Polifenol Oksidaz Enziminin Isı-Ultrason Kombinasyonu ile İnaktivasyonu Sırasında Enzimin Yapısında Meydana Gelen Değişimin Fourier Değişim Kızıl Ötesi (FTIR) Spektroskopisi ile İncelenmesi

Proje No: 112 O 433

Prof. Dr. Alev Bayındırlı

EKİM 2013
ANKARA

ÖNSÖZ

Günümüzde gıda endüstrisinde mikroorganizma ve enzimleri etkisiz hale getirmek için en yaygın şekilde kullanılan teknik, ısıl işlem uygulamasıdır. Ancak, ısı gıdaların besin bileşenlerine zarar vermekte, doku, renk, ve tat gibi fiziksel özelliklerini etkilemektedir. Bu etki, araştırma ve uygulamaları minimum ısıl işlem yönünde teşvik etmiştir. Isıl olmayan koruma teknolojilerinin ya da bu teknolojilerin düşük sıcaklıkta ki ısı uygulaması ile kombinasyonlarının, yüksek sıcaklıkta uygulanan ısıl işlemler ile kıyaslandığında daha iyi kalitede gıda üretimi için enzim ve mikroorganizmaların inaktivasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Bu işlemler sırasında seçilen parametrelere göre enzimlerin üç boyutlu yapısı bozulmakta ve aktivitelerinde azalmalar olmaktadır. Bu değişimler kalıcı olabildiği gibi geri dönüşümlüde olabilmektedir.Bilindiği üzere 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.

Bu çalışmanın amacı ısıl işlem ve düşük sıcaklıkta ultrason uygulamasının mantar PPO enziminin aktivitesi ve ikincil yapısı üzerine etkilerini araştırmak ve karşılaştırmaktır. Çalışmada inaktivasyon mekanizmasını belirlemek için mantar kaynaklı PPO enzimi model enzim olarak seçilmiştir. Araştırmanın ilk aşamasında farklı güç, sıcaklık ve süre etkileri göz önüne alınarak ısı ve ısı-ultrason kombinasyonu inaktivasyonu ile PPO enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Daha sonraki aşamada PPO enziminin yapısal değişikliklerini belirlemek amacıyla, FTIR spektroskopisi kullanılarak protein ikincil yapısı analiz edilmiştir.

Söz konusu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Tarım Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu (TÜBİTAK-TOVAG) tarafından desteklenmiştir.

Prof. Dr. Alev Bayındırlı

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i

İÇİNDEKİLER ii

ŞEKİL LİSTESİ iii

ÖZET iv

ABSTRACT v

1. Giriş 1

2. Genel Bilgiler 2

3. Gereç ve Yöntem 5

3.1. Enzimin Hazırlanması ve Aktivitesinin Ölçülmesi 5

3.2. Isıl İşlem Uygulaması 6

3.3. Termosonikasyon Uygulaması 6

3.4. FTIR Çalışmaları 7

3.5. İstatistiksel Analizler 7

4. Araştırma Bulguları ve Tartışma 8

4.1. Isıl İşlem Uygulamasının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi 8

4.2. Termosonikasyon Uygulamasının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi 9

4.3. Enzimin İkincil Yapısının İncelenmesi 12

4.4. Mantar PPO Enzimi İkincil Yapısı Üzerine Isıl İşlemin Etkisi 15

4.5. Mantar PPO Enzimi İkincil Yapısı Üzerine Ultrason İşlemin Etkisi 18

6. Referanslar 22

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Isıl işlem uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi 8
Şekil 2. %100 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi 9
Şekil 3. %80 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi 10
Şekil 4. %60 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi 11
Şekil 5. Örnek ve tampon çözelti spektrumları 13
Şekil 6. PPO spektrumu 14
Şekil 7. PPO ikincil türev spektrumu 15
Şekil 8. Farklı sıcaklıklarda kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları 16
Şekil 9. Farklı sıcaklıklarda kaydedilen mantar PPO enzimi ikincil türev spektrumları 17
Şekil 10. Termosonikasyon uygulaması sonrasında kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları 18
Şekil 11. Termosonikasyon uygulaması sonrasında kaydedilen mantar PPO enzimi ikincil türev spektrumları 19

ÖZET

Bu araştırmada ısı ve ısı-ultrason kombinasyonu inaktivasyonu farklı güç, sıcaklık ve süre etkileri göz önüne alınarak, PPO enziminin yapısal değişikliklerini belirlemek amacıyla, FTIR spektroskopisi kullanılarak protein ikincil yapısı analiz edilmiş ve bu sonuçlar aktivitedeki değişiklikler ile karşılaştırılmıştır.

Isıl işlem uygulaması sonrasında enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin 40°C sıcaklığa kadar tamamen aktif kaldığı belirlenmiş; 40°C' de 30 dakika ısıl işlem uygulaması boyunca aktivitede hafif bir azalma gözlenmiş; 50-70°C sıcaklık aralığında enzim aktivitesinde hızlı bir düşüşün olduğu, 70°C de 5 dakika sonunda %99 oranında enzimin inaktive olduğu ve 80°C üzerinde herhangi bir aktivite gözlenmediği bulunmuştur.

PPO aktivitesine termosonikasyonun etkisi incelendiğinde enzim aktivitesi 20 °C' de 30 dakikalık ultrason uygulaması boyunca hafif bir azalma gösterirken, 30-60°C aralığında daha hızlı bir inaktivasyon elde edildiği gözlenmiştir. Termosonikasyon işleminde artan sıcaklık, zaman ve genlik ile enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. %100 genlikte farklı sıcaklık ve sürelerde gözlemlenen aktivite azalmasına benzer bir eğilim %80 ve 60 genlikte de gözlemlenmiştir. Buna karşın genlik azaldıkça kalan enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

Isıl işlem ve ultrason uygulamasının enzimin ikincil yapısı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla ikincil türev spektrumları incelendiğinde, uygulanan ısıl işlem ve termosonikasyonun enzimin ikincil yapısı üzerinde geri dönüşümsüz bir inaktivasyona neden olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber ısıl işlem ile kıyaslandığında termosonikasyon işleminin ikincil yapının değişimi üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Sonuç olarak ısı-ultrason kombinasyonunun enzim inaktivasyonunu sağlamada ısıl işleme göre daha etkili olduğu söylenebilmektedir. Bu çalışmanın bundan sonra yapılacak benzeri bilimsel çalışmalara örnek teşkil edeceği ve elde edilen sonuçların ultrason uygulamasının endüstrideki enzim inaktivasyonu amacıyla kullanımına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler:
Polifenol oksidaz, enzim inaktivasyonu, ultrason, Fourier Değişim Kızıl Ötesi spektroskopisi, protein ikincil yapısı.

ABSTRACT

This project was related to understand the conformational changes of PPO after inactivation by heat and heat-ultrasound at different power, temperature and time combinations. The secondary structure change was analyzed by using FTIR spectroscopy and compared with the change in the enzyme activity.

When stability of mushroom PPO after heat treatment was investigated, the enzyme remained fully active up to 40°C. There was a slight decrease during the period of 30 min at 40℃; between 50°C and 70℃ higher inactivation was achieved and 99% inactivation was detectable at 70℃ for 5 min. Furthermore, no activity was observed over 80℃.

When the effect of ultrasound on PPO activity was examined, the activities of PPO dropped slightly during the period of 30 min at 20℃ after ultrasound treatment, higher PPO inactivation was observed after treatments between 30 and 60 ℃ with ultrasound. In thermosonicatiion, residual enzyme activity decreased with increasing amplitude, time and temperature. Similar trend was also observed for 80 and 60% amplitude ultrasound treatment. In contrast, it was observed that the remaining enzyme activity increased with decreasing amplitude.

When the second derivative spectra was investigated in order to determine the effect of heat and ultrasound treatment on the secondary structure of the enzyme, it was observed that applied heat treatment and thermosonication caused an irreversible change on the secondary structure of the enzyme. However, thermosonication seemed to be more effective on the secondary structural change compared to the heat treatment. In conclusion, enzyme inactivation by combination of heat and ultrasound treatment can be said to be more effective than heat treatment. The result of this study is thought to reference for the similar studies related to the application of ultrasound for enzyme inactivation and can make a significant contribution for the industrial application of ultrasound for enzyme inactivation.

Keywords:

Polyphenol oxidase, enzyme inactivation, ultrasound, Fourier Transform Infrared spectroscopy, protein secondary structure.

1. GİRİŞ

Meyvelerin ve sebzelerin işlenmesinde gıda kalitesinin sağlanması için enzimlerin inaktive edilmesi önem taşımaktadır. Gıda kalitesini etkileyen önemli enzimlerden biri de meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşmeye neden olan Polifenol oksidaz (PPO) enzimidir. Günümüzde enzimlerin inaktivasyonunda yaygın şekilde kullanılan teknik, ısıl işlem uygulamasıdır. Fakat ısıl işlem gıdaların besin bileşenlerini yok etmekte ve gıdanın doku, renk ve tat gibi fiziksel özelliklerini etkilemektedir. Bu olumsuzluklar araştırmacıları minimum ısıl işlem uygulamaları kullanmaya teşvik etmiştir. Isıl olmayan koruma teknikleri ya da bu teknolojilerin düşük sıcaklıkta ki ısıl işlem uygulamaları ile kombinasyonu, yüksek sıcaklıkta uygulanan ısıl işlemler ile kıyaslandığında daha yüksek kalitede gıda üretimi için enzim ve mikroorganizmaların inaktivasyonunda önem kazanmaktadır. Ultrason büyük ilgi gören yeni ısıl olmayan koruma tekniklerinden biridir. Tek başına ya da ısı ile birlikte (termosonikasyon) ultrasonun polifenol oksidaz gibi gıda kalitesi ile ilgili çeşitli gıda enzimlerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (O`Donnell ve ark. 2010).

Polifenol oksidaz (PPO), taze meyve ve sebze ürünlerinde enzimatik esmerleşmeye neden olan, yapısında bakır bulunduran bir enzimdir. Bu enzimatik esmerleşme, gıdalarda renk, lezzet ve besin kalitesinin bozulmasına yol açmaktadır. Bu nedenle bu enzim esmerleşmeyi önlemek için gıdaların işlenmesi sırasında inaktive edilmektedir (Ludikhuyze ve ark. 2003). İnaktivasyon sırasında enzimlerin ikincil yapıları zarar görmekte ve enzimler denatüre olmaktadır. Protein konformasyonunu incelemek için birçok analitik araç kullanılmaktadır. Proteinlerin yapısal karakterizasyonu belirlemek için son zamanlarda çok popüler hale gelen tekniklerden biri de Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopidir (Haris ve Severcan 1999).

Enzimlerin inaktivasyonu, son yıllarda yaygın olarak çalışılmakta ve literatürde enzimlerin inaktivasyonu genellikle basit kinetik yaklaşımlar ile açıklanmaktadır. Buna karşılık, ısı ve ultrason inaktivasyonu sırasında gıda enzimlerin konformasyon değişiklikleri hakkında az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ısıl olmayan işlemlerin sıcaklık ve süre gibi değişik ana işlem parametrelerinde, polifenol oksidaz enziminin yapısında ve aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi ve bu değişimlerin karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Gıda kalitesini etkileyen önemli enzimlerden birisi de PPO enzimidir. Bu enzim, meyve ve sebzelerin depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında gözlenen esmerleşme reaksiyonunun başlanmasına neden olur. PPO zedelenme ile açığa çıkan hücre özsuyundaki fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eder. Enzimatik esmerleşme, elma, kayısı, armut, muz, üzüm, patates, kıvırcık salata ve de ayrıca mantarda en belirgin şekilde görülür (Ludikhuyze ve ark. 2003, Whitaker 1994).

Gıdalarda kalite kayıplarına neden olan enzimleri inaktif hale getirmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Isıl işlemler enzim inaktivasyonunda gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Ancak, ısıl işlemler mikroorganizma ve enzim inaktivasyonunda oldukça etkiliyken, özellikle yüksek sıcaklıklardaki ısıl işlemler gıdanın besinsel ve duyusal özellikleri üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler. Yüksek sıcaklığın etkisiyle gıdanın uçucu tat-koku maddeleri, vitaminler ve diğer besin ögeleri kaybı, tekstür bozuklukları gibi olumsuzluklar ortaya çıkar (Fellows 2000).

Son yıllarda geleneksel yöntemlere alternatif olarak gıdaların ısıl olmayan koruma teknikleri ya da bu teknolojilerin düşük sıcaklıktaki ısıl işlem uygulamaları ile kombinasyonu kullanılmaya başlanmıştır. Isıl olmayan gıda koruma tekniklerinden biri de ultrason uygulamasıdır. Genellikle, ultrason uygulamasında 20 kHz'den 10 MHz'e kadar değişen frekanslar kullanmaktadır. Ultrason uygulanan ses dalgasının büyüklüğü ve kullanılan frekansa bağlı olarak iki gruba ayrılmaktadır:

(1) Düşük güç, yüksek frekanslı ultrason (<1 W/cm^2; > 100 kHz), normal gıdaların kompozisyon, yapı veya akış oranını değerlendirmek için tahribatsız bir analitik yöntem olarak kullanılmaktadır.

(2) Yüksek güç, düşük frekanslı ultrason (10-1000 W/cm^2; 20-100 kHz), dokuların fiziksel bozulması, emülsiyon hazırlama, ekipman temizliği veya reaksiyon hızının arttırılması veya azaltılması için kullanılmaktadır.

Ultrason (sonikasyon), gıda endüstrisinde uzun yıllardan beri farklı amaçlarla kullanılan bir tekniktir. Düşük frekans, yüksek güce sahip ultrason ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların başında başlamış ve bu zamana kadar kurutma, ekstraksiyon, mikroorganizmaların yok edilmesi ve

enzimlerin etkisizleştirilmesi gibi gıda endüstrisindeki potansiyel birçok uygulaması belirlenmiştir. Sıcaklık ve/veya basınç ile birlikte kullanımı ultrason etkisini arttırmaktadır. Düşük ısı ve ultrason kombinasyonuna termosonikasyon (TS), basınç ve ultrason kombinasyonuna manosonikasyon (MS) ve basınç, ısı ve ultrason kombinasyonuna manotermosonikasyon (MTS) adı verilmektedir (Fellows 2000, Rahman 2007).

Gıda proseslerinde enzim inaktivasyonu amacıyla düşük frekanslı (20-100 kHz) ve yüksek güçlü ultrason (power ultrasound) kullanılabilir. Ultrason uygulaması sonucunda enzim inaktivasyonuna neden olan mekanizmalar kavitasyon ve serbest radikal oluşumudur. Ses enerjisi sürekli dalga-tipi bir hareket oluşturarak ortama girdiğinde, bu hareketin bir sonucu olarak boylamsal dalgalar oluşur ve bu durumda ortamdaki partiküller üzerinde bir sıkışma ve gevşeme yaratır. Bunun sonucunda sıvıda nano boyutunda baloncuklar oluşmaktadır. Bunlar daha fazla enerji absorblayamadıkları bir hacme ulaştıklarında şiddetli bir şekilde patlamaktadır. Bu olgu kavitasyon olarak bilinmektedir. Bu baloncukların patlamasıyla sıcaklık ve basınçta ani değişimler meydana gelmektedir. Oluşan yüksek sıcaklık ve basınç inaktivasyonda etkili olmaktadır. İnaktivasyona neden olan bir diğer mekanizma serbest radikal oluşumudur. Ultrason uygulaması sırasında suyun ayrışması sonucunda H^+ ve OH^- radikalleri oluşmaktadır. Meydana gelen serbest radikaller, enzimin yapısal stabilizasyonunda veya katalitik fonksiyonlarında rol alan amino asitlerle reaksiyona girebilmekte ve enzim denatürasyonuna neden olmaktadır. Denatürasyon sonucu enzimlerin ikincil yapısı zarar görmektedir (Fellows 2000, Rahman 2007).

Ultrason uygulamalarının portakal, elma, domates, çilek ve üzüm suyunda raf ömrünün uzatılması amacıyla enzimlerin inaktivasyonunda kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bu uygulamalarda seçilen frekanslar 20-35 kHz aralığında olup farklı güçlerde (%40-100) ve 0-30 dakika sürelerde uygulamalar yapılmıştır. Ancak,ultrasonun diğer yöntemlerle kombine kullanımı (ısı ve basınç) enzimlerin inaktivasyonunda daha etkili olmaktadır. Isı ve /veya basınç ile birlikte kullanılan ultrasonun lipoksigenaz, pektinmetil esteraz, peroksidaz, PPO gibi çeşitli gıda kalitesi ile ilişkili enzimlere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (O'Donnell ve ark. 2010). Su teresinde (Nasturtium officinale) bulunan peroksidaz enziminin %90 oranında inaktivasyonunu gerçekleştirmek için 90°C' de 70 saniye ısı uygulanırken bu süre aynı sıcaklıkta termosonikasyon (20 kHz) uygulaması için 5 saniyedir (Cruz ve ark. 2006). Raviyan ve ark. (2005) 50-72°C sıcaklık aralığında ultrason (20kHz, 20 µm genlik) uygulanmış domates suyunda pektinmetil esteraz inaktivasyonunun tek başına ısı uygulaması ile karşılaştırıldığında artmış

olduğunu rapor etmişlerdir. Basınç (200kPa), ultrason (117µm) ve ısının (72°C) eşzamanlı uygulanması ile PME inaktivasyon hızı tampon çözeltide 25 kez, portakal suyunda 400 kezden fazla arttırılmıştır (Vercet ve ark. 1999). Benzer şekilde model tampon sistemde PPO üzerine ısı (70.7°C), basınç (392 kPa) ve ultrasonun (35-145 µm) sinerjetik etkisi ve artan genlik değeri ile log D değerinde doğrusal bir azalma rapor edilmiştir (Lopez ve ark. 1994).

Proteinlerin yapısal karakterizasyonu belirlemek için son zamanlarda çok popüler hale gelen tekniklerden biri de FTIR spektroskopidir. Bu yöntem ile düşük miktardaki (10 µg) proteinlerden yüksek kaliteli spektrum sağlanmaktadır. Aynı zamanda bu yöntemde protein büyüklüğü önemli değildir. FTIR spektroskopisi küçük çözünür proteinlerden büyük membran proteinlerine geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Bu yöntem nispeten düşük maliyeti ile kısa ölçüm süresine sahiptir. Kızılötesi spektroskopisi bir titreşim spektroskopisi tekniğidir ve moleküllerin döndükleri ve titreştikleri frekanslara bağlı olarak özel ayrık enerji seviyelerine sahip olmaları prensibine dayanmaktadır. Her bileşik kızılötesi spektrumunda karakteristik bir emilim bandına sahiptir. Proteinlerin ve polipeptidlerin kızılötesi spektrumunda bulunan karakteristik bantları Amide I ve Amide II bandıdır. Bu bantlar aminoasitleri birbirine bağlayan amid bantlarından meydana gelmektedir. Amide I bandı protein amid bandının C=O titreşiminden (% 80) , Amide II bandı N-H titreşiminden (% 60) ve C-N titreşiminden (%40) meydana gelmektedir. Hem C=O hem de N-H bantları ikincil yapıdaki farklı elementler arasında bulunan hidrojen bağlarına katıldığı için Amide I ve Amide II bantları ikincil yapının tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. Amide I ve amide II bant bölgeleri analiz edilerek α-sarmal, β-yapılar ve tesadüfi kıvrılmaların yüzde dağılımları belirlenebilmektedir. Ancak, ikincil yapıdaki birçok bandın üstüste çakışmasından dolayı Amide I ve Amide II bantlarının detaylı sayısal analizini yapmak her zaman kolay olmamaktadır. Çakışan amide bantlarının analizi için çeşitli spektral analiz yöntemleri ileri sürülmüştür. Çoğu ikinci türev ya da dekonvolüsyon spektrumunda tepe noktasını tayin etmeye bağlı frekans bazlı metodlardır. İkinci türev ve dekonvolüsyon bant çözünürlüğünü arttırarak, farklı protein yapılarının ve denatürasyon kaynaklı yapısal değişikliklerin belirlenmesine olanak sağlar.

Enzim stabilitesi ile ilgili çalışmalar ile karşılaştırıldığında, ısıl ve ısıl olmayan işlemler sırasında gıda enzimlerinin inaktivasyon mekanizmaları ve konformasyon değişiklikleri hakkında daha az bilgi bulunmaktadır. Literatürde protein ve enzimlerin ikincil yapısına değişik faktörlerin etkisinin FTIR spektroskopisi kullanılarak incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Haris ve Severcan, 1999; Severcan ve Haris, 2003; Gülseren ve ark. 2007; Jung 2008; Garip ve ark. 2010; Huang

ve ark. 2011). Fakat gıda kaynaklı enzimlerin yapısal değişiminin FTIR spektroskopisi kullanılarak incelendiği araştırmalar sınırlı sayıdadır. Weeamaes ve ark. (1997) mantar kaynaklı PPO enziminin sıcaklık ve basınç etkisi ile değişimini FTIR spektroskopisi kullanarak incelemişlerdir. Termal inaktivasyonun aktif bölgedeki küçük bir değişiklikten mi yoksa genel bir yapısal değişiminden mi kaynaklandığını belirlemek için FTIR spektroskopisi kullanarak bir sıcaklık titrasyon kurvesi çizdirmişler ve 50°C üzerindeki değişimlerin genel bir yapısal değişiminden kaynaklandığını yani geri dönüşümsüz olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca FTIR spektroskopisi çalışmaları sonucunda sıcaklık ve basıncın neden olduğu denatürasyonun birbirinden farklı olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde lipoksigenaz enzimine basıncın etkisini, tütün kaynaklı PPO enzimine farklı pH' ların etkisini, mantar kaynaklı PPO enzimine yüksek hidrostatik basıncın etkisini incelemek için FTIR kullanılmıştır (Heinisch ve ark. 1995; Shi ve ark. 2003; Yi ve ark. 2012).

Bu araştırmada FTIR çalışmalarında daha etkili sonuç elde edebilmek için saf halde bulunan mantar PPO enzimi model enzim olarak seçilmiştir. Araştırmada farklı güç, sıcaklık ve sürelerde ısı-ultrason kombinasyonu ve ısıl işlem inaktivasyonunun mantar PPO enzim aktivitesi ve enzimin yapısal değişiklikleri üzerine etkisinin belirlenmesi ve aktivitedeki değişimlerin yapısal değişiklikler ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma sonunda mantar PPO enzimi için bulunan sonuçların bundan sonra diğer meyve ve sebzeler ile yapılacak olan çalışmalara zemin oluşturacağı düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Enzimin Hazırlanması ve Aktivitesinin Ölçülmesi

Liyofilize mantar PPO enzimi (EC 1.14.18.1, Sigma) 50 mM (pH=6.5) potasyum fosfat tamponu içinde çözülmüştür. Aktivite tayin yöntemleri için enzim 0.08 mg/ml, yapısal değişimi belirlemek için 70 mg/ml konsantrasyonda kullanılmıştır.

İnaktivasyon sonunda enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Sun ve Song 2003). PPO enzim aktivitesi 420 nm dalga boyunda absorbans artışı ölçülerek belirlenmiştir. 0.3 ml enzim solüsyona, 2 ml 50 mM (pH=6.5) potasyum fosfat tamponu ve 0.3 ml fosfat tamponu (pH=6.5) içinde çözünmüş 0.2 M kateşol solüsyonu eklenmiştir. Bir ünite enzim

aktivitesi 420 nm'de ilk 0.001/dakikada absorbans artışı olarak tanımlanmıştır. Her bir uygulama üç kez tekrarlanmış ve her bir uygulamanın analizi üç kere yapılmıştır. Enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.2. Isıl İşlem Uygulaması

Isıl işlem uygulaması ile enzim inaktivasyonu bu proje kapsamında satın alınan soğutmalı blok ısıtıcı (Daihan Model HBR-48 Model) kullanılarak yapılmıştır. 16 mm iç çapa, 50 mm derinliğe sahip bir cam tüp içine potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 6.5) içinde çözülen 5 ml PPO solüsyonu konmuştur. Isıl işlem uygulaması 20-80°C' de 0-30 dakika aralığında uygulanmış, enzim solüsyonu sıcaklığı istenen değere ulaşıldığı andan itibaren inaktivasyon takip edilmiştir (Weemaes ve ark. 1997, Kadkhodaee ve Povey 2008).

3.3. Termosonikasyon Uygulaması

Düşük sıcaklıkta ultrason uygulamasının inaktivasyondaki etkisini belirlemek için yine bu proje kapsamında satın alınan soğutmalı blok ısıtıcı (Daihan Model HBR-48 Model) kullanılmış ve bu cihaz içine yerleştirilen cam tüp içine ultrasonik prob daldırılarak sonikasyon gerçekleştirilmiştir. İnaktivasyon sırasında ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Hielscher (Dr. Hielscher GmbH, Germany) marka 3 (H3) ve 14 (H14) mm sonik proba sahip UP400S (24 kHz, 400 W, genlik %20-100) model ultrason cihazı kullanılmıştır. 3 mm prob için maksimum genlik seviyesi 210 µm'dir. Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 6.5) içinde çözülen PPO, 16 mm iç çapa, 50 mm derinliğe sahip bir cam tüp içine konmuştur. 3 mm' lik probun ucu 5ml' lik solüsyon içine 5 mm daldırılmıştır. Sonikasyon %60, 80 ve 100 genlikte (125, 170 ve 210 µm), 20-60°C sıcaklık aralığında 10°C artış ile, 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika boyunca uygulanmıştır. Sonikasyon sırasında oluşan aşırı ısınmayı önlemek amacıyla kullanılan soğutmalı kuru blok ısıtıcının sıcaklığı belirlenen değerde sabit tutmada oldukça etkili olduğu yapılan denemeler sonucu tespit edilmiştir. Cam tüp içine konulan enzim solüsyonu sıcaklığı istenen değere ulaştığında sonikasyon işlemine başlanmıştır. Örnekler inaktivasyon uygulamasının hemen sonrasında buzlu su banyosuna alınmıştır.

3.4. FTIR Çalışmaları

Enzim inaktivasyon mekanizması FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için MIR TGS dedektörü bulunan Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) FTIR spektroskopisi cihazı kullanılmıştır. Örneklerdeki protein bantlarının belirlenebilmesi için tranmisyon spektroskopi (transmission spectroscopy) yöntemi uygulanmıştır. Bunun için örnekler bu proje kapsamında satın alınan CaF_2 pencereler arasına yerleştirilmiştir. Enzime sıcaklığın etkisinin belirlenebilmesi için örnek tutucu içine yerleştirilen CaF_2 pencereler arasına yerleştirilen örnekler doğrusal bir sıcaklık gradyeni (25-70℃) boyunca kesintisiz olarak ısıtılmış ve inaktivasyonun geri dönüşümsüz olup olmadığını kontrol etmek için tekrar 25℃'ye soğutulmuştur. Spektrumlar her 10℃' de bir kaydedilmiştir. Sıcaklık kontrolü, hücre tutucunun etrafından sıcak suyun geçirilmesi ile sağlanmıştır. Ayrıca ultrason inaktivasyonundan sonra her bir inaktive edilmiş örnek CaF_2 pencereler arasına yerleştirilerek elde edilen spektrumları kaydedilmiştir. Spektrumların toplanması ve tüm dataların analizi IR solution yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Havanın spektrumu arka plan olarak kaydedilmiş ve otomatik olarak örnek ve tampon çözelti spektrumundan çıkarılmıştır. Her bir örnek ve tampon çözelti spektrumu 1200-2800 cm^{-1} bölgesinde toplanmıştır. 2 cm^{-1} çözünürlükte 400 tarama gerçekleştirilmiştir. Örnek spektrumundan tampon çözeltinin FTIR spektrumu çıkartılarak protein bandları elde edilmiştir. Isı ve ultrasonun protein yapısı üzerine yaptığı değişiklikleri belirlemek için 1700-1600 cm^{-1} arasında yer alan Amide I bandının ikinci türev spektrumu OPUS 5.5 (Bruker optics GmbH) yazılımı kullanılarak elde edilmiş ve ikincil türevin minimum tepe noktaları enzimin ikincil yapısının belirlenmesinde kullanılmıştır (Haris ve Severcan 1999; Severcan ve Haris 2003; Garip ve ark. 2010).

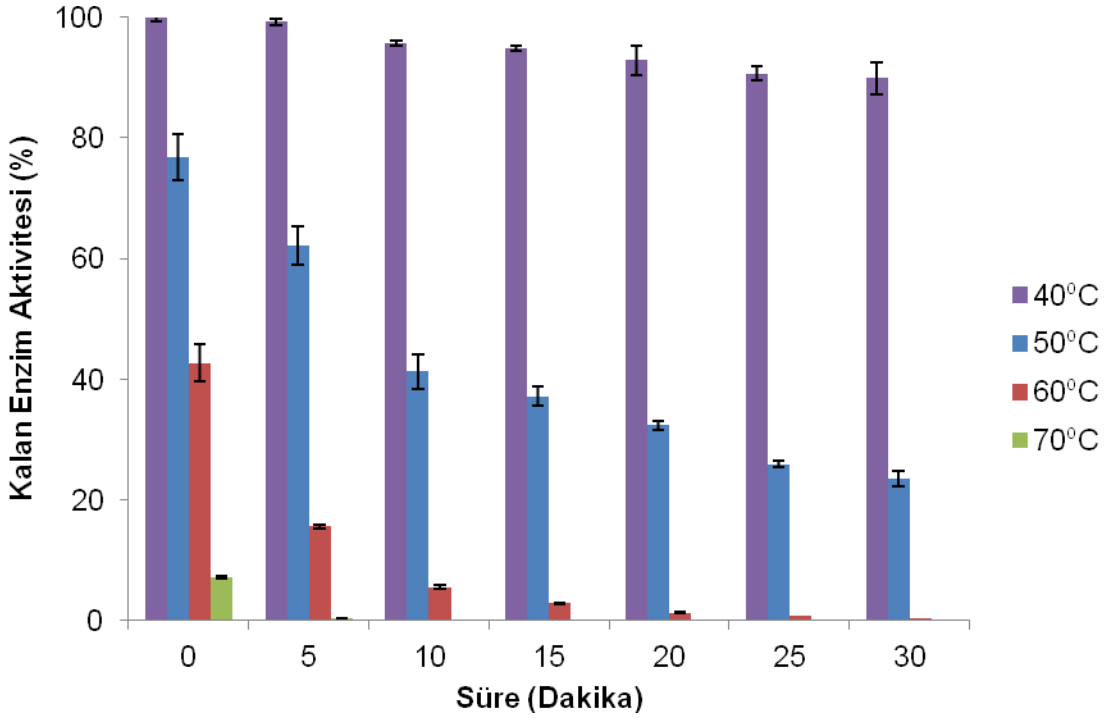
3.5. İstatistiksel Analizler

Veriler Minitab 16 (Minitab Inc.State College, PA) paket program kullanılarak % 95 güven aralığında analiz edilmiş olup verilerin analizinde varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların tespiti için Tukey's çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Her bir deney 3 kez tekrarlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Isıl İşlem Uygulamasının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı zaman aralıkları için ısıl işlem uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi Şekil 1' de gösterilmektedir.



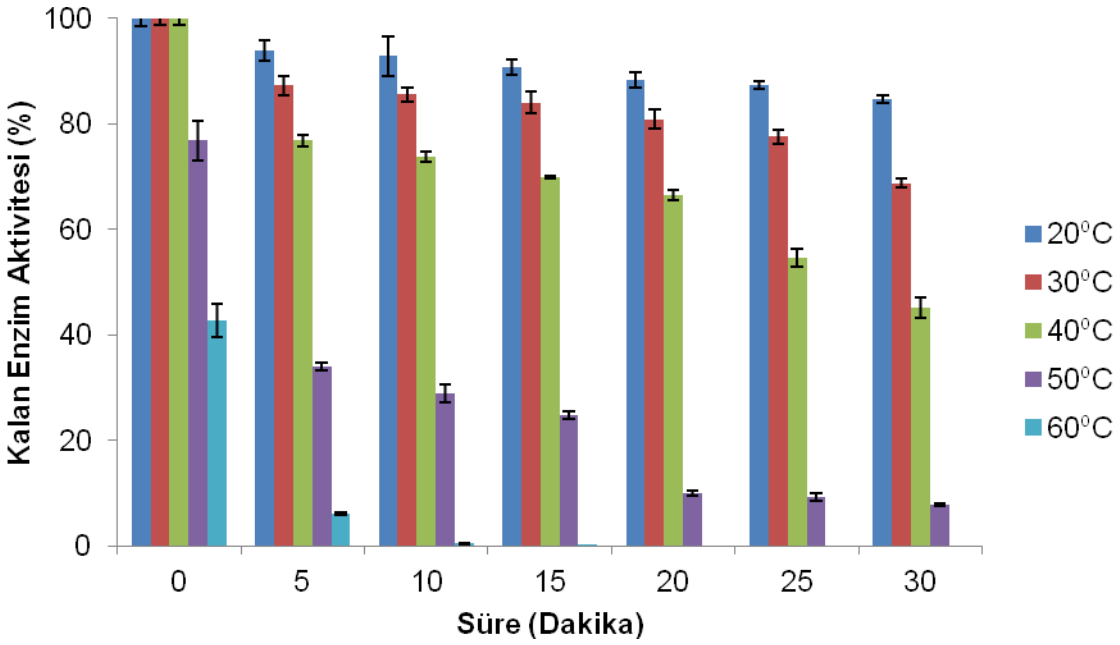
Şekil 1. Isıl işlem uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi

Isıl işlem uygulaması sonrasında enzim aktivitesi belirlenmiş, farklı sürelerde ve sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin 40°C sıcaklığa kadar tamamen aktif kaldığı belirlenmiştir (veriler gösterilmemiştir). 40°C' de 30 dakika ısıl işlem uygulaması boyunca aktivitede hafif bir azalma gözlenmiş ve 30 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi %89.84 ± 2.70 olarak belirlenmiştir. 50-70°C sıcaklık aralığında enzim aktivitesinde hızlı bir düşüşün olduğu, 70°C de

5 dakika sonunda %99 oranında enzimin inaktive olduğu ve 80°C üzerinde herhangi bir aktivite gözlenmediği bulunmuştur. 50 ve 60°C' de 30 dakikalık ısıl işlem uygulamasının ardından kalan enzim aktivitesi sırasıyla %23.60 ± 1.26 ve %0.42 ± 0.03 olarak belirlenmiştir. Literatüre göre ısıl işlem uygulanan mantar PPO enziminin 45°C' ye kadar tamamen aktif olarak kaldığı, 45-70°C arasında kademeli bir düşüş gözlendiği ve 70°C üzerinde herhangi bir aktivite gözlenmediği bulunmuştur (Mccord ve Kilara 1983). Bulunan sonuçların literatür verileri ile uyumlu olduğu gözlemlemiştir. Şekil 1. 'den görüldüğü gibi, PPO inaktivasyon oranının, artan sıcaklık ve süre ile arttığı gözlenmektedir ($P < 0.05$).

4.2. Termosonikasyon Uygulamasının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

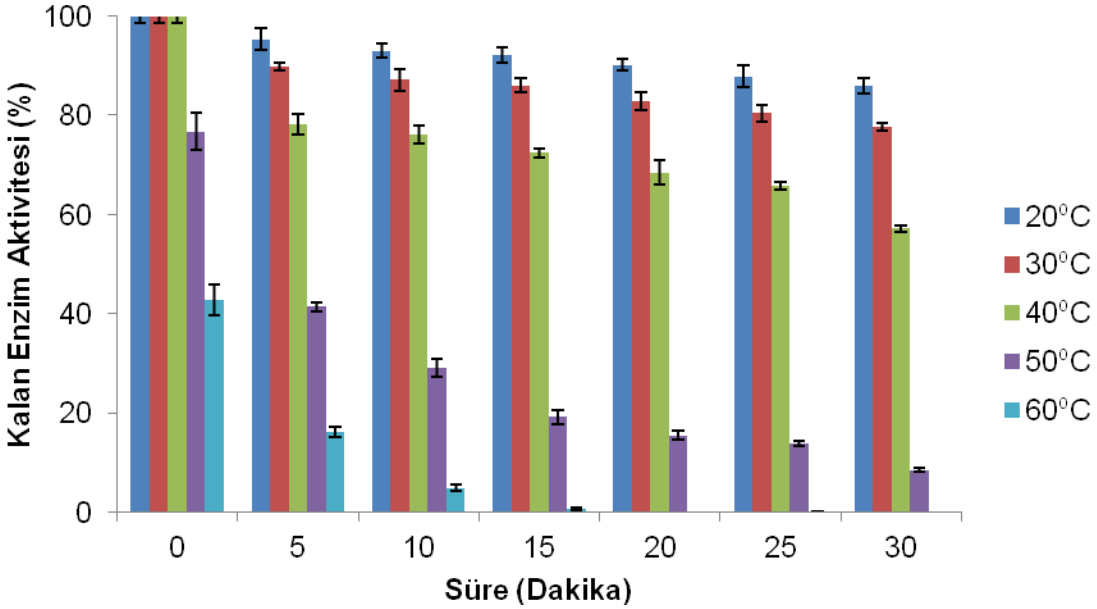
%100 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi Şekil 2' de gösterilmektedir.



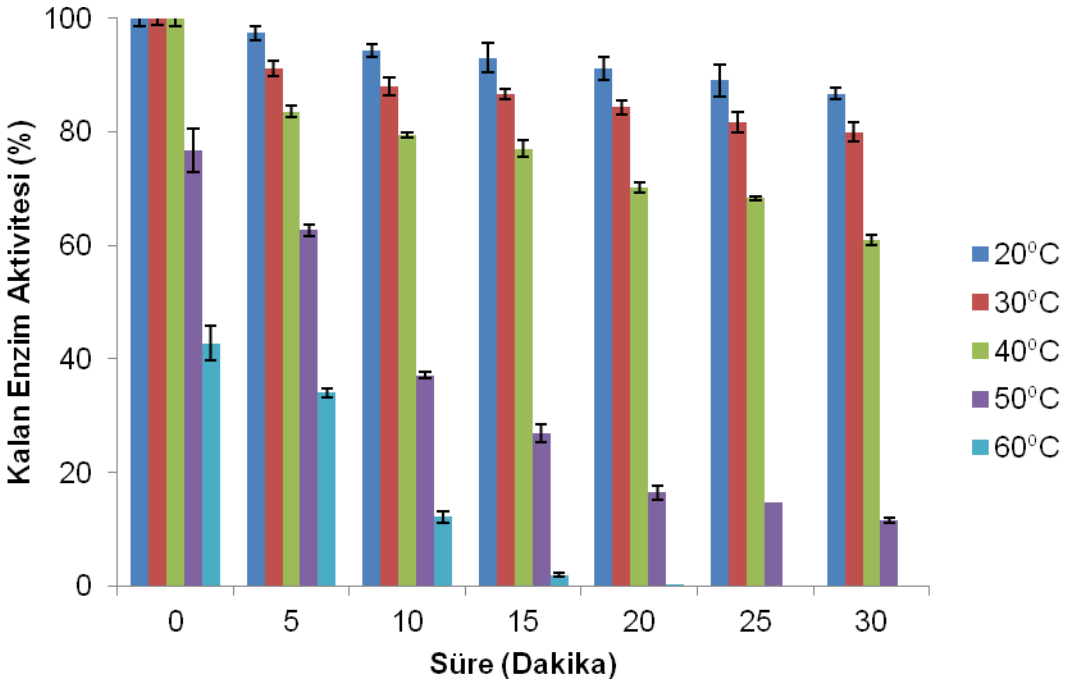
Şekil 2. %100 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi

PPO aktivitesine termosonikasyonun etkisi incelendiğinde enzim aktivitesi 20 °C' de 30 dakikalık ultrason uygulaması boyunca hafif bir azalma gösterirken, 30-60°C aralığında daha hızlı bir inaktivasyon elde edildiği gözlenmiştir. Termosonikasyon işleminde artan sıcaklık, zaman ve genlik ile enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. 20 °C' de 30 dakikalık ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi yaklaşık olarak %15.38 ± 0.83 belirlenmiştir. Buna karşın kalan enzim aktivitesi 30, 40 ve 50°C' de 30 dakikalık ultrason uygulaması sonunda sırasıyla %68.71 ± 0.78, %45.08 ± 1.92 ve %7.68 ± 0.25 olarak bulunmuştur. Mantar PPO enzimi %100 genlikte, 60°C sıcaklıkta 10 dakika sonikasyon sonunda %99 oranında inaktive edilmiştir.

%80 ve 60 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi sırasıyla Şekil 3 ve 4' te gösterilmektedir.



Şekil 3. %80 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi



Şekil 4. %60 genlikte ısı-ultrason uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi

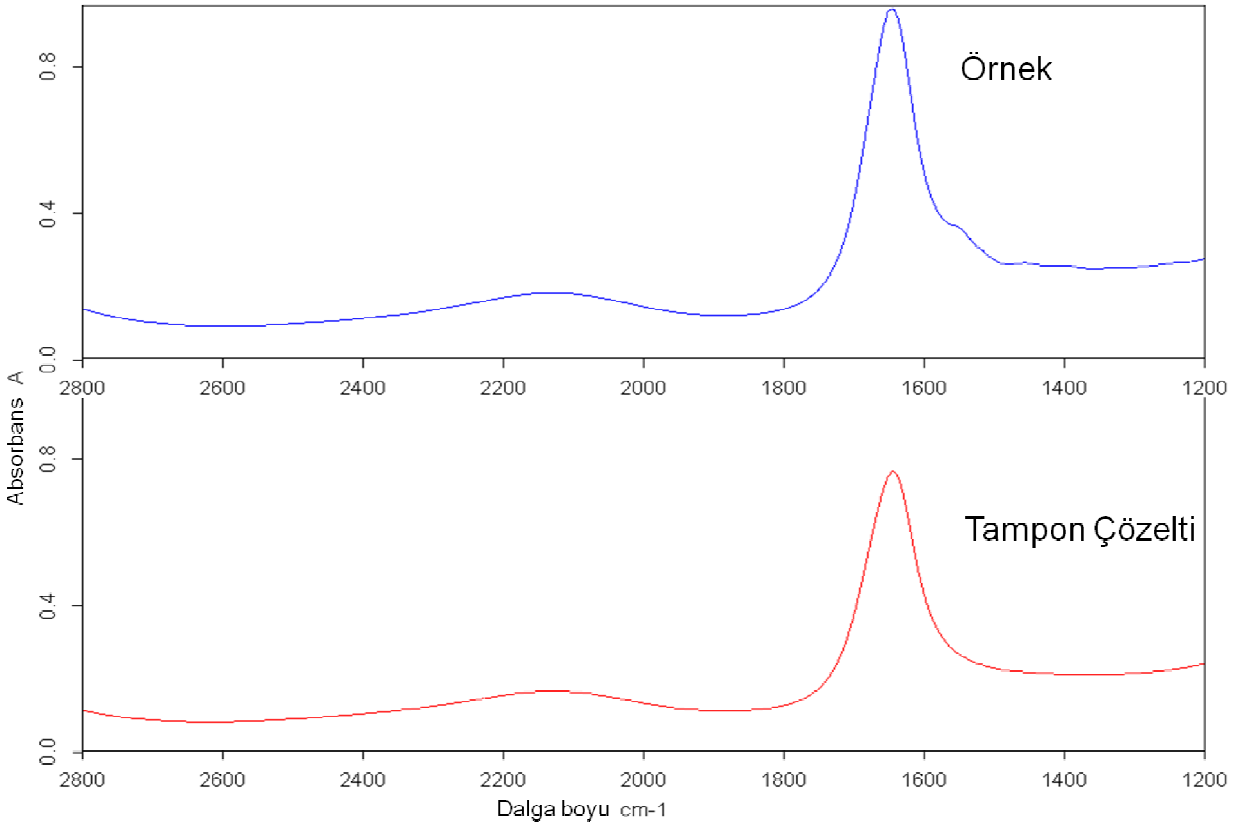
%100 genlikte farklı sıcaklık ve sürelerde gözlemlenen aktivite azalmasına benzer bir eğilim %80 ve 60 genlikte de gözlemlenmiştir. Buna karşın genlik azaldıkça kalan enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. 30 dakika, %80 genlik ultrason uygulamasından sonra, 20, 30, 40 ve 50℃ sıcaklıklar için kalan enzim aktivitesi sırasıyla %85.91 ± 1.64, %77.73 ± 0.79, %57.14 ± 0.75 ve %8.51 ± 0.43 olarak bulunmuştur. Kalan enzim aktivitesi, 30 dakika, %60 genlik ultrason uygulaması sonunda, 20, 30, 40 ve 50℃ sıcaklıklar için sırasıyla %86.67 ± 1.04, %79.93 ± 1.62, %60.94 ± 0.86 ve %11.59 ± 0.50 olarak belirlenmiştir. %99 inaktivasyon 60°C sıcaklıkta, %80 genlikte 15 dakikada, %60 genlikte 20 dakikada elde edilmektedir. Ayrıca, kalan enzim aktivitesinin artan genlik, sıcaklık ve süre ile önemli ölçüde ($P < 0.05$) azaldığı belirlenmiştir.

Isıl işlem ile karşılaştırıldığında ısı- ultrason kombinasyonunun enzim akitivitesini azaltmada daha etkili olduğu ve bulunan sonuçların literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Literatürde ısı ve ultrasonun enzim inaktivasyonu üzerine sinerjetik etkisinin gözlemlendiği çalışmalar

bulunmaktadır. Su teresinde (Nasturtium officinale) bulunan peroksidaz enziminin %90 oranında inaktivasyonunu gerçekleştirmek için 90°C' de 70 saniye ısı uygulanırken bu süre aynı sıcaklıkta termosonikasyon (20 kHz) uygulaması için 5 saniyedir (Cruz ve ark. 2006). Raviyan ve ark. (2005) 50-72°C sıcaklık aralığında ultrason (20kHz, 20 µm genlik) uygulanmış domates suyunda pektinmetil esteraz (PME) inaktivasyonunun tek başına ısı uygulaması ile karşılaştırıldığında artmış olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde mantar PPO enziminin inaktivasyon kinetiği üzerine ısı ve termosonikasyonun etkisinin 55-75°C sıcaklık aralığında çalışılmış, ultrason ve ısının kombine etkisinin sinerjik olarak inaktivasyon kinetiğini arttırmada yararlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada termosonikasyon ile inaktivasyon sırasında ısıl işlemin etkinliğini sağlamak için su banyosu kullanılmış ve kalan enzim aktivitesi 60°C' de 15 dakikalık termosonikasyon uygulaması sonunda %1 olarak belirlenmiştir. Buna karşın 75°C' de 3 dakikalık termosonikasyon uygulaması sonunda enzimin tamamen inactive olduğu rapor edilmiştir (Cheng ve ark. 2013).

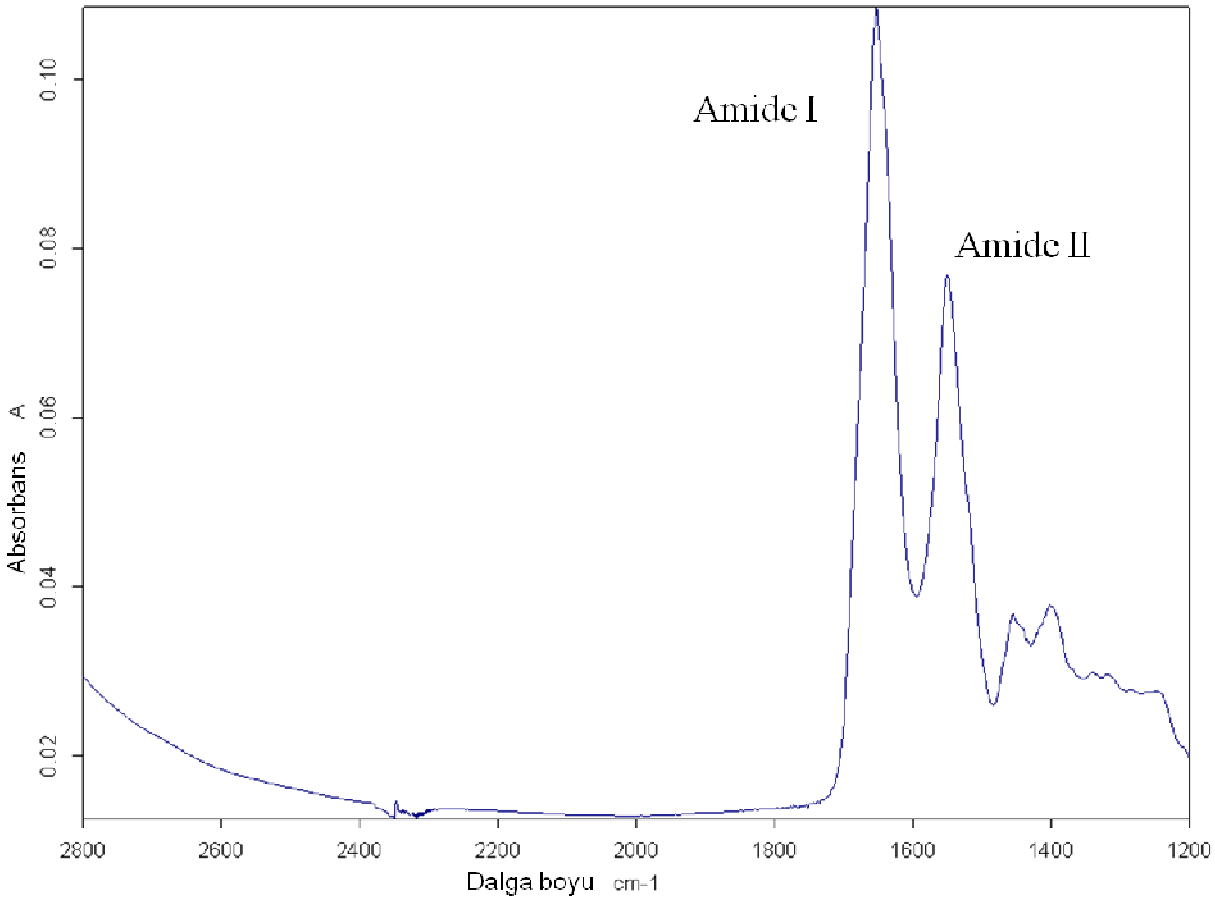
4.3. Enzimin İkincil Yapısının İncelenmesi

Bu çalışmada, enzimin ikincil yapısı Fourier Değişim Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla 50 mM (pH=6.5) potasyum fosfat tamponu içinde çözülmüş mantar PPO enzimi (örnek) ve 50 mM (pH=6.5) potasyum fosfat tamponu bu proje kapsamında satın alınan demonte edilebilir hücre içine yerleştirilebilen CaF_2 pencereler arasına yerleştirilmiş ve spektrumlar elde edilmiştir. Havanın spektrumu arka plan olarak kaydedilmiş ve elde edilen bu spektrumlardan otomatik olarak çıkarılmıştır. Elde edilen örnek ve tampon çözelti spektrumları absorbansa (A) karşı dalga boyu (cm^{-1}) grafiğinde gösterilmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Örnek ve tampon çözelti spektrumları

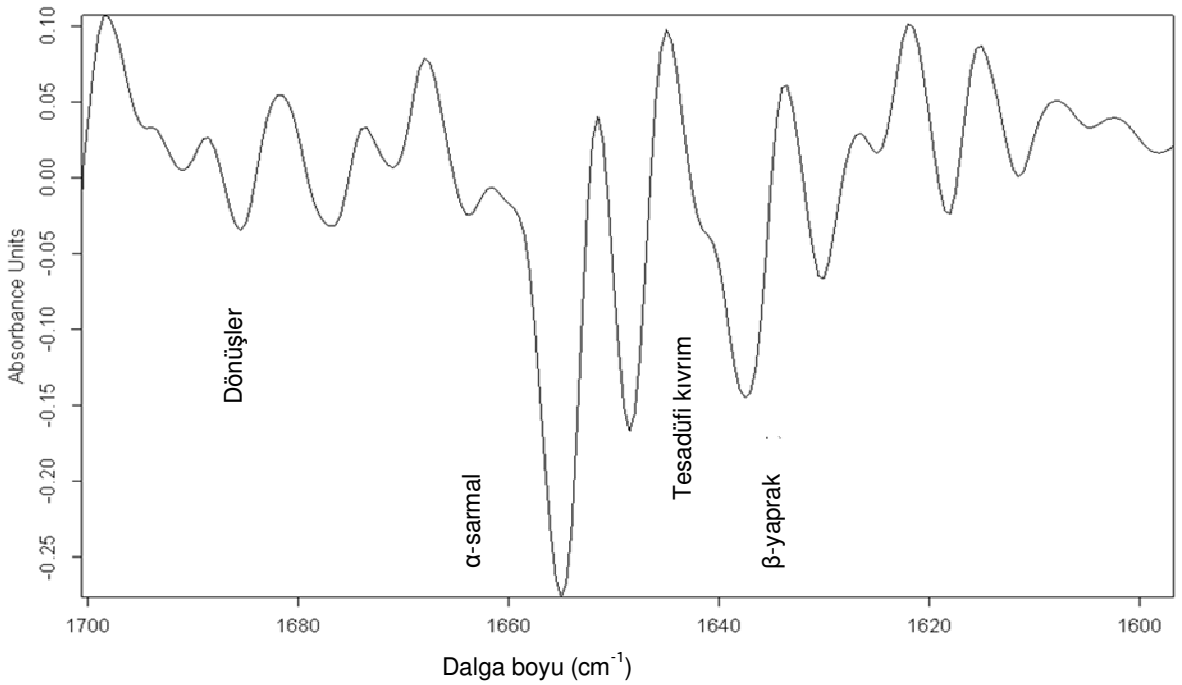
Tampon çözelti spektrumu örnek spektrumundan çıkarılarak su bandları uzaklaştırılmıştır. Çıkarma işlemi sırasında 2125 cm^{-1}' da bulunan su bandı düzleştirilerek, çıkarma işlemi sonrasında protein bandları elde edilmiştir. Elde edilen PPO spektrumu Şekil 6' da gösterilmektedir.



Şekil 6. PPO spektrumu

1653 cm^{-1}' da bulunan pik, protein yapısında bulunan C=O geriliminden (%80) kaynaklanan Amid I bandı olarak; 1550 cm^{-1}' da bulunan pik ise N-H eğilme (60%) ve C-N geriliminden (40%) kaynaklanan Amid II bandı olarak belirlenmiştir (Stuart 2004, Haris ve Severcan 1999).

Proteinler genellikle farklı konformasyonlarda bulunan α-sarmal, β-yapılar, dönüşler ve tesadüfi kıvrımlar gibi çeşitli polipeptid fragmentleri içerir. Bu fragmentlerin analizi için en yararlı kızılötesi bant, yaklaşık 1700 ila 1600 cm^{-1} arasında meydana gelen, Amid I bandıdır. Amid I bandının ikincil türev spektrumu kullanılarak proteinlerin ikincil yapı analizi yapılabilmekte ve ikincil yapıdaki değişimler ikincil türevin alt bantlarının yoğunluklarındaki değişimin incelenmesi ile belirlenebilmektedir (Stuart 2004). PPO enziminin ikincil türev spektrumu Şekil 7' de gösterilmektedir.

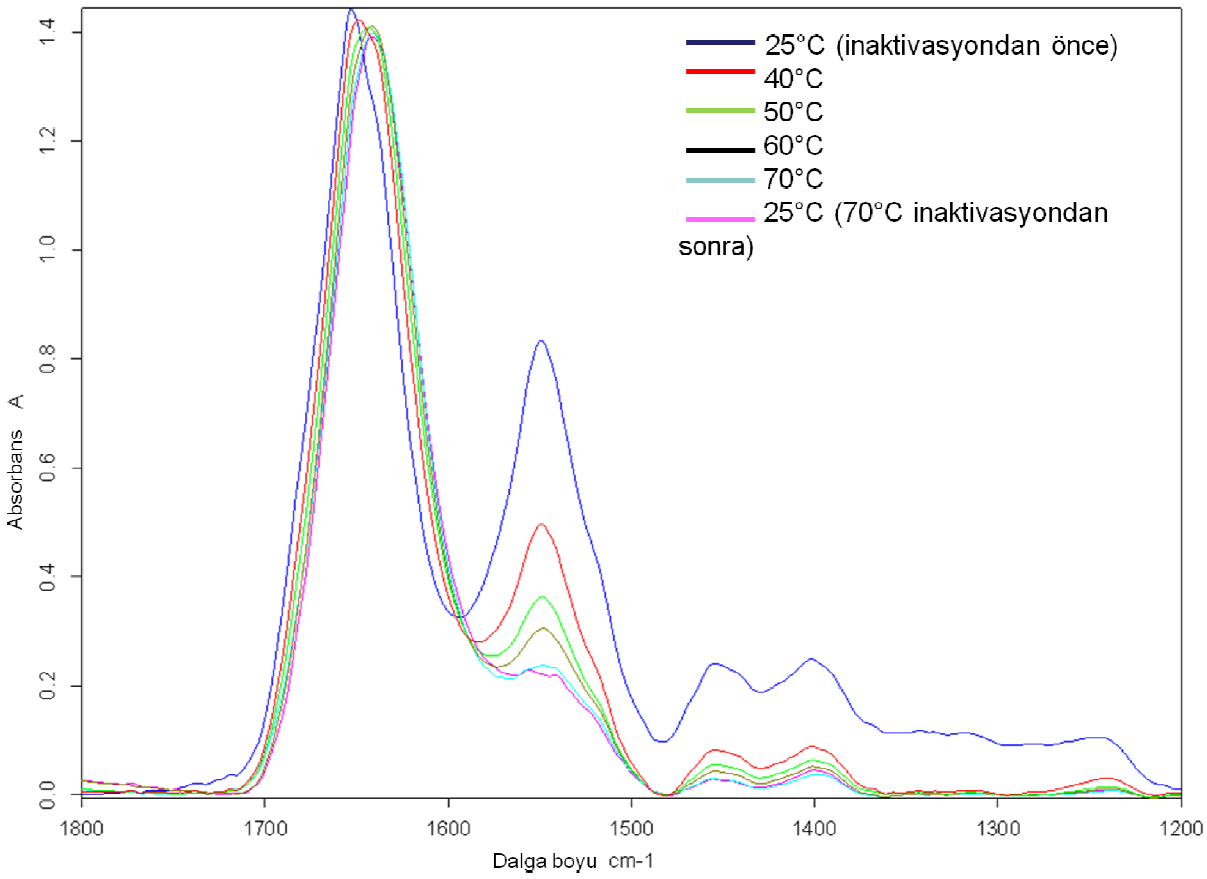


Şekil 7. PPO ikincil türev spektrumu

Literatüre göre 1686 cm^{-1}' da bulunan pik dönüşlerden, 1655 cm^{-1}' da bulunan pik α-sarmal yapıdan, 1648 cm^{-1}' da bulunan pik tesadüfi kıvrımlardan, 1637 ve 1630 cm^{-1}' da bulunan pik β-yaprak yapıdan, 1618 cm^{-1}' da bulunan pik ise antiparalel β-yaprak yapıdan kaynaklanmaktadır (Stuart 2004, Garip ve ark. 2010).

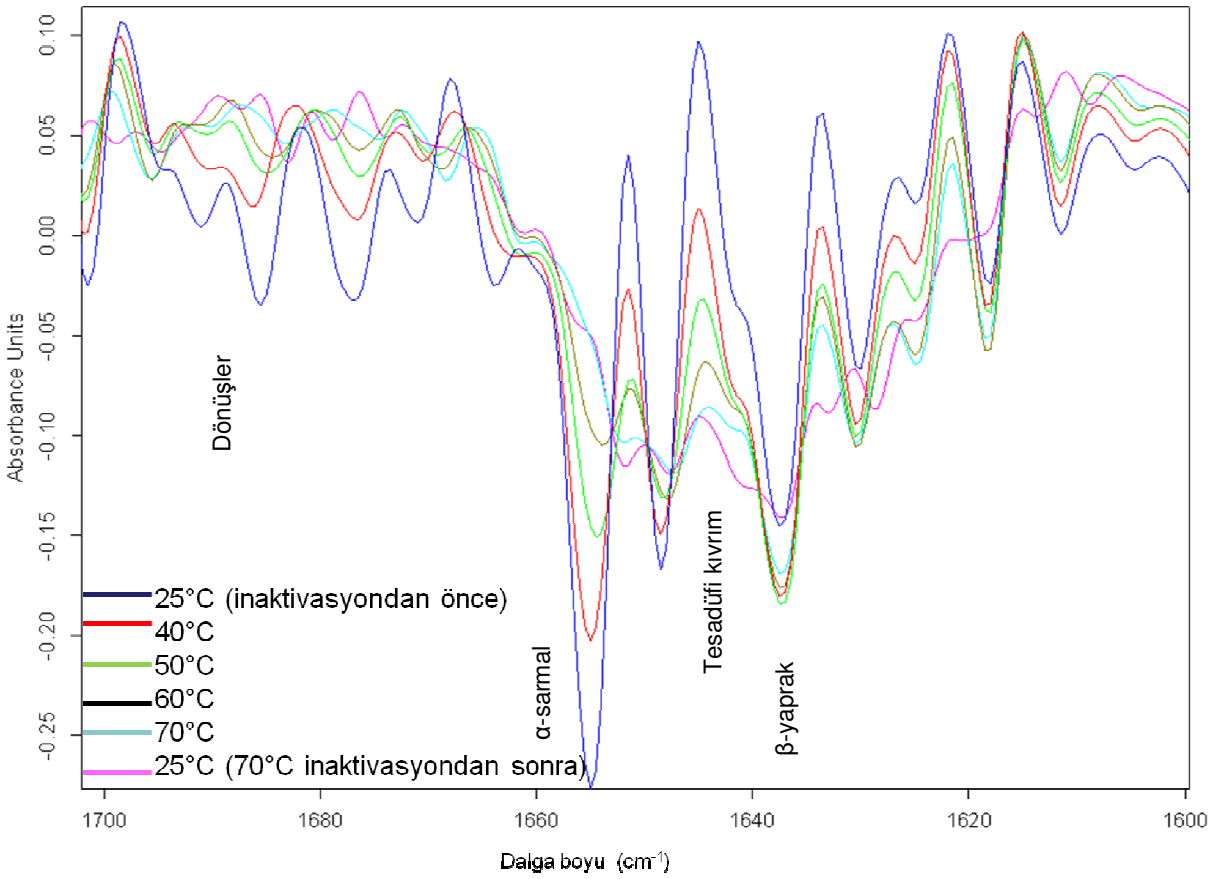
4.4. Mantar PPO Enzimi İkincil Yapısı Üzerine Isıl İşlemin Etkisi

Çalışmanın ikinci bölümünde, ısıl işlem uygulamasının mantar PPO enziminin ikincil yapısı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Isıl işlem uygulamasının etkilerini gözlemlemek için farklı sıcaklıklarda kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları Şekil 8' de gösterilmektedir.



Şekil 8. Farklı sıcaklıklarda kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları

Şekil 8' de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça Amid I bandının pozisyonu değişmektedir. Bu durum enzimin ikincil yapısında bir değişim olduğunu göstermektedir. İkincil yapıdaki değişimlerin daha ayrıntılı incelenmesi amacıyla Amid I bandının ikincil türevi alınarak her bir farklı sıcaklık için alt bandlar belirlenmiş ve Şekil 9' da gösterilmiştir.

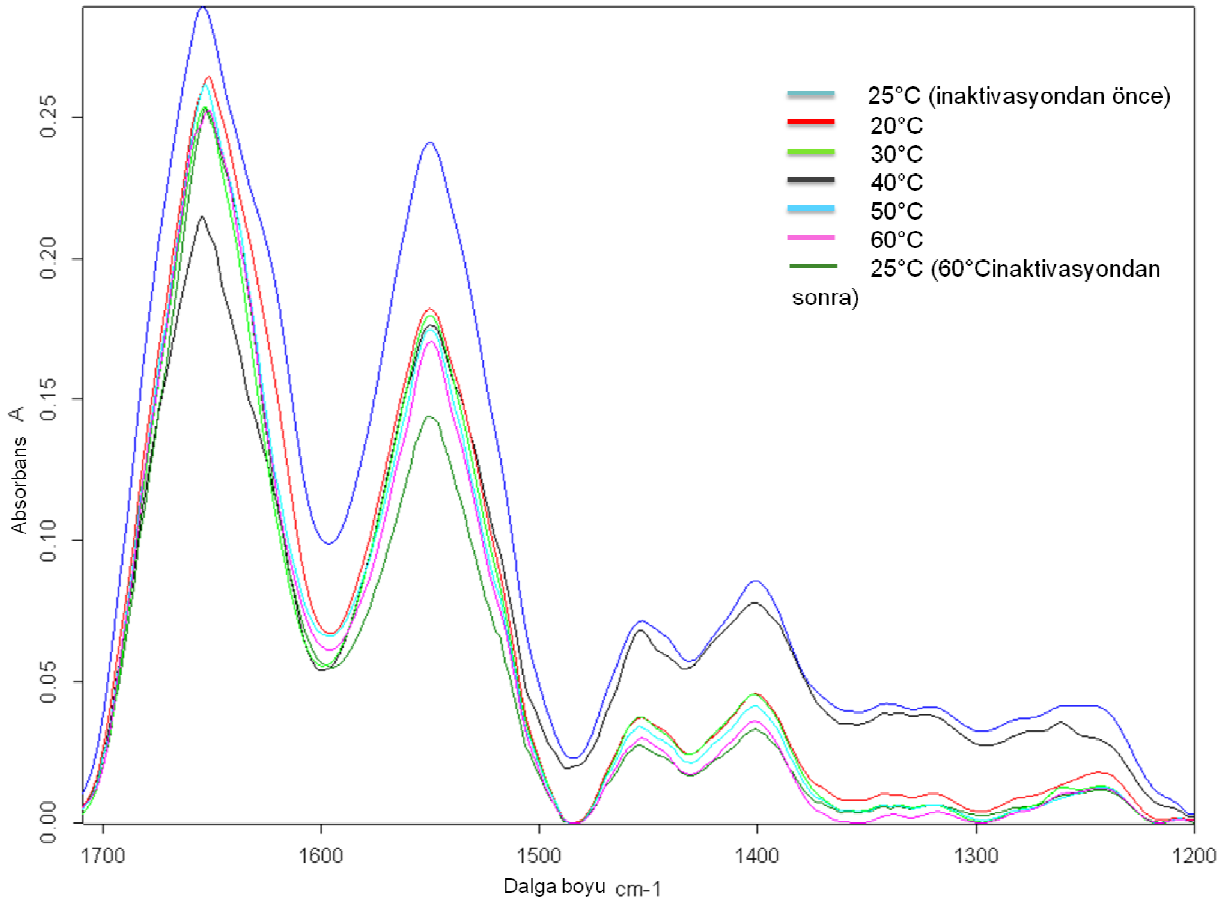


Şekil 9. Farklı sıcaklıklarda kaydedilen mantar PPO enzimi ikincil türev spektrumları

Isıl işlem uygulamasının enzimin ikincil yapısı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla ikincil türev spektrumları incelendiğinde, sıcaklık 25ºC' den 70ºC' ye yükseldiğinde α-sarmal yapıda bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda tesadüfi kıvrımların belirginleştiği ve anti-paralel β-yaprak yapının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum ikincil yapıda bir açılma olduğunu göstermektedir. Sıcaklık, ısıl işlem uygulaması sonunda 70ºC' den 25ºC' ye düşürüldüğünde bu bantların pozisyonlarında bir değişim olmadığı gözlemlenmektedir. Bu durum da uygulanan ısıl işlemin enzimin ikincil yapısı üzerinde geri dönüşümsüz bir inaktivasyona neden olduğunu kanıtlamaktadır.

4.5. Mantar PPO Enzimi İkincil Yapısı Üzerine Ultrason İşlemin Etkisi

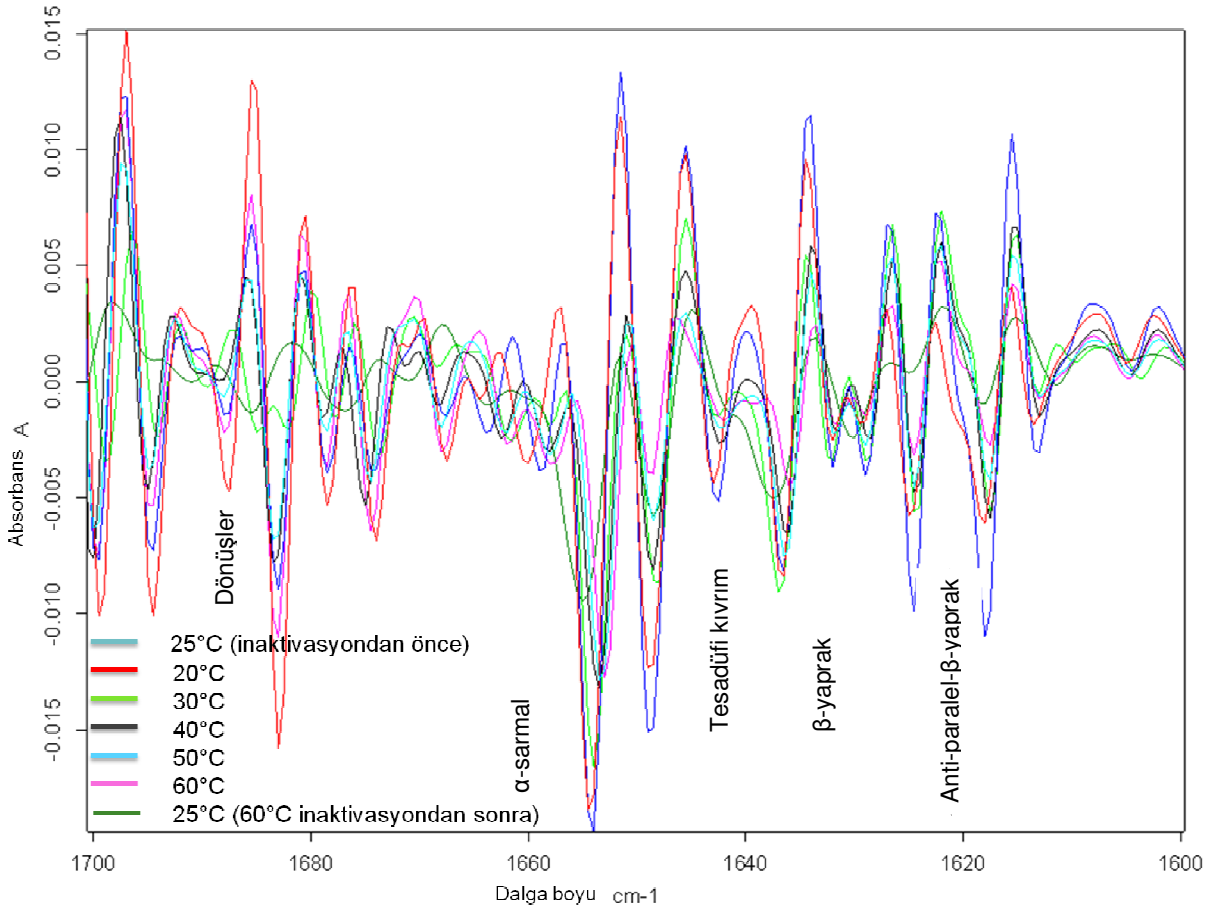
Çalışmanın bu kısmında ısı- ultrason kombinasyonunun mantar PPO enziminin ikincil yapısı üzerindeki etkilerini gözlemlemek için sonikasyon %100 genlikte, 20-60°C sıcaklık aralığında 10°C artış ile 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Termosonikasyon uygulaması ardından kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları Şekil 10' da gösterilmektedir.



Şekil 10. Termosonikasyon uygulaması sonrasında kaydedilen mantar PPO enzim spektrumları

Şekil 10' da görüldüğü gibi uygulanan termosonikasyon sıcaklığı arttıkça Amid I bandının pozisyonu değişmektedir. Bu durum ısıl işlem uygulamasında olduğu gibi enzimin ikincil yapısında bir değişim olduğunu göstermektedir. Bununla beraber ısıl işlem ile kıyaslandığında termosonikasyon işleminin Amid I bandının değişimi üzerinde daha etkili olduğu gözlenmektedir.

İkincil yapıdaki değişimlerin daha ayrıntılı incelenmesi amacıyla Amid I bandının ikincil türevi alınarak her bir uygulama için alt bandlar belirlenmiş ve Şekil 11' de gösterilmektedir.



Şekil 11. Termosonikasyon uygulaması sonrasında kaydedilen mantar PPO enzimi ikincil türev spektrumları

Termosonikasyon uygulamasının enzimin ikincil yapısı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla ikincil türev spektrumları incelendiğinde, uygulanan sonikasyon sıcaklığı arttırıldıkça α-sarmal yapıda bir düşüş olduğu, tesadüfi kıvrımların belirginleştiği ve anti-paralel β-yaprak yapının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum ikincil yapıda bir açılma olduğunu ifade etmektedir. Uygulanan termosonikasyon sonunda sıcaklık tekrar 25ºC' ye düşürüldüğünde bu bantların pozisyonlarında bir değişim olmadığı gözlemlenmektedir. Bu durum ısıl işlem uygulamasında olduğu gibi uygulanan termosonikasyon işleminin enzimin ikincil yapısı üzerinde geri dönüşümsüz bir inaktivasyona neden olduğunu kanıtlamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Isı-ultrason kombinasyonu ile enzim inaktivasyonu konusunda çok fazla çalışma olmasına rağmen enzimlerin konformasyon değişiklikleri üzerine termosonikasyonun etkisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. O nedenle bu çalışmada farklı güç, sıcaklık ve süre etkileri göz önüne alınarak ısı ve ısı-ultrason kombinasyonu ile mantar PPO enzimi inaktive edilmiş, yapısal değişiklikleri belirlemek amacıyla FTIR spektroskopisi kullanılarak protein ikincil yapısı analiz edilmiş ve bu sonuçlar aktivitedeki değişiklikler ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında ısıl işlem uygulamasında artan sıcaklık ve süre ile enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Isıl işlem uygulaması sonrasında enzim aktivitesi ölçüldüğünde 70°C de 5 dakika sonunda %99 oranında enzimin inaktive olduğu ve 80°C üzerinde herhangi bir aktivite gözlenmediği bulunmuştur. Termosonikasyon uygulamasında artan sıcaklık, süre ve genlik ile enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Mantar PPO enzimi %100 genlikte, 60°C sıcaklıkta 10 dakika sonikasyon sonunda %99 oranında inaktive edilmiştir. Buna karşın genlik azaldıkça kalan enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. %99 inaktivasyon 60°C sıcaklıkta, %80 genlikte 15 dakikada, %60 genlikte 20 dakikada elde edilmektedir. Buna göre ısı-ultrason kombinasyonunun enzim akitivtesini azaltmada ısıl işleme kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir.

Isı ve ısı- ultrason kombinasyonunun mantar PPO enziminin ikincil yapısı üzerindeki etkileri incelendiğinde ise, uygulanan sıcaklık arttıkça Amid I bandının pozisyonu değişmektedir. Bu durum enzimin ikincil yapısında bir değişim olduğunu göstermektedir. İkincil yapıdaki değişimlerin daha ayrıntılı incelenmesi amacıyla Amid I bandının ikincil türevi alınarak her bir farklı sıcaklık için alt bandlar belirlenmiştir. İkincil türev spektrumları incelendiğinde, uygulanan sıcaklık arttırıldıkça α-sarmal yapıda bir düşüş olduğu, tesadüfi kıvrımların belirginleştiği ve anti-paralel β-yaprak yapının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum ikincil yapıda bir açılma olduğunu ifade etmektedir. İnaktivasyonlar sonunda sıcaklık tekrar 25ºC' ye düşürüldüğünde bu bantların pozisyonlarında bir değişim olmadığı gözlemlenmektedir.Bu durum her iki yöntemin de enzimin ikincil yapısı üzerinde geri dönüşümsüz bir inaktivasyona neden olduğu göstermektedir. Bununla beraber Amid I bandının pozisyon değişimine bakılarak termosonikasyon işleminin ikincil yapının değişimi üzerinde ısıl işleme kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, ısı-ultrason

kombinasyonunun enzim inaktivasyonunu sağlamada ısıl işleme göre daha etkili olduğu söylenebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında termosonikasyon işleminin mantar PPO enziminin aktivitesi ve ikincil yapı üzerindeki etkisi belirlenmiş ve bu değişimler ısıl işlem inaktivasyonu ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmanın bundan sonra yapılacak benzeri bilimsel çalışmalara örnek teşkil edeceği ve bu projede kurulan sistemin birçok araştırmacıya yeni bir çalışma alanı sağlayacağı düşünülmektedir. Taşıdığı avantajlar nedeniyle bundan sonra yapılacak çalışmalarda Türkiye' de çok tüketilen kayısı, şefali, vişne gibi meyve sularının üretiminde enzim inaktivasyonu için termosonikasyon kullanımını teşvik edebileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçların ultrason uygulamasının endüstrideki enzim inaktivasyonu amacıyla kullanımına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. REFERANSLAR

Cheng X.-F., Zhang M., Adhikari B. 2013. “The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (Agaricus bisporus) during thermal and thermosonic treatments”, Ultrasonics Sonochemistry, 20, 674–679.

Cruz R.M.S., Vieira M.C., Silva C.L.M. 2006. “Effect of Heat and Thermosonication Treatments on Peroxidase Inactivation Kinetics in Watercress (Nasturtium officinale)”, Journal of Food Engineering, 72, 8–15.

Fellows, P.J. 2000. Food Processing Technology: Principles & Practice. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.

Garip S., Yapıcı E., Sımsek OZEK N., Severcan M., Severcan F. 2010. “Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis”, Analyst, 135, 3233–3241.

Gülseren İ., Güzey D., Bruce B.D., Weiss J. 2007. “Structural and Functional Changes in Ultrasonicated Bovine Serum Albumin Solutions”, Ultrasonics Sonochemistry, 14, 173–183.

Haris P.I., Severcan F. 1999. “FTIR Spectroscopic Characterization of Protein Structure in Aqueous and Non-Aqueous Media”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 7, 207–221.

Heinisch O., Kowalski E., Goossens K., Frank J., Heremans K., Ludwig H., Tauscher B. 1995. “Pressure Effects on the Stability of Lipoxygenase: Fourier Transform infrared Spectroscopy (FTIR) and Enzyme Activity Studies”, Zeitschrift fur Lebensmittel und Forschung, 201, 562-565.

Huang H., Xie J., Chen H. 2011. “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.

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

Kadkhodaee R., Povey M.J.W. 2008. “Ultrasonic inactivation of Bacillus a-amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe”, Ultrasonics Sonochemistry, 15, 133–142.

Lo´pez, P., Sala, F. J., de la Fuente, J. L., Condon, S., Raso, J., & Burgos, J. 1994. “Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polypohenol oxidase by manothermosonication”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 252-256.

Ludikhuyze L., Van Loey A., Smout I.C., Hendrickx M. 2003. “Effects of Combined Pressure and Temperature on Enzymes Related to Quality of Fruits and Vegetables: From Kinetic Information

to Process Engineering Aspects", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(5), 527–586.

Mccord, J.D. & Kilara, A. 1983. "Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*)", Journal of Food Science, 48, 1479–1483.

O'Donnell C.P., Tiwari B.K., Bourke P. ,Cullen P.J. 2010. "Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance", Trends in Food Science & Technology, 21, 358-367.

Rahman M.S., 2007. Handbook of Food Preservation Second Edition, CRC Press.

Raviyan, P., Zhang, Z., & Feng, H. 2005. "Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation", Journal of Food Engineering, 70, 189-196.

Severcan F., Haris P. 2003. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy Suggests Unfolding of Loop Structures Precedes Complete Unfolding of Pig Citrate Synthase", Biopolymers, 69, 440-447.

Shi C., Dai Y., Liu Q., Xie Y, Xu X. 2003. The FT-IR Spectrometric Analysis of the Changes of Polyphenol Oxidase II Secondary Structure, *Journal of Molecular Structure*, 644, 139–144, (2003).

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

Sun N.K., Song K.B. 2003. "Effect of Nonthermal Treatment on the Molecular Properties of Mushroom Polyphenoloxidase", Journal of Food Science, 68(5), 1639-1643.

Vercet, A., Lopez, P., & Burgos, J. 1999. "Inactivation of heat-resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47, 432-437.

Weemaes C., Rubens P., De Cordt S., Ludikhuyze L., Van Den Broeck I., Hendrickx M., Heremans K., Tobback P. 1997. "Temperature Sensitivity and Pressure Resistance of Mushroom Polyphenoloxidase", Journal of Food Science, 62(2), 261-266.

Whitaker, J.R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, INC.

Yi J.Y., Dong P., Wang Y.T., Jiang B., Liao X.J., Hu X.S., Zhang Y. 2012. " 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.

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 112O433
Proje Başlığı: Polifenol oksidaz enziminin ısı-ultrason kombinasyonu ile inaktivasyonu sırasında enzimin yapısında meydana gelen değişimin Fourier Değişim Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopisi ile incelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Alev Bayındırlı, Hande Baltacıoğlu
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Üniversiteler Mahallesi, Dumlupınar Bulvarı No:1 06800 Çankaya Ankara/TURKEY
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/10/2012-01/10/2013
Öz (en çok 70 kelime) Bu araştırmada ısı ve ısı-ultrason kombinasyonu inaktivasyonu farklı güç, sıcaklık ve süre etkileri göz önüne alınarak, PPO enziminin yapısal değişikliklerini belirlemek amacıyla, FTIR spektroskopisi kullanılarak protein ikincil yapısı analiz edilmiş ve bu sonuçlar aktivitedeki değişiklikler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler ışığında ısı-ultrason kombinasyonunun enzim akitivtesini azaltmada ve ikincil yapının değişimi üzerinde ısıl işleme kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir.
Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, enzim inaktivasyonu, ultrason, Fourier Değişim Kızıl Ötesi spektroskopisi, protein ikincil yapısı
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? **Evet** ☐ **Gerekli Değil** ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: **Baltacıoğlu, H.**, Bayındırlı A. and Severcan F. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometric Analysis of Structural Changes of Mushroom Polyphenol Oxidase During Inactivation by Thermosonication. EuroFoodChem XVII. 07-10 May 2013, İstanbul, Türkiye.