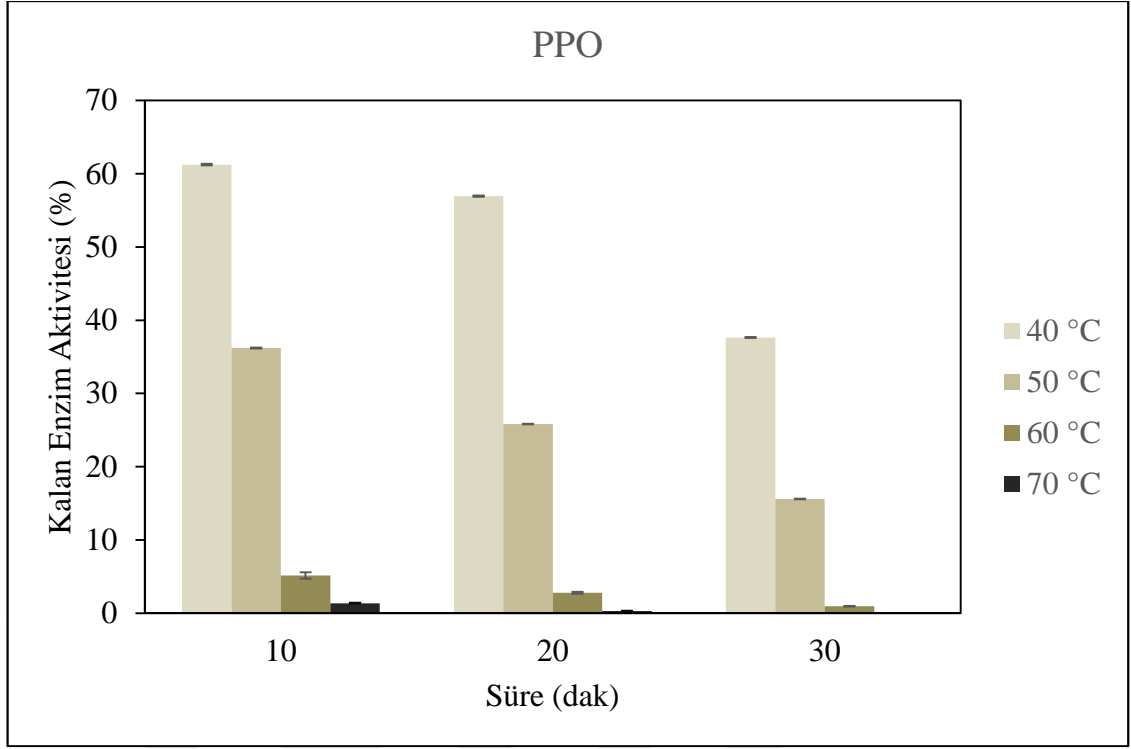
PPO, bitkilerde enzimatik esmerleşmenin ana nedeni olan en önemli enzimlerden biridir. Enzimatik esmerleşme, o-difenollerin, moleküler oksijen varlığında PPO enzimi tarafından stabil olmayan kinonlara oksidasyonunun bir sonucudur. o-kinonlar yüksek derecede reaktif bileşiklerdir ve diğer fenoller ve fenolik olmayan bileşiklerle reaksiyona girerek kahverengi pigmentler oluşturur. Bu reaksiyonlar, gıda ürünlerinin lezzetini, rengini ve besleyici değerini de etkileyebilmektedir. Bu nedenle, gıda işlemlerinde özellikle meyve suyu sektöründe PPO aktivitesinin kontrolü önemlidir (Cemeroğlu vd., 2001).

PPO aktivite ölçümünde, substratın harcama veya ürün oluşum oranı belirlenmektedir. Reaksiyon hızlarının ölçülmesi için en kolay yöntem ürün oluşumunun belirlenmesidir. Ürün oluşumu, kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik yoğunluğunun ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. PPO aktivite ölçümünde en uygun substrat kateoldir (Torralles vd., 2005). PPO aktivite ölçümünde kullanılacak optimum substrat konsantrasyonu, farklı substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızları belirlenerek ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, enzim aktivitesinin belirlenmesi için optimum substrat konsantrasyonu 0,25 M kateoldü olarak seçilmiştir. Substrat çözümü içindeki kateoldü konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



ekil 4.1. Farklı kate ol konsantrasyonlarına karşı reaksiyon hızı grafiği

Isıl işlem, enzimleri inaktive etmek için meyve suyu üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstrakte edilen ehtali PPO enziminde, ısı işlem su banyosunda sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi numuneler deney sıcaklığına ulaştırıldığında, zamanlama başlatılmış ve kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı sürelerde ısı işlem uygulanmıştır. Buna göre ehtali PPO enzimi için farklı sıcaklık ve sürelerde belirlenen kalan enzim aktivitesi ekil 4.2’de gösterilmektedir.



ekil 4.2. Isıl i lem süresince eftali PPO enziminin kalan enzim aktivitesi

Grafik e göre, 40 ° C sıcaklıkta, ısıl i lem uygulaması boyunca 30 dakikalık sürede enzim aktivitesinde hafif bir dü ü gözlenmi tir. 40 ° C’de kalan enzim aktivitesi, 10, 20 ve 30 dakikalık ısıl i lemden sonra sırasıyla %61,23 ± 0,11; %56,93 ± 0,1 ve %37,63 ± 0,07 olarak saptanmı tir. 50 ° C ile 70 ° C arasında, daha yüksek inaktivasyon sa lanmı tir. eftali PPO inaktivasyon oranının sıcaklı a ba lı oldu u ve artan sıcaklık ve zaman ile arttı ı belirlenmi tir (p <0.05).Ayrıca zaman ve sıcaklık arasında önemli bir etkile im (p <0.05) oldu u gözlenmi tir. Kalan enzim aktivitesi,50°C sıcaklıkta ısıl i lemden sonra artan sürelerde sırasıyla %36,21± 0,07; %25.84± 0,05; %15.61± 0,03 olarak saptanmı tir. 60 ° C sıcaklıkta 30 dakika sonunda % 99’luk inaktivasyon, tespit edilmi tir. Aynı sıcaklıkta 10 ve 20 dakika sonunda kalan enzim aktivitesinin sırasıyla %5,17± 0,45 ve %2,8± 0,13 oldu u gözlemlenmi tir. 70 ° C sıcaklıkta 10 dakika sonunda % 99’luk inaktivasyon, tespit edilmi tir.

Benzer eilde yapılan bir çalı mada Hale Haven eftalisinde 30-55°C arasındaki sıcaklıkların 5 dakika süren etkisinin, PPO enzim aktivitelerini çok az düzeyde dü ürdü ü, buna ra men 55°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda inaktivasyonun çok hızlandı ı belirlenmi tir. 70 ° C’ de 5 dakikalık ısıl i lem ile kalan aktivite % 21 olarak saptanmı tir (Yemenicio lu ve Cemero lu 1998). Bir ba ka çalı mada Jubileu cinsi et

eftalisinde 70 °C’ de 550 sn’ de PPO enzim aktivitesinin %95’ nin kayboldu u gözlenmi tir (Lopes vd., 2014). Granada cinsi et eftalisinden ekstrakte edilen PPO enziminin kate ol varlı nda yapılan 55 °C’ nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesinin hızlıca dü tü ü gözlemlenmi tir. 60 °C’ de 540 sn’de aktivitesinin %80’ nin kayboldu u belirlenmi tir (Toralles vd., 2005, Liu vd., 2015a) eftaliden (*Prunus persica* L. Batsch) elde edilen PPO enziminin ısıl inhibisyonunda, pH 6,8’ de kalan enzim aktivitesini 70 °C’de 9 dakikalık inkübasyondan sonra % 20,36; 60 ° C’de ise 10 dakikalık inkübasyondan sonra aktivite yakla ık% 82,99 olarak tespit etmi tir. Görüldü ü gibi yapılan çalı malarda 50 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda PPO inaktivasyonu hızlanmaktadır fakat farklı eftali çe itlerinden elde edilen PPO enziminin ısıl direnci farklılık göstermektedir. Bu çalı mada bulunan sonuçlar literatürde belirlenenler sonuçlar ile uyumlu bulunmu tur.

PPO enzimi için, farklı sıcaklıkta uygulanan ısıl i lemin etkinli ini incelemek D de eri ve enzimin ısıl direncini belirlemek için z de eri hesaplanmı ve de erler Çizelge 4.1’ de gösterilmektedir.

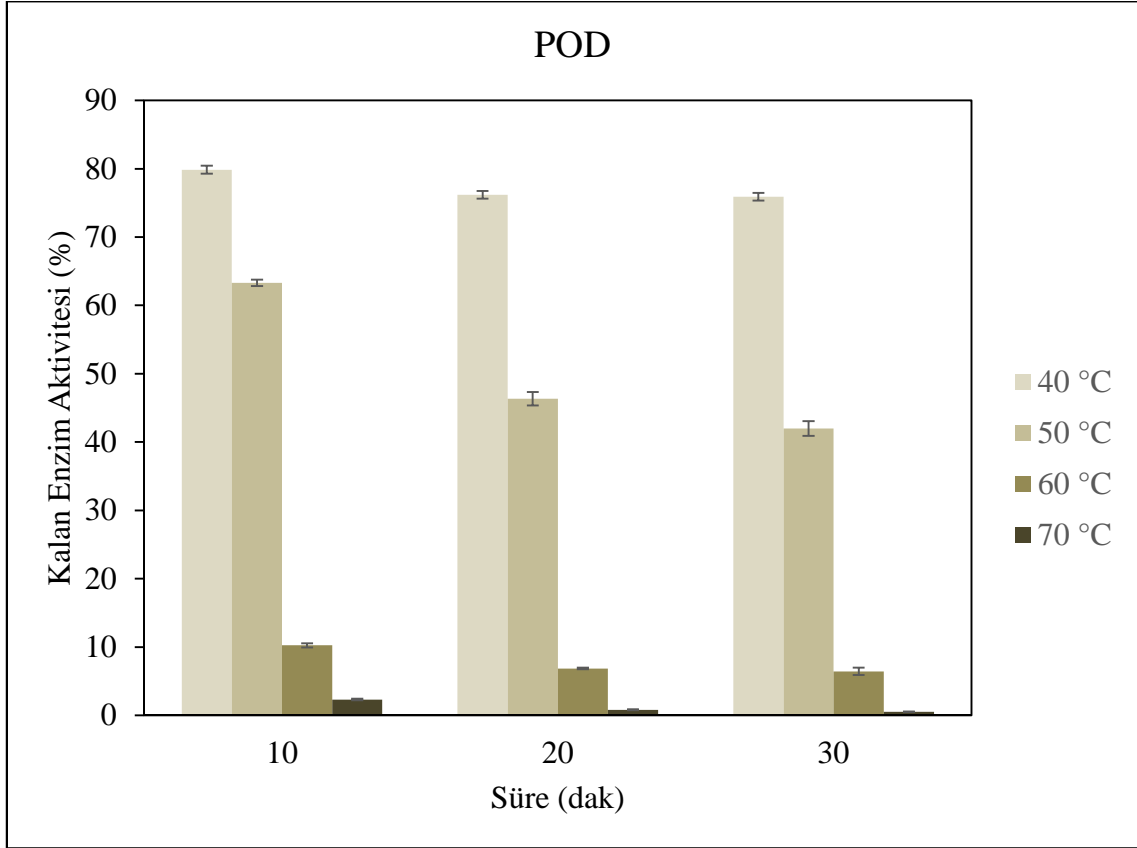
Çizelge 4.1. Isıl i lem ile PPO inaktivasyonu için D ve z de erleri

Sıcaklık (°C)	D-de eri (dak)
40	175,80
50	89,61
60	36,61
70	23,91
z de eri (°C)	3,35

Sonuçlar incelendi inde uygulanan sıcaklık arttıkça D de erinin azaldı ı gözlenmi tir. Benzer ekilde Liu vd. (2015a) eftaliden (*Prunus persica* L. Batsch) elde edilen PPO enziminin ısıl inhibisyonunda, D de erlerinin sıcaklık arttıkça azaldı ını ve pH 6,8’ de D₆₀, D₇₀, D₈₀ ve D₉₀ de erlerini sırasıyla 68,97; 12,82; 1,98; 0,83 dakika olarak belirlemi tir. Jubileu cinsi et eftalisinde PPO enzim için D₆₀ de eri 17,3 dakika olarak bulunmu tur (Lopes vd., 2014). D de erleri kar ıla tırıldı nda farklılıklar gözlenmi , bu durum PPO enzimi ısıl direncinin eftali çe idine ba lı oldu unu göstermektedir.

4.2 Isıl i lem Sırasında eftali POD naktivasyonu

eftali POD enzimi için farklı sıcaklık ve sürelerde belirlenen kalan enzim aktivitesi ekil 4.3' de gösterilmektedir.



ekil 4.3. Isıl i lem süresince eftali POD enziminin kalan enzim aktivitesi

Kalan enzim aktivitesi de erleri incelendi inde eftali POD enziminin, PPO enzimine kıyasla ısıya daha dirençli oldu u görülmektedir. Özellikle dü ük sıcaklıklarda (40 ve 50 °C), POD enzim aktivitesinde ölçülen azalmanın yüksek sıcaklıklar ile kar ıla tırıldı nda daha yava oldu u gözlenmi tir. eftali POD' ının kalan enzim aktivitesi, 40 ° C'de, 10, 20 ve 30 dakikalık ısıl i lemden sonra sırasıyla %79,89 ± 0,6; %76,18 ± 0,57 ve %75,91 ± 0,57 olarak saptanmı tir. 50 ° C'de, 10, 20 ve 30 dakikalık ısıl i lemden sonra sırasıyla %63,32 ± 0,47; %46,34 ± 0,98 ve %41,98 ± 1,09 olarak ölçülmü tür. Buna ra men, 60 °C ve 70 °C'de, inaktivasyon hızı artmı tir. eftali POD inaktivasyonu, PPO enziminde oldu u gibi sıcaklı a ba lıdır ve artan sıcaklık ve zaman ile artı gözlenmi tir (p <0.05). Kalan enzim aktivitesi 60 ° C'de, 10, 20 ve 30 dakikalık ısıl i lemden sonra sırasıyla %10,24 ± 0,32; %6,86 ± 0,11 ve %6,42 ± 0,54 olarak

belirlenmi tir. 70 °C sıcaklıkta 10 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi $2,3 \pm 0,12$ olarak saptanmı tır ve 20 dakika sonunda % 99'luk inaktivasyon tespit edilmi tir.

Benzer ekilde yapılan bir çalı mada eftali (*Prunus persica* L. var. Rei da Conserva) suyu POD enziminde 65 °C' de 4 dakika sonunda kalan aktivite %20 olarak belirlenirken, 70 °C' de 3 dakikada ve 75 °C' de 1 dakikada POD enzim aktivitesinin %95' nin kayboldu u belirlenmi tir (Neves 2002). Jubileu cinsi et eftalisinde POD enzimi 65 °C' de 150 sn de aktivitenin % 95 'ini kaybetmi tir (Lopes vd., 2014).Granada cinsi et eftalisinden ekstrakte edilen POD enziminin 60°C' de 180 saniyede aktivitesinin yakla ık %80' ninin kayboldu u belirlenmi tir (Toralles vd., 2005). Yapılan çalı malarda artan sıcaklık ve süre ile POD inaktivasyonu hızlanmaktadır fakat farklı eftali çe itlerinden elde edilen POD enziminin uygulanan ısı i lem parametrelerine göre inaktivasyon süreleri farklılık göstermektedir.

Farklı sıcaklıkta uygulanan ısı i lemin etkinli ini incelemek POD enzimi için D ve z de eri hesaplanmı ve Çizelge 4.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Isıl i lem ile POD inaktivasyonu için D ve z de erleri

Sıcaklık (°C)	D de eri (dak)
40	606,05
50	181,34
60	61,41
70	31,50
z de eri (°C)	23,15

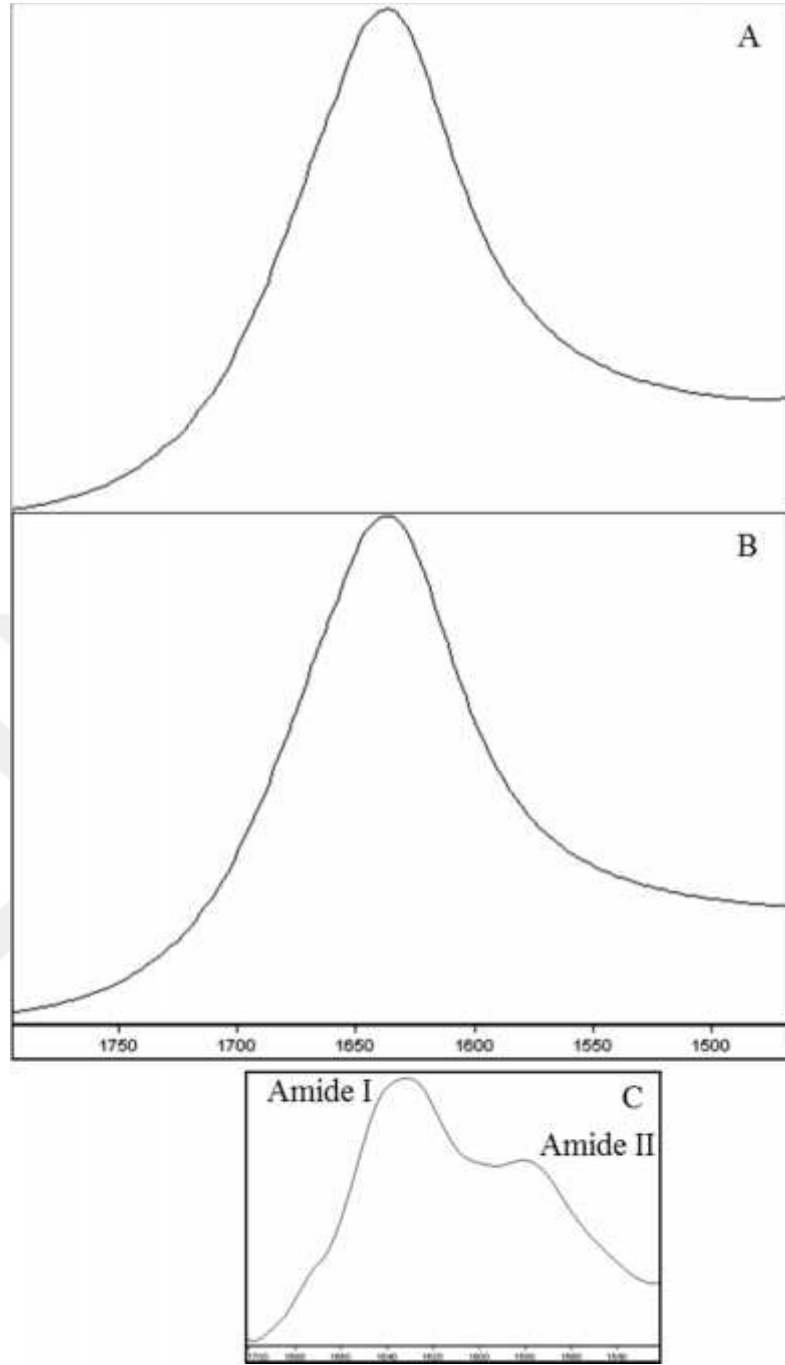
Benzer ekilde POD için de uygulanan sıcaklık arttıkça D de erinin azaldı ı gözlenmi tir. Bununla beraber farklı eftali türlerinden elde edilen POD enziminin ısı i direnci farklılık göstermektedir. Jubileu cinsi et eftalisinde POD enzim için D₆₀de eri 2,4 dakika olarak belirlenmi tir (Lopes vd., 2014). Çalı mamızda kullandı ımız eftaliden (*Prunus persica* L. var. Monroe) elde edilen PPO ve POD enzimi için D de erleri kar ıla tırıldı ında; PPO için D₇₀ de eri 23,91 dakika, POD için D₇₀ de eri 31,50 dakika olarak belirlenmi tir. Buna göre POD enziminin ısı i direncinin PPO enzimine göre daha yüksek oldu u görülmektedir. Fakat yapılan çalı malarda Jubileu ve

Granada cinsi eftalilerde PPO enziminin ısı direncinin POD enzimine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lopes vd., 2014, Toralles vd., 2005).

z de eri enzimin ısı direncini yansıtan bir di er parametredir ve bu de er ne kadar yüksek ise enzim sıcaklığı a o oranda dayanıklı olmaktadır. Buna göre PPO ve POD için z de eri sırasıyla 3,35 ve 23,15 olarak belirlenmiştir. z de erleri kıyaslandığında, eftali POD için bu de erin daha yüksek olduğu belirlenmiştir yani POD enziminin sıcaklığı a PPO enzimine göre daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

4.3 FTIR Çalışmaları

Bu çalışma enzimin ikincil yapısı FTIR spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla enzim ekstraktlarına farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60 ve 70 °C) 10 dakika boyunca ısı işlemi uygulanmış ve ısı işlemi sonucunda FTIR spektrumları ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak ısı işlemi uygulanmamış enzim ekstraktı alınarak oda sıcaklığında (25 °C) FTIR spektrumları belirlenmiştir. Su bandının protein bandını kapatmasından dolayı örnek spektrumundan tampon çözelti spektrumu çıkarılarak protein bantları elde edilmiştir. Enzim çözeltisi, tampon çözelti spektrumu, ve protein bantlarının çıkarılmış spektrumu ekil 4.4’de gösterilmiştir.

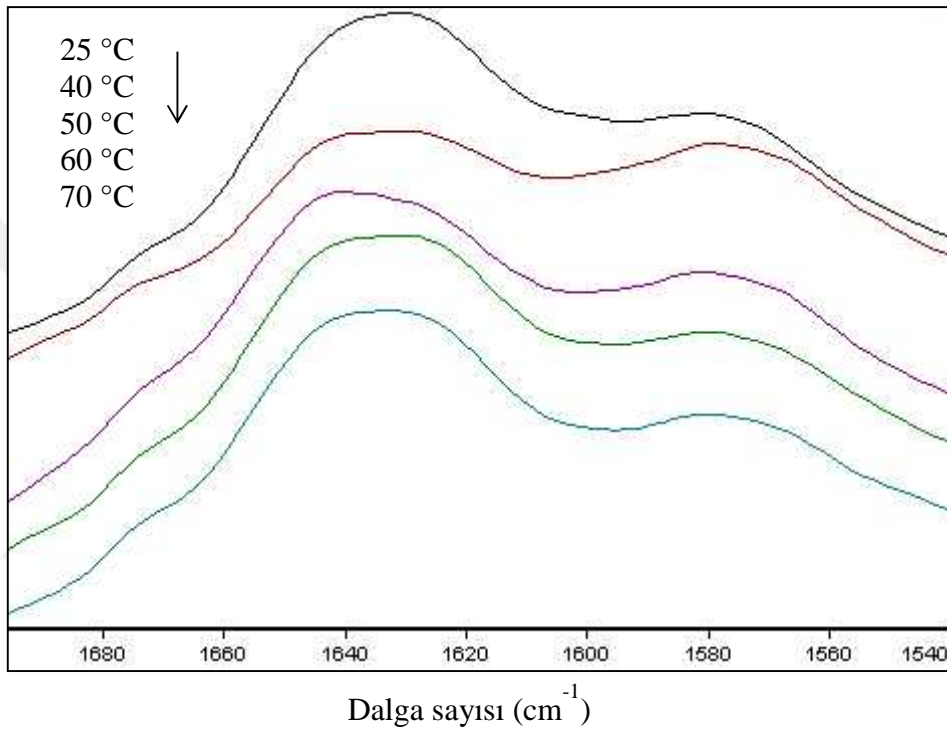


ekil 4.4. Örnek (A), tampon çözelti spektrumu (B), ve protein bantlarının çıkarılması spektrumu (C)

Elde edilen protein spektrumunda 1700 ile 1600 cm^{-1} arasında elde edilen bant Amid I bandıdır ve proteinlerin ikincil yapısının analizi için en kullanı lı kızılötesi banttır. Amid I bandı, N-H e ilme ve C-N gerdirme modlarına ba lı, amid grubunun C = O germe titre iminin% 80'ini temsil eder.1550 cm^{-1} de erindeki pik, peptid omurgasının N-H e ilme (% 60) ve C-N gerdirme (% 40) titre imine ba lı olan Amid II bandı olarak atanmı tır (Stuart 2004, Haris ve Severcan 1999).

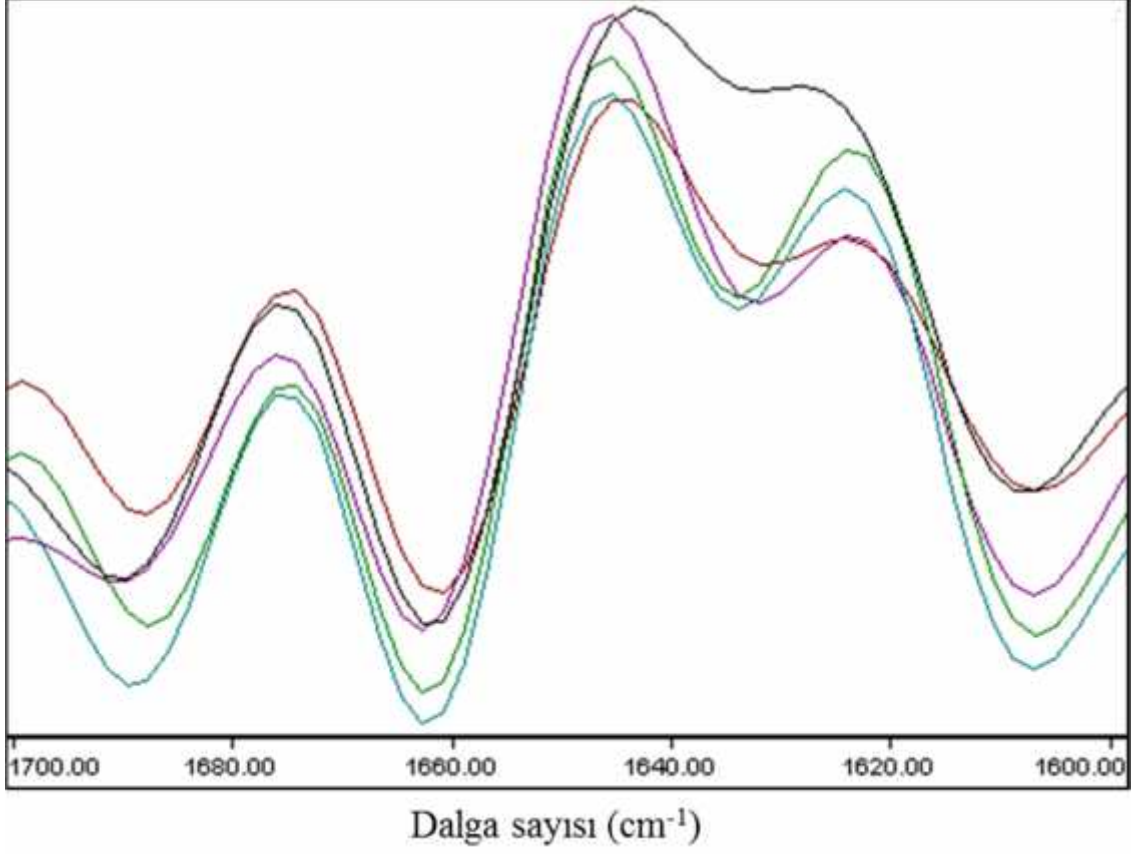
4.3.1 Isıl i lemin eftali PPO enzimi ikincil yapısı üzerine etkisi

1700 - 1540 cm^{-1} bölgesindeki, farklı sıcaklıklarda kaydedilen PPO' in absorbands spektrumları ekil 4,5'de gösterilmi tir. Amid I bandının yo unlu unun 25 - 70 $^{\circ}\text{C}$ arasında sıcaklık arttı nda azaldı ı gözlenmi tir. Bu, enzimin ikincil yapısında bir de i iklik oldu unu göstermektedir. Benzer ekilde ba ka bir çalı mada ısıl i lem ile mantar PPO enziminin Amid I bandının azaldı ı bildirilmi tir (Baltacıo lu vd., 2015).



ekil 4.5. 25-70 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralı nda PPO' in absorbands spektrumları

Isıl i lem süresince PPO enziminin ikincil yapı de i imlerini detaylı olarak belirleyebilmek için Amid I bandına Fourier self dekonvülasyon (FSD) i lemi uygulanmı ve bantların ayrı ması sa lanmı tir. ekil 4.6' da, 25-70 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralı nda ölçülen 1700 - 1600 cm^{-1} bölgesindeki eftali PPO enziminin ayrı tırılmı spektrumları gösterilmi tir.



ekil 4.6. 25-70 °C sıcaklık aralı ında PPO'nun ayrı tırılmı spektrumları (25 °C (), 40°C (), 50 °C (), 60 °C () ve 70 °C ())

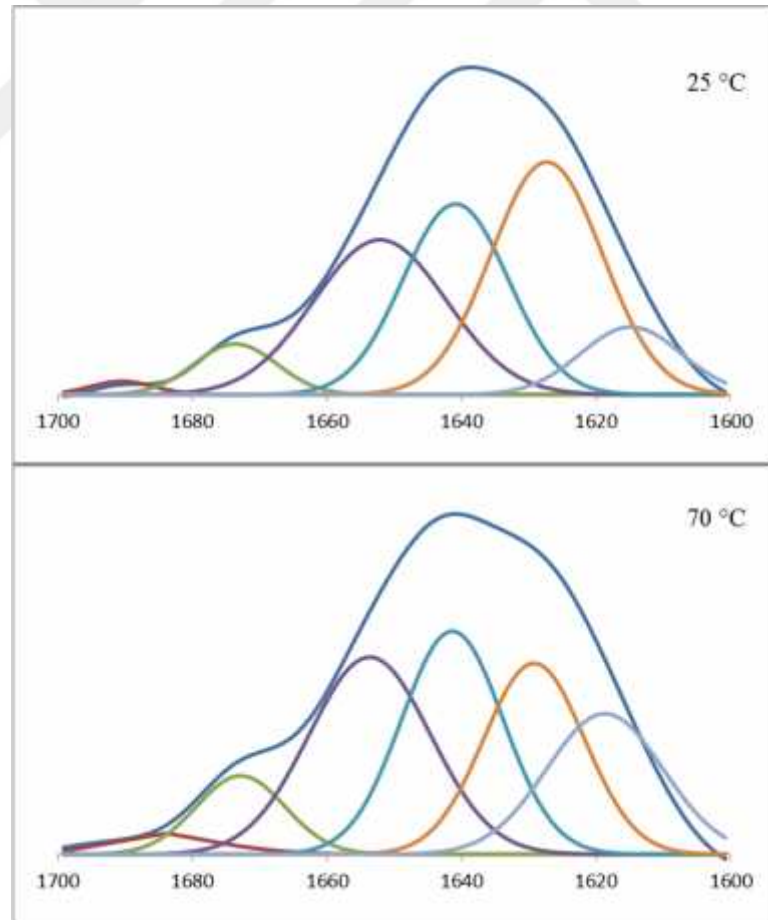
Yapılan çalı malarda ayrı tırılmı spekturumlarda elde edilen 1653 cm⁻¹'deki amid I bandının -sarmal yapısına, 1676 cm⁻¹'de bulunan bandın -dönü yapısına, 1695 ve 1636 cm⁻¹'deki bantlar sıklıkla -yaprak yapısına, 1640 cm⁻¹'deki bantlar tesadüfi kıvrım yapısına, 1617 cm⁻¹ civarında bulunan pik toplanmı - yaprak yapısına ba lı oldu u ortaya çıkarılmı tır (Severcan and Haris 2003, Murayama and Tomida 2004).

eftali PPO ayrı tırılmı spektrumları incelendi inde 1695, 1676, 1645 ve 1626 cm⁻¹'de pikler gözlemlenmi tir.1695 cm⁻¹'de belirlenen pikin -yaprak yapısından, 1676 cm⁻¹'de belirlenen pikin -dönü yapısından kaynaklandı ı görülmektedir. 1645 cm⁻¹'de belirlenen pikin aynı ve yüksek oranlarda olmasından dolayı -sarmal ve tesadüfi kıvrımların birle imini ifade eden tek bir pik olarak gözlemlendi i tahmin edilmektedir. Aynı ekilde 1626 cm⁻¹'de gözlemlenen pikin -yaprak ve toplanmı - yaprak yapılarının birle imi ekinde görüldü ü dü ünülmektedir.

Sıcaklık artışı ile birlikte α -dönü, β -sarmal ve tesadüfi kıvrım yapılarından kaynaklanan piklerde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte 1626 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik azaldığı ve tepe noktasının 1620 cm^{-1} 'e doğru kaydığı belirlenmiştir. Bu değişimin β -yaprak yapısında azalma olmasıyla birlikte toplam β -yaprak yapısının artmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde mantar PPO enziminin ısıl inaktivasyonunun incelendiği bir çalışmada artan sıcaklık ile toplam β -yaprak yapısının oluştuğu gözlenmiştir (Baltacıoğlu vd., 2015).

4.3.2 Eftali PPO ikincil yapı bileşenlerinin FTIR uydurma yöntemi ile analizi

PPO enziminin ikincil yapı bileşenlerinin ısıl değişim süresince değişimini (%) belirlemek için FTIR uydurma analizi $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde uygulanmıştır. Kontrol örneği ve $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da 10 dakika süresince inaktive edilmiş örnek için yapılan FTIR uydurma analizi sonucu elde edilen bantlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Eftali PPO enzimi için Amid I bandının FTIR uydurma analizi

Buna göre 1690 cm^{-1} 'deki -yaprak yapı, 1673 cm^{-1} 'deki -dönü , 1652 cm^{-1} 'deki -sarmal, 1640 cm^{-1} 'deki tesadüfi kıvrımlar, 1630 cm^{-1} 'deki -yaprak yapı ve 1615 cm^{-1} 'deki toplamı -yaprak yapıyı ifade eden bantlardır. Elde edilen bant alanlarına göre % da ılım belirlenmi ve Çizelge 4.3' de gösterilmi tir.

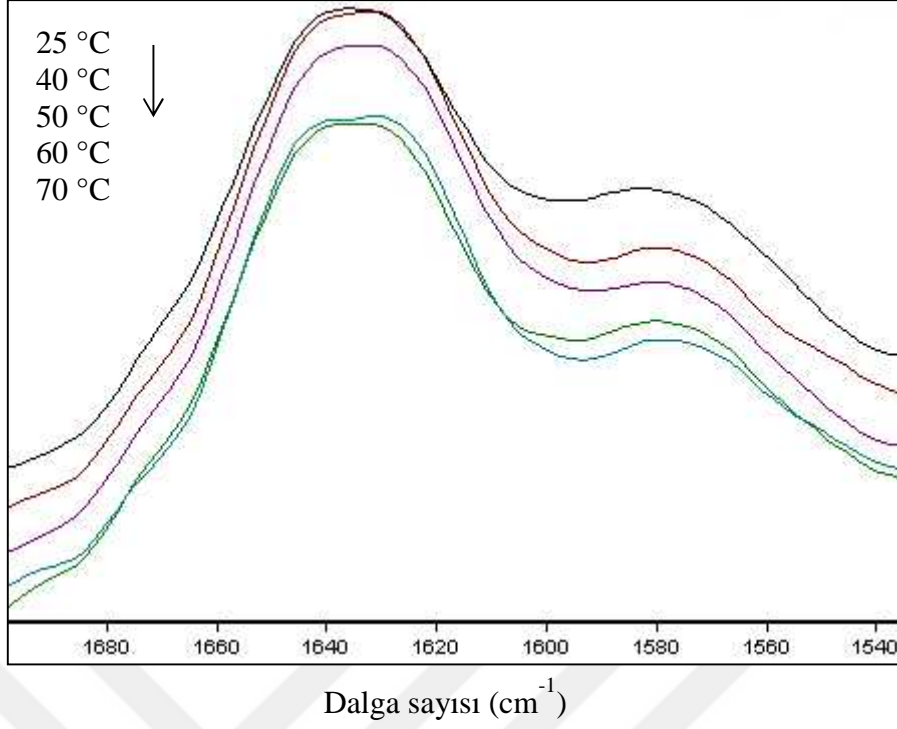
Çizelge 4.3. E ri uydurma analizi ile belirlenen eftali PPO enziminin ikincil yapısındaki de i im (%)

ikincil yapı bile enlerinin da ılımı (%)	25 °C	70 °C
-sarmal	29,36	23,25
-yaprak yapı	32,65	25,52
-dönü	5,13	7,89
Tesadüfi kıvrımlar	24,59	24,97
Toplanmı -yaprak yapı	8,28	18,37

Buna göre ısıl i lem süresince -sarmal ve -yaprak yapının miktarı azalmı , -dönü ve toplamı -yaprak yapının miktarı artmı tir. 1640 cm^{-1} 'deki tesadüfi kıvrımların miktarında önemli bir de i im olmamı tir. -sarmal ve -yaprak yapının miktarının azalması, -dönü ve toplamı -yaprak yapının miktarının artması protein denatürasyonunu ifade etmektedir. Aynı de i im ısıl i lem süresince mantar PPO enziminin ikincil yapı analizinde de gözlenmi tir (Baltacıo lu vd., 2015).

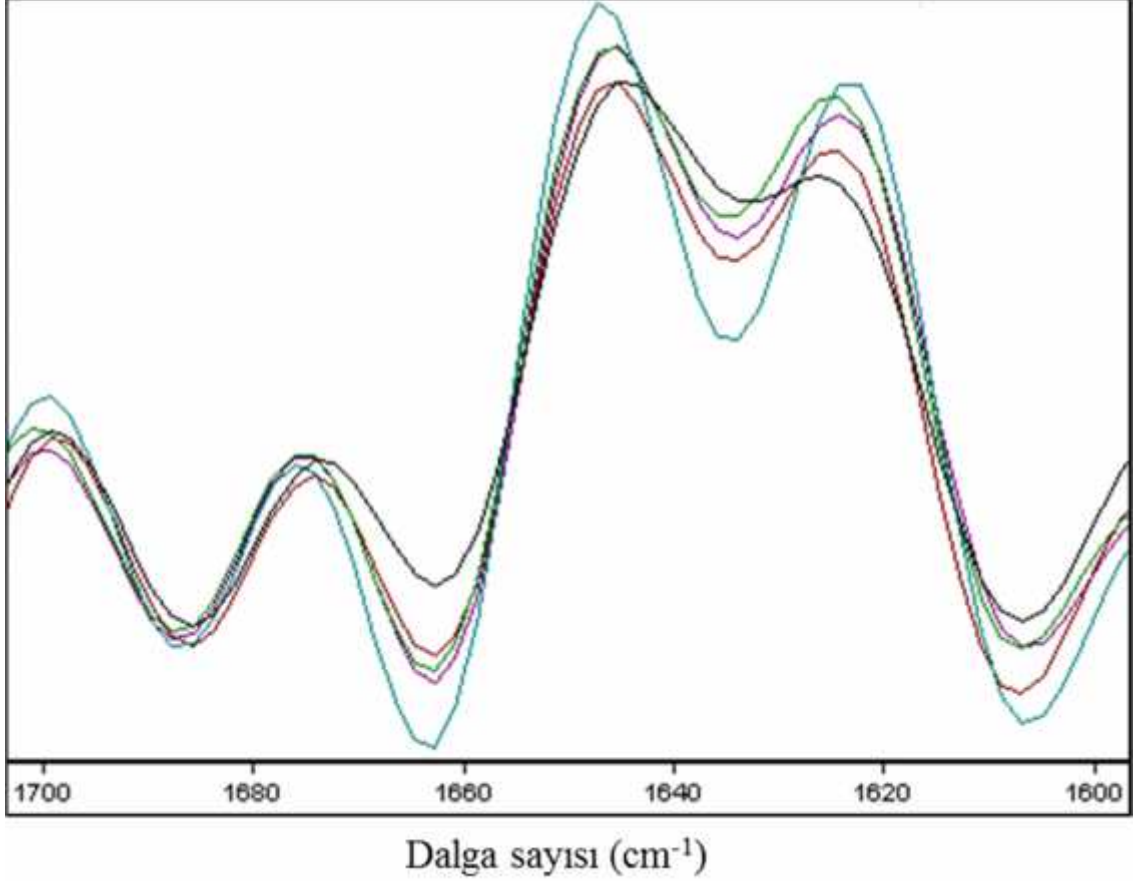
4.3.3 Isıl i lemin eftali POD enzimi ikincil yapısı üzerine etkisi

eftali POD enzimi için 1700 - 1540 cm^{-1} bölgesinde, farklı sıcaklıklarda kaydedilen absorban spektrumları ekil 4.8'de gösterilmi tir. Sıcaklık artı ı ile enzimin ikincil yapısında bir de i iklik oldu unu ifade eden Amid I bandının yo unlu unun azaldı ı gözlenmi tir.



ekil 4.8. 25-70 °C sıcaklık aralı ında PPO' ın absorbans spektrumları

eftali POD enziminin ikincil yapı de i imlerini detaylı olarak belirleyebilmek için Amid I bandına Fourier self dekonvülyasyon (FSD) i lemi uygulanmı ve bantların ayrı ması sa lanmı tır. Isıl i lem süresince ölçülen 1700 - 1600 cm⁻¹ bölgesindeki eftali PODenziminin ayrı tırılmı spektrumları ekil 4.9' da, gösterilmı tır.



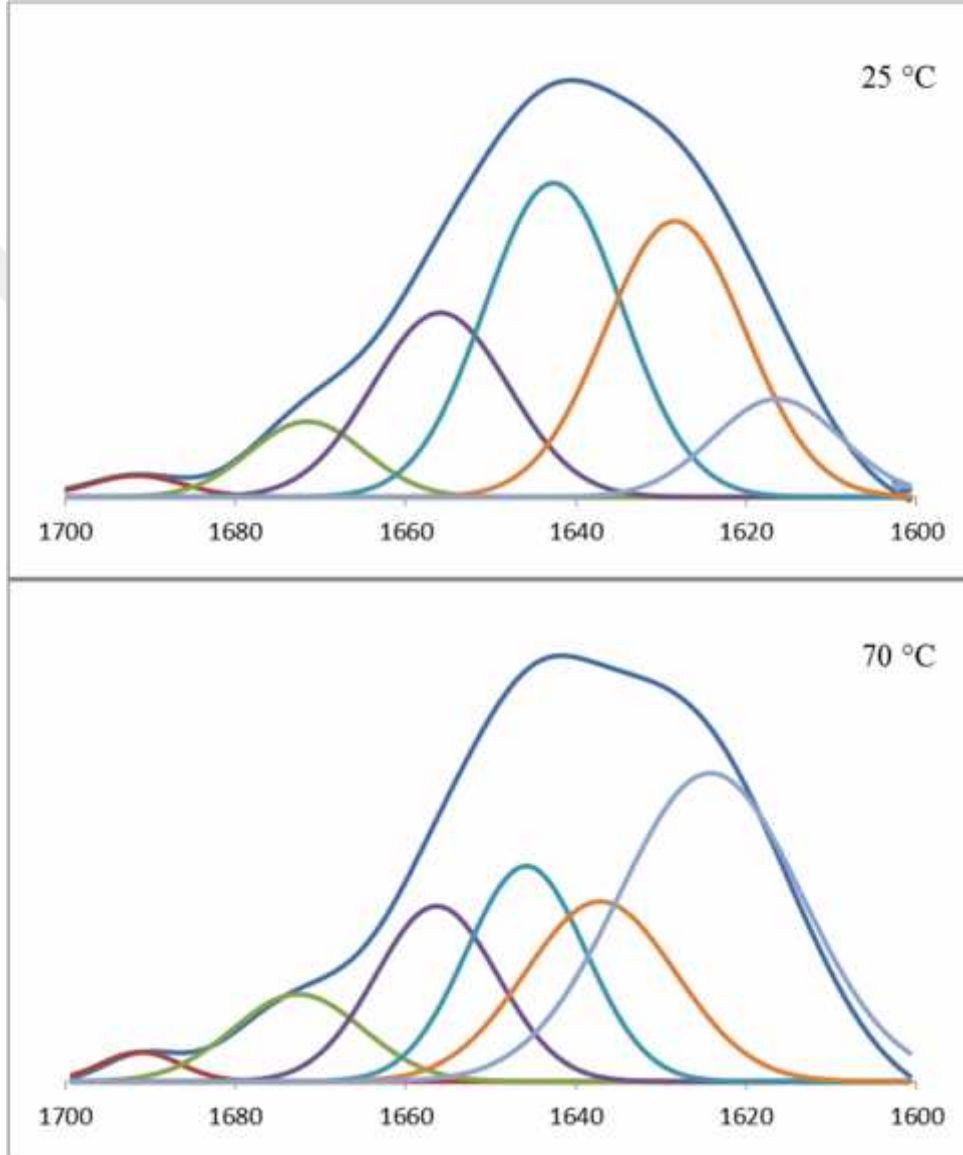
ekil 4.9. 25-70 °C sıcaklık aralığında POD'nin ayrı tırlımı spektrumları (25 °C (), 40°C (), 50 °C (), 60 °C () ve 70 °C ())

eftali PPO enzimi ayrı tırlımı spektrumlarında olduğu gibi POD enzimi için de 1695, 1676, 1645 ve 1626 cm^{-1} 'de pikler belirlenmiştir. 1695 cm^{-1} 'de belirlenen pikin β -yaprak yapısından, 1676 cm^{-1} 'de belirlenen pikin α -dönü yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1645 cm^{-1} 'de belirlenen pikin α -sarmal ve tesadüfi kıvrımların karışımını ifade eden tek bir pik olarak gözlemlendiği düşünülmektedir. Aynı şekilde β -yaprak ve toplam β -yaprak yapılarının birleşimi 1626 cm^{-1} 'de tek bir pik olarak gözlemlenmiştir.

Sıcaklık artışı ile birlikte α -dönü ve tesadüfi kıvrım yapılarında azalma gözlenmiştir. Buna karşın 1645 cm^{-1} 'de gözlenen pikte artış ve 1653 cm^{-1} 'e doğru bir kayma belirlenmiştir. Bunun nedeninin α -sarmal yapının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca 1626 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikin tepe noktasının 1620 cm^{-1} 'e doğru kayması ve oluşan toplam β -yaprak yapısının artmasıyla birlikte pikin artışı belirlenmiştir.

4.3.4 eftali POD ikincil yapı bile enlerinin e ri uydurma yöntemi ile analizi

POD enziminin ikincil yapı bile enlerinin ısıl i lem süresince de i imini (%) belirlemek için e ri uydurma analizi 1600-1700 cm^{-1} bölgesinde uygulanmıştır. Kontrol örne i ve 70 °C' da 10 dakika süresince inaktive edilmi örne k için yapılan e ri uydurma analizi sonucu elde edilen bantlar ekil 4.10' da gösterilmi tir.



ekil 4.10. eftali POD enzimi için Amid I bandının e ri uydurma analizi

Buna göre 1690 cm⁻¹' deki -yaprak yapı, 1673 cm⁻¹' deki -dönü , 1652 cm⁻¹' deki -sarmal, 1640 cm⁻¹' deki tesadüfi kıvrımlar, 1630 cm⁻¹' deki -yaprak yapı ve 1615 cm⁻¹' deki toplamı -yaprak yapıyı ifade eden bantlardır. Elde edilen bant alanlarına göre % da ılım belirlenmi ve Çizelge 4.4' de gösterilmi tir.

Çizelge 4.4. E ri uydurma analizi ile belirlenen eftali POD enziminin ikincil yapısındaki de i im (%)

ikincil yapı bile enlerinin da ılımı (%)	25 °C	70 °C
-sarmal	19,26	23,14
-yaprak yapı	31,23	20,46
-dönü	6,67	6,68
Tesadüfi kıvrımlar	33,24	20,17
Toplanmı -yaprak yapı	9,60	29,56

Buna göre ısı i lem süresince tesadüfi kıvrımlar ve -yaprak yapının miktarı azalmı , -sarmal ve toplamı -yaprak yapının miktarı artmı tir. -dönü yapının miktarında önemli bir de i im olmamı tir. Tesadüfi kıvrımlar ve -yaprak yapının miktarının azalması ve toplamı -yaprak yapının miktarının artması protein denatürasyonunu ifade etmektedir (Baltacıo lu vd., 2015). Bununla birlikte ısı i lem sonucunda POD enzimi -sarmal yapısında artı gözlenmi tir. Bu durum enzim yapısının tam olarak bozulmadı mı göstermektedir. Bilindi i üzere POD enzimi genel olarak meyve ve sebzelerde ısıya en dirençli enzimdir ve indikatör olarak kullanılır. Isı i lem görmü ürünlerde depolama sonrasında rejenere olmakta ve tekrar aktivite göstermektedir (Cemero lu vd., 2001). Kar ıla ılan bu sorunun POD enziminin -sarmal yapısının ısı i lem ile tam olarak parçalanamaması sonucunda oldu u dü ünülebilir.

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında ısıl işlem uygulamasının etkili PPO ve POD enzimlerinin aktivite ve yapısal değişimlerine etkisi incelenmiştir. Buna göre PPO enzimi için 70 °C sıcaklıkta 10 dakika sonunda % 99'luk inaktivasyon, tespit edilmiştir. Fakat POD enzimi için aynı inaktivasyon 70 °C sıcaklıkta 20 dakika sonunda elde edilmiştir. Enzimlerin ısıl dirençlerini karşılamak için D ve z değerleri tespit edilmiştir. PPO ve POD için D₇₀ değerleri sırasıyla 23,91 ve 31,50 dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca z değeri PPO ve POD için sırasıyla 3,35 ve 23,15 °C olarak gözlenmiştir. Görüldüğü üzere etkili POD enzimi PPO'ya göre ısıya daha dirençli bulunmuştur.

PPO ve POD enzimlerinin ısıl işlem boyunca konformasyonel değişimi FTIR spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Buna göre PPO enziminin ikincil yapısında ısıl işlem ile değişimler gözlenmiştir; sıcaklık artışı ile birlikte α -sarmal ve β -yaprak yapının miktarı azalmıştır, protein denatürasyonunu ifade eden β -dönüşüm ve toplanmış β -yaprak yapının miktarları artmıştır. Aynı şekilde ısıl işlem uygulaması ile POD enziminin de ikincil yapısında değişimler gözlenmiştir. FTIR spektroskopisi ve enerji uydurma analizi sonucunda tesadüfi kıvrımlar ve β -yaprak yapının miktarı azalmıştır ve protein denatürasyonunu ifade eden toplanmış β -yaprak yapının miktarı artmıştır. Fakat POD enzimi α -sarmal yapısında artış gözlenmiştir. Bu durumun enzim rejenerasyonunda etkili olduğunu düşünülmektedir.

Tüm sonuçlar incelendiğinde aktivite ve yapıdaki değişimlerin uyumlu olduğunu görülmektedir. Isıl işlem enzim inaktivasyonunda etkili bir yöntem olmasına karşın enzim yapısının bozulmasında özellikle POD enzimi için yeterli olamamaktadır. FTIR spektroskopisi enzim yapısal değişiminin incelenmesinde etkili bir yöntemdir. Bu tez çalışması enzim yapısal değişimi üzerine ısıl işlemin etkisini belirlemek için FTIR spektroskopisi kullanımının etkili olduğunu ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M.M., Wu, T., Lei, S., Khan, M.K. and Zeng, X., “Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 984–990, 2014.

Anonim, Türkiye meyve suyu v.b. ürünler sanayi raporu. <https://www.meyed.org.tr>. 2011 (Erişim tarihi: 15 Mart 2015).

Arrondo, J.R., Muga, A., Castresa, J. and Goni, R. M., “Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier transform infrared spectroscopy”, *Progress. Biophys. Acta.*, 468:63-72, 1993.

Bahçeci, S., Dondurularak muhafaza edilen bazı sebzelerde peroksidaz ve lipoksigenaz enzimlerinin termal inaktivasyon ve reaksiyon koşullarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2003.

Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A., Severcan, M. and Severcan, F., “Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study”, *Food Chemistry*, 187, 263-269, 2015.

Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A. and Severcan, F., “Secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy”, *Food Chemistry*, 214, 507-514, 2017.

Barth, A., “Infrared spectroscopy of proteins”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 1073–1101, 2007.

Carbonaro, M. and Nucara A., “Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region”, *Amino Acids*, 38, 679–690, 2010.

Cemero lu B., Yemenicio lu A. ve Özkan M., Meyve Ve Sebzelerin Bile imi So ukta Depolanmaları, *Gıda Teknolojisi Derne i Yayınları*, No:24, Ankara, 2001.

Chutintrasri, B. and Noomhorm, A., “Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree”, *LWT – Food Sci. Technol.*, 3, 492–495, 2006.

Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C. and Hendrickx, M., “Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study”, *J. Food Biochem.*, 30, 56–76, 2006.

Damodaran, S., Parkin, K.L. and Fennema, O.R, Fennema’s Food Chemistry, Fourth Edition, *CRC Press*, Boca Raton, 2008.

De Castro Leite Junior, B. R., Lima Tribst, A. A., Grant, N. J., Yada, R. Y. and Cristianini, M., “Biophysical evaluation of milk-clotting enzymes processed by high pressure”, *Food Research International*, 97, 116-122, 2017.

Durst, R. and Weaver, G., “Nutritional content of fresh and canned peache”, *Journal of The Science of Food And Agriculture*, 93(3), 593-603, 2013.

Erol, S., eftali pulpunda meyve oranının mineral bile enler yardımı ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2007.

Freifelder, D., Physical Chemistry, Applications to Biochemistry and Molecular Biology, New York, 1982.

Gülseren, ., Güzey, D., Bruce, B.D. and Weiss, J., “Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 173–183, 2007.

Haris P.I. and Severcan F., “FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 207–221, 1999.

Heinisch, O., Kowalski, E., Goossens, K., Frank, J., Heremans, K., Ludwig, H. and Tauscher, B., “Pressure effects on the stability of lipoxygenase: fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and enzyme activity studies”, *Zeitschrift fur Lebensmittel und Forschung*, 201, 562-565, 1995.

Huang, H., Xie, J. and Chen, H., “Adsorption behavior of human serum albumin on ATR crystal studied by in situ ATR/FTIR spectroscopy and two-dimensional correlation analysis”, *Analyst*, 136, 1747–1752, 2011.

Jung, C., “Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs)”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 1031–1058, 2008.

Karoui R., Pierna J.A.F. and Dufour E., Mid-infrared (MIR) and Fourier Transform Mid-infrared (FT-MIR) Spectroscopies, (pp. 27-64), *Academic Press*, 2008.

Lewis M.J. and Heppell N.J., Continuous Thermal Processing Of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization, *Aspen Publishers Inc*, 2000.

Liu, L., Cao, S-Q., Qi, X-Y. and Yang, Z-F., “The effect of pH on the activity, thermokinetics and inhibition of polyphenol oxidase from peach”, *J Food Sci Technol* 52(11), 7465–7471, 2015a.

Liu, Q., Wang, R-F., Zhang, B-B., Zhao, X-Y., Wang, D. and Zhang, C., “Protein secondary structure changes of watermelon juice treated with high hydrostatic pressure by FTIR spectroscopy”, *Journal of Food Process Engineering*, 37, 543–549, 2015b.

Lopes, A.M., Toralles, R.P. and Rombaldi, C.V., “Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree”, *Food Sci. Technol, Campinas*, 34(1), 150-156, 2014.

Lurie, S. and Crisosto, C.H., “Chilling Injury In Peach And Nectarine”, *Postharvest Biology And Technology*, 37(3), 195-208, 2005.

Mantsch, H.H., *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials* (pp. 1-14). **Marcel Dekker, Inc**, 2001.

Murayama, K. and Tomida, M., "Heat-Induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by fourier transform infrared spectroscopy", **Biochemistry**, 43, 11526-11532, 2004.

Neves, V.A., "Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit", **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 45(1), 7 - 16, 2002.

Önez, Z., Üzümden (*Vitis Vinifera L.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2006.

Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C. and Hendrickx, M., "Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera*ssp. *Sativa*)", **Food Chem**, 94, 253-361, 2006.

Severcan, M., Severcan, F. and Haris, P.I., "Estimation of protein secondary structure from FTIR spectra using neural networks", **Journal of Molecular Structure**, 565-566, 383-387, 2001.

Severcan, F. and Haris, P., "Fourier transform infrared spectroscopy suggests unfolding of loop structures precedes complete unfolding of pig citrate synthase", **Biopolymers**, 69, 440-447, 2003.

Stuart, B. and Ando, D.J., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, **John Wiley and Sons**, 1997.

Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, **John Wiley and Sons**, 2004.

Sun, N.K. and Song, K.B., "Effect of nonthermal treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase", **Journal of Food Science**, 68(5), 1639-1643, 2003.

Terefe, N.S., Buckow, R. and Versteeg, C., “Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies Part 1: high-pressure processing”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 24-63, 2014.

Toralles, R.P., Vendruscolo, J.L., Vendruscolo, C.T., Del Pino, F.A.B. and Antunes, P.L., “Properties of polyphenoloxidase and peroxidase from granada clingstone peaches”, *Braz. J. Food Technol.*, 8(3), 233-242, 2005.

Weemaes, C., Rubens, P., De Cordt, S., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I., Hendrickx, M., Heremans, K. and Tobback, P., “Temperature sensitivity and pressure resistance of mushroom polyphenoloxidase”, *Journal of Food Science*, 62(2), 261-266, 1997.

Yemenicio lu, A., Özkan, M. and Cemero lu, B., “Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form”, *Journal of Food Science*, 62(3), 508-510, 1997.

Yemenicio lu, A. ve Cemero lu, B., “Hale Haven eftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 261-265, 1998.

Yi, J.Y., Dong, P., Wang, Y.T., Jiang, B., Liao, X.J., Hu, X.S. and Zhang, Y., “Study on the effect of high hydrostatic pressure treatment on the secondary structure of mushroom polyphenoloxidase by SRCD and FTIR”, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis*, 32(2), 317-323, 2012.

ÖZGEÇM

Katibe Sinem CORUK 28.10.1993 tarihinde Ni de'de do du. İlk, orta ve lise e itimini Ni de'de tamamladı. 2011 yılında girdi i Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisli i Bölümün'den 2016 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ni de Ömer Halis Demir Üniversitesi Gıda Mühendisli i Bölümünde Yüksek Lisans Ö renimine ba ladı. Bilim dalındaki ilgi alanı Meyve ve Sebze leme Teknolojisidir



