

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*SIDERITIS PERFOLIATA* L. SUBSP. *ATHOA* (PAPAN. &  
KOKKINI) BADEN'DEN ELDE EDİLEN  
POLİFENOLOKSİDAZİN KİSMİ BİYOKİMYASAL  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADİR BOZDEMİR

BALIKESİR, HAZİRAN - 2014

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*SIDERITIS PERFOLIATA* L. SUBSP. *ATHOA* (PAPAN. &  
KOKKINI) BADEN'DEN ELDE EDİLEN  
POLİFENOLOKSİDAZİN KİSMİ BİYOKİMYASAL  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI


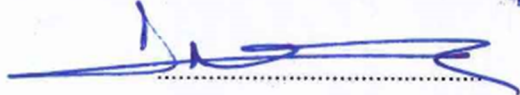
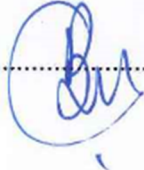
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADİR BOZDEMİR

BALIKESİR, HAZİRAN - 2014

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Kadir BOZDEMİR** tarafından hazırlanan “*SIDERITIS PERFOLIATA* L. SUBSP. *ATHOA* (PAPAN. & KOKKINI) BADEN'DEN ELDE EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZIN KISMİ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 04.06.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Danışman Prof. Dr. Serap DOĞAN	
Üye Prof. Dr. Fatih SATIL	
Üye Doç. Dr. Baki ÇİÇEK	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

## ÖZET

***SIDERITIS PERFOLIATA* L. SUBSP. *ATHOA* (PAPAN. & KOKKINI)  
BADEN'DEN ELDE EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZIN KISMİ  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KADİR BOZDEMİR  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

Bu çalışmada, dağçayından (*Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden) polifenol oksidaz (PFO) enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleriyle kısmen saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Dağçayı PFO'sunun substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, inhibisyon tipleri ve  $I_{50}$  değerleri belirlenmiştir. Enzimin 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlarına karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzimin katalizleme gücünü gösteren  $V_{max}/K_M$  değerlerine göre en iyi substratın 4-metilkatekol olduğu ve bunu katekol ve pirogallolun takip ettiği belirlenmiştir. Optimum pH, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için sırasıyla 5.0, 7.0 ve 7.5 olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı 4-metilkatekol, katekol için 20 °C ve pirogallol için ise 50 °C olarak tespit edilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan PFO aktivitesi üzerine askorbik asit, glutamik asit ve L-sistein gibi farklı inhibitörlerin etkileri 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak spektrofotometrik olarak araştırılmıştır. Substrat olarak 4-metilkatekol ve katekol kullanıldığında en etkin inhibitörün L-sistein, substrat olarak pirogallol kullanıldığında en etkin inhibitörün askorbik asit olduğu bulunmuştur. Bradford methodu kullanılarak elde edilen bulgular enzim ekstraktının 14,06 mg/100 g protein içeriğine sahip olduğunu göstermiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Polifenol oksidaz, dağçayı, *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa*, substrat spesifikliğı, pH, sıcaklık, inhibisyon

## ABSTRACT

**PARTIAL BIOCHEMICAL PROPERTIES INVESTIGATION OF  
POLYPHENOLOXIDASE OBTAINED FROM *SIDERITIS PERFOLIATA* L.  
SUBSP. *ATHOA* (PAPAN. & KOKKINI) BADEN  
MSC THESIS  
KADIR BOZDEMIR  
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY  
(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN )**

**BALIKESİR, JUNE 2014**

In this study, a partial purified of polyphenol oxidase (PPO) obtained from sage (*Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden) was described that PPO is characterization through  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation and dialysis. The samples obtained from  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation and dialysis were used for the characterization of PPO. The characterization of PPO was studied in terms of substrate specificity, optimum pH and temperature. It was found that the enzyme had an activity with 4-methylcatechol, catechol, and pyrogallol substrates. Of these three substrates, 4-methylcatechol was the best substrate because of the highest  $V_{\text{max}}/K_m$  value, followed by catechol and pyrogallol. The optimum pH was at 5.0; 7.0 and 7.5 for 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates, respectively. The enzyme had an optimum temperature of 20, 20 and 50 °C for the 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates, respectively. The effect of different inhibitors such as ascorbic acid, glutamic acid and L-cysteine on partially purified polyphenol oxidase activity was investigated spectrophotometrically by using 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates. It was found the most effective inhibitor L-cystein using 4-methylcatechol and catechol, the most effective inhibitor ascorbic acid using pyrogallol. Protein amount of the enzyme extract was showed 14,06 mg/100g using by Bradford method.

**KEYWORDS:** Polyphenol oxidase, sage, *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa*, substrat specificity, pH, temperature, inhibition

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Sideritis perfoliata</i> L. subsp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini) Baden .....	2
1.2 Polifenol Oksidaz .....	4
1.2.1 Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı .....	5
1.2.2 Polifenol Oksidazın Substratları .....	6
1.3 Enzimatik Kararma .....	7
1.4 Enzim Kinetiği.....	9
1.5 İnhibisyon.....	11
1.5.1 Yarışmalı İnhibisyon .....	12
1.5.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon .....	14
1.5.3 Karışık Tür İnhibisyon.....	15
1.6 Literatür Özeti .....	16
1.7 Amaç ve Kapsam.....	18
<b>2. MATERYAL METOT .....</b>	<b>20</b>
2.1 Materyal .....	20
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	20
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	21
2.2 Ham Ekstraktların Hazırlanışı .....	21
2.3 Polifenol Oksidazın Kısmi Saflaştırılması .....	22
2.4 Spektrofotometrik Ölçümler .....	23
2.5 Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	23
2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	23
2.7 İnhibisyon.....	24

2.8	<i>Sideritis perfoliata</i> L. subsp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini) Baden'in Ekstraktının Protein İçeriği .....	25
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>26</b>
3.1	<i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'nın Ekstraktının Protein İçeriği .....	26
3.2	<i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'nun Substrat Spesifikliği .....	26
3.3	Optimum pH.....	28
3.4	Optimum Sıcaklık.....	30
3.5	Polifenoloksidazın İnhibisyonu .....	31
3.6	I <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....	49
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>59</b>
4.1	<i>S. perfoliata</i> L.subsp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini) Baden'in Toplam Protein İçeriği.....	59
4.2	Optimum pH.....	60
4.3	Optimum Sıcaklık.....	62
4.4	Substrat Spesifikliği.....	63
4.5	Enzim İnhibisyonu.....	65
4.5.1	Yarışmalı İnhibisyon .....	66
4.5.2	Yarı-yarışmalı İnhibisyon.....	67
4.5.3	Karışık Tür İnhibisyon.....	68
4.6	I <sub>50</sub> Değerleri .....	69
<b>5.</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1. 1: <i>Sideritis perfoliata</i> L. subsp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini) Baden'in fotoğrafi .....	3
Şekil 1. 2: Enzimatik kararmada polifenol oksidazın rolü .....	4
Şekil 1. 3: Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı ve oksijen kırmızı renkle gösterilmiştir).....	5
Şekil 1. 4: Meyve ve sebzelerin yapısında doğal substrat olarak bulunan bazı fenolik bileşikler .....	7
Şekil 1. 5: Michelis-Menten eğrisi .....	10
Şekil 1. 6: Lineweaver-Burk grafiği .....	11
Şekil 1. 7: Yarışmalı inhibisyon için enzim substrat kompleksi.....	12
Şekil 1. 8: Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri .....	13
Şekil 1. 9: Yarı-yarışmalı inhibisyon için enzim substrat kompleksi.....	14
Şekil 1. 10: Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.....	15
Şekil 1. 11: Karışık inhibisyon için enzim substrat kompleksi.....	15
Şekil 1. 12: Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.....	16
Şekil 2. 1: Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları .....	24
Şekil 3.1 : Katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenoloksidazı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrileri .....	28
Şekil 3.2 : <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimi .....	29
Şekil 3.3 : <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> bitkisinden elde edilen PFO aktivitesinin sıcaklıkla değişimi .....	31
Şekil 3.4 : 4-metilkatekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S.</i> <i>perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenoloksidazının inhibisyonunu için $1/V_0-$ $1/[S]$ eğrileri .....	33
Şekil 3.5 : 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S.</i> <i>perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri .....	35



<b>Şekil 3.6</b> : 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	37
<b>Şekil 3.7</b> : Katekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri. ....	39
<b>Şekil 3.8</b> : Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri. ....	41
<b>Şekil 3.9</b> : Katekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri. ....	43
<b>Şekil 3.10</b> : Pirogallol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri. ....	45
<b>Şekil 3.11</b> : Pirogallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	47
<b>Şekil 3.12</b> : Pirogallol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'sunun inhibisyonunu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	49
<b>Şekil 3.13</b> : 4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. 51	
<b>Şekil 3.14</b> : 4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.....	51
<b>Şekil 3.15</b> : 4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu..	52
<b>Şekil 3.16</b> : Katekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> Baden polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. 54	
<b>Şekil 3.17</b> : Katekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. ....	54
<b>Şekil 3.18</b> : Katekol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. ....	55
<b>Şekil 3.19</b> : Piragallol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.....	57
<b>Şekil 3.20</b> : Piragallol substratı kullanılarak <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. ....	57

**Şekil 3.21** : Piragallol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu. .... 58

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1:</b> <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'dan elde edilen polifenoloksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler.....	27
<b>Tablo 3.2:</b> <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler.....	29
<b>Tablo 3.3:</b> <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait veriler.....	30
<b>Tablo 3.4:</b> 4-metilkatekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	32
<b>Tablo 3.5:</b> 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	34
<b>Tablo 3.6:</b> 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	36
<b>Tablo 3.7:</b> Katekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	38
<b>Tablo 3.8:</b> Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	40
<b>Tablo 3.9:</b> Katekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	42
<b>Tablo 3.10:</b> Pirogallol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	44
<b>Tablo 3.11:</b> Pirogallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler .....	46
<b>Tablo 3.12:</b> Pirogallol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	48

<b>Tablo 3.13:</b> Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri.....	50
<b>Tablo 3.14:</b> Bir substrat olarak katekol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri. ....	53
<b>Tablo 3.15:</b> Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri.....	56
<b>Tablo 4.1:</b> <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'dan elde edilen PFO'nun substrat spesifikliğı .....	64
<b>Tablo 4.2:</b> Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi, Ki ve Ki' değerleri .....	68
<b>Tablo 4.3:</b> Substrat olarak katekol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi, Ki ve Ki' değerleri ..	69
<b>Tablo 4.4:</b> Substrat olarak pirogallol kullanıldığında <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> 'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi, Ki ve Ki' değerleri .....	69
<b>Tablo 4.5:</b> <i>S. perfoliata</i> subsp. <i>athoa</i> PFO'nun glutamik asit, L-sistein ve askorbik asit inhibitörlerine ait I50 değerleri.....	70

## SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
<b>PFO</b>	Polifenoloksidaz enzimi
<b>E.C.</b>	Enzim kod numarası
<b>E.Ü.</b>	Enzim ünitesi
<b>I<sub>50</sub></b>	%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
<b>V<sub>0</sub></b>	Başlangıç anındaki hız
<b>V<sub>max</sub></b>	Enzimin substrata doyduğu andaki hızı
<b>K<sub>M</sub></b>	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu
<b>[S]</b>	Substrat konsantrasyonu
<b>[I]</b>	İnhibitör konsantrasyonu
<b>V</b>	Süpernatant hacmi
<b>S<sub>1</sub></b>	1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu
<b>S<sub>2</sub></b>	1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan, bize her türlü desteği sağlayan çok saygıdeğer Sayın Prof. Dr. Serap DOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım da yardımlarını esirgemeyen Dr. Ümran ALAN ve Uzm. Mehmet Emin DİKEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bitki temin ve teşhisinde yardımcı olan Öğr. Görevlisi Mikail ACAR'a , Ömer Faruk KARASAKAL'a ve Mehmet Bahadır BAŞOĞLU'na, ayrıca tüm çalışmalarım esnasında anlayışlı ve yardımsever laboratuvar arkadaşlarıma ve Anıl KARAAĞAÇ'a da çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve her şeyimi bir borç bildiğim, canımdan çok sevdiğim aileme, annem Nihal BOZDEMİR, babam Veysel BOZDEMİR, abim Murat BOZDEMİR ve ailesi, anneannem Zuhale AYDIN'a gösterdikleri sabır ve anlayış için, maddi ve manevi destekleri için çok çok teşekkür ederim.

BALIKESİR 2014

Kadir BOZDEMİR

## 1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinde enzimler özellikle son yıllarda tüketiciye cazip gelecek yüksek besleyicilik değerine sahip gıdaların geliştirilmesi ve üretiminde gittikçe artan bir öneme sahip olmaya başlamışlardır. Gıdaların korunmasına ilişkin olarak yapılması gereken temel uygulamalardan birisi dokulardaki kimyasal olayların kontrol altına alınmasıdır [1]. Özellikle meyve ve sebzelerin hasat edilmesi, taşınması, depolanması veya işlenmesi sırasında meydana gelen doku zedelenmeleri, bir takım kimyasal reaksiyonlara maruz kalarak kahverengi veya esmerleşme olarak bilinen kararmalara neden olmaktadır [2]. Meyve ve sebzelerde ortaya çıkan enzimatik kararma istenmeyen renk, koku ve tad oluşumuna neden olmakta, bu da gıdaların besin değerinin önemli ölçüde düşmesine sebep olmaktadır. Enzimatik kararmanın başlıca sorumlusu polifenol oksidazdır (PFO). Polifenol oksidaz (PFO; E.C. 1.14.18.1), bitkiler aleminde yaygın şekilde bulunan monofenollerin *o*-hidroksilasyonunu katalizleyen ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara yükseltgenmesini sağlayan bakır içeren bir monooksijenazdır [1]. Meydana gelen kinonlar koyu renkli pigmentlere kondenze olabileceği gibi bazı proteinlerin yapısına da bağlanır. PFO'nun bitkilerdeki mevcudiyeti sınırlı olsa bile tabiattaki rolü oldukça fazladır. Kısmen de olsa enzimin önemli bir görevi bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direncinde rol oynamasıdır. Bitkilerin enfeksiyona karşı direnci ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada enzimin faaliyeti sonucu oluşan kinonların ikinci bir polimerizasyon reaksiyonuna uğraması ile koyu renkli, suda çözünmeyen polimerler oluştuğu belirtilmiştir. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı tampon görevi yapmaktadır. Öte yandan bazı tahıllardan elde edilen unlardaki yüksek PFO aktivitesinden dolayı, ekmek ve makarna ürünlerinin kararma gösterdiği enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan kinonların proteinlerle birleşerek onların hazmolma yeteneklerini ve bu arada lizin amino asidinin yararlılığını azalttığı bildirilmiştir. Siyah çay üretiminde ise enzimatik kararma istenen bir olaydır. Kinonlar çaya içim tadı ve kalitesini kazandıran teaflavin ve tearübişinlerin ön maddeleridir. Açık renkli meyvelerden elde edilen meyve sularının altın sarısı rengi, ılımlı ve kontrollü bir esmerleşme ile elde edilir. Kakao ve

kahvenin renk ve aroması, siyah zeytinin renk ve lezzetinde enzimatik kararmanın rolü oldukça büyüktür [3].

Bu çalışmada, *Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden'den elde edilen PFO kısmen saflaştırılarak substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık, inhibisyon kinetiği ve protein içeriği gibi bazı biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma günlük tüketilen bitkisel çaylar arasında *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa*'nın tercihi hakkında bize önemli katkılar sağlayacaktır.

### 1.1 *Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden

*Sideritis* cinsi, bitkiler aleminin zengin familyalarından biri olan Lamiaceae'ye aittir. Lamiaceae familyasında yer alan bitkiler hemen her çeşit habitatta ve yükseltide yayılış göstermekle birlikte asıl yayılış alanlarının çoğunluğu Akdeniz havzası olmak üzere, Kanarya Adaları'na kadar olan bölgeyi kapsamaktadır. *Sideritis* türleri halk arasında adaçayı, dağçayı, yaylaçayı adları ile tanınmaktadır [4,5].

Tıbbi ve aromatik bitkiler içinde önemli bir yere sahip olan *Sideritis* türlerinin adı eski Yunancada “*Sideron-Kılıç yarasını iyileştiren*” kelimesinden türetilmiştir [6,7]. Literatürde, *Sideritis* türlerinin eskiden beri hem Türkiye hem de Avrupa'da kırsal yörede halk ilacı olarak tüketildiği, ayrıca Avrupa'nın yanısıra Anadolu'da, özellikle Ege ve Akdeniz bölgesinde bitkisel çay olarak da kullanıldığı rapor edilmiştir [6,8]. Halk arasında ağrı kesici, antiromatizmal, sindirimi kolaylaştırıcı ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle kullanıldığı belirlenmiştir [8]. Halk tıbbında *Sideritis* türlerinin sinir sistemi uyarıcısı, yatıştırıcısı, ateş düşürücü, öksürük giderici, sindirim sistemi düzenleyici, enfeksiyonlara karşı tonik olarak, histeriye karşı, idrar söktürücü etkisinden dolayı böbrek taşlarının düşürülmesinde, deri döküntüsü ve yaralarının tedavisinde, kan dindirici ve şeker hastalığında kullanıldığı bilinmektedir [9]. Ayrıca Türkiye'de bazı *Sideritis* türleri; iştah açıcı, iltihap dağıtıcı, tonik, gaz söktürücü, kas gevşetici, mide ağrılarını kesici ve soğuk algınlığında ağrı kesici olarak kullanılmaktadır [7]. Son yıllarda *Sideritis*'in antistres, antioksidan, ve



antibakteriyal etkileri belirlenmiştir [5]. Tıbbi özelliklerinin yanısıra bazı *Sideritis* türlerinin, böcek kovucu özelliklerinin olduğu da tespit edilmiştir [10].

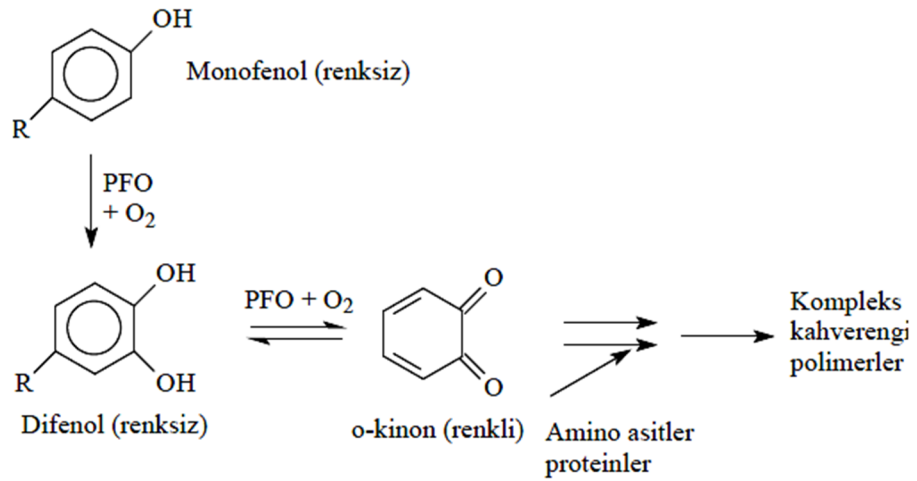
*Sideritis* türlerinden biri olan *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa* 30-60 cm boyunda çok yıllık bir bitkidir. Bitkinin tabanında bulunan yapraklar saplı, diğerleri ise sapsızdır. İnternodyumlar tabanda 1.8-3 cm, üst kısımlarda 2.0-3.5 cm, yapraklar gövde üzerinde üste doğru kademe kademe farklılaşım göstermiştir. Çiçek durumunda 4-10 vertisillat bulunur ve her vertisillatın 6 adet çiçek taşıdığı bildirilmiştir. Kaliks yeşil, 11-13 mm uzunluğunda, yüzeyi tüp kısmında salgı tüyleri ile kaplı, taşıdıkları uçucu yağdan parlak sarı damlalar halinde, dişlerde örtü tüyleri çok yoğun, iç yüzey hemen hemen tüsüzdür. Korolla mat sarı, kaliks tübünden hemen hemen uzun 12-15 mm, korolla tübünün dış yüzü, üst kısımlarda tüylü, iç yüzeyde damarların çevresi tüylü, boyun kısmında örtü tüylerinden oluşmuş bir halka taşır. Boyundan tabana kadar olan kısmı ise tüsüz olan bir bitkidir [11].



**Şekil 1.1 :** *Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden'in fotoğrafı

## 1.2 Polifenol Oksidaz

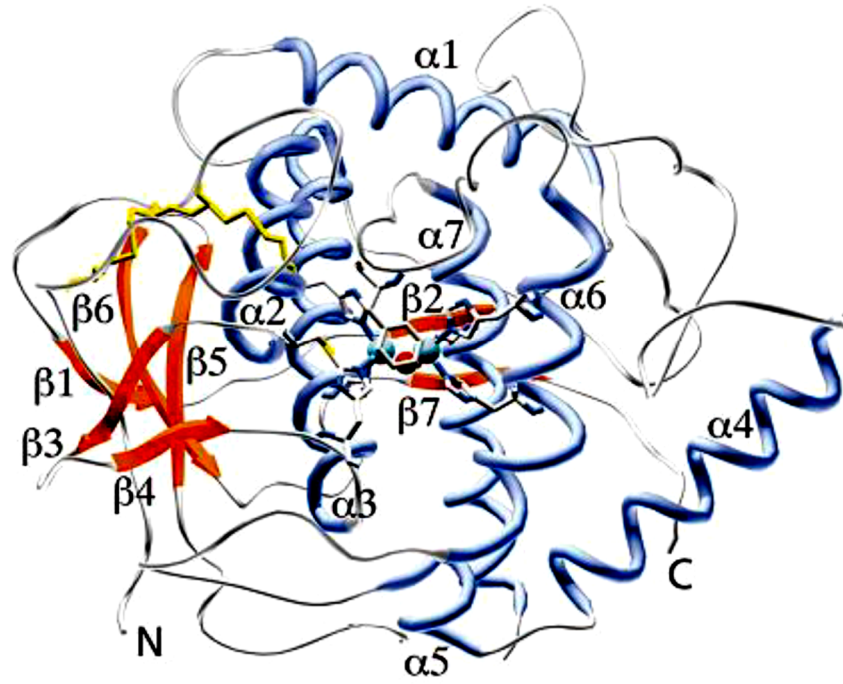
Polifenol oksidaz (PFO; E.C. 1.14.18.1), yapısında kofaktör olarak bakır ( $\text{Cu}^{+2}$ ) içeren proteinlerin bir grubu olup, tüm filogenetik skalada çok geniş bir yayılım gösteren oksidoredüktaz sınıfına ait bifonksiyonel enzimlerdir. Moleküler oksijen varlığında fenollerin oksidasyonunu katalizleme kapasiteleri bulunmaktadır [12]. Bu oksidasyon sırasında iki reaksiyon katalizlenerek; monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve *o*-fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) meydana gelmektedir (Şekil 1.2). PFO enziminin sistematik adı (Şekil 1.3); monofenol, L-dopa: oksijen oksido redüktaz olarak bilinmektedir. Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre az kullanılan adları da bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, tirozinaz, kresolaz, fenolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, *o*-difenolaz, katekol oksidaz, pirokatekol oksidaz, dopa oksidaz, monofenol monooksidaz, *o*-difenol oksido redüktaz, difenol oksidaz ve klorogenik oksidazdır [13].



Şekil 1.2 : Enzimatik kararmada polifenol oksidazın rolü

PFO, birçok meyve ve sebzenin toplanma ve depolanma süresince kararmasının başlıca sebebidir [1]. PFO'nun katalizlediği fenolik bileşiklerin kinonlara, onların da daha sonra renkli pigmentlere oksidasyonu sonucunda meyve

ve sebzelerin karardığı gözlemlenmektedir (Şekil 1.2) [14]. Renkli bakır bileşiklerinin polimerize olmasıyla meydana gelen kinonlar, besin kalitesinin, meyve ve sebzelerin ticari değerlerinin düşmesine sebep olmaktadır [15]. Enzimatik kararmanın derecesi fenolik bileşiklerin miktarına, doğasına, oksijenin varlığına, indirgen maddeye, metalik iyonlara, pH'ya, sıcaklığa ve polifenol oksidaza bağlıdır [16].



**Şekil 1.3** : Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı ve oksijen kırmızı renkle gösterilmiştir)

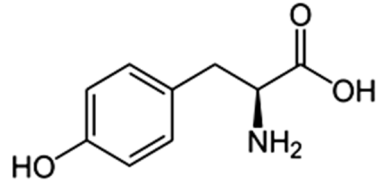
### 1.2.1 Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı

İlk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunan polifenoloksidaz, bitkilerde yaygın olmasının yanısıra mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hayvansal organizmalarda da bulunmaktadır [17]. Bunun haricinde beyaz karides, küçük karides gibi bazı deniz hayvanlarında da polifenol oksidaz enzimine rastlanmıştır [18]. Ayrıca, bazı toprak türlerinde glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO varlığı rapor edilmiştir [19,20,21,22]. PFO, bitki

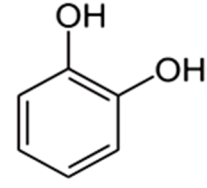
ve hayvan dokularında yaygın olarak görülen bir enzimdir. Bitkilerin tüm kısımlarında lokalize olmuşken, gelişmiş hayvanların deri, saç, tüy ve gözlerinde de bulunduğu bildirilmiştir. Bitkisel dokularda öncelikle inaktif formda sentezlenmekte ve zamanla çeşitli (proteazlar ve etilen gibi bir takım solunum metabolitleri vb.) etkenlerle aktif hale gelmektedir [22,23].

### **1.2.2 Polifenol Oksidazın Substratları**

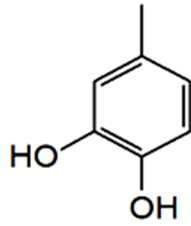
Meyve ve sebzelerde birçok türde fenolik bileşik olmasına rağmen bunların sadece bir kısmı PFO'nun substratlarıdır. Flavonoid tipi fenollerle, basit fenoller meyve ve sebzelerdeki PFO'nun en yaygın doğal substratlarıdır. Flavonoidler bitkilerin belirli bölgelerinde konsantre olarak değil, bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunacak şekilde homojen olarak dağılmışlardır. Bitkilerde doğal olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, lökoantosiyanidinler, antosiyaninler, flavonoller, basit fenoller ve sinnamik asit türevleri besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler [1,24].



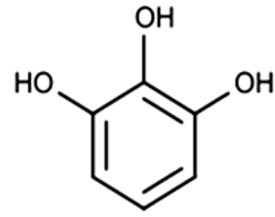
L-tirozin



Katekol



4-metil katekol



Pirogallol

**Şekil 1.4 :** Meyve ve sebzelerin yapısında doğal substrat olarak bulunan bazı fenolik bileşikler

### 1.3 Enzimatik Kararma

Enzimatik kararma, besinlerin toplanması, depolanması veya onlarla yapılan işlemler sırasında dokularının zedelenmesi, kesilmesi, kabuklarının soyulması sonucu meydana gelmektedir. Bu renk değişimleri enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır [25]. Enzimatik kararma meyve ve sebzelerin içerdikleri fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ilişkilidir. Bu bileşikler ortamda oksijen varlığında oksidasyon sonucu kahverengi, kırmızı ve siyah pigmentlere yani yüksek derecede kararlı olmayan kinonlara dönüşerek istenmeyen renk, tad ve koku oluşumu gözlenir [1]. Gıdalarda besin değerlerinin düşmesine sebep olan bu durum, gıda endüstrisi için önemli bir problem oluşturmaktadır.

Enzimatik olmayan kararırna ise Maillard reaksiyonu, askorbik asit mekanizması ve etkin aldehit teorisi, karamelizasyon, okside lipidler tarafından kararırn polimerlerin şekillenmesi şeklinde beş farklı mekanizmanın kontrolündedir [14].

Lakkaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz fenolik maddeleri okside etme yeteneğine sahip olan enzimlerdir. Benzer substrat tercihleri olan bu üç grup enzimin ayırt edilmesinde özellikle seçilmiş inhibitörler önemlidir. Peroksidazlar hidrojen peroksit varlığında substratları okside edebilirler. Polifenol oksidaz, oksidatif reaksiyonlarda gerek işlemeden önce gerekse işlem sırasında sebze ve meyvelerle ilgili renk bozulmalarında sorumludur [26].

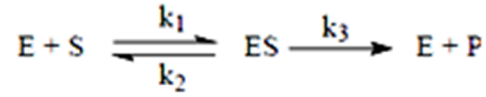
Bitkilerde bulunan fenolik moleküllerin oksijenli ortamda yükseltgenmesini sağlayan polifenol oksidaz renksiz olan bu bileşiklerden renkli ürünlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Öncelikle monofenoller difenollere yükseltgenerek kresolaz aktivitesi gösterirler. Kresolaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan ürünler de yine polifenol oksidaz tarafından *o*-kinonlara yükseltgenerek katekolaz aktivitesi gösterirler. Oluşan *o*-kinonlar polimerize olurlar. Ortamdaki amino asitler ve proteinlerle kompleks oluşturarak kahverengi pigmentlere dönüşürler. Meydana gelen bu pigmentler yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerlerdir. Enzimatik kararmada ilk adım *o*-kinonların oluşmasıdır. *O*-kinonlar ise, *o*-dihidroksi ünitesi içeren her çeşit fenolik maddeyi içermektedir. Sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan doğal flavonoid maddelerden, katekinler, proantosiyanidinler (lökoantosiyanidinler), antosiyanidinler, flavonoller ile ayrıca hidroksibenzoik, hidroksisinamik ve bunların türevleri olan çeşitli bileşikler; kafeik, ferulik, *p*-kumarik, kuinik, gallik, sinamik ve klorogenik asitler gibi çok çeşitli basit fenolik maddeler; ve polifenollerin enzimatik kararırn reaksiyonlarında rol oynadığı görülmektedir. Ancak meyve ve sebzede çok az bulunmasına karşın, onların enzimatik yolla kararmalarında önemli rol oynayan maddelerden diğeri de gerçekte bir basit fenolik madde olan ve aminoasitler arasında yer alan tirozindir [1,16].

Enzimatik kararırn reaksiyonlarında bir çok polifenolik maddenin substrat olarak rol oynamasına karşın, bazı fenolik maddeler ise tam aksine, inhibitör rolü oynamaktadır. Enzimatik kararırn reaksiyonlarının oluştuğı ortamda bulunan bazı maddeler, renk değışimlerinin kilit maddesi olan *o*-kinonları geriye, yani *o*-fenolik formlara indirgeme niteliğine sahiptirler. Böylece enzimatik kararırn olayı, o noktada

durmakta ve renk bozulmamaktadır. Bu indirgen maddelerin başında askorbik asit gelmektedir. Askorbik asit oluşan *o*-kinonları, *o*-fenolik bileşiklere indirgeyerek renk bozunmasını engellemekte ve bu sırada askorbik asit parçalanmaktadır. Ayrıca askorbik asit ortamdaki oksijeni indirgeyerek de kararlı reaksiyonlarını ikinci bir yolla inhibe etme özelliğine sahiptir. İşte meyve ve sebzelerin işlenmesinde, işlenmekte olan ürünün rengini korumak amacı ile askorbik asidin yaygın olarak kullanılma nedeni budur [1,16].

#### 1.4 Enzim Kinetiği

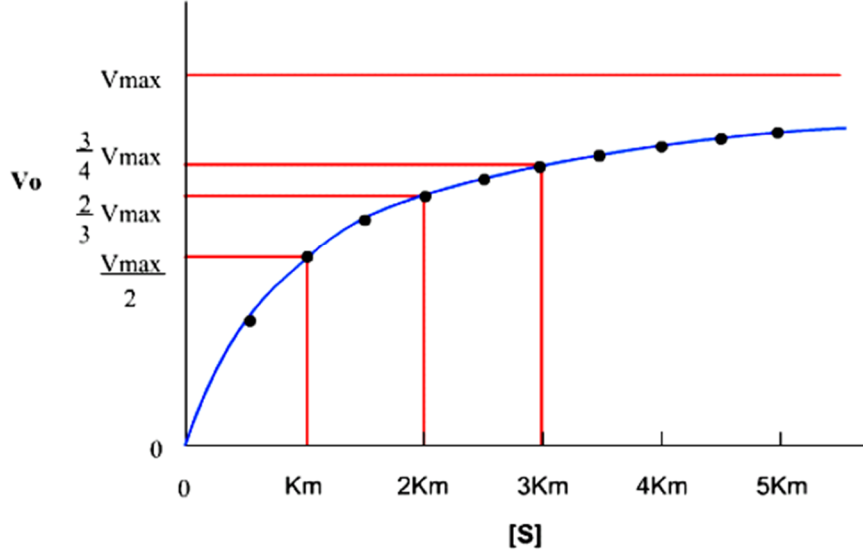
Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını inceler. Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Enzimler substratları ile bazen de koenzimleri ile kompleks oluştururlar. Doygunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES kompleksi halindedir. Enzim ve substrat arasındaki bir reaksiyon için aşağıdaki eşitlik yazılabilir.



Bu kimyasal reaksiyon için Michelis-Menten denklemi aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

Burada  $V_{max}$ , enzimin substrata doydugu andaki hız;  $K_M$ , maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substratın konsantrasyonudur.



Şekil 1.5 : Michelis-Menten eğrisi

Şekil 1.5 enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci derecedendir. Substrat konsantrasyonu arttırıldığı zaman reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfıncı ile birinci dereceler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat konsantrasyonu daha da arttırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonu ile değişmez. Bu kısımda reaksiyon sıfıncı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substrat ile birleşmiş yani doymuş haldedir.

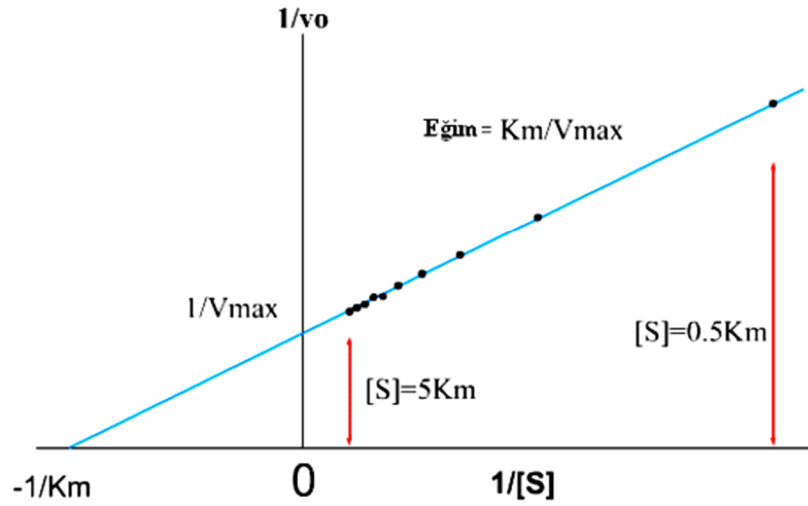
Michelis-Menten eşitliğinin parametrelerini belirlemek için birkaç metot vardır.  $[S]$ 'nin çok yüksek değerlerinde başlangıç hızı ( $V_0$ )  $V_{max}$ 'a yaklaşır. Bununla birlikte pratikte Şekil 1.5'de gösterildiği gibi  $V_0$ 'ın  $[S]$ 'ye karşı grafiğinden  $V_{max}$ 'u



doğru bir şekilde belirlemek çok zordur.  $V_{max}$  ve  $K_M$ 'nin değerlerini belirlemek için daha iyi bir metot Lineweaver-Burk tarafından geliştirilmiş olup bu denklem Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmiş biçimidir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Bu eşitlikte  $1/V_0$ 'ın  $1/[S]$ 'ye karşı eğrisi, eğimi  $K_M/V_{max}$  ve ekstrapolasyonu  $1/V_{max}$  olan düz bir doğru verecektir (şekil 1.6) [27].



şekil 1.6 : Lineweaver-Burk grafiği.

## 1.5 İnhibisyon

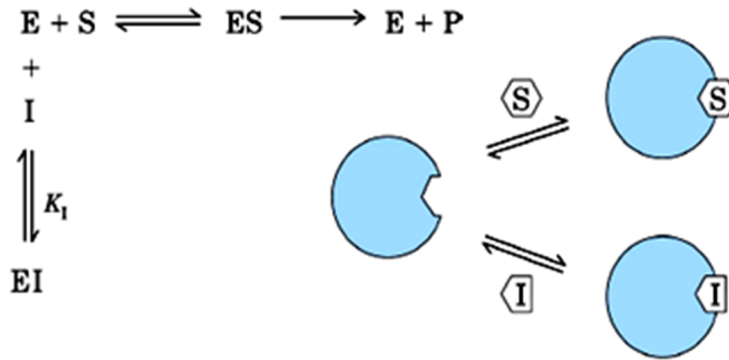
Enzim inhibisyonu, enzimin katalitik ya da düzenleyici merkezleri olarak tanımlanan aktif bölgelerine spesifik olarak bağlanan inhibitörler ile enzim aktivitesinin azaltılması olarak tanımlanabilir. Pek çok madde substratın bağlanmasını ve/veya turnover sayısını etkileyen bir yolla enzime bağlanarak

enzimin aktivitesini değistirir. Bu yolla enzimin aktivitesini azaltan maddeler inhibitörler olarak bilinir.

Bir inhibitörün enzime bağlanma şekli elde edilmiş deneysel verilerin değerlendirilmesi için büyük bir öneme sahiptir. Çoğu inhibitörler enzime tersinir olarak bağlandıkları için bunlar enzimden tekrar ayrılabilirler. Bununla birlikte bazı inhibitörler enzime çok kuvvetli bir şekilde (kovalent bağlarla) bağlanabilirler ve bu inhibitörler enzimden ayrılmazlar. Bir çok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzeyen maddelerdirler. Bu maddeler substratla karşılaştırıldığında ya hiç reaksiyon vermezler ya da çok yavaş reaksiyon verirler. Enzim inhibitörlerinin etkin olarak rol oynadığı çeşitli mekanizmalar vardır. Enzim, substrat ve inhibitor arasındaki inhibisyon mekanizması aşağıdaki eşitliklerin birisi kullanılarak açıklanabilir [1].

### 1.5.1 Yarışmalı İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif merkezine bağlanmak için enzimin substratı ile yarışır. Enzimin aktif bölgesine ya substrat ya da inhibitör bağlanır. Her ikisinin de birlikte bağlanması mümkün değildir.



Şekil 1. 1: Yarışmalı inhibisyon için enzim substrat kompleksi

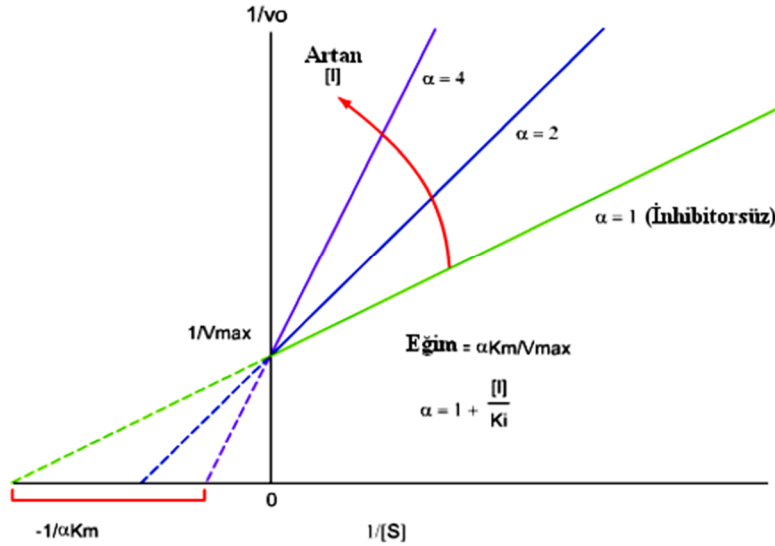
Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

Bu eşitliğin eğrisi düz doğrudur. Bu düz doğrunun eğimi  $\alpha K_M / V_{max}$  ve ekstrapolasyonu  $1/V_{max}$  'dur. Bu durum Şekil 1.8'de görülmektedir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için yukarıdaki denklem  $1/V_0$  ekseninde  $1/V_{max}$  kayımına sahiptir. Bu, diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [28].

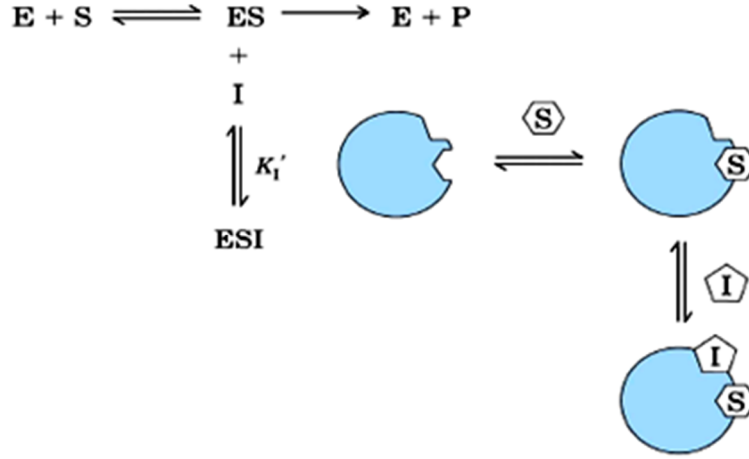
:



Şekil 1. 2: Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

### 1.5.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

Yarı-yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanır.

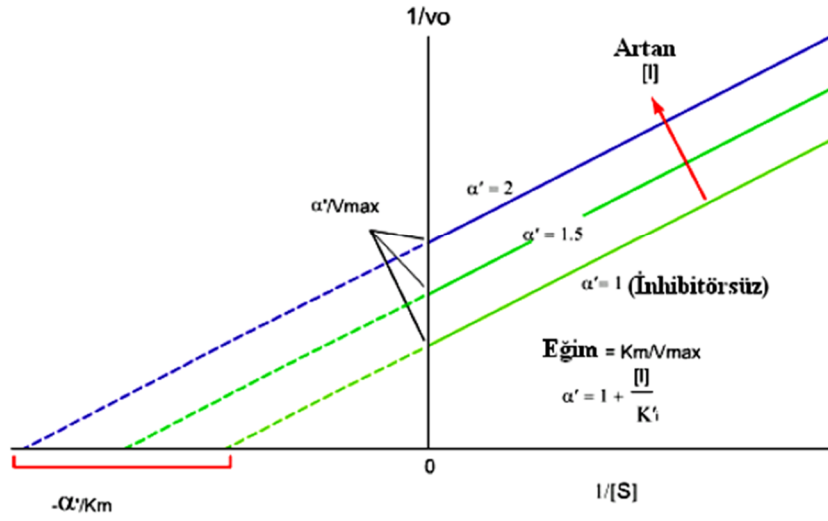


Şekil 1. 3: Yarı-yarışmalı inhibisyon için enzim substrat kompleksi

Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

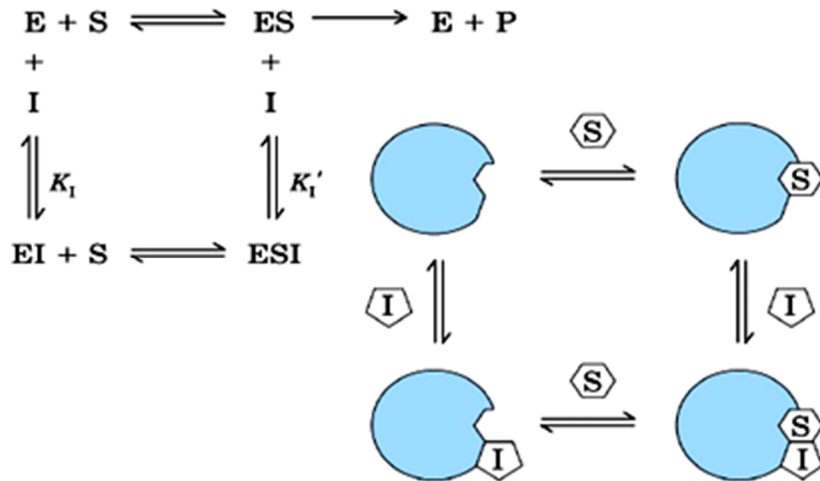
Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi ( $K_M/V_{max}$ ) ve ekstrapolasyonu ( $\alpha'/V_{max}$ ) olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.10). Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [28].



Şekil 1. 4: Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

### 1.5.3 Karışık Tür İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda inhibitörler hem enzim hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilirler.

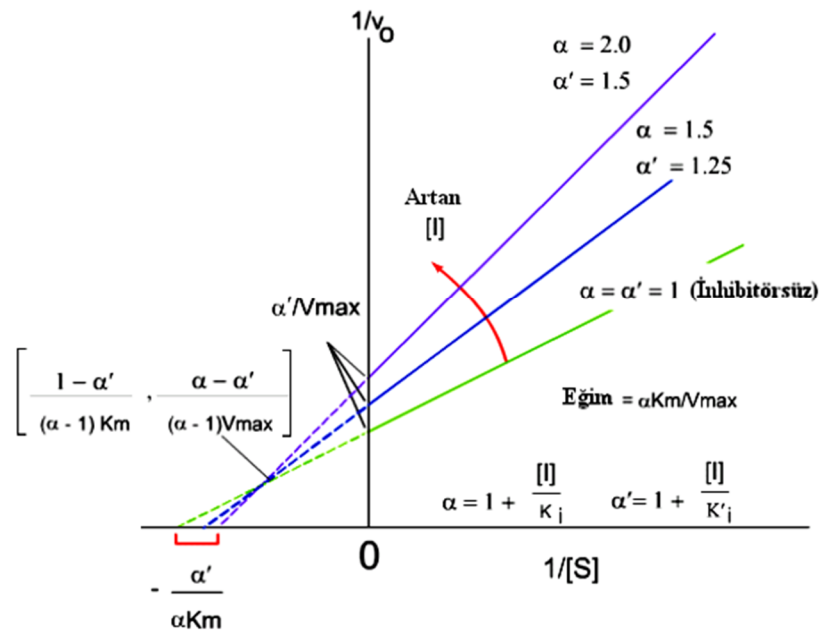


Şekil 1. 5: Karışık inhibisyon için enzim substrat kompleksi

Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$\frac{1}{V} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

Bu eşitliğin eğrisi eğimi  $(\alpha K_M/V_{max})$  ve ekstrapolasyonu  $(\alpha'/V_{max})$  olan doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.12).  $K_i=K'_i$  ( $\alpha=\alpha'$ ) olduğu özel durum için, kesişim  $1/[S]$  eksenindedir. Bu durumda inhibisyon çeşiti yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır [28].



Şekil 1. 6: Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

## 1.6 Literatür Özeti

PFO, gıda endüstrisi açısından son derece önemli bir enzim olduğu için yapılan literatür taraması sırasında polifenol oksidazla yapılmış çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Dinçer, 1999 yılında döngel bitkisinden hazırladığı ekstraktlarda polifenol oksidaz aktivitesini çeşitli biyokimyasal ve kinetik veriler açısından detaylı bir şekilde incelemiştir [29]. 2005 yılında Gutes ve arkadaşları, polifenol oksidaz

biyosensörleri vasıtası ile fenolik bileşiklerin belirlenmesini araştırmışlardır [30]. 2005 yılında Turan, *O. basilicum*'den ekstrakte edilen polifenol oksidazın kısmi karakterizasyonunu yaparak, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin çalışılan substratlara bağlı olarak değiştiğini rapor etmiştir [26]. 2006 yılında Doğan ve arkadaşları, *Ocimum basilicum* L. ve mantardan elde ettikleri PFO'nun glutamik asitle inhibe olduğunu saptamışlardır [31]. 2006 yılında Önez, İzmir üzümünden ekstrakte edilmiş polifenol oksidazı amonyum sülfat çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmıştır. Çalışmasında 6 adet inhibitörle çalışmış ve en etkili olanların sodyum azid, sodyum dietilditiyokarbamat ve tiyoüre olduklarını bulmuştur [32]. 2006 yılında Salman, marul bitkisinde polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırmasını yapmış ve bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Deneysel sonuçlarına göre marul bitkisinin polifenol oksidaz enziminin inhibisyonu için en güçlü inhibitörün glutatyon olduğunu göstermiştir [1]. 2006 yılında Demir, muşmula bitkisinin tamamen çiçeklenmesinin ardından üç ayrı olgunluk safhasında meyvelerinden hazırlanan ekstraktlarda polifenol oksidazı, biyokimyasal ve kinetik veriler yönünden detaylı bir şekilde incelemiştir. Yapılan çalışmaları sonucunda muşmula bitkisinin polifenol oksidaz enziminin en yüksek ilgiyi 4-metilkatekol substratına karşı gösterdiği belirlenmiştir [33]. 2008 yılında Güngör, badem çağladan ekstrakte edilmiş polifenol oksidaz enzimini amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmış ve en iyi substratın 4-metilkatekol olduğunu tespit etmiştir [34]. 2008 yılında Yabancı, Karadeniz bölgesinden yetiştirilen çay bitkisinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklık, optimum pH, substrat spesifikliğı, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özelliklerini araştırmıştır [35]. 2008 yılında Ayyıldız, *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* bitkisinden polifenol oksidazı karakterize ederek, substrat spesifikliğini belirlemiş, en iyi substratın katekol olduğu ve bunu sırasıyla 4-metilkatekol ve pirogallol substratlarının izlediğini rapor etmiştir [36]. 2009 yılında Gökkaya, Konya'nın Ereğli ilçesinde yetiştirilen beyaz kirazdan izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidazın optimum sıcaklık, optimum pH, termal inaktivasyon, kinetik parametreler ve inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırmıştır [37]. 2009 yılında Taş, Çukurova bölgesinde yetiştirilen Domat çeşidi zeytinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminde çalışmış ve denenilen inhibitörlerden en düşük inhibisyon etkisi askorbik asitte görülmüştür [38]. 2009 yılında Türkan, Iğdır

elmasından polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırmış ve çeşitli özelliklerini incelemiştir [39]. 2009 yılında Keskin, *Russula delica*'dan elde edilen ham özütteki polifenol oksidaz enzimini spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak karakterize etmiştir. PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri üzerine etkileri incelenerek,  $Hg^{+2}$  iyonu monofenolaz aktivitesini inhibe ederken,  $Ca^{+2}$  iyonunun ise aktiviteyi etkilemediği gözlenmiştir.  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonları difenolaz aktivitesi üzerinde bir etki göstermezken, diğer iyonlar değişik oranlarda inhibisyona neden olmuştur [40]. 2009 yılında Dedeoğlu, *Lactarius salmonicolors* ve *Agaricus bisporus* mantarlarından polifenol oksidazı saflaştırmış, katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratlarını kullanarak enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerini belirlemiştir [13]. 2010 yılında Öz, yabani ve yenilebilir bir mantar olan *L. piperatus*'tan polifenol oksidaz ekstrakte ederek saflaştırmış ve karakterize etmiştir. *L. piperatus*'tan saflaştırılan polifenol oksidazın, heptan, toluen ve diklorometan gibi organik çözücülerde, kateşin substratı kullanılması durumunda, etkili bir biyokatalizör olabileceği belirlenmiştir [4]. 2014 yılında Kuyumcu, yabani ve yenilebilir bir mantar türü olan *L. eucalypti*'den ekstrakte edilen polifenol oksidazı saflaştırmış ve biyokimyasal olarak karakterize etmiştir. Polifenol oksidaz için elde edilen  $I_{50}$  değerlerine göre askorbik asitin etkili inhibitör olduğunu belirtmiştir. [41].

## 1.7 Amaç ve Kapsam

Enzimatik kararmadan sorumlu olan PFO'nun meyve ve sebzelerden izole edilip biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi depolama ve işleme sırasında kalite kayıplarının en aza indirilmesi ve böylece daha kaliteli ürünlerin üretilmesine olanak sağlayabilir. Bu nedenle PFO enzimi üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış, çok değişik meyve ve sebzelerdeki PFO enziminin özellikleri belirlenmiştir. Ancak, yapılan literatür taraması sonucunda, ülkemizde yetişen *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada;

- ✓ *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan kısmi olarak saflaştırılan PFO'nun optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin bulunması,



- ✓ *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO'nun belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması,
- ✓ *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'nun substrat spesifikliğinin belirlenmesi,
- ✓ Yine aynı bitkiden elde edilen enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılarak inhibisyon türlerinin tespiti ve  $K_i$  değerlerinin hesaplanması,
- ✓ Kullanılan inhibitörlerin yüzde inhibisyon verileriyle oluşturulan grafiklerden inhibisyon gücünün ifadesi olan  $I_{50}$  değerlerinin bulunması,
- ✓ Ayrıca *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın toplam protein içeriğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin, bitki çayı olarak kullanılan *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO'nun endüstride kullanılabilirliğini, bitki çayı olarak tüketilmesi ve hatta kültürünün yapılması durumunda saklama ve depolama koşullarının ortaya konması noktasında önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. MATERYAL METOT

### 2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisi Balıkesir İli sınırları içinde yer alan Ulus Dağı'nın (1700m) zirvesinden toplanmıştır ve Uzman Mikail ACAR tarafından teşhis edilmiştir. Taze bitki örnekleri -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma'dan satın alınmıştır. Enzim aktiviteleri ise Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 35 kullanılarak belirlenmiştir [1,4,16,28].

#### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Katekol
2. 4-Metilkatekol
3. Pirogallol
4. Glutasyon
5. Askorbik asit
6. Benzoik asit
7. Sodyum azid
8. L-tirozin
9. Amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
10. Disodyumhidrojenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
11. Sodyum hidroksit (NaOH)
12. Sodyum asetat (NaCH<sub>3</sub>COO )
13. Nitrik asit (HNO<sub>3</sub>)
14. Sodyum karbonat
15. Serum albumin
16. Coomassie Brilliant-Blue G- 250
17. Folin- Ciocalteau belirteci
18. Sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

### 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1.	UV/VIS Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 35
2.	pH metre	Hanna instruments
3.	Terazi	Denver
4.	Ultrasonik su banyosu	Selecta
5.	Otomatik pipetler	Eppendorf
6.	Blender	Warning
7.	Etüv	Memmert
8.	Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K 30
9.	Magnetik karıştırıcı	Heidolph
10.	Vorteks	Nüve NM 100

### 2.2 Ham Ekstraktların Hazırlanışı

Ulus Dağı'ndan toplanan *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinin yaprakları toplandıktan sonra, ham ekstrakt hazırlamak için -80 °C'de saklanmıştır. 10 g bitki örneği 10 mM askorbik asit ve 4 g polietilenglikol içeren pH'ı 6,5 olan 100 mL fosfat tamponunun içerisinde, paslanmaz çelik bir blender kullanılarak 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzümüştür. Santrifüj tüplerine alınarak ağırlıkları eşitlenen süzüntü 15 000 x g'de 10 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilmiştir [1,16,28]. Santrifüj sonrası üst kısımları süzülerek elde edilen süpernatant bir gün süresince 0.01 M'luk pH'ı 7.0 olan fosfat tamponu içerisinde diyalize bırakılmıştır. Diyaliz süresince tampon 4 kez değiştirilmiştir [42]. Diyalizden alınan bitki ekstraktı diğer işlemlerde kullanılmıştır.

### 2.3 Polifenol Oksidazın Kısmi Saflaştırılması

Diyaliz sonrası elde edilen ekstrakt % 10-90'lık amonyum sülfat doygunluklarında test edilmiştir. En ideal amonyum sülfat oranının % 80 doygunlukta olduğu tespit edilmiştir. Çöktürme işleminde kullanılacak ekstraktın hacminin belirlenmesinin ardından kullanılması gereken katı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen süpernatant % 80 doygunlukta amonyum sülfatta çöktürmeye bırakılmıştır. % 80 doygunlukta kullanılması gereken katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki denklem yardımıyla belirlenmiştir:

$$g_{[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]} = \frac{1.77V(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

- V: Süpernatantın hacmi,  
S<sub>1</sub>: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu,  
S<sub>2</sub>: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğudur.

Eklenen katı amonyum sülfat en düşük devirde çalışan bir magnetik karıştırıcı üzerindeki ham ekstrakt içerisine yavaş yavaş ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Eklenen amonyum sülfat parçacıkları tamamen çözünene kadar ekstrakt karıştırılmaya devam edilmiştir. Yaklaşık yarım saat süren bu işlemde; katı amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra % 80 doygunluğa ulaşan süspansiyon tekrar santrifüj tüplerine alınıp ağırlıkları eşitlendikten sonra 60 dakika boyunca +4 °C'de 15 000 x g'de santrifüj edilmiştir [42]. Üstte kalan sıvı kısım atılarak tüpte kalan çökelek, pH'sı 7.0 olan 5 mM'lık fosfat tamponunda çözünebildiği en az miktarda çözülmüştür. Enzim solüsyonu diyaliz tüpüne boşaltılarak torba içerisinde 5 mM'lık, pH'sı 6.5 olan fosfat tamponu bulunan bir behere alınmış ve 24 saat boyunca diyalize bırakılmıştır. Düşük devirde çalışan bir magnetik karıştırıcı üzerinde +4 °C'de gerçekleştirilen diyaliz işlemi süresince tampon dört defa değiştirilmiştir. Gerçekleştirilen diyaliz işleminden sonra kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz, deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır [43].

## 2.4 Spektrofotometrik Ölçümler

Reaksiyon 1 cm'lik ışık yolu olan ve 3 mL hacimli kuartz küvet içinde, Perkin Elmer Lambda 35 UV-Visible spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılmıştır. Analiz karışımı genel olarak 2.3 mL fosfat tamponu, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim şeklinde, solüsyonun hacmi 3 mL de sabit tutularak hazırlanmıştır. Ölçümler 2 dakikadan, 2'şer defa tekrarlanarak yapılmıştır. Ölçümlerde 4-metilkatekol ve katekol substratları için 420 nm'de, pirogallol substratı içinde 320 nm'de absorbans ölçümü alınarak gerçekleştirilmiştir [42].

## 2.5 Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

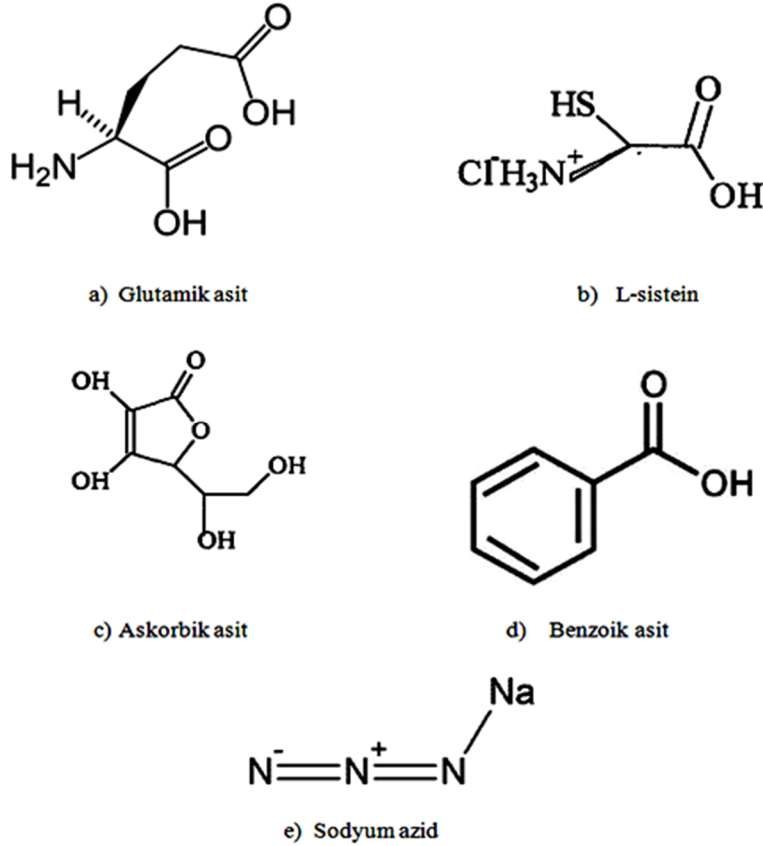
*S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için pH 4-6 aralığında 0.1 M asetat ve pH 6-9 aralığında 0.1 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Tampon çözeltilerinin pH ayarları 0.1 M NaOH ve 0.1 M HNO<sub>3</sub> çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. 3 mL'lik reaksiyon karışımı 2.3 mL tampon, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim karışımından meydana gelmiş, ölçümler ikişer kez tekrarlanmıştır [42].

## 2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

*S. perfoliata* L. subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenol oksidazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 20–70 °C dereceleri arasında çalışılarak belirlenmiştir. Ölçümlerde kullanılan substrat ve tampon çözeltilerinin sıcaklığı bir su banyosu yardımıyla ayarlanmıştır. 3 mL'lik reaksiyon karışımı 2.3 mL tampon, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim karışımından meydana gelmiştir. Ölçümler ikişer kez tekrarlanmıştır [44].

## 2.7 İnhibisyon

4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak polifenol oksidazın inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. Askorbik asit, L-sistein, glutamik asit, benzoik asit ve sodyum azid ise inhibitör maddeler olarak kullanılmıştır. Benzoik asit ve sodyum azidle polifenol oksidazın inhibe olmadığı görülmüştür. Reaksiyon 3 mL de sabit tutularak 0.1 M fosfat tamponu, 0.1 M enzim çözeltisi ve değişik konsantrasyonlardaki substrat ve inhibitörleri karıştırılarak meydana gelmiştir. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir [45].



Şekil 2. 1: Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları

## 2.8 *Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden'in Ekstraktının Protein İçeriği

*S. perfoliata* L. subsp. *athoa*'nın protein içeriği Bradford yöntemi ile belirlenmiştir [46]. Bradford yöntemi, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifiyle kompleks oluşturmaları şeklinde gerçekleşmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [28].

1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden deney tüplerine sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL otomatik pipet yardımıyla konuldu. Albumin çözeltisi bulunan tüplerin hacimleri 5 mM pH'sı 6.5 olan fosfat tamponuyla 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant-Bule G-250 reaktifi bütün tüplere eklendikten sonra tüpler bir vorteks yardımıyla 1 dakika süresince karıştırıldı. 30 dakika karanlık ortamda beklemeye bırakılan çözeltinin absorbansı 595 nm'de belirlendi. Kör olarak hazırlanan tüp 0.1 mL fosfat tamponu ve 5 mL Coomassie Brilliant-Bule G-250 reaktifini içerdi. Hazırlanan enzim ekstraktından 3 ayrı tüpe 0.2'ser mL alınarak üzerine 5'er mL Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifi eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Üç ölçümün ortalaması alındıktan sonra absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı [28].

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO kısmi saflaştırılarak bazı biyokimyasal parametreleri; belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri, enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisi ve inhibisyon türleri tespiti,  $K_i$  değerlerinin hesaplanması ve bitkinin protein içeriği belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunulmaktadır.

#### 3.1 *S. perfoliata* subsp. *athoa* Ekstraktının Protein İçeriği

Ham enzim ekstraktlarındaki total protein içeriği Bradford yöntemine göre [46] belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular enzim ekstraktının 14,06mg / 100 g protein içeriğine sahip olduğunu göstermiştir.

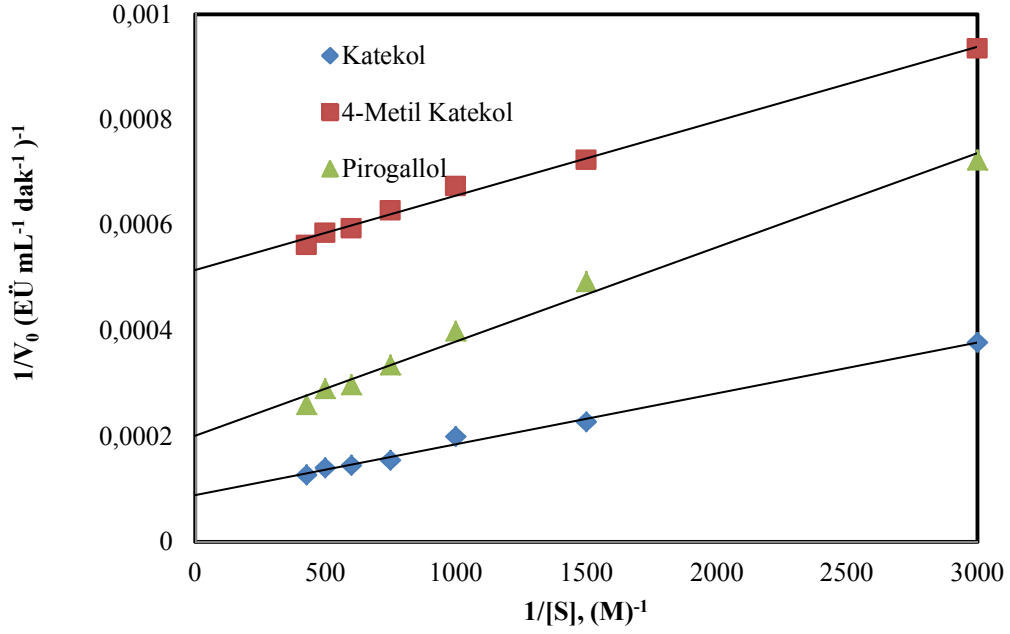
#### 3.2 *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun Substrat Spesifikliği

*S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenoloksidaz aktivitesi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Tablo 3.1 ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Tablo 3.1:** *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenoloksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler.

Substratlar	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> mM	V <sub>max</sub> /K <sub>M</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>Katekol</b>	3,33	424	300	23	11111	11	1010	0,9932
	6,67	495	150	20				
	10,00	593	100	16				
	13,33	742	75	13				
	16,67	989	60	10				
	20,00	1484	50	6,7				
	23,33	2968	43	3,3				
<b>4-metilkatekol</b>	3,33	257	600	38	5000	1,5	3333	0,9955
	6,67	299	300	33				
	10,00	359	200	27				
	13,33	449	150	22				
	16,67	599	120	16				
	20,00	899	100	11				
	23,33	1799	85,7	5,5				
<b>Pirogallol</b>	3,33	430	300	23	5000	5,0	1000	0,9900
	6,67	502	150	19				
	10,00	602	100	16				
	13,33	752	75	13				
	16,67	1002	60	9,9				
	20,00	1502	50	6,6				
	23,33	3002	43	3,3				



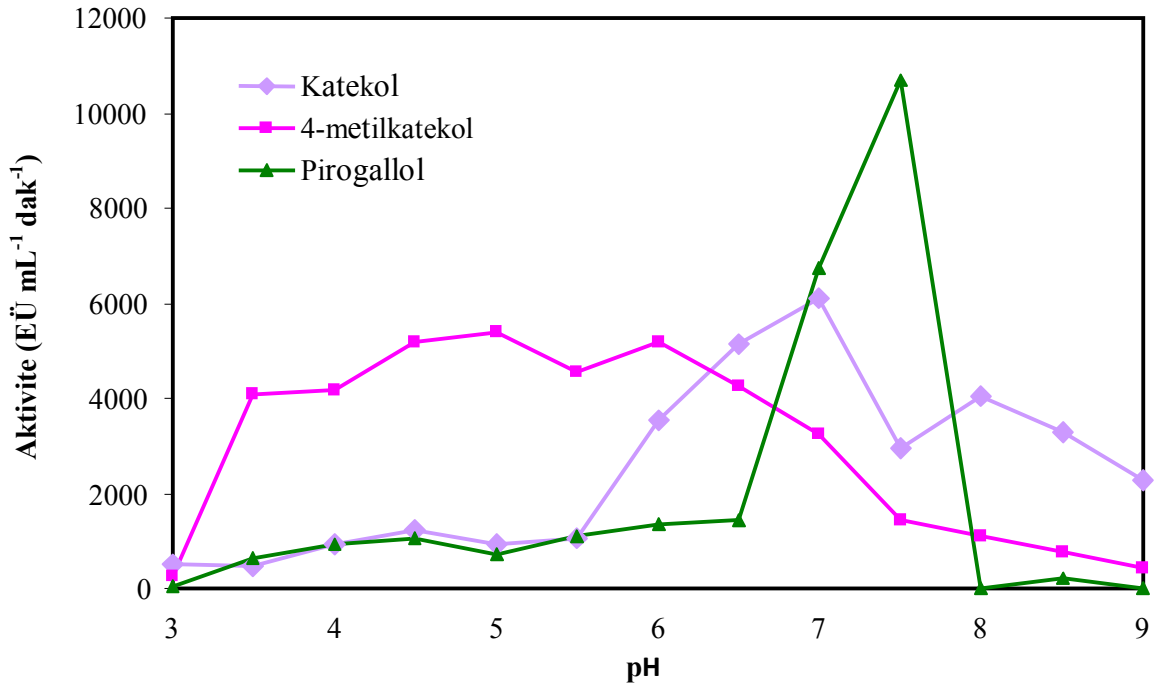
**Şekil 3.1 :** Katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenoloksidazı için çizilmiş  $1/[S]$ - $1/V_0$  eğrileri.

### 3.3 Optimum pH

*S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen polifenol oksidazın optimum pH değerleri 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol substratları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen deneysel veriler Tablo 3.2 ve Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

**Tablo 3.2:** *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler.

pH	Aktivite (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )		
	Katekol	4-metilkatekol	Pirogallol
4,0	1035	4343	723
4,5	1037	5170	683
5,0	1084	<b>5373</b>	703
5,5	1049	4553	1083
6,0	2575	4318	1007
6,5	4289	4261	1496
7,0	<b>6116</b>	3258	6467
7,5	3988	1436	<b>10689</b>
8,0	4063	1110	199
8,5	3271	773	0
9,0	2259	405	0



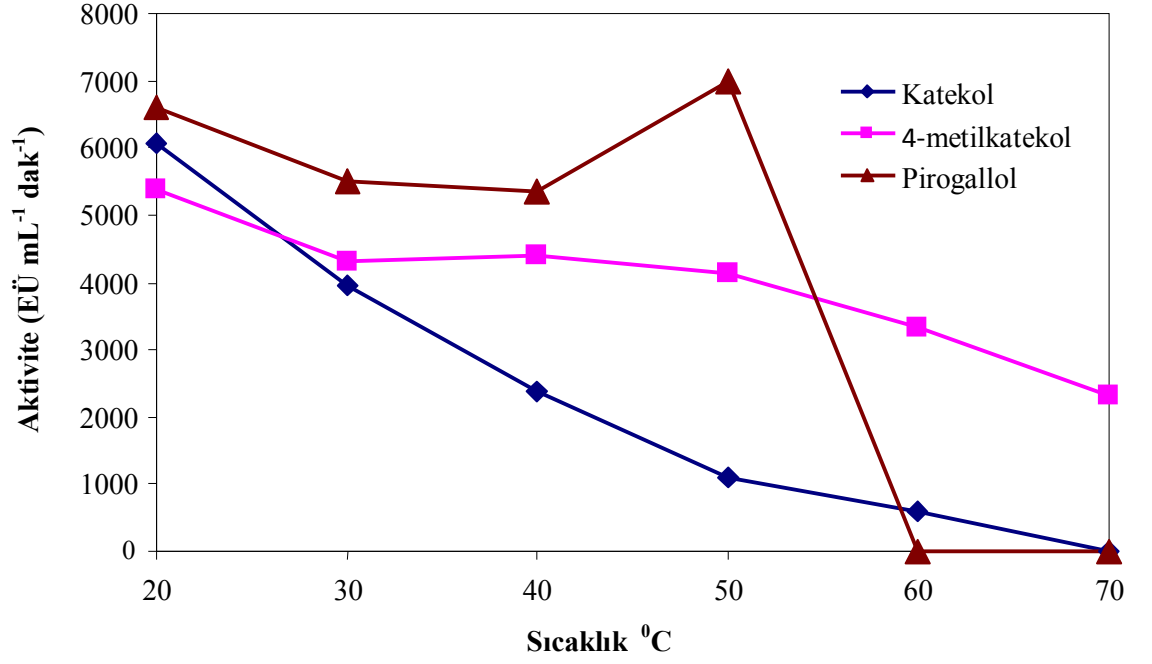
**Şekil 3.2 :** *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimi

### 3.4 Optimum Sıcaklık

4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* 'dan elde edilen PFO aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 20, 30, 40, 50 ve 60 °C'lerde incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Tablo 3.3 ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol ve katekol substratları için optimum sıcaklık 20 °C iken pirogallol için 50 °C'dir.

**Tablo 3.3:** *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait veriler

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )		
	Katekol	4-metilkatekol	Pirogallol
<b>20</b>	<b>6116</b>	<b>5453</b>	6467
<b>30</b>	3494	4377	5303
<b>40</b>	2728	4326	5873
<b>50</b>	1170	4178	<b>7021</b>
<b>60</b>	0	3335	0



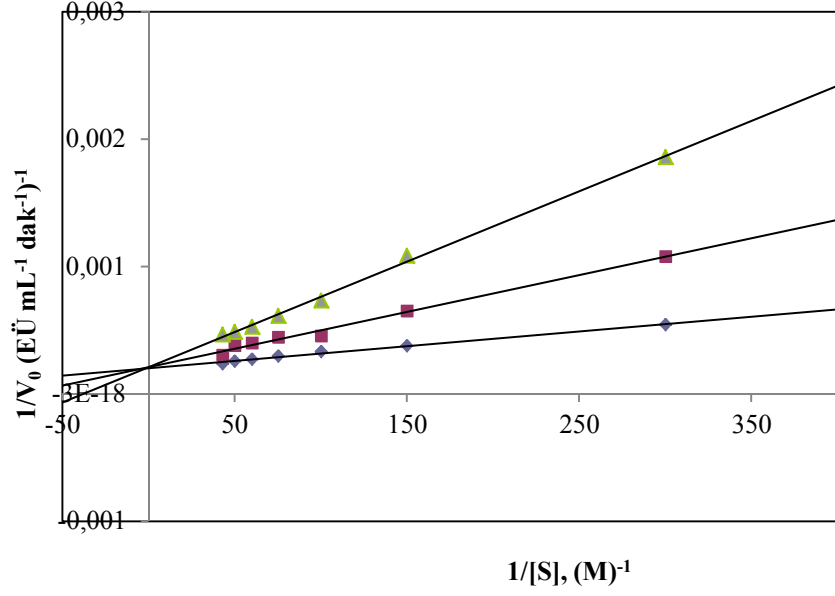
Şekil 3.3 : *S. perfoliata* L. subsp. *athoa* bitkisinden elde edilen PFO aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

### 3.5 Polifenoloksidazın İnhibisyonu

Askorbik asit, L-sistein ve glutamik asit inhibitörleri ile polifenoloksidazın inhibisyonu 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler sırasıyla Tablo 3.4- 3.12 ve Şekil 3.3- 3.11’de verilmiştir. Deneysel bulgular benzoik asit ve sodyum azidin *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO’sunu inhibe etmediğini göstermiştir.

**Tablo 3.4:** 4-metilkatekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I](M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	2000	600	5,0	5000	1,5	—	0,9955
	6,67	2857	300	3,5				
	10,00	3333	200	3,0				
	13,33	3636	150	2,7				
	16,67	3846	120	2,6				
	20,00	4000	100	2,5				
	23,33	4117	85,7	2,4				
1,33 x 10 <sup>-4</sup>	3,33	909	600	11	—	—	1,4 x 10 <sup>-3</sup>	0,9911
	6,67	1538	300	6,5				
	10,00	2000	200	5,0				
	13,33	2352	150	4,2				
	16,67	2631	120	3,8				
	20,00	2857	100	3,5				
	23,33	3043	85,7	3,2				
2 x 10 <sup>-2</sup>	3,33	500	600	20	—	—	2,04 x 10 <sup>-4</sup>	0,9975
	6,67	909	300	11				
	10,00	1250	200	8,0				
	13,33	1538	150	6,5				
	16,67	1785	120	5,6				
	20,00	2000	100	5,0				
	23,33	2187	85,7	4,5				

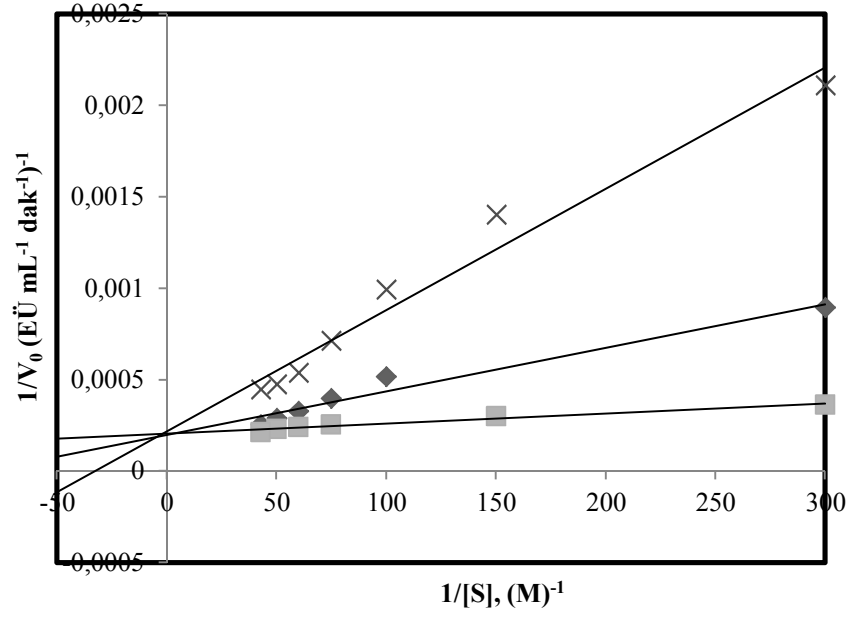


**Şekil 3.4 :** 4-metilkatekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenoloksidazının inhibisyonunu için  $1/V_0$ - $1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.5:** 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I] (M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	434	600	23	5000	1,5	—	0.9676
	6,67	800	300	12				
	10,00	1111	200	9,0				
	13,33	1379	150	7,2				
	16,67	1612	120	6,2				
	20,00	1818	100	5,5				
	23,33	2000	85,7	5,0				
1 x 10 <sup>-4</sup>	3,33	1250	600	8,0	—	—	1,01 x 10 <sup>-4</sup>	0.9634
	6,67	2000	300	5,0				
	10,00	2500	200	4,0				
	13,33	2857	150	3,5				
	16,67	3125	120	3,2				
	20,00	3333	100	3,0				
	23,33	3500	85,7	2,8				
1,6 x 10 <sup>-4</sup>	3,33	2857	600	3,5	—	—	1,7 x 10 <sup>-3</sup>	0.9653
	6,67	3636	300	2,7				
	10,00	4000	200	2,5				
	13,33	4210	150	2,3				
	16,67	4347	120	2,2				

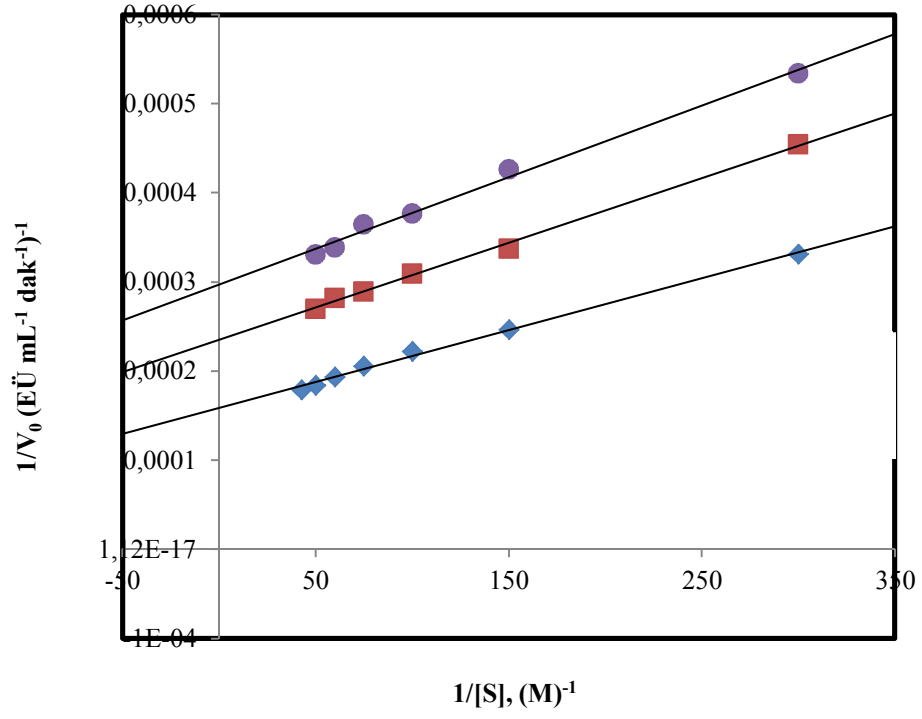




**Şekil 3.5 :** 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.6:** 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

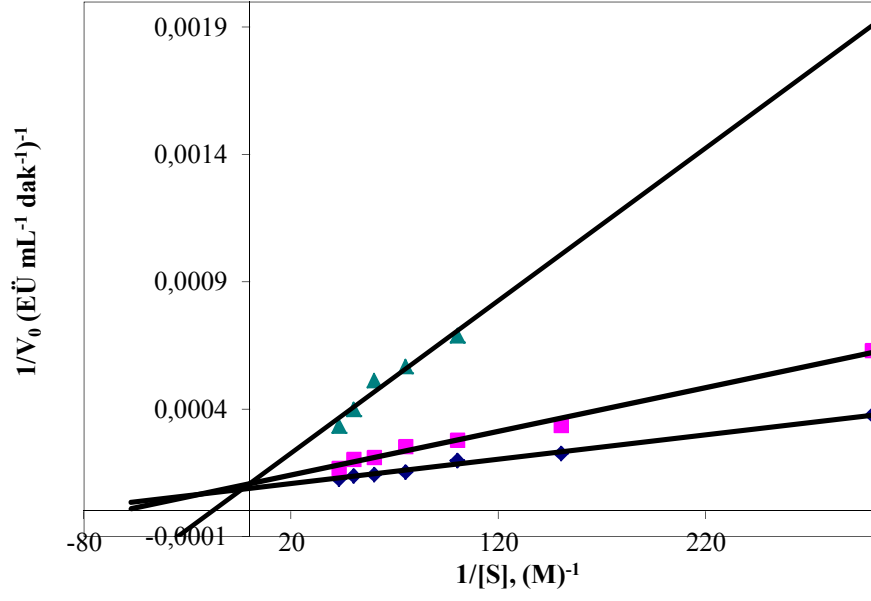
[I](M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> ' (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	257,1	600	38	3333	1,3	—	0.9955
	6,67	299,9	300	33				
	10,00	359,9	200	27				
	13,33	449,9	150	22				
	16,67	599,9	120	16				
	20,00	899,9	100	11				
	23,33	1799	85.7	5,5				
3,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	2272	600	4.4	—	—	9,9 x 10 <sup>-3</sup>	0.9975
	6,67	3125	300	3.2				
	10,00	3571	200	2.8				
	13,33	3846	150	2.6				
	16,67	4032	120	2.4				
	20,00	4166	100	2.4				
1,0 x 10 <sup>-2</sup>	3,33	2631	600	3.8	—	—	33,3	0.9921
	6,67	3448	300	2.9				
	10,00	3846	200	2.6				
	13,33	4081	150	2.4				
	16,67	4237	120	2.3				
	20,00	4347	100	2.3				



Şekil 3.6 : 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.7:** Katekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

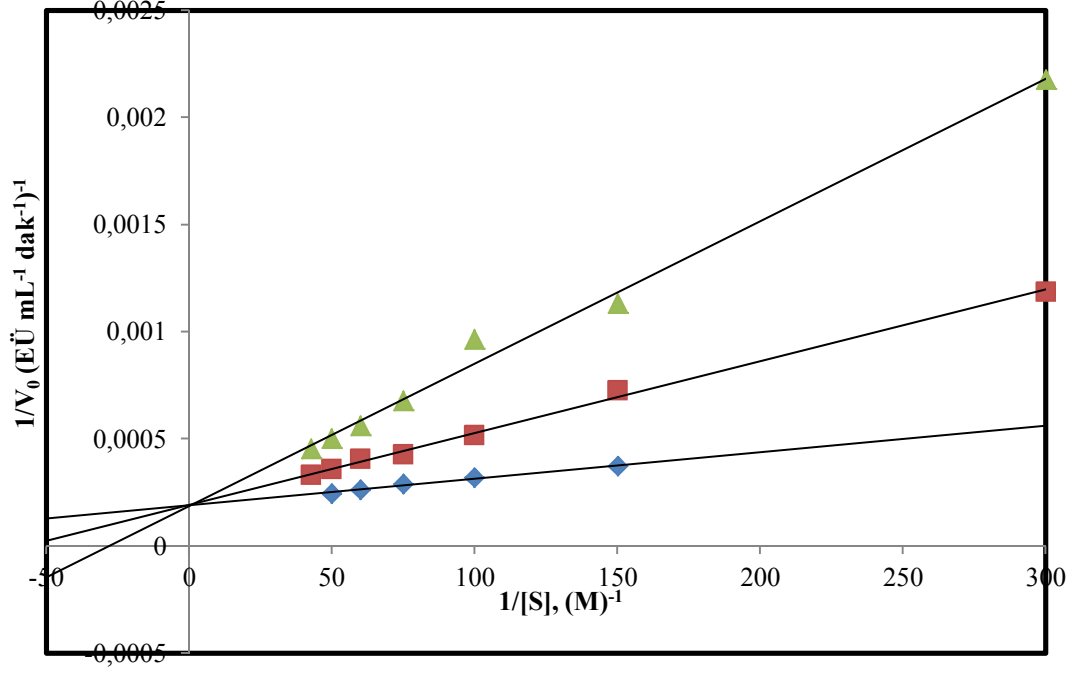
[I] (M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	2500	300	4,0	11111	11	—	0,9932
	6,67	4000	150	2,5				
	10,00	5000	100	2,0				
	13,33	5714	75	1,7				
	16,67	6250	60	1,6				
	20,00	6666	50	1,5				
	23,33	7000	43	1,4				
3,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	1428	300	7,0	—	—	6,7 x 10 <sup>-6</sup>	0,9896
	6,67	2500	150	4,0				
	10,00	3333	100	3,0				
	13,33	4000	75	2,5				
	16,67	4545	60	2,2				
	20,00	5000	50	2,0				
	23,33	5384	43	1,8				
1 x 10 <sup>-2</sup>	10,00	1428	100	7,0	—	—	6,1 x 10 <sup>-5</sup>	0,9546
	13,33	1818	75	5,5				
	16,67	2173	60	4,6				
	20,00	2500	50	4,0				
	23,33	2800	43	3,5				



**Şekil 3.7 :** Katekol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.8:** Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I] (M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	424	1000	23	11111	11	—	0,9932
	6,67	495	500	20				
	10,00	593	333	16				
	13,33	742	250	13				
	16,67	989	200	10				
	20,00	1484	166	6,7				
	23,33	2968	142	3,3				
3,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	333	1000	23	—	—	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	0,9939
	6,67	998	500	19				
	10,00	1330	333	16				
	13,33	1661	250	13				
	16,67	1992	200	9,0				
	20,00	2322	166	6,0				
	23,33	4375	142	2.2				
6,7 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	613	1000	6,0	—	—	2,8 x 10 <sup>-3</sup>	0,9956
	6,67	698	500	4.5				
	10,00	745	333	4,0				
	13,33	866	250	3.7				
	20,00	1597	166	3.5				

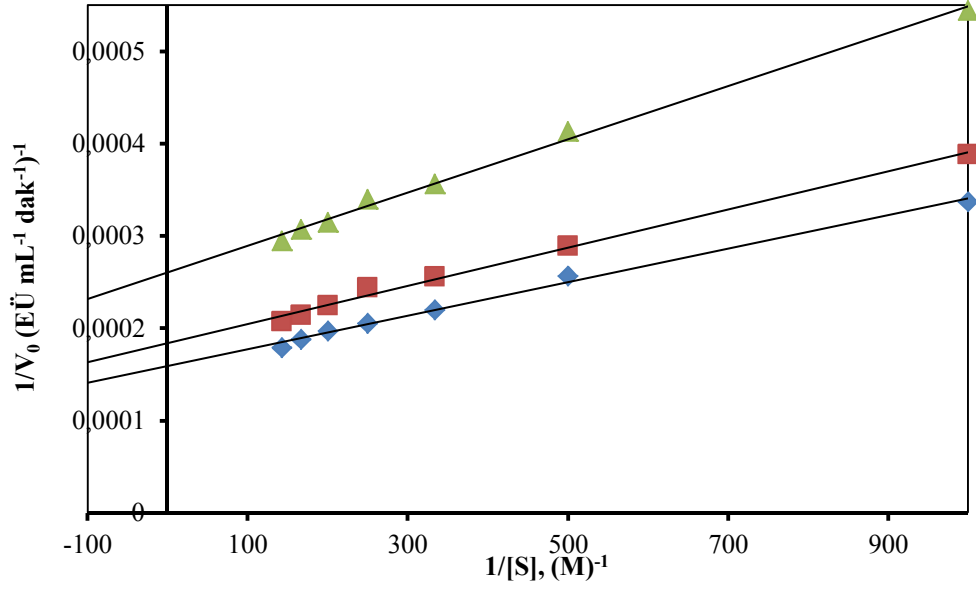


Şekil 3.8 : Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.9:** Katekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I](M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	2564	300	3,9	11111	11	—	0,9932
	6,67	2898	150	3,4				
	10,00	3030	100	3,3				
	13,33	3100	75	3,2				
	16,67	3144	60	3,18				
	20,00	3174	50	3,15				
	23,33	3196	42	3,12				
3,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	2439	300	4,1	—	—	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	0,9939
	6,67	3278	150	3,0				
	10,00	3703	100	2,7				
	13,33	3960	75	2,5				
	16,67	4132	60	2,4				
	20,00	4255	50	2,3				
	23,33	4347	42	2,2				
6,7 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	909	300	11	—	—	2,8 x 10 <sup>-3</sup>	0,9956
	6,67	1538	150	6,5				
	10,00	2000	100	5,0				
	13,33	2352	75	4,2				
	16,67	2631	60	3,8				
	20,00	2857	50	3,5				
	23,33	3043	42	3,2				

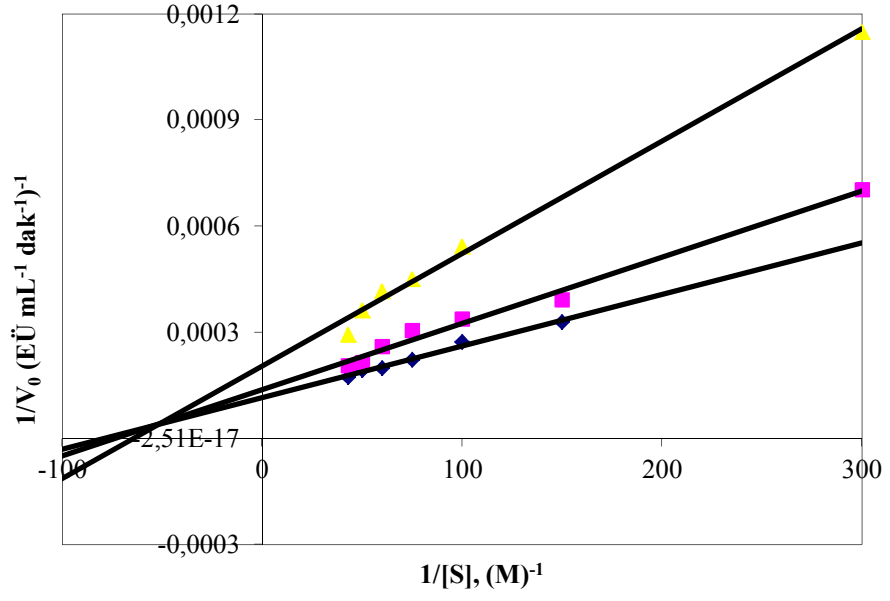




Şekil 3.9 : Katekol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.10:** Pirogallol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

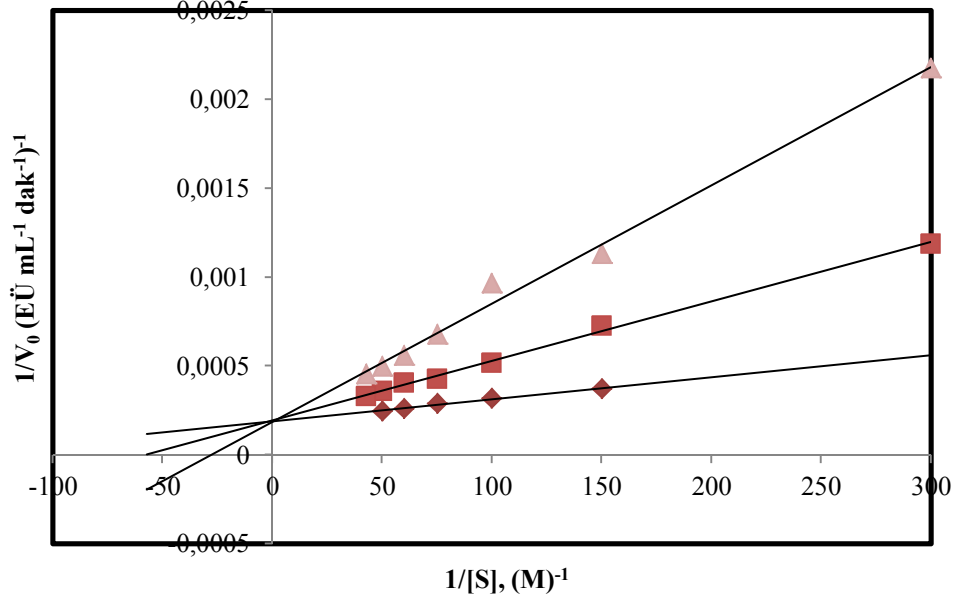
[I](M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	2500	300	4,0	5000	5,0	—	0,9862
	6,67	4000	150	2,5				
	10,00	5000	100	2,0				
	13,33	5700	75	1,7				
	16,67	6250	60	1,6				
	20,00	6666	50	1,5				
	23,33	7000	43	1,4				
3,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	1428	300	7,0	—	—	6,66 x 10 <sup>-3</sup>	0,9883
	6,67	2500	150	4,0				
	10,00	3333	100	3,0				
	13,33	4000	75	2,5				
	16,67	4545	60	2,2				
	20,00	5000	50	2,0				
	23,33	5384	43	1,8				
1 x 10 <sup>-2</sup>	3,33	909	300	11	—	—	2 x 10 <sup>-2</sup>	0,9933
	6,67	1538	150	6,5				
	10,00	2000	100	5,0				
	13,33	2352	75	4,2				
	16,67	2631	60	3,8				
	20,00	2857	50	3,5				
	23,33	3043	43	3,2				



Şekil 3.10 : Pirogallol substratı kullanılarak L-sistein inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.11:** Pirogallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler

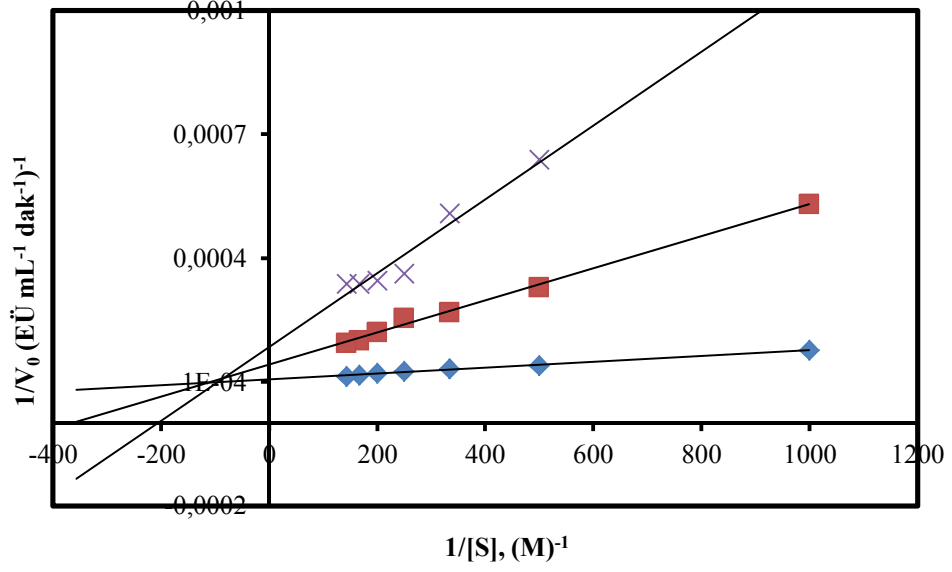
[I] (M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	430	300	23	5000	5,0	—	0,99
	6,67	502	150	19				
	10,00	602	100	16				
	13,33	752	75	13				
	16,67	1002	60	9,9				
	20,00	1502	50	6,6				
	23,33	3002	43	3,3				
1,6 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	2500	300	4,0	—	—	4,1 x 10 <sup>-4</sup>	0,997
	6,67	3333	150	3,0				
	10,00	3750	100	2,7				
	13,33	4000	75	2,5				
	16,67	4166	60	2,4				
	20,00	4285	50	2,3				
	23,33	4375	43	2,3				
8,3 x 10 <sup>-2</sup>	3,33	1666	300	6,0	—	—	2,1 x 10 <sup>-2</sup>	0,9923
	6,67	2222	150	4,5				
	10,00	2500	100	4,0				
	13,33	2666	75	3,7				
	16,67	2777	60	3,6				
	20,00	2857	50	3,5				
	23,33	2916	43	3,4				



**Şekil 3.11** : Pirogallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

**Tablo 3.12:** Pirogallol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I] (M)	[S] (M) x 10 <sup>+3</sup>	V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	1/[S] (M) <sup>-1</sup>	1/V <sub>0</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> x 10 <sup>+4</sup>	V <sub>max</sub> (EÜ mL <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (M)	R <sup>2</sup>
0	3,33	5882	1000	1,70	5000	5,0	—	99,12
	6,67	7407	500	1,35				
	10,00	8108	333	1,23				
	13,33	8510	250	1,17				
	16,67	8771	200	1,14				
	20,00	8955	166	1,11				
	23,33	9090	142	1,10				
1,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,33	2000	1000	5,0	—	—	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	99,62
	6,67	3333	500	3,0				
	10,00	4285	333	2,3				
	13,33	5000	250	2,0				
	16,67	5555	200	1,8				
	20,00	6000	166	1,6				
	23,33	6363	142	1,5				
1,0 x 10 <sup>-2</sup>	3,33	909	1000	11	—	—	2 x 10 <sup>-2</sup>	99,12
	6,67	1538	500	6,5				
	10,00	2000	333	5,0				
	13,33	2352	250	4,2				
	16,67	2631	200	3,8				
	20,00	2857	166	3,5				
	23,33	3043	142	3,2				



**Şekil 3.12 :** Pirogallol substratı kullanılarak glutamik asit inhibitörü ile *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun inhibisyonunu için  $1/V_0-1/[S]$  eğrileri.

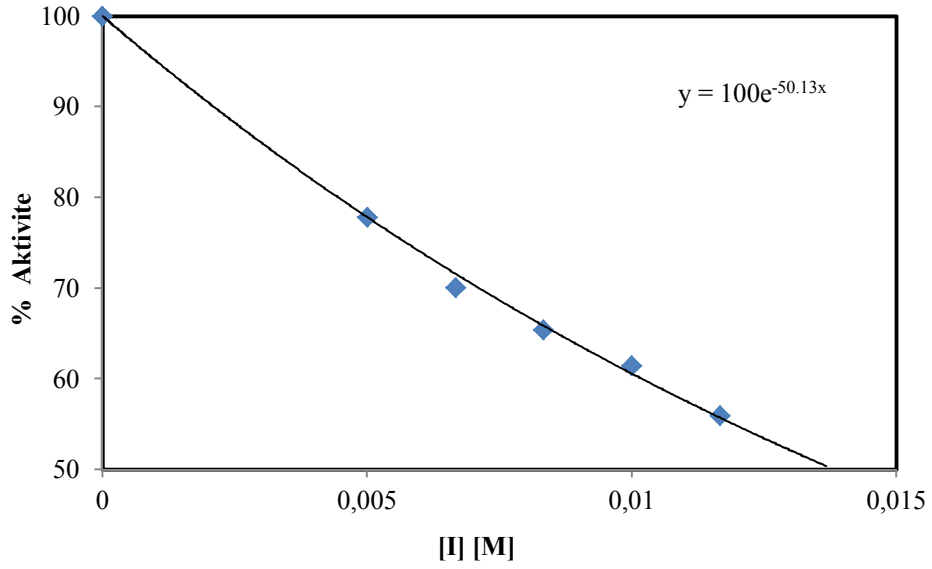
### 3.6 I<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

Polifenol oksidazın askorbik asit, L-sistein ve glutamik asit inhibitörleri ile I<sub>50</sub> değerini tayin etmek için 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlar olarak kullanılmıştır. Elde edilen deneysel veriler Tablo 3.13-3.15 ve Şekil 3.13-3.21'de gösterilmiştir. İnhibitör konsantrasyonunun yüzde inhibisyona karşı çizilen grafiklerinin eğrilerinden elde edilen denklemlerinden I<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.

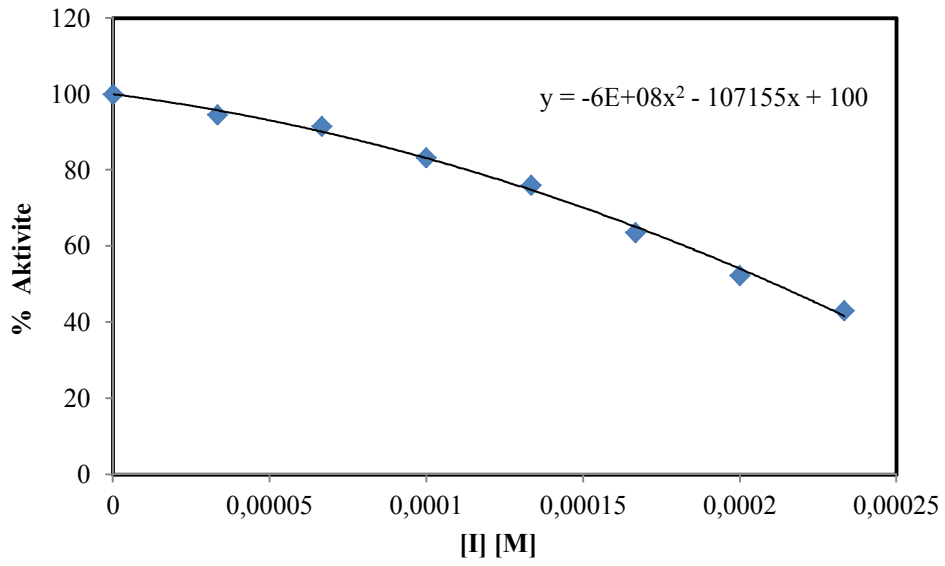
**Tablo 3.13:** Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri

<b>İnhibitör</b>	<b>[I] (M)</b>	<b>Absorbans</b>	<b>% İnhibisyon</b>
<b>Glutamik asit</b>	0,000000	0.5684	100,0
	0.005000	0.4179	73,5
	0.006667	0.3983	70,1
	0.008333	0.3898	68,6
	0.010000	0.3494	61,4
	0.011667	0.3181	56,0
<b>L-sistein</b>	0,000000	0,4258	100
	0,000033	0,4028	94,5
	0,000066	0,3900	91,5
	0,000100	0,3550	83,3
	0,000133	0,3239	76,0
	0,000166	0,2512	58,9
	0,000200	0,2027	47,6
	0,000233	0,1838	43,1
<b>Askorbik asit</b>	0,000033	0,4371	100,0
	0,000066	0,3319	74,7
	0,000100	0,3268	65,3
	0,000133	0,2857	57,3
	0,000166	0,2505	44,1
	0,000200	0,1931	31,9
	0,000233	0,1117	25,5

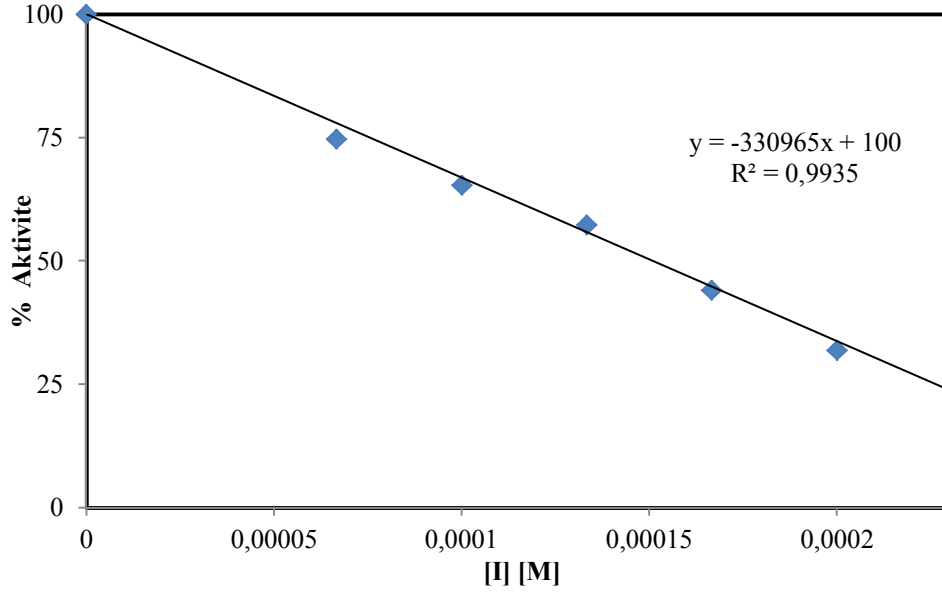




**Şekil 3.13 :** 4-metilkatekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



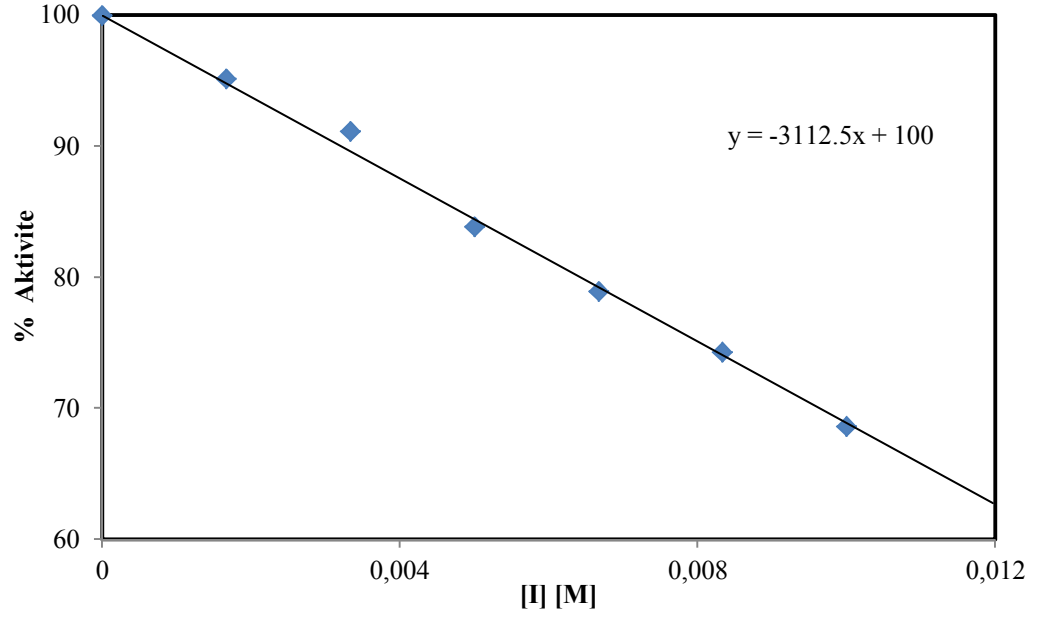
**Şekil 3.14 :** 4-metilkatekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



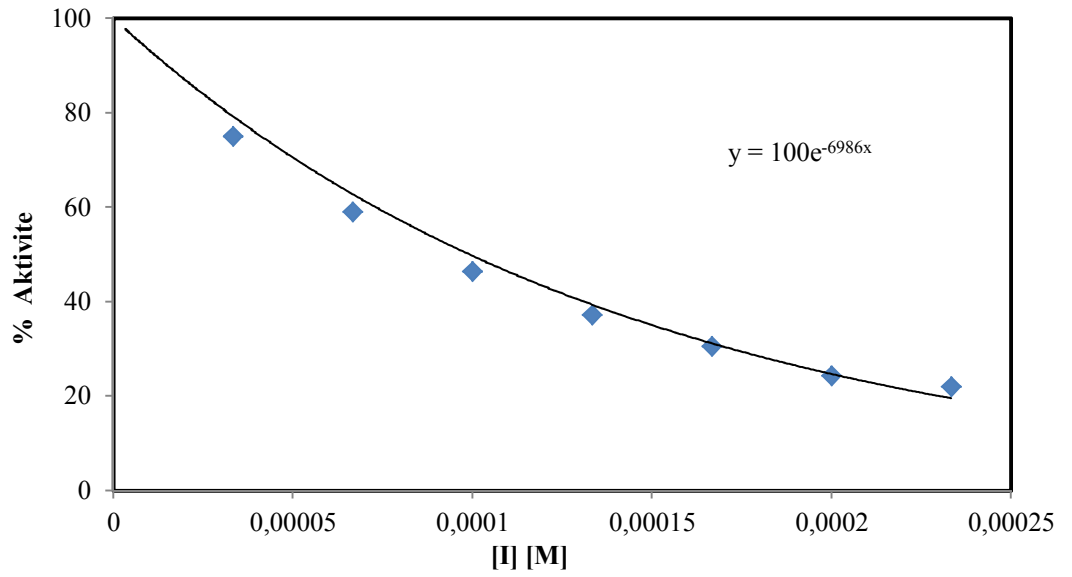
**Şekil 3.15 :** 4-metilkatekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu

**Tablo 3.14:** Bir substrat olarak katekol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri.

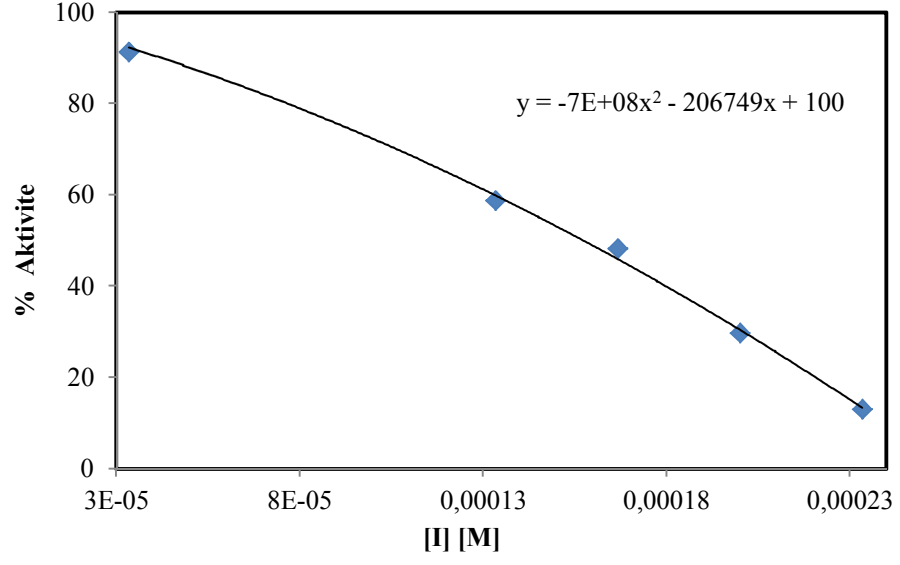
<b>İnhibitör</b>	<b>[I] (M)</b>	<b>Absorbans</b>	<b>% İnhibisyon</b>
<b>Glutamik asit</b>	0	0,5581	100,0
	0,001667	0,5410	96,9
	0,003333	0,5087	91,1
	0,005000	0,4821	86,3
	0,006667	0,4406	78,9
	0,008333	0,4146	74,2
	0,010000	0,3689	66,0
<b>L-sistein</b>	0,000033	0,7901	100,0
	0,000066	0,5924	74,9
	0,000100	0,4662	59,0
	0,000133	0,2941	37,2
	0,000166	0,2415	30,5
	0,000200	0,1918	24,2
<b>Askorbik Asit</b>	0000000	0,6726	100,0
	0,000033	0,6143	91,3
	0,000066	0,5028	74,7
	0,000100	0,4249	63,1
	0,000133	0,3955	58,8
	0,000166	0,3444	51,2
	0,000200	0,2002	29,7
	0,000233	0,0876	13,0



**Şekil 3.16 :** Katekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



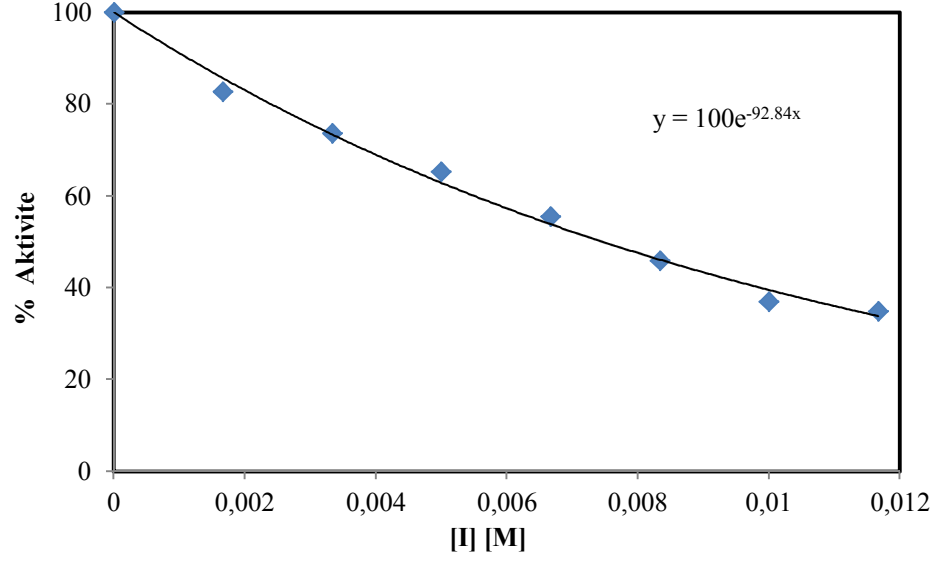
**Şekil 3.17 :** Katekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



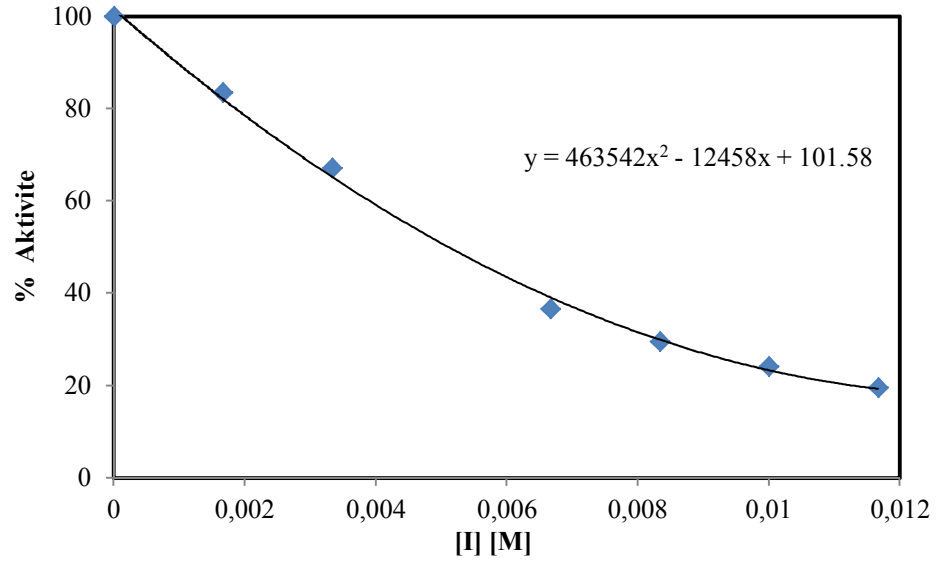
**Şekil 3.18 :** Katekol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.

**Tablo 3.15:** Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri.

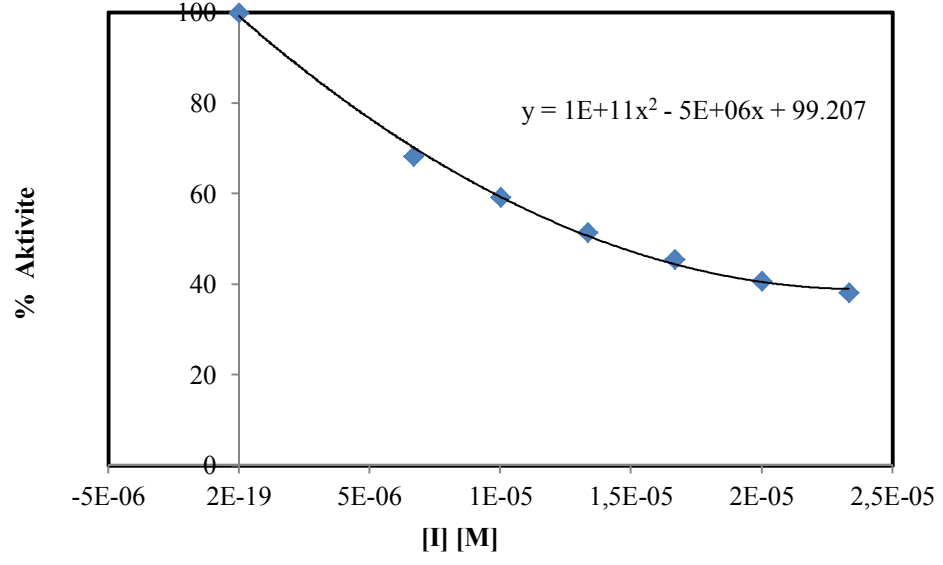
<b>İnhibitör</b>	<b>[I] (M)</b>	<b>Absorbans</b>	<b>% İnhibisyon</b>
<b>Glutamik asit</b>	0000000	0.8744	100,0
	0.001667	0.7036	80.4
	0.003333	0.6439	73.6
	0.005000	0.5709	65.2
	0.006667	0.5060	57.8
	0.008333	0.4012	45.8
	0.010000	0.3238	37.0
<b>L-sistein</b>	0,000000	0.5775	100,0
	0.001667	0.4821	83.4
	0.003333	0.3881	67.2
	0.005000	0.3401	58.8
	0.006667	0.1991	34.4
<b>Askorbik Asit</b>	0000000	0.5028	100,0
	0.000010	0.2979	59.2
	0.000013	0.2588	51.4
	0.000067	0.2291	45.5
	0.000020	0.2046	40.6
	0.000023	0.1925	38.2



Şekil 3.19 : Piragallol substratı kullanılarak *S. perfoliata* L. subsp. *athoa* polifenol oksidazının glutamik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



Şekil 3.20 : Piragallol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının L-sistein inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



Şekil 3.21 : Piragallol substratı kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörüyle yüzde inhibisyonu.



## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra bazı biyokimyasal parametreleri incelenmiştir. *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan kısmen saflaştırılan PFO enziminin substrat spesifikliğı, belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri, enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisi, inhibisyon türlerinin tespiti ile  $K_i$  değerlerinin hesaplanması ve bitkinin protein içeriğı belirlenmiştir.

### 4.1 *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın Toplam Protein İçeriğı

Bitkisel besinlerin gıda değerlerinin belirlenmesinde protein içeriğı önemli bir parametredir. *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın protein içeriğı asidik bir boya olan Coomassie-Brillant Blue (CBB) G-250 solüsyonu kullanılarak Bradford metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [46]. Buna göre; *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın enzim ekstraktının 14,06 mg/100 g protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Literatürde bir çok bitkinin değışik amaçlarla protein içeriğinin tespit edildiğı görölmektedir. Muzun protein içeriğı 1,5-2,1 mg mL<sup>-1</sup>, elmanın 0,19 mg mL<sup>-1</sup>, sakız ağacının 0,0526 mg mL<sup>-1</sup> [47], *O. onites* ve *O. vulgare* subsp. *hirtum* türlerinin vejetatif ve generatif dönemlerde yapraklarındaki protein içeriğinin sırasıyla 5,89–4,34 ve 7,96–55,59 mg g<sup>-1</sup> aralığında olduğu bulunmuştur [48]. Diğeri bir çalışmada ise *Lactuca sativa* L.'nin protein içeriğinin 494 mg/mL olduğu bildirilmiştir [1]. Menhgini ve arkadaşları antioksidan aktivite ve kimyasal kompozisyonunu belirlemeye çalıştıkları *Sideritis italica*'nın total protein içeriğini taze yapraklarda 606.7±141.9 µg/g, çiçeklerde ise 1095.0±229.6 µg/g olduğunu tespit etmişlerdir [49].

Bitkilerin serbest amino asit içeriğı bitkiden bitkiye göre değışim göstermektedir. Bunun yanısıra protein varlığı ve dağılımı çevresel faktörlere göre de değışim göstermektedir [50]. Bitki hücrelerindeki protein içeriklerinin bitkinin

türüne, yaşına, sebze ve meyvelerin olgunluğuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmektedir [50].

## 4.2 Optimum pH

Enzimler, protein yapısında olmalarından dolayı pH değişiminden oldukça etkilenirler. Enzimlerin aktif merkezleri genelde iyonlaşabilen gruplardan oluşur ve bir enzimin bir reaksiyonu katalizleyebilmesi, substrata yapışabilmesi ya da aktif merkezinin uygun durumda olması için bu grupların uygun iyonik formda olması gerekmektedir. Substratların da iyonlaşabilen gruplar içermesi durumunda substrat yalnızca bir iyonik formda enzimle birleşebilir ya da katalize edilebilir. pH değişimiyle iyonizasyon ve dissosiyasyonda değişimler meydana gelmektedir. Enzim-substrat sisteminde enzimlerin aktivite gösterdiği pH aralığı oldukça dardır [51, 52, 53]. Artan pH değeri ile enzim aktivitesi ilk önce bir maksimum değere erişir ve daha sonra bazik bölgede sıfır değerine doğru azalır. Substratın enzime bağlanması, enzimin katalitik aktivitesi, substratın iyonlaşması, protein yapısında meydana gelen etkiler gibi nedenlerle pH aralığı daralır [54]. Optimum pH, enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeridir ve bu yüzden her substrata ait pH değeri belirlenmektedir [36,53,55].

*S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'nun pH profili 4.5-9.0 aralığında asetat ve fosfat tamponları kullanılarak incelenmiştir. Tablo 3.2 ve Şekil 3.2'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su için optimum pH'ların sırasıyla 5.0, 7.0, 7.5 olduğu bulunmuştur. Genellikle, bitkiler nötral pH değerinde optimum pH aktivitesi göstermektedirler [42]. Yapılan literatür araştırmasında *Sideritis* türlerinden elde edilen PFO enzimine ait optimum pH çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak literatürde çeşitli kaynaklardan elde edilmiş PFO için farklı optimum pH değerlerinin olduğu bildirilmiştir.

Fenolik bir substrat olan 4-metilkatekol kullanıldığında dut bitkisi PFO'su için optimum pH 5.0 [34], *Ferula* sp. PFO'su için optimum pH'nın 6.0 [56], çilek PFO'su için optimum pH'nın 4.5, patlıcan PFO'su için optimum pH'nın 6.0 olduğu bulunmuştur [16]. Çay bitkisi PFO'nun en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH

değeri 6.02 olarak belirlenmiştir. Muşmula PFO'ı için 4-metilkatekol substratıyla optimum pH değerinin 7.0 olduğu, aynı substrat ile napolyon üzüm PFO'ı için optimum pH değerinin 3.0 olduğu rapor edilmiştir [35]. Çin'in güneyinde yetişen ve geçmişte kral meyvesi olarak bilinen liçi PFO'su ile yapılan çalışmada 4-metilkatekol substratı için optimum pH değerinin 7.0, armut ile yapılan çalışmada aynı substrat için pH'nın 5.0 olduğu belirtilmiştir [57,58].

PFO'nun substratlarından biri olan katekol kullanıldığında ayva bitkisi PFO'su için optimum pH 8.0, dut bitkisi PFO'su için optimum pH'nın 7.0 [34], *Ferula* sp. PFO'su için optimum pH'nın 7.0 [56], marula meyvesi PFO'su için optimum pH'nın 7.0 [60], kivi PFO'su için optimum pH'nın 7.3 [61] olduğu bulunmuştur. Olgunluk aşamasına göre şeftali PFO'su için katekol substratı ile belirlenen optimum pH derecesi 6.0-6.5 arasında bulunmuştur. Tam olgun şeftalilerde elde edilmiş enzimin optimum pH'nın 6.2 olduğu bildirilmiştir [62-65]. Katekol substratı kullanılarak enginar kabuğu ve meyve PFO'sunun optimum pH değerleri, kabuk PFO'su için 7.5, meyve PFO'su için 8.0 olarak bulunmuştur [66]. Yine aynı substrat kullanıldığında anamur muzundan elde edilen PFO için optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir [67]. Armut PFO'su ile yapılan çalışmada katekol substratı için optimum pH değerinin 5.0 olduğu rapor edilmiştir [58]. *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinin PFO'sunun optimum pH değerleri katekol substratı için çalışılan bitki PFO'ları ile benzerlik göstermektedir.

Pirogallol substratı kullanıldığında ise dut PFO'su için optimum pH'nın 7.5 [34], Çin lahanası PFO'su için optimum pH'nın 5.0 [68], enginar PFO'su için optimum pH'nın 8.0 [69], *Ocimum basilicum* L. PFO'su için optimum pH'nın 9.0 olduğu belirlenmiştir [70]. Pirogallol substratı ile amasya elma PFO'su için optimum pH değerinin 8.6 olduğu bildirilmiştir [71]. Pirogallol substratıyla maruldan elde edilen PFO için optimum pH değerinin 7.5 olduğu tespit edilmiştir [1]. Armuttan elde edilen PFO ile yapılan çalışmada pirogallol substratı için optimum pH değerinin 8.0 olduğu bildirilmiştir [58]. Bu PFO'ların optimum pH'ları ile kıyaslandığında *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su Çin lahanası, enginar, *O. basilicum* L. ve armut PFO'larından farklılık göstermektedir. Ancak dut ve marul PFO'su ile aynı optimum pH değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Optimum pH'lar arasındaki farklılık, değişik kaynaklardan elde edilen PFO'ların değişik formlarının bulunması, enzim

kaynağının olgunluk durumu, enzimin saflaştırılma derecesi ve substrat tipi ile yakından ilişkilidir [72].

### 4.3 Optimum Sıcaklık

Bir enzimin optimum sıcaklığı çoğu zaman deneyin yapıldığı şartlara bağlıdır. Genel olarak sıcaklık arttırıldığında reaksiyon için gerekli kinetik enerjiye sahip moleküllerin kesri arttığı için reaksiyon hızı artar. Sıcaklık çok fazla arttırıldığında termal denaturasyon etkisinden dolayı reaksiyon hızı azalır. Bu durum çoğu enzimler için hemen hemen aynıdır [48]. Enzimlerin optimum sıcaklığı da, pH gibi izole edildiği kaynakla ortamın pH'sı ile ve kullanılan substratlarla doğrudan ilişkilidir [66]. *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın polifenol oksidaz aktivitesinin 3 farklı substratta sıcaklıkla değişimini Şekil 3.3'te gösterilmektedir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20, 20 ve 50<sup>0</sup>C olarak belirlenmiştir. *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın polifenol oksidaz aktivitesini 60 <sup>0</sup>C ve üzerinde enzim aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Enginar kabuğu ve meyve PFO'sunun optimum sıcaklık, kabuk ve meyve PFO'su için sırasıyla 25<sup>0</sup>C ve 30<sup>0</sup>C bulunmuştur [73]. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için *O. basilicum* PFO'nun optimum sıcaklık değerleri sırası ile 20, 40 ve 50<sup>0</sup>C olarak tespit edilmiştir [28]. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *Lactuca sativa* L. PFO'ı için optimum sıcaklıkların sırasıyla 30, 40 ve 30 <sup>0</sup>C olduğu bulunmuştur [1]. Katekol substratı ile Güney Afrika'da yetişen Viktorya üzümünden ekstrakte edilen PFO için optimum sıcaklık 25 <sup>0</sup>C olarak tespit edilmiştir [74]. Çukurova bölgesinde yetiştirilen Domat çeşidi zeytinden kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin 4-metilkatekol substratı kullanılarak, optimum sıcaklık derecesinin 30<sup>0</sup>C olduğu rapor edilmiştir [38]. Birçok bitki ve meyve üzerinde yapılan çalışmalarda PFO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 25-30<sup>0</sup>C aralığında olduğu, sıcaklığın 40 <sup>0</sup>C'nin üzerine çıkmaya başladığı anda PFO aktivitesinin azalma gösterdiği belirtilmiştir [25,45,71,75,76]. Lee ve arkadaşları kakao tanelerinin 60 <sup>0</sup>C'ye ısıtılmasıyla bitkinin bünyesindeki gizli PFO'nun aktif hale geldiğini fakat daha yüksek sıcaklıklarda ise aktivite göstermediğini belirtmişlerdir [16].

#### 4.4 Substrat Spesifikliği

*S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenol oksidazın substratlara bağlı olarak gösterdiği aktiviteyi belirlemek amacıyla 4-metilkatekol ve katekol gibi difenolik, pirogallol gibi trifenolik substratlar kullanılmıştır. Polifenol oksidazların difenolaz aktivite gösterdiği domates tohumları [77], *Solonum tuberosum* [78], DeChaunac zm [79], *Sorghum* taneleri [80] ve polifenol oksidazların trifenolaz aktivite gösterdiği ilek [81], Gum Arabic [82], elma [83] yapılan literatür araştırması sonucunda saptanmıştır. Difenolik ve trifenolik substratlar için doygunluk eğrileri *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun basit Michelis-Menten eğrileri sergilediğini göstermiştir. Michealis-Menten sabitleri olan  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerlerini belirlemek için deneyler, enzimin ilgili substratlarla optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Üç farklı substratın farklı konsantrasyonlarında llms olan reaksiyon hızlarından Michealis-Menten sabitlerini ( $V_{max}$  ve  $K_M$ ) belirlemek için Lineweaver-Burk denklemi kullanılmış ve denklemin eğim ve ekstrapolasyonundan  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri hesaplanmıştır.

Enzimin katalizleme gücünü gösteren  $V_{max}/K_M$  değerleri hesaplanarak en etkin substratın 4-metilkatekol olduğu ve bunu sırasıyla katekol ve pirogallolun izlediği bulunmuştur. Her üç substrat için hesaplanmış Michelis-Menten sabitleri ve  $V_{max}/K_M$  değerleri Tablo 4.1' de verilmektedir.

**Tablo 4. 1:** *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO'nun substrat spesifikliği

<b>Substratlar</b>	<b><math>V_{max}</math>(EU mL<sup>-1</sup> dak<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>K_M</math>(mM)</b>	<b><math>V_{max}/K_M</math>(EU mL<sup>-1</sup> dak<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>)</b>
4-metilkatekol	5000	1.5	3333.3
Katekol	11111	11	1010
Pirogallol	5000	5.0	1000

Bu çalışmada *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su için elde edilen  $K_M$  değerleri, substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak fesleğen için elde edilmiş 1.62 mM [70], *Annona cherimola* Müll.'den elde edilmiş 1.33 mM [1] değerlerine yakın, *Thymus*'dan elde edilmiş 9.8 mM [44], enginar için elde edilmiş 11.6 mM [69] değerlerinden düşük bulunmuştur. Substrat olarak katekol kullanılarak patlıcan için elde edilmiş 9.3 mM [45], çay yaprağı için elde edilmiş 12.5 mM ve bakla tohumu için elde edilmiş 10.5 mM [16] değerlerine yakın, Amasya elması için elde edilmiş 34 mM [25], *Thymus*'dan elde edilmiş 18 mM [44] değerlerinden düşük bulunmuştur. Substrat olarak pirogallol kullanılarak Yali şeftalisi için elde edilmiş 2.6 mM , *Lactuca sativa* için elde edilmiş 3.0 mM [1] değerlerinden yüksek, çay yaprağı için elde edilmiş 17.8 mM [16] ve Amasya elması için elde edilmiş 27 mM [25] değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir. Farklı fenoller için rapor edilen PFO'nun  $K_M$  değerlerinde görülen bu geniş aralığın nedenleri olarak i.) farklı ölçüm metodları, ii.) varyetelerin farklı oluşu, iii.) aynı varyetenin farklı türleri ve iv.) ekstraksiyon çözeltisini hazırlamak için kullanılan tamponlar ve bu tamponların pH'ları sayılabilir.

#### 4.5 Enzim İnhibisyonu

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler arasında pH, ısı, ışık ve bazı fiziksel faktörler, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, reaksiyon ürünleri, çeşitli iyonların varlığı, hormonlar, bazı biyokimyasal faktörler ve inhibitörler ya da inhibitör etkisi gösteren bileşikler bulunur. Birçok madde enzimin aktivitesini, substratın enzime bağlanmasını ve/veya enzimin turnover sayısını etkileyerek değiştirir. Bu maddeler modülatör olarak bilinirler. Modülatör bileşikler aktivatör ve inhibitör bileşikler olarak iki gruba ayrılırlar. Aktivatörler, enzimlerin aktivitesini arttıran, inhibitörler ise enzimatik tepkimeleri yavaşlatarak veya durdurarak etkileyen moleküler ajanlardır [85].

Sebzelerdeki enzimatik kararmanın inhibisyonu;

- Polifenol oksidazın inaktivasyonu,
- Reaksiyon için oksijen ve polifenoller gibi substratlardan birisinin giderilmesi,
- İkincil reaksiyondaki renkli ürünlerin oluşumunu inhibe etmek için enzimin reaksiyon ürünleri üzerinde inhibitörlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir [85].

Sebzelerin enzimatik kararması oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktantları ortamdaki gidererek veya PFO inhibitörleri kullanılarak geciktirebilir ya da tamamen önlenir [86].

Çalışmamızda inhibitör olarak glutamik asit, L-sistein, askorbik asit, benzoik asit ve sodyum azid, substrat olarak ise 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol kullanılmıştır. Elde edilen deneysel verilere göre benzoik asit ve sodyum azidin, *S. perfoliata* subsp. *athoa*'nın PFO'sunu inhibe etmediği gözlemlenmiştir. Spesifik bir inhibitörle enzimatik kararmanın önlenmesi ya da tek bir mekanizmanın ya da iki ve daha fazla inhibitör etki mekanizmasının karşılıklı etkileşiminin bir sonucu olabilir. Enzimlerin etki mekanizmalarını gösteren 3 adet inhibisyon türü vardır.

#### 4.5.1 Yarışmalı İnhibisyon

Yarışmalı inhibisyon için genel reaksiyon şeması ve Linewaver-Burk denklemi verilmişti. Linewaver-Burk denkleminin eğrisi, eğimi  $\alpha K_M/V_{max}$  ve ekstrapolasyonu  $1/V_{max}$  olan düz bir doğru verecektir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için Linewaver-Burk eğrileri  $1/V_0$  ekseninde  $1/V_{max}$  noktasında kesişirler. Diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında çeşitli inhibitör konsantrasyonlarındaki Linewaver-Burk eğrilerinin  $1/V_{max}$ 'da kesişmesi yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [27].

Bir enzimin bağ noktası için normal bir substrat ile doğrudan yarışan bir madde yarışmalı bir inhibitör olarak bilinir. Böyle bir inhibitör çoğu zaman enzimin substratına benzer. Bu tür inhibisyonda inhibitör, enzimin turnover sayısını etkilemez. Spesifik bir inhibitörle enzimatik kararmanın önlenmesi ya tek bir mekanizmanın ya da iki ve daha fazla inhibitör etki mekanizmasının karşılıklı etkileşiminin bir sonucu olabilir.

*S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'sunun substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için; substrat olarak katekol kullanıldığında yine L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için; substrat olarak pirogallol kullandığımızda ise askorbik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı olduğu bulunmuştur. Askorbik asit inhibitör etkisini polifenoloksidazlar tarafından oluşturulmuş kinonları tekrar polifenollere indirgeyerek gösterir. Böylece askorbik asit enzimatik kararmayı sadece geçici olarak önler. Aynı zamanda askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında enzimin inaktivasyonuna da sebep olabilir. L-sistein kinonlara kolay bir şekilde kompleksler oluşturur ve böylece ikincil oksidasyonu ve mevcut substratı tüketen polimerizasyon reaksiyonlarını inhibe eder. Tiyol bileşikleri ile inhibisyon ya kinonlarla katılma reaksiyonu sonucu oluşmuş kararlı renksiz ürünlere ya da metabisülfid gibi polifenoloksidazın aktif merkezine bağlanmasına atfedilebilir [16,87,88].

Doğan ve Doğan, *Thymus* polifenoloksidazı için substratlar olarak 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol kullanarak glutatyon inhibitörü için inhibisyon



türünün yarışmalı; Paul ve Gowda tarla baklası polifenoloksidazı substratı olarak katekol kullanarak tropolon, askorbik asit ve L-sistein inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı [89]; ve Robert ve arkadaşları, Palmito polifenoloksidazı için substrat olarak 4-metilkatekolü kullanarak benzoik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı olduğunu bulmuşlardır [90]. Yukarıda ki örneklerde de görüldüğü gibi inhibisyon türü sadece incelenmiş polifenoloksidazın kaynağına değil, aynı zamanda kullanılmış substrata da bağlıdır.

#### 4.5.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

Yarı-yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanır. Böyle bir mekanizma, inhibitör için bağ noktası sadece substratla etkileştiğinde anlaşılabilir. Ayrıca bu kompleks çok kararlı olduğu için ürüne dönüşmez. Yarı-yarışmalı inhibisyon için inaktif kompleksin oluşumu ve Lineweaver-Burk denklemi ise daha önce verilmiştir. Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi  $K_M/V_{max}$  ve ekstrapolasyonu  $\alpha'/V_{max}$  olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir. Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur. Yarı-yarışmalı inhibisyonda, inhibitor enzimin katalitik fonksiyonunu etkiler ancak substrata bağlanmasını etkilemez [27].

*S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının substrat olarak 4-metilkatekol ve katekol kullanıldığında glutamik asit inhibitörünün inhibisyon türü yarı-yarışmalı olarak bulunmuştur.

Arslan ve Doğan'ın mantar polifenol oksidazını inhibe etmek üzere yaptıkları çalışmada katekol ve pirogallol kullanıldığında 2,3-diaminopropionik asidin enzimi yarı-yarışmalı inhibisyon türüne sahip olduğu bulunmuştur. Yine Doğan ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise 4-metilkatekol kullanıldığında glutamik asidin *Ocimum basilicum* PFO'sunu yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. [31,91].

### 4.5.3 Karışık Tür İnhibisyon

Bu inhibisyon türünde büyük bir olasılıkla inhibitör hem enzim-substrat kompleksine ve hem de katalize iştirak eden enzimin aktif noktalarına bağlanır. Bu tür inhibisyon da hem enzim hem de enzim-substrat kompleksinin reaksiyonu ve Lineweaver-Burk denklemi daha önce verilmiştir. Lineweaver-Burk denkleminin eğrisi eğimi  $\alpha K_M/V_{max}$  ve ekstrapolasyonu  $\alpha'/V_{max}$  olan düz bir doğru verecektir. İnhibitörün farklı konsantrasyonları için bu eşitliğin eğrileri  $1/V_0$  ekseninin solunda keşişen birbirine benzer doğrulardan meydana gelir. Bu tür inhibisyonda  $V_{max}$  değeri azalırken  $K_M$  değeri artar [27].

*S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenol oksidazının substrat olarak pirogallol kullanıldığında L-sistein ve glutamik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün karışık tür olduğu belirlenmiştir. Patates PFO'su için sinamik asit inhibitörü ve tropolon inhibitörü ile inhibisyon tipinin karışık tip inhibisyon olduğu bulunmuştur [92,93]. Literatürde Doğan ve arkadaşları, marul PFO'sunda 4-metilkatekol substratını kullanarak, tropolon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleriyle yapılan inhibisyonda; katekol substratı kullanarak glutatyon ve askorbik asit inhibitörleriyle yapılan inhibisyonda ve pirogallol substratını kullanarak askorbik asit inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda karışık tür inhibisyon elde etmişlerdir [1].

**Tablo 4. 2:** Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi,  $K_i$  ve  $K_i'$  değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	$K_i$ (M)	$K_i'$ (M)	İnhibisyon türleri
L-sistein	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$	—	Yarışmalı
	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-4}$		
Askorbik asit	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$	—	Yarışmalı
	$1,6 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-3}$		
Glutamik asit	$3,3 \times 10^{-3}$	—	$9,9 \times 10^{-3}$	Yarı-yarışmalı
	$1,0 \times 10^{-2}$		$3,3 \times 10^{-3}$	

**Tablo 4. 3:** Substrat olarak katekol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi,  $K_i$  ve  $K_i'$  değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	$K_i$ (M)	$K_i'$ (M)	İnhibisyon türleri
<b>L-sistein</b>	$3,3 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-6}$	—	Yarışmalı
	$1,0 \times 10^{-2}$	$6,1 \times 10^{-5}$		
<b>Askorbik asit</b>	$3,3 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$	—	Yarışmalı
	$6,7 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$		
<b>Glutamik asit</b>	$3,3 \times 10^{-3}$	—	$2,7 \times 10^{-3}$	Yarı-yarışmalı
	$6,7 \times 10^{-3}$		$2,8 \times 10^{-3}$	

**Tablo 4. 4:** Substrat olarak pirogallol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon tipi,  $K_i$  ve  $K_i'$  değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	$K_i$ (M)	$K_i'$ (M)	İnhibisyon türleri
<b>L-sistein</b>	$3,3 \times 10^{-3}$	$6,66 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-1}$	Karışık
	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-1}$	
<b>Askorbik asit</b>	$1,6 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-4}$	—	Yarışmalı
	$8,3 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$		
<b>Glutamik asit</b>	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-3}$	Karışık
	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-2}$	

#### 4.6 $I_{50}$ Değerleri

Tablo 4.5, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlar olarak kullanıldığında L-sistein, glutamik asit ve askorbik asit inhibitörleri için elde edilmiş  $I_{50}$  değerlerini göstermektedir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi polifenoloksidazın inhibitörlere duyarlılığı substrattan substrata değişmektedir. Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında L-sistein, glutamik asit ve askorbik asit inhibitörleri için elde edilmiş  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $2,12 \times 10^{-4}$ ,  $1,36 \times 10^{-2}$ ,  $5,34 \times 10^{-3}$  M; bir substrat olarak katekol kullanıldığında L-sistein, glutamik asit ve askorbik asit inhibitörleri için elde edilmiş  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $9,87 \times 10^{-5}$ ,  $1,25 \times 10^{-2}$ ,  $1,57 \times 10^{-4}$

M; ve bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında L-sistein, glutamik asit ve askorbik asit inhibitörleri için elde edilmiş  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $5,11 \times 10^{-3}$ ,  $7,43 \times 10^{-3}$ ,  $3,65 \times 10^{-5}$  M'dir.

**Tablo 4. 5:** *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'nun glutamik asit, L-sistein ve askorbik asit inhibitörlerine ait  $I_{50}$  değerleri.

İnhibitörler	Substratlar	$[I_{50}] (M) \times 10^{+4}$
Glutamik asit	4-metilkatekol	$1,36 \times 10^{-2}$
	katekol	$1,25 \times 10^{-2}$
	pirogallol	$7,43 \times 10^{-3}$
L-sistein	4-metilkatekol	$2,12 \times 10^{-4}$
	katekol	$9,87 \times 10^{-5}$
	pirogallol	$5,11 \times 10^{-3}$
Askorbik asit	4-metilkatekol	$5,34 \times 10^{-3}$
	katekol	$1,57 \times 10^{-4}$
	pirogallol	$3,65 \times 10^{-5}$

Sonuç olarak tablo 4.5'den de görüldüğü gibi bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında *S. perfoliata* subsp. *athoa* polifenoloksidazının inhibisyonu için en etkin inhibitörün L-sistein olduğu ve bunu askorbik asit ve glutamik asitin izlediği; bir substrat olarak katekol kullanıldığında en etkin inhibitörün L-sistein olduğu ve bunu askorbik asit ve glutamik asitin izlediği; bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında en etkin inhibitörün askorbik asit olduğu ve bunu L-sistein ve glutamik asitin izlediği bulunmuştur.

## 5. SONUÇLAR

*Sideritis perfoliata* L. subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden PFO'sunun özellikleri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, Balıkesir ilinin Sındırgı ilçesine bağlı bulunan Ulus Dağı bölgesinde yetişen *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su kısmen saflaştırılarak bazı biyokimyasal parametreleri incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar şunlardır:

- 1) *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan kısmi olarak saflaştırılan PFO'su enzimi için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Her bir substrat için optimum pH değeri sırasıyla 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol için 5.0, 7.0, 7.5 iken optimum sıcaklık değerleri de sırasıyla 20, 20 ve 50<sup>0</sup>C olarak belirlenmiştir.
- 2) *S. perfoliata* subsp. *athoa*'dan elde edilen PFO için tespit edilen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunmuştur. Optimum şartlarda 4-metil katekol, katekol ve pirogallol substratları için  $K_M$  değerleri sırasıyla 1.5, 11.0, 5.0 mM ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 5000, 11111, 5000 EU mL<sup>-1</sup>dak<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.
- 3) *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su substrat spesifikliğı belirlenmiş ve bu bitkiye ait PFO için en iyi substratın 4-metilkatekol olduğu belirlenmiştir.
- 4) Yine aynı bitkiden elde edilen enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisi araştırılarak inhibisyon türleri tespit edilmiş,  $K_i$  ve  $K_i'$  değerleri hesaplanmıştır. *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su için 4-metil katekol substratının L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için  $K_i$  değerleri sırasıyla  $1,4 \times 10^{-3}$ ,  $2,0 \times 10^{-4}$ ;  $1,0 \times 10^{-4}$ ,  $1,7 \times 10^{-3}$ , glutamik asit inhibitörü için  $K_i'$  değerleri  $9,9 \times 10^{-3}$ ,  $3,3 \times 10^{-3}$  katekol substratının L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için  $K_i$  değerleri sırasıyla  $6,7 \times 10^{-6}$ ,  $6,1 \times 10^{-5}$ ;  $2,7 \times 10^{-3}$ ,  $2,8 \times 10^{-3}$ , glutamik asit inhibitörü için  $K_i'$  değerleri  $2,7 \times 10^{-3}$ ,  $2,8 \times 10^{-3}$  ve pirogallol substratının L-sistein, askorbik asit ve glutamik asit inhibitörleri için  $K_i$  değerleri sırasıyla  $6,66 \times 10^{-3}$ ,  $2,0 \times 10^{-2}$ ;  $4,1 \times 10^{-4}$ ,  $2,1 \times 10^{-2}$ ;  $3,33 \times 10^{-5}$ ,  $2,0 \times 10^{-2}$ , L-sistein ve glutamik asit inhibitörü için  $K_i'$  değerleri sırasıyla  $5,0 \times 10^{-1}$ ,  $5,0 \times 10^{-1}$ ;  $2,0 \times 10^{-3}$ ,  $1,0 \times 10^{-2}$  olarak tespit edilmiştir.

5) Kullanılan inhibitörlerin yüzde inhibisyon verileriyle oluşturulan grafiklerden inhibisyon gücünün ifadesi olan  $I_{50}$  değerleri bulunmuştur. *S. perfoliata* subsp. *athoa* PFO'su için 4-metil katekol substratının glutamik asit, L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $1,36 \times 10^{-2}$  ,  $2,12 \times 10^{-4}$  ,  $5,34 \times 10^{-3}$  katekol substratının glutamik asit, L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $1,25 \times 10^{-2}$  ,  $9,87 \times 10^{-5}$  ,  $1,57 \times 10^{-4}$  ve piragallol substratının glutamik asit, L-sistein ve askorbik asit inhibitörleri için  $I_{50}$  değerleri sırasıyla  $7,43 \times 10^{-3}$  ,  $5,11 \times 10^{-3}$  ,  $3,65 \times 10^{-5}$  olarak belirlenmiştir.

6) Ayrıca *S. perfoliata* subsp. *athoa* bitkisinin total protein içeriği de belirlenmiştir. Bitkiye ait ekstraktta toplam protein içeriği 14,06 mg/100 g olarak hesaplanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Dogan, S. and Salman, Ü. “Partial Characterization of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Polyphenol Oxidase”. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 93-103, (2007).
- [2] Akbulut, N. “Dereotundan (*Anethum graveolens*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Bazı Killerle İmmobilizasyonu ve Seçilmiş Özelliklerinin İncelenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2011).
- [3] Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O. and Alkan, M. “Variations of Peroxidase Activity Among *Salvia* Species”. *Journal of Food Engineering*, 79 (2), 375-382, (2007).
- [4] Margaris, N., Koedam A. and Vokou D. (eds). “*Lamiaceae Sideritis athoa* Papan. & Kokkini”. *Aromatic Plants (World Crops, 7)* 104 (1982).
- [5] Gören, G. “Türkiye’de Yetişen *Sideritis* L. (Lamiaceae) Cinsinin *hesiodia* ve *burgsdorfia* Seksiyonlarının ITS nrDNA ile *trnL-F* ve *ndhF* cpDNA Dizileriyle Moleküler Sistemik Analizi”. Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).
- [6] Öz, S. “Balıkesir Edremit Kazdağ Yöresinde Yetişen *Sideritis* Türlerinde Kromozom Çalışmaları (*S.perfololata* L., *S.athoa* Papakolu & Kokkini, *S.dichotoma* Huter, *S.trojana* Bornm)”. Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (1995).
- [7] Uçar, E. ve Turgut, K. “Bazı Dağ Çayı (*sideritis*) Türlerinin in vitro Çoğaltımı”. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1), 51–57, (2009).
- [8] Çarıkçı, S. “Bazı *Sideritis* (*Sideritis niveotomentosa*, *Sideritis hololeuca*, *Sideritis brevidens*) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”. Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).

- [9] Davis, P.H. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands". *University Press*, Edinburgh, Vol.7, (1982).
- [10] Sarı, A. O. ve Oğuz, B. Bilgiç, A. "Dağ Çayında (*Sideritis perfoliata* L.) Bitki Sıklığının Verim Üzerine Etkisi". *Anadolu, J. of AARI*,15 (1), 27 – 33, (2005).
- [11] Papanikolaou, K. and Kakkini, S. "A Taxonomic Revision of *Sideritis* L. Section *Empedoclea* (Rafin) Bentham (Labiatae) in Greece In: Aromatic Plants, Basic and Applied Aspects, Margaris, N. and Koedam, A. and Vokou, D. (Eds.), Martinus Nijhoff Publ". *The Hague, Boston, London*, 101-127, (1982).
- [12] Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y. and Xu, X. "The Mechanism of Azide Activation of Polyphenol Oxidase II from Tobacco". *Acta Biochimica Polonica*. 49(4), 1029-1035, (2002).
- [13] Dedeoğlu, N. "Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu". Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [14] Lee, M-K. and Park, I. "Inhibition of Potato Polyphenol Oxidase by Maillard reaction product". *Food Chemistry*, 91, 57-61, (2005).
- [15] Dogan, S., Turan, P., Dogan, M. and Alkan, M. "Inhibition of Polyphenol Oxidase by Glutamic Acid". *Process Biochemistry*, (2006).
- [16] Ertürk, H. "*Cynara scolymus* L. Bitkisinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Özelliklerinin Arastırılması". Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).
- [17] Satiawatoharaphang, C., Rymal, K.S. and Dozier, J. "Polyphenol Oxidase System in Red Delicious Apples". *J. Food Sci*, (1976).
- [18] Ragazzi, E. and Veranese, G. "Ricerche Sulle Fenol Oksidasi sul Contenuto in o-difenol Delle Olive". *Ann. Chim*, 57, 1476, (1976).
- [19] Sarkar, J. M., Leonowicz, A. and Bollog. J. M. "Immobilization of Enzymes on Clays and Soils". *Soil Biol. Biochem*, 21 (2), 223-230, (1989).
- [20] Gul'ko, A. Y. and Khaziyev, F. K. "Soil Polyphenol Oxidases; Their Production, Immobilization and Activity". *Eurasian Soil Science*, 25 (4), 101-113, (1993).



- [21] Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A. and Klenitskaya, I. A. "Immobilization of Polyphenol Oxidase by Soil Humus". *Eurasian Science*, 5, 60-65, (1992).
- [22] Demir, D. "Bazı Üre Türevlerinin Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması". Doktora Tezi, *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).
- [23] Mayer, A. M. and HAREL, E. "Polyphenol Oxidases in Plants". *Phytochemistry*, 18 (2), 193-215, (1979).
- [24] Dogan, S., Arslan, O. and Özen, F. "Polyphenol oxidase activity of oregano at different stages". *Food Chemistry*, 91(2), 341-345, (2005).
- [25] Keles, F. "Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerine Araştırmalar I Genel Özellikler". *Doğa D2*, 10(2), 224-234, (1986).
- [26] Lee, C.Y. and Withaker, J.R. "Enzymatic Browning and Its Prevention". *American Chemical Society*, Washington, DC, (1995).
- [27] Voet, D. and Voet, J.G. "Biochemistry" *John Wiley & Sons*, Inc. US, (2003).
- [28] Turan, P. "*Ocimum basilicum* L. Polifenol Oksidazının Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [29] Dinçer, B., Colak, A., Aydın, N., Kadioğlu, A. and Güner, S. "Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., *Rosaceae*". *Food Chemistry*, 77(1), 1-7, (2002).
- [30] Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S. and del Valle, M. "Determination of Phenolic Compounds by a Polyphenol Oxidase Amperometric Biosensor and Artificial Neural Network Analysis". *Biosensors and Bioelectronics*. 20, 1668-1673, (2005).
- [31] Doğan, S., Turan P., Doğan, M. and Alkan, M. "Inhibition of Polyphenol Oxidase by Glutamic Acid". *Process Biochemistry*, (2006).
- [32] Önez, Z. "Üzümünden (*Vitis vinifera* L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, (2006).

- [33] Demir, Ö., Ayaz, F. A., Torun, H., Kolcuoğlu, Y. and Colak, A. "Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening". *Food Chemistry*, 106(1), 291-298, (2008).
- [34] Güngör, K. "Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu". Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, (2008).
- [35] Yabacı, N. "Çay Bitkisi Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2008).
- [36] Ayyıldız, Y. "*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten Elde Edilen Polifenoloksidazın Karakterizasyonu ve Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2008).
- [37] Gökçaya, Ö. "Beyaz Kiraz Meyvesi (Starks Gold) Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu". Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, (2009).
- [38] Taş, C. "Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2009).
- [39] Türkan, F. "Iğdır Elmasından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Van, (2009).
- [40] Keskin, Ş. "*Russula delica* (*Russulaceae*)' dan Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu". Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2009).
- [41] Kuyumcu, İ. "Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Lactarius eucalypti* O.K.Mill&R.N.Hilton'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu". Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2014).

- [42] Dogan, S. and Dogan, M. "Determination of Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*)". *Food Chemistry*, 88, 69-77, (2004).
- [43] Panskul, N., Leelasert, B. and Rakariyatham, N. "Effect of L- Cysteine Potassium Metabisulfite, Ascorbic Acid and Citric Acid on Inhibition of Enzymatic Browning in Longon". *Chiang Mai J. Sci.* 33(1), 137-141, (2006).
- [44] Dogan,S., Dogan M. and Arslan, O. "Characterization of Polyphenol Oxidase from *Thymus* ( *Thymus longicaulis* var. *subisophyllus*)". *Advances in Food Science.* 25(2), 56-64, (2003).
- [45] Doğan, M., Arslan, O. and Doğan, S. "Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Different Aubergine Cultivars". *International Journal of Food Science and Technology.* 37, 415-423, (2002).
- [46] Bradford, M. A. "Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72, 248-254, (1976).
- [47] Cheynier, V., Fulerand, H., Guyot, S., Oszmianski, J. and Moutounet, M. "Reactions of enzymically generated quinones relation to browning in grape musts and wines. (Enzymatic browning and its prevention, Editors; Lee, C. Y. and Whitaker, J. R.)". *ACS*, Washington, DC, (1995).
- [48] Doğan,S. "The determination of protein contents of different *Origanum* types collected from both different growth stages and localities". *Advanced in Food Science*, 25(4), 150-153 (2003).
- [49] Menghini, L., Pintore, G., Tirillini, B. and Leporini, L. "Chemical Composition, Antioxidant Activities and Protective Effects of *Sideritis italica* Extract on C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Oxidative Stress". *European Journal of Medicinal Plants* 4(4): 365-382, (2014).
- [50] Lin, J-Y. and Tang, C-Y. "Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruit and vegetables, as well as their stimulator, effects on mouse splenocyte proliferation". *Food Chemistry*, (2006).
- [51] Segel, I.H. "Enzyme Kinetics". *Willey Classics Library Edition*, Canada, (1993).

- [52] Hukla, S.R., Sharma, U. and Kulkarni, K.S. "Enzymes and Their Use in Textile Processes". *Colourage*, 19-24s, (2000).
- [53] Temiz, F. "Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresindeki Su Ve Toprak Örneklerinden İzole Edilen Selüloz Üreticisi *Bacillus* sp. Suşlarının Farklı Substratlar ve Karbon Kaynakları Kullanılarak Enzim Üretim Yeteneklerinin Araştırılması". Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, (2007).
- [54] Alyward, F. and Haisman, D.R. "Oxidation system in fruits and vegetables their relation to quality of pressured products". *Adv. Food. Res.*,17, 1-76, (1969).
- [55] Onsa, G. H., bin Sari, N., Selamat, J. and Bakar, J. "Latent Polyphenol Oxidases from Sago log (*Metroxylon sagu*): Partial Purification, Activation and Some Properties". *J.Agric. Food Chem.* 48 (10), 5041-5045, (2000).
- [56] Erat, M., Sakıroğlu, H. ve Kuhrevioğlu, I. O. "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Ferula* sp". *Food Chemistry*, 95, 503-508, (2006).
- [57] Mizobutsil, G.P., Finger, F.L., Ribeiro, R.A., Puschmann, R., Neves, L.L.M. and Mota, W.F. "Effect of pH and Temperature on Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities of Litchi Pericarp". *Sci. Agric.* (Piracicaba, Braz.), v.67, n.2, p.213-217, (2010).
- [58] Gomes, M.H., Vieira, T., Fundo, J.F. and Almeida, D.P.F. "Polyphenoloxidase Activity and Browning in Fresh-cut 'Rocha' Pear as Affected by pH, Phenolic Substrates, and Antibrowning Additives". *Postharvest Biology and Technology*, Volume 91, Pages 32-38, (2014).
- [59] Duangmal, K. and Owusu Apenten, R. K. "A Comparative Study of Polyphenoloxidases from Taro (*Colocasia esculenta*) and Potato (*Solanum tuberosum* var. *romano*)". *Food Chemistry*, 64, 351-359, (1999).
- [60] Mdluli, K. M. "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *caffra*)". *Food Chemistry*, 92, 311-323, (2005).
- [61] Park, E.Y. and Luh, B. S. "Polyphenol Oxidase of Kiwi Fruit. *Journal of Food Science*", 50, 678, (1985).

- [62] Elzaawely, A. A., Xuan, T. D. and Tawata, S. “Changes in Essential Oil, Kava Pyrones and Total Phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt.& R. M Sm. leaves exposed to copper sulphate”. *Environmental and Experimental Botany*, (2006).
- [63] Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. “Assessment of Phenolic Content and Free Radical-Scavenging Capacity of Some Thai Indigenous Plants”. *Food Chemistry*, (2006).
- [64] Singleton, V. L. and Rossi, J. A. “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents”. *American Journal of Enology*. 16, 144- 145, (1965).
- [65] Yemenicioğlu, A. ve Cemeroglu, B. “Hale Haven Şeftalilerinde Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Bazı Nitelikleri”. *Tr.J.of Agriculture and Forestry* 22, 261-265, (1998).
- [66] Ziyen, E. ve Pekyardımcı, Ş. “Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*)”. *Turkish Journal of Chemistry*, 27:217-22, (2003).
- [67] Ünal, M.Ü. “Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*)”, *Food Chemistry*, 100: 909-913, (2007).
- [68] Hadler, J., Tamuli, P. and Bhaduri, A.N. “Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf”. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 75, (1998).
- [69] Dogan, S., Turan, Y., Ertürk, H. and Arslan, O. “Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase From Artichoke (*Cynara scolymus* L.)” *J.Agric. Food Chem.* 5, 776-785, (2005).
- [70] Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Arslan, O. and Alkan, M. “Characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase”. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10224-10230, (2005).
- [71] Arslan, O., Temur, A. and Tozlu, Y. “Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot”. *J. Agric. Food Chem*, 46, 1239-1241, (1998).
- [72] Pekyardımcı, Ş. “Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisi Uygulamaları”. *Gıda*, 17, 181-186, (1992).

- [73] Zıyan, E. "Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*pyrus communis*)'ndan İzole Edilmesi, Saflastırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (1998).
- [74] Rapeanu, G., Loey, A. V., Smout, C. ve Hendrickx, M. "Biochemical Characterization and Process Stability of Poliphenoloxidase Extacted from Victoria Grape (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*)". *Food Chemistry*, 94: 253-261, (2006).
- [75] Sakiroglu, H. "Kusburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenoloksidaz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi". Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [76] Arslan, O. and Tozlu, I. "Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from *Anethum graveolens* L. *Italian*". *J. Food Sci.* 9, 249-253, (1997).
- [77] Kaur, C. and Kapoor, H.C. "Anti-Oxidant Activity and Phenolic Content of Some Asian Vegatables". *Int. J. Food Sci. Technol*, 37(2), 153-161, (2002).
- [78] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavsek, J. and Tumer, N. "Control of Enzymmatic Browning in Potato (*Solanum tuberasum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenol Oxidase". *J. Agric. Food Chem.* 49, 652-657, (2001).
- [79] Lee, C. Y., Smith, N. L., and Pennesi, A. P. "Polypenoloxidase from DeChanunac Grapes". *J. Sci. Food Agric.* 34, 987-991, (1983).
- [80] Dicko, M. H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Traore, A. S., Laane, C., van Berkel, W. J. H. and Voragen, A. G. J. "Comparison of Content in Phenolic Compounds, Polyphenol Oxidase, and Peroxidase in Grains of Fifty *Sorghum* Varieties from Burkina Faso". *J. Agric. Food Chem.* 50(13), 3780-3788, (2002).
- [81] Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. "Strawberry Polyphenoloxidase Extraction and Partial Characterization". *Journal of Food Science.* 55 , 1320, (1990).

- [82] Billaud, C., Lecornu, D. and Nicolas, J. "Substrates and Carboxylic Acid Inhibitors of Partially Purified Polyphenol Oxidase from Gum Arabic". *J. Agric. Food Chem.* 44, 1668-1675, (1996).
- [83] Javovitz-Klapp, A., Richard, F. and Nicolas, J. "Polyphenoloxidase from Apple, Partial Purification and Some Properties". *Phytochemistry*. 28, 2903-2907, (1989).
- [84] Nelson, N.L. and Cox, M.M. /Çeviri Editörü: Prof Dr. Kılıç, N. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık ,Ankara, (2005).
- [85] Augustin, M. A., Ghazali, H. M. and Hashim, H. "Polyphenoloxidase from Guava (*Psidium guajava* L.)". *J. Sci. Food. Agric.* 36, 159-1265, (1985).
- [86] Roudsari, M. H., Signoset, A. and Crovzet, J. "Eggplant Polyphenol Oxidase: Purification, Characterization and Properties". *Food Chemistry*. 7, 227- 235, (1981).
- [87] Kermasha, S., Goetghebeur, M. and Monfette, A. "Studies on Inhibition of Mushroom Polyphenol Oxidase Using Chlorogenic Acid as Substrate". *J. Agric. Food Chem.*41, 526-531, (1993).
- [88] Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C. and Nicolas, J. J. "Polyphenol Oxidase from Apple, Partial Purification and Some Properties". *Phytochemistry*. 28(11), 2903-2907, (1989).
- [89] Poul, B. and Gowda, L. R. "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dalichos lablab*)". *J. Agric. Food Chem.* 48, 3839-3846, (2000).
- [90] Robert, C., Rouch, C. and Cadet, F. "Inhibition of Palmito (*Acanthoenix rubra*) Polyphenol Oxidase by Carboxylic Acids". *Food Chemistry*, 59(3), 355-360, (1997).
- [91] Arslan, O. and Dogan S. "Inhibition of Polyphenol Oxidase Obtained from Various Sources by 2,3-diaminopropionic Acid". *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 85,1499-1504, (2005).
- [92] Macrae, A. R. and Duggleby, R. G. "Substrates and Inhibitors of Potato Tuber Phenolase". *Phytochemistry*. 7, 855-861, (1968).
- [93] Kahn, V. and Andrawis, A. "Inhibition of Mushroom Tyrosinase by Tropolone". *Phytochemistry*. 24, 905-908, (1985).