

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

OCIMUM BASILICUM L.'DEN ELDE EDİLEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI,
KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

169050

Pınar TURAN

Balıkesir, Ağustos 2005

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

OCIMUM BASILICUM L.'DEN ELDE EDİLEN
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI,
KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar TURAN

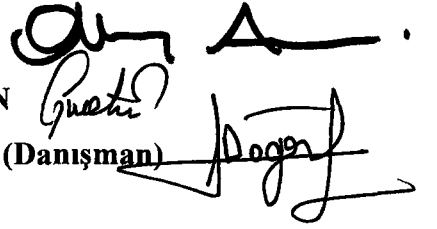
Tez Danışmanları : Doç.Dr. Mehmet DOĞAN (1.Danışman)
: Yrd.Dç.Dr. Serap DOĞAN (2. Danışman)

Sınav Tarihi : 02.09.2005

Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Oktay ARSLAN

Doç.Dr. Cengiz ÖZMETİN

Doç.Dr. Mehmet DOĞAN (Danışman)



Balıkesir, Ağustos 2005

ÖZ

***OCIMUM BASILICUM* L.'DEN ELDE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Pınar TURAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/ Tez Danışmanları: Doç.Dr. Mehmet DOĞAN-

Yrd.Doç.Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir, 2005

Bu çalışmada *Ocimum basilicum* L.'den ekstrakte edilen polifenol oksidazın (PFO) kısmi karakterizasyonu tanımlanmaktadır. Polifenol oksidaz, *Ocimum basilicum* L.'den ekstrakte edilerek amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonuyla saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen örnekler polifenol oksidazın karakterizasyonu için kullanılmıştır. Afinite kromatografisi ile 11,5 katlık saflaştırılma sağlanmıştır. Elde edilen saf enzim, sodyumdodesilsülfat-poliakrilamidjel (SDS-PAGE) elektroforezinde tek bir bant olarak gözlenmiştir. Polifenol oksidazın molekül ağırlığı yaklaşık 54 kDa olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Ocimum basilicum* L.'nin protein içeriği ve toplam fenolik madde içeriği tayin edilmiştir. *Ocimum basilicum* L.'nin toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak belirlenmiş ve 100 g taze bitki için 280 mg fenolik madde içeriği bulunmuştur. Protein içeriği Bradford metoduna göre tayin edilmiştir. Polifenol oksidaz 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlarına karşı aktivite gösterirken, tirozin substratına karşı aktivite göstermemiştir. Enzimin katalizleme gücünü gösteren V_{max}/K_m değerlerine göre en iyi substratın 4-metilkatekol olduğu ve bunu sırasıyla pirogallol ve katekolün izlediği bulunmuştur. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için sırasıyla optimum pH değerleri 6,0; 8,0 ve 9,0 olarak

bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerleri 4-metilkatekol için 20, katekol için 40 ve pirogallol substratı için ise 50 °C olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin çalışılan substratlara bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için enzim aktivitesinin, artan sıcaklık ve inaktivasyon süresi ile , ısı denaturasyonundan dolayı azaldığı bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: *Ocimum basilicum* L.; polifenol oksidaz; saflaştırma; substrat spesifikliği; pH; sıcaklık; ısı inaktivasyonu; inhibisyon.

ABSTRACT

PURIFICATION AND INVESTIGATION OF KINETIC AND ELECTROPHORETIC PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME OBTAINED FROM *OCIMUM BASILICUM* L.

Pınar TURAN

Balıkesir Üniuersity, Institute of Science, Department of Chemistry

(MSc Thesis / Supervisors: Associate Prof.Dr. Mehmet DOĞAN-

Assistant Prof.Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir, 2005

In this study, a partial characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from *Ocimum basilicum* L. has been described. Polyphenol oxidase from *Ocimum basilicum* L. was extracted and then purified through $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, dialysis and a Sepharose 4B-L-tyrosine- p-aminobenzoic acid affinity column. The samples obtained from $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialyses were used for the characterization of PPO. At the end of purification by affinity chromatography, 11.5-fold purification was achieved. The purified enzyme exhibited a clear single band on sodiumdodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular mass of the enzyme was estimated to be about 54 kDa. The contents of total phenolic and protein of *Ocimum basilicum* L. extracts were determined. The total phenolic content of *Ocimum basilicum* L. was determined spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure and was found to be 280 mg/100 g on a fresh weight basis. Protein content was determined according to Bradford method. The enzyme showed activity to 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates, but not to tyrosine. 4-methylcatecol was the best substrate due to the highest V_{max}/K_m value, followed by pyrogallol and catechol. The optimum pH was at 6.0; 8.0 and 9.0 for 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates, respectively. The enzyme had an optimum temperature of 20, 40 and 50 °C for 4-

methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates, respectively. It was found that optimum temperature and pH were dependent on the substrates studied. The enzyme activity decreased due to heat denaturation of the enzyme with increasing temperature and inactivation time for 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol substrates.

Key Words: Polyphenol oxidase; *Ocimum basilicum* L.; purification; substrate specificity; pH; temperature; heat inactivation; inhibition.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖNSÖZ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.2 <i>Ocimum basilicum</i> L.	1
1.3 Polifenol Oksidaz	2
1.3.1 Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı	3
1.3.2 Bitkilerde Polifenol Oksidazın Biyolojik Önemi	4
1.3.3 Polifenol Oksidazın Substratları	4
1.3.3.1 Katekinler	5
1.3.3.2 Lökoantosiyandinler	5
1.3.3.3 Antosiyantinler	6
1.3.3.4 Flavonoller	6
1.3.3.5 Sinamik Asit Türevleri	7
1.3.3.6 Basit Fenoller	7
1.4 Enzimatik Kararma	8
1.5 Enzim Kinetiği	10
1.6 İnhibisyon	12
1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon	13
1.6.2 Yarı-Yarışmalı İnhibisyon	13
1.6.3 Karışık-Tür İnhibisyon	15
1.7 Polifenol Oksidaz İle İlgili Yapılan Çalışmalar	16

1.8 Çalışmanın Amacı	17
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1 Materyal	18
2.2 Ham Ekstraktların Hazırlanması	18
2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması	18
2.4 Afinite Kromatografisi	19
2.5 Elektroforez	19
2.6 Spektrofotometrik Ölçümler	19
2.7 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi	20
2.8 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	20
2.9 Isı İnaktivasyonu	21
2.10 İnhibisyon	21
2.11 <i>Ocimum basilicum</i> L. Ekstraktının Protein İçeriği	21
2.12 <i>Ocimum basilicum</i> L. Ekstraktının Toplam Fenolik Madde İçeriği	23
3. BULGULAR	24
3.1 <i>Ocimum basilicum</i> L. Ekstraktlarının Toplam Protein ve Fenolik Madde İçerikleri	24
3.2 Substrat Spesifikliği	24
3.3 Optimum pH	26
3.4 Optimum Sıcaklık	28
3.5 Termal İnaktivasyon	29
3.6 Polifenol Oksidazın İnhibisyonu	32
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	76
4.1 Toplam Fenolik Madde İçeriği	76
4.2 Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	77
4.3 Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliği	78
4.4 Optimum pH	81
4.5 Optimum Sıcaklık	81
4.6 Termal İnaktivasyon	82
4.7 Enzim İnhibisyonu	83

4.7.1 Yarışmalı İnhibisyon	84
4.7.2 Yarı-Yarışmalı İnhibisyon	87
4.7.3 Karışık-Tür İnhibisyon	91
4.8 Sonuçlar	92
KAYNAKLAR	94



SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı	Birimi
PFO	: Polifenol oksidaz enzimi	-
E.C	: Enzim kod numarası	-
EÜ	: Enzim ünitesi	EÜ
v_0	: Başlangıç hızı	EÜ/dak mL
V_{max}	: Enzimin substrata doydugu andaki hız	EÜ/dak mL
K_m	: Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu	mol/L
[S]	: Substrat konsantrasyonu	mol/L
[I]	: İnhibitör konsantrasyonu	mol/L
V	: Süpernatantın hacmi	mL
S_1	: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu	
S_2	: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu	
K_i	: EI kompleksinin ayrışma denge sabiti	M

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	<i>Ocimum basilicum</i> L.'nin fotoğrafı	2
Şekil 1.2	Enzimatik kararmada polifenol oksidazın rolü	9
Şekil 1.3	Enzimatik kararmanın önlenmesinde indirgeyici reaktiflerin rolü	10
Şekil 1.4	Michealis-Menten eğrisi	11
Şekil 1.5	Lineweaver-Burk grafiği	12
Şekil 1.6	Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	14
Şekil 1.7	Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	14
Şekil 1.8	Karışık-tür inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	15
Şekil 2.1	Çalışmada kullanılan substratların açık yapıları	20
Şekil 2.2	Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları	22
Şekil 3.1	4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları ile <i>Ocimum basilicum</i> L. polifenol oksidazı için çizilmiş	26

1/[S]-1/v₀ eğrileri

Şekil 3.2	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimi	27
Şekil 3.3	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	29
Şekil 3.4	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin termal denatürasyonuna ait eğriler	31
Şekil 3.5	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonu için 1/v ₀ -1/[S] eğrileri	33
Şekil 3.6	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için 1/v ₀ -1/[S] eğrileri	35
Şekil 3.7	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için 1/v ₀ -1/[S] eğrileri	37
Şekil 3.8	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonu için 1/v ₀ -1/[S] eğrileri	39
Şekil 3.9	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için 1/v ₀ -1/[S] eğrileri	41

Şekil 3.10	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	43
Şekil 3.11	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	45
Şekil 3.12	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	47
Şekil 3.13	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	49
Şekil 3.14	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	51
Şekil 3.15	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	53
Şekil 3.16	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	55
Şekil 3.17	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	57
Şekil 3.18	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i>	59

	L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	
Şekil 3.19	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	61
Şekil 3.20	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	63
Şekil 3.21	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	65
Şekil 3.22	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	67
Şekil 3.23	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	69
Şekil 3.24	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	71
Şekil 3.25	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri	73
Şekil 3.26	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon	75

inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Şekil 4.1

Ocimum basilicum L. polifenol oksidazı için SDS-PAGE

78



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 3.1	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler	25
Çizelge 3.2	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait deneysel veriler	27
Çizelge 3.3	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait deneysel veriler	28
Çizelge 3.4	<i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz enziminin termal denatürasyonu için elde edilmiş deneysel veriler	30
Çizelge 3.5	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	32
Çizelge 3.6	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	34

Çizelge 3.7	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	36
Çizelge 3.8	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	38
Çizelge 3.9	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	40
Çizelge 3.10	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	42
Çizelge 3.11	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	44
Çizelge 3.12	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	46
Çizelge 3.13	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-	48

	aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	
Çizelge 3.14	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	50
Çizelge 3.15	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	52
Çizelge 3.16	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	54
Çizelge 3.17	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	56
Çizelge 3.18	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	58
Çizelge 3.19	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	60
Çizelge 3.20	Katekol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	62
Çizelge 3.21	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i>	64

	L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	
Çizelge 3.22	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	66
Çizelge 3.23	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	68
Çizelge 3.24	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	70
Çizelge 3.25	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	72
Çizelge 3.26	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Ocimum basilicum</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler	74
Çizelge 4.1	<i>Ocimum basilicum</i> L. polifenol oksidazının saflaştırılması	77
Çizelge 4.2	<i>Ocimum basilicum</i> L. polifenol oksidazının substrat spesifikliğı	80
Çizelge 4.3	4-metilkatekol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşiti	88

Çizelge 4.4	Katekol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşiti	89
Çizelge 4.5	Pirogallol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşiti	90



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan danışmanlarım Doç.Dr. Mehmet DOĞAN ve Yrd.Doç.Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkürler.

Çalışmalarım süresince bilgileriyle bana yardımcı olan hocalarım sayın Prof.Dr. Mahir ALKAN ve sayın Prof.Dr. Oktay ARSLAN' a; ayrıca deneysel aşamalarda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Arş.Grv. Özen ÖZENSOY ve Arş.Grv. Özkan DEMİRBAŞ'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezimin deneysel aşamalarını gerçekleştirmiş olduğum Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (BÜTAM) ve Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm'üne teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda yanımda olan ailem, babam Ahmet Rıdvan TURAN ve bütün sevdiğlerime minnettarım. Bu tezin gerçek sahibi onlardır.

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler, bitkisel ve hayvansal dokuların bileşiminde yer alan, iz miktarda bulunan, fakat çok önemli görevleri olan organik katalizörlerdirler[1]. Enzimler katalizledikleri reaksiyon açısından spesifiktirler. Enzimleri diğer katalizörlerden daha önemli kılan özellikleri şunlardır[2]:

- Enzim katalizli reaksiyonların hızları çok yüksektir,
- % 100 verimle çalışırlar,
- Reaksiyon sonucu yan ürün oluşmaz,
- Spesifiktirler yani bir enzim sadece bir reaksiyonu katalizler.

Enzimler gıda endüstrisinde büyük öneme sahiptir. Bazı durumlarda enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar gıda endüstrisi açısından olumlu sonuçlar verirken, bazı durumlarda istenmeyen durumlarla karşılaşmaktadır. Bunun en ilginç örneği fenoloksidaz enzimlerince katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Siyah çay üretiminde, fenoloksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonla çayın başlıca karakterini veren siyah renk oluşur ve bu istenen bir durum olduğu halde meyvelerde aynı olay, rengin bozulmasına neden olduğundan hiçbir şekilde istenmez ve olayın önlenmesi istenir[1,3].

1.2 *Ocimum basilicum* L.

Ocimum basilicum L., Türkiye’de “Fesleğen yada Reyhan” olarak bilinen önemli bir tıbbi ve baharat bitkisidir. Fesleğen, birçok aromatik bitkinin yer aldığı Lamiaceae familyasının *Ocimum* genusuna ait bir yıllık ve otsu bitkidir. Bu tür, 10-40 cm yükseklikte, beyaz veya pembe çiçeklidir. Vatanı Hindistan olmakla beraber, bugün bütün Akdeniz bölgesi ülkelerinde ve Türkiye’de (Güney Anadolu) geniş bir

şekilde yetiştirilmektedir[4]. Fesleğenin içerdığı yüksek orandaki esansiyal yağlarından dolayı yaygın bir şekilde kültürü yapılmaktadır. *Ocimum basilicum* L. taze, kurutulmuş ve dondurulmuş olarak tüketilmektedir. Oldukça yüksek oranda içermiş olduğu esansiyal yağlarından dolayı antifungal, böcek önleyici ve toksik aktivite göstermektedir[5]. Amerika'da, Akdeniz Ülkeleri'nde ve Dünya'nın birçok bölgesinde ticari olarak geniş bir biçimde yetiştirilmektedir. Fenolik maddece zengin olan bu bitkilerin ekstraktları, lipidlerin oksidatif degradasyonunu önledikleri için ve bunun sonucunda besinsel değerini ve kalitesini iyileştirdikleri için gıda endüstrisinde artan bir öneme sahiptirler. *Ocimum basilicum* L. ekstraktlarının fenolik madde içeriklerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu da belirtilmektedir[6]. Şekil 1.1, *Ocimum basilicum* L.'nin fotoğrafını göstermektedir.

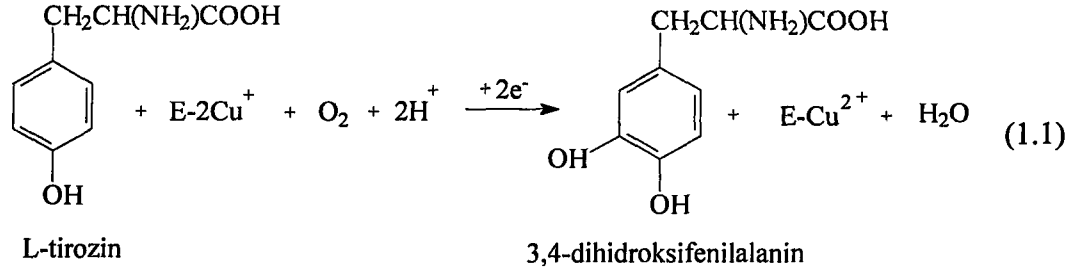


Şekil 1.1 *Ocimum basilicum* L.'nin fotoğrafı

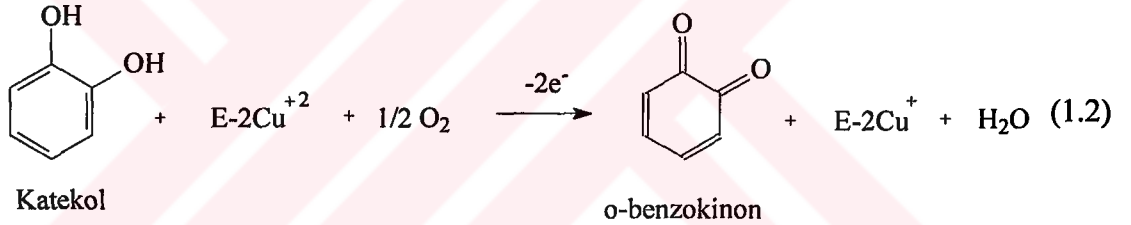
1.3 Polifenol Oksidaz

Polifenol oksidaz, (monofenol, dihidroksifenilalanin: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.14.18.1), monofenollerin hidroksilasyonu ve/veya polifenollerin oksidasyonunu katalizleyen Cu^{+2} içeren bir metalo enzimdir[7,8]. Polifenol oksidaz, hem prostetik grup olarak bakıra hem de oksijenin varlığına ihtiyaç duymaktadır. Polifenol oksidaz, oksijen vasıtasıyla hidrojen yakalayıcısı olduğu için oksidoredüktaz olarak da sınıflandırılmaktadır. Bu enzim yüksek bitkilerde, mantarlarda ve hayvansal dokularda oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır[9]. Polifenol oksidaz, bitki ve mantarlardaki geniş substrat spesifikliğine bağlı olarak tirozinaz, fenolaz, katekol oksidaz, katekolaz, monofenol oksidaz, o-difenol oksidaz ve ortofenolaz gibi isimlerle de bilinmektedir[7,10]. Polifenol oksidaz, iki tip reaksiyonu

katalizlemektedir. Polifenol oksidaz moleküler oksijen varlığında monofenollerin o-dihidroksi fenollere hidroksilasyonunu (kresolaz aktivitesi) (eşitlik 1.1) ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (eşitlik 1.2) katalizler (katekolaz aktivitesi)[4]. Kresolaz yada monofenolaz aktivitesi patatesten, L-tirozinin 3,4-dihidroksifenilalanine oksidasyonu şeklinde gerçekleşmektedir[9].



Katekolaz yada difenolaz tipi reaksiyon ise en iyi şekilde laboratuvarında sıkça substrat olarak kullanılan katekolün oksidasyon reaksiyonudur.



Kinon formasyonu hem enzime hem de oksijene bağlıdır. Kinon oluşuktan sonra diğer reaksiyonlar kendiliğinden meydana gelir ve artık reaksiyon polifenol oksidazın yada oksijenin varlığına bağımlı değildir. Bu reaksiyonlar kahverengi renkli pigmentlerin oluşumunu açıklamaktadırlar[9].

1.3.1 Polifenoloksidazın Tabiattaki Dağılımı

Polifenoloksidaz ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur. Polifenol oksidaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalarda, özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunur[12]. Bazı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karides, küçük karides) bu enzimin varlığına rastlanmıştır[13,1]. Polifenoloksidaz bitkisel gıdalarda enzimatik kararmaya neden olurken, hayvansal gıdalarda enzimatik kararma söz konusu değildir[14].

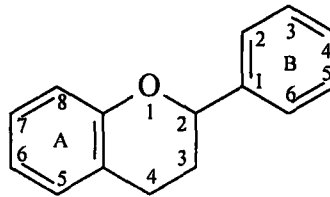
1.3.2 Bitkilerde Polifenol Oksidazın Biyolojik Önemi

Canlı, sağlam hücrelerde polifenol oksidazın rolü tam olarak bilinmemektedir. İlk çalışmalar solunum yada lignin biyosentezinde görev aldığını belirtmektedir. Polifenol oksidaz virüsler, bakteriler ve mantarlar tarafından meydana getirilen enfeksiyonlara yada mekanik zararlara karşı bitkilerin direnç göstermesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Bu şartlar altında bitkide enfeksiyonun yayılmasına bariyer oluşturarak çözünmez polimerlerin üretimiyle enzim aktivitesini artırır[15].

1.3.3 Polifenol Oksidazın Substratları

Meyve ve sebzeler oldukça fazla türde fenolik bileşik ihtiva ederler. Bununla birlikte bunların sadece bir kısmı PFO'nun substratlarıdır. PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en yaygın doğal substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Flavonoidler, bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunurlar. Genelde flavonoidler bitkilerin belirli bölgelerinde konsantre bir şekilde bulunmazlar. Bitkilerin çeşitli bölümlerinde hemen hemen homojen bir şekilde dağılmışlardır. Değişik konsantrasyonlardaki polifenoller yenilebilir ürünlerin çoğunda, kararma reaksiyonlarının meydana gelmesi için yeterli sebeptir.

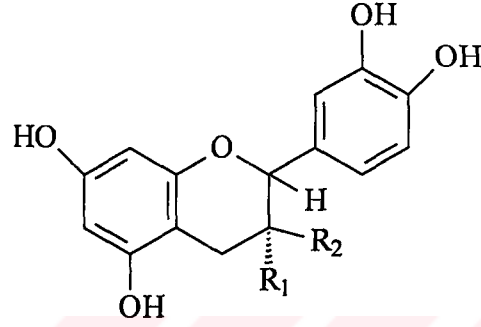
Bitkilerde doğal olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, lökoantosiyandinler, antosiyaninler, flavonoller ve sinamik asit türevleri besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler. Flavonoidlerin kimyasal yapısının



şeklinde olduğu belirtilmektedir[14].

1.3.3.1 Katekinler

Flavonoidlerin çoğunun hidroksilli türevleri, resorsinol ve bir katekol birimi ihtiva eder. Katekinler, (+) katekin ve onun stereoizomeri olan (-) epikatekin doğal olarak bulunmuştur. Diğer doğal olarak bulunan formları ise katekinlerin sıcak sodyum karbonatla muamelesiyle elde edilir[14].

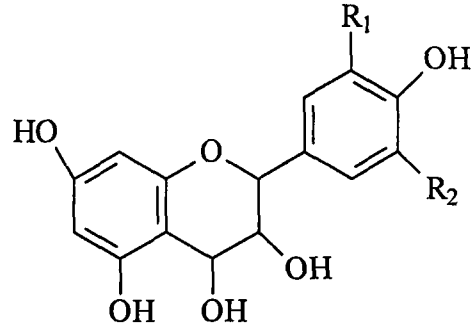


(+)-Katekin ($R_1=H$, $R_2=OH$)

(-)-Epikatekin ($R_1=OH$, $R_2=H$)

1.3.3.2 Lökoantosiyandinler

Lökoantosiyandinlerin ilk göze çarpan özelliği asidik ortamda ısıtılmasıyla antosiyandinlere dönüşebilen bileşikler sınıfına dahil olmasıdır. Lökoantosiyandinlerin stereokimyası, katekinlerin stereokimyası kadar araştırılmamıştır[14].



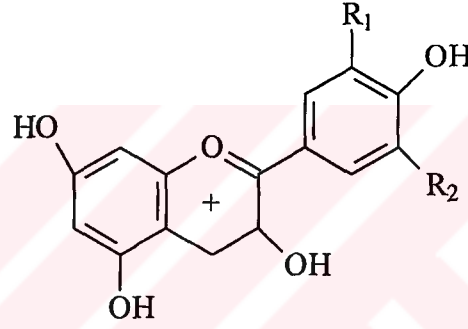
Lökosiyandin ($R_1=H$, $R_2=H$)

Lökodelfinidin ($R_1=R_2=OH$)

Lökopelargonidin ($R_1=R_2=H$)

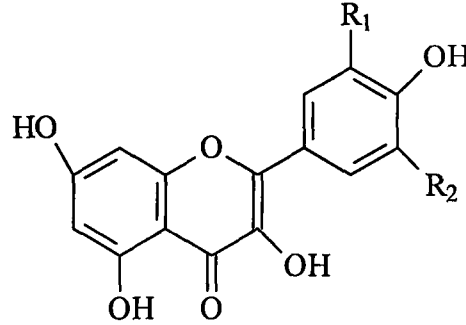
1.3.3.3 Antosiyaninler

Antosiyaninler renklidirler, fakat bu durum kararmış reaksiyonlar için o kadar önemli değildir. Birkaç değişik durumda sekonder reaksiyonlar için vazgeçilmez bir bileşen oldukları gösterilmiştir. Çiçek, meyve ve bitkilerin diğer kısımlarında, çözülmüş halde hücre özsuyunda mevcuttur ve genellikle glikozidler halinde bulunurlar. Hidroksilasyonun temelini teşkil eden antosiyanidinler, üç ana sınıfta sınıflandırılmıştır. Pelargonidin, siyanidin ve delphinidin buna ilaveten metillenmiş türevler tabii olarak da bulunabilirler. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin % 20'lik HCl ile 3 dakika civarında kaynatılarak hidroliz edilmesinden bir veya birçok şeker molekülleriyle beraber elde edilirler[14].



1.3.3.4 Flavonoller

Flavonoller antoksanin pigmentleri olarak adlandırılırlar. Genelde bunların renkleri açık yeşildir. Flavonoller bazı durumlarda kararma reaksiyonlarına bizzat iştirak ederler. Bunlar genellikle glikozidler halinde mevcuttur[14].



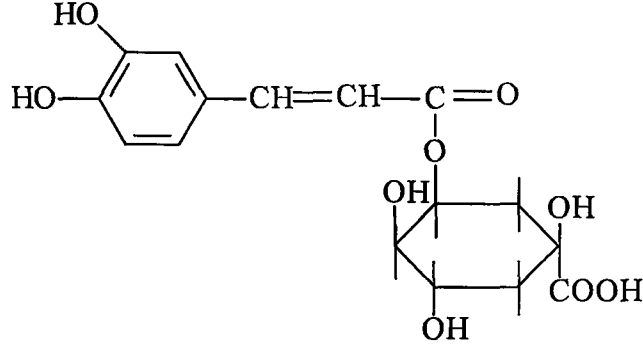
Quercetin ($R_1=OH, R_2=H$)

Myricetin ($R_1=R_2=OH$)

Kaempferol ($R_1=R_2=H$)

1.3.3.5 Sinamik Asit Türevleri

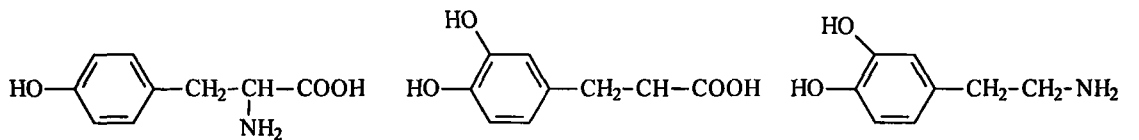
Sinamik asit bir flavonoid değildir. Fakat flavonoid bileşiklerinin C₆-C₃ fenil propan biriminin oluşmasında önce B halkasının sentezlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir[14].



Klorogenik asit

1.3.3.6 Basit Fenoller

Doğal olarak oluşan flavonoidlerin bir çoğu, katekol gibi hidroksilli B halkasına sahiptir. Katekol bu yüzden en basit *o*-dihidroksi fenol olarak düşünülebilir. Gallik asit, hidroliz olabilen taninlerin esas birimini oluşturur. Hidroliz olabilen tanninler gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmazlar. Bununla birlikte gallik asit serbest olarak, az miktarlarda birkaç meyvede ve diğer gıdalarda bulunur. Tirozin çoğu gıdada bulunan önemli bir amino asittir ve melanin oluşumunda enzimatik oksidasyon için klasik monohidroksifenolik bir substrattır. Tirozinin hidroksilasyon ürünü olan dihidroksifenilalanin (Dopa) ve dihidroksifenil-etilamin (dopamin) bitki dokularında bulunur[14]. Aşağıda tirozin, dopa ve dopaminin yapıları verilmektedir.



Tirozin

3,4-dihidroksifenilalanin
(dopa)

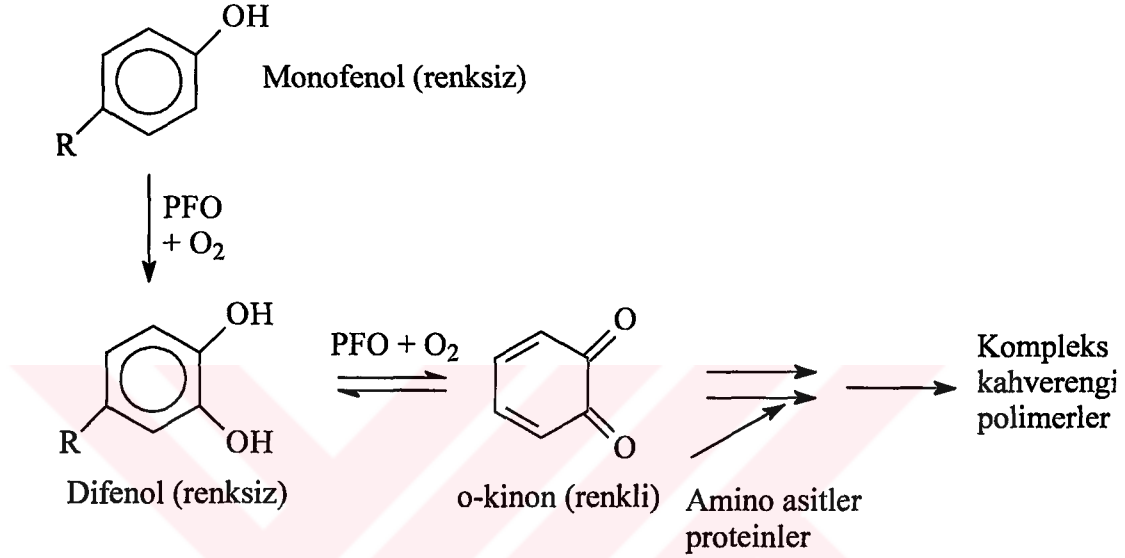
3,4-dihidroksifeniletilamin
(dopamin)

1.4 Enzimatik Kararma

Birçok bitkide ve meyvede enzimatik kararma genel adıyla bilinen renk değişimleri meydana gelmektedir. Renk bozunmaları enzimatik ve/veya enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzimatik kararma yada fenolik kararma gıda endüstrisinde oldukça önemli bir problemdir. Genellikle bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında bitki dokularının mekanik bir etkiyle zarar görmesi sonucu ortaya çıkan enzimatik kararma, bazı ürünlerde istenmeyen renk, koku ve tad oluşumuna neden olmakta ve sonuçta ürünlerin gıda değerinde önemli derecede kayıplar oluşturmaktadır. Diğer taraftan enzimatik olmayan kararma diye bilinen bir grup renk değişimleri de vardır. Bunlar, kısaca aminoasitlerle indirgen şekerler arasında meydana gelen ve Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi kimyasal sürecin sonucudur. Bu reaksiyonlar oksijensiz şartlarda da cereyan ederler ancak oksijen bu reaksiyonlar için katalizördür. Enzimsiz renk bozunmaları, ürünün işlenmeye başlamasından tüketimine kadar sürebilir, özellikle uygun olmayan şartlar altında uzun süre depolamada bu tür renk değişimleri daha büyük boyutlar kazanır.

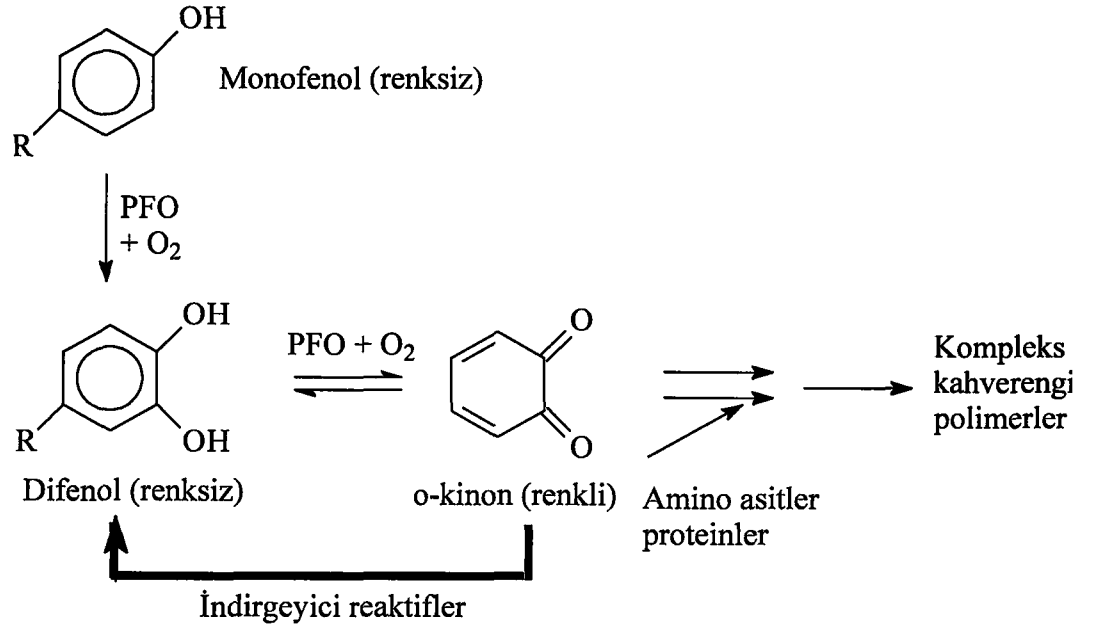
Enzimatik kararmanın başlıca sorumlusu polifenol oksidaz (PFO) adı verilen bir enzimdir. Polifenol oksidazlar bitkilerin bünyesindeki renksiz monofenollerin renksiz difenollere hidrosilasyon reaksiyonlarını katalizler yani kresolaz aktivitesi gösterirler. Ayrıca kresolaz aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin *o*-kinonlara yükseltgenme reaksiyonlarını da kataliz ederler. Bu reaksiyonlar da katekolaz aktivitesi olarak bilinmektedir. Oluşan *o*-kinonlar polimerize olurlar ve/veya ortamdaki amino asitler ve proteinlerle kompleks kahverengi renkli pigmentlere dönüşürler (Şekil 1.2)[11]. Buna göre enzimatik kararmanın ilk aşaması *o*-kinonların oluşmasıdır. *O*-kinonlar ise, *o*-dihidroksi ünitesi içeren her çeşit fenolik maddelerden oluşmaktadır. Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan doğal flavonoid maddelerden, katekinler, proantosiyanidinler (lökoantosiyanidinler), antosiyanidinler, flavonoller ile ayrıca hidroksi benzoik, hidroksi sinamik ve bunların türevleri olan çeşitli bileşiklerin, kafeik, ferulik, p-kumarik, kuinik, gallik, sinamik ve klorogenik asitler gibi çok çeşitli basit fenolik maddelerin ve polifenollerin

enzimatik kararma reaksiyonlarında rol oynamakta olduğu görülmektedir. Birçok meyve ve sebze de çok az bulunmasına karşın, onların enzimatik yolla kararmalarında önemli rol oynayan maddelerden birisi de gerçekte bir basit fenolik madde olan ve aminoasitler arasında yer alan tirozindir. Örneğin patateslerin kararmalarında kafeik asit ve klorojenik asit yanında tirozin de önemli rol oynamaktadır[16].



Şekil 1.2 Enzimatik kararmada polifenol oksidazın rolü

Enzimatik kararma reaksiyonlarında bir çok polifenolik maddelerin substrat olarak rol oynamalarına karşın, bazı fenolik maddeler tam aksine, inhibitör rolü oynamaktadır. Enzimatik kararma reaksiyonlarının oluştuğu ortamda bulunan bazı maddeler, renk değişimlerinin kilit maddesi olan *o*-kinonları geriye, yani *o*-fenolik formlara indirgeme niteliğine sahiptirler (Şekil 1.3). Böylece enzimatik kararma 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 kararma reaksiyonlarını ikinci bir yolla inhibe etme özelliğine sahiptir. İşte meyve ve sebzelerin işlenmesinde, işlenmekte olan ürünün rengini korumak amacı ile askorbik asidin yaygın kullanılma nedeni budur[16].



Şekil 1.3 Enzimatik kararmanın önlenmesinde indirgeyici reaktiflerin rolü

1.5 Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon hızlarının incelendiği bir konudur. Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Enzimler substratları ile ve bazen de koenzimleri ile kompleksler oluşturular. Doygunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES kompleksi halindedir. Enzim ve substrat arasındaki bir reaksiyon için aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

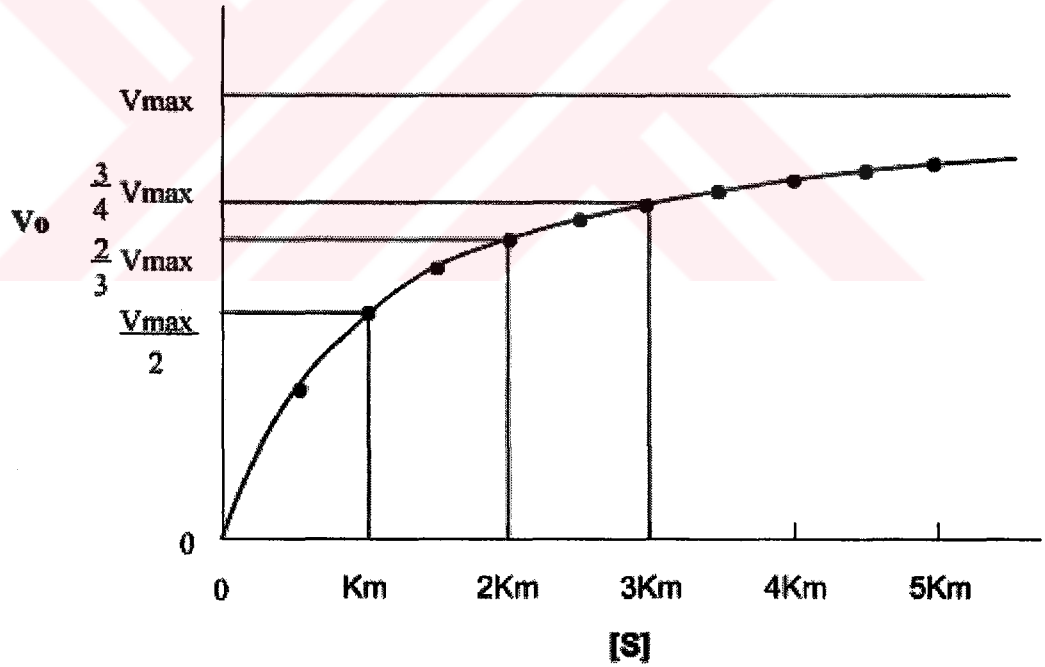


Bu kimyasal reaksiyon için Michaelis-Menten denklemi aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad (1.4)$$

Burada V_{max} , enzimin substrata doydugu andaki hız (EÜ dak⁻¹); K_m , maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substratın konsantrasyonu (M); $[S]$, substrat konsantrasyonu (M); ve v_0 , başlangıç hızı (EÜ dak⁻¹)'dır.

Şekil 1.4 enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı 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.



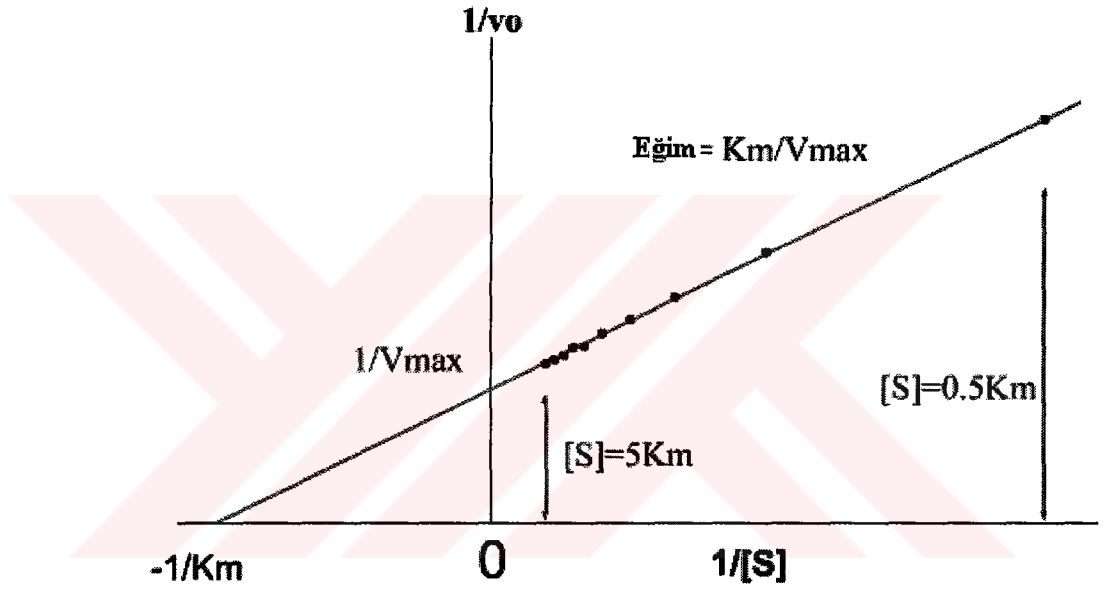
Şekil 1.4 Michealis-Menten eğrisi

Michaelis-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 1.4'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:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.5)$$

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 1.5)[17].



Şekil 1.5 Lineweaver-Burk grafiği

1.6 İnhibisyon

Enzimlerin hücre içi (*in vivo*) ve hücre dışı (*in vitro*) aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de “inhibitör” denilmektedir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ve iyonlardır. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç çeşittir[17].

1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif merkezine bağlanmak için enzimin substratı ile yarışır. Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.6)$$

Burada,

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (1.7)$$

Bu denkleme göre $1/v_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı eğrisi eğimi $\alpha K_M / V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{\max}$ olan düz bir doğru verecektir. Bu durum Şekil 1.6'da 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.

1.6.2 Yarı-Yarışmalı İnhibisyon

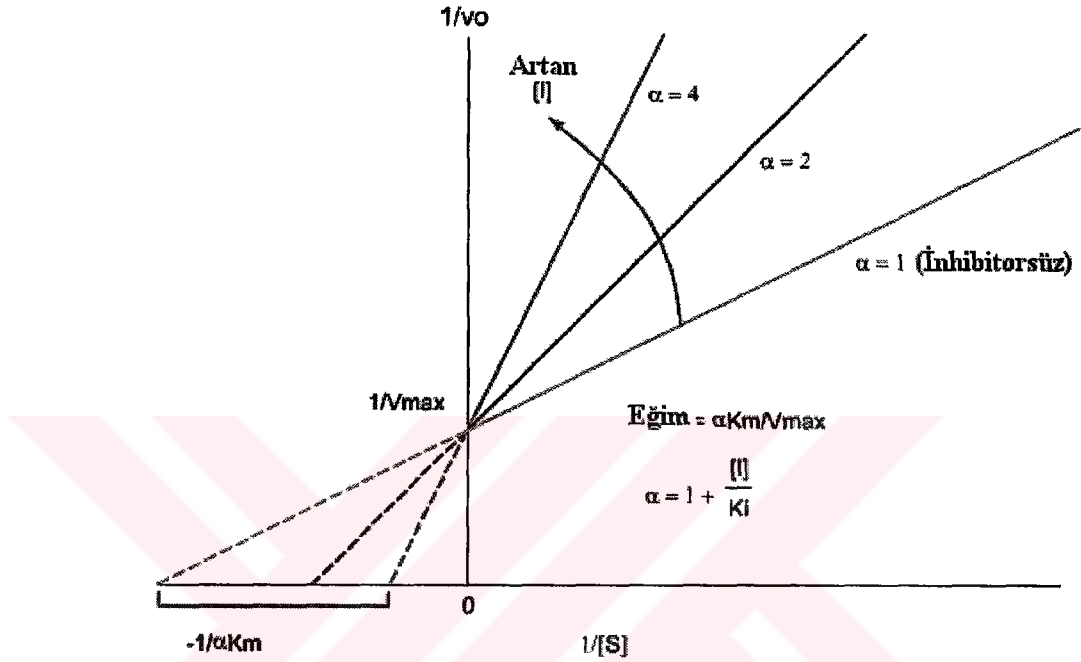
Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanır. Bu tür inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (1.8)$$

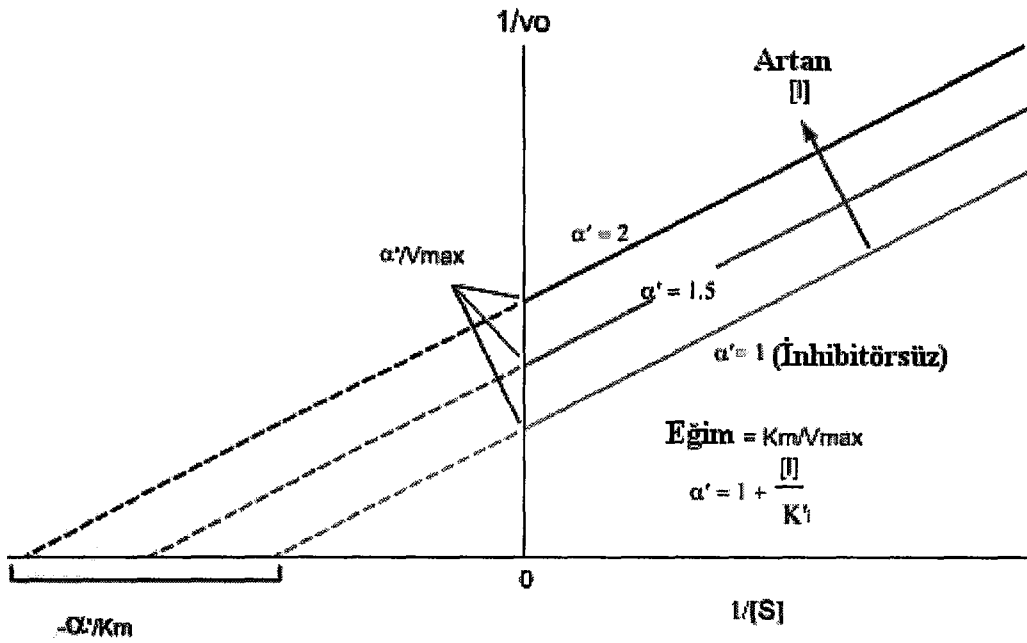
Burada,

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'} \quad (1.9)$$

Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi (K_M/V_{max}) ve ekstrapolasyonu (α/V_{max}) olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.7). Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur.



Şekil 1.6 Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri



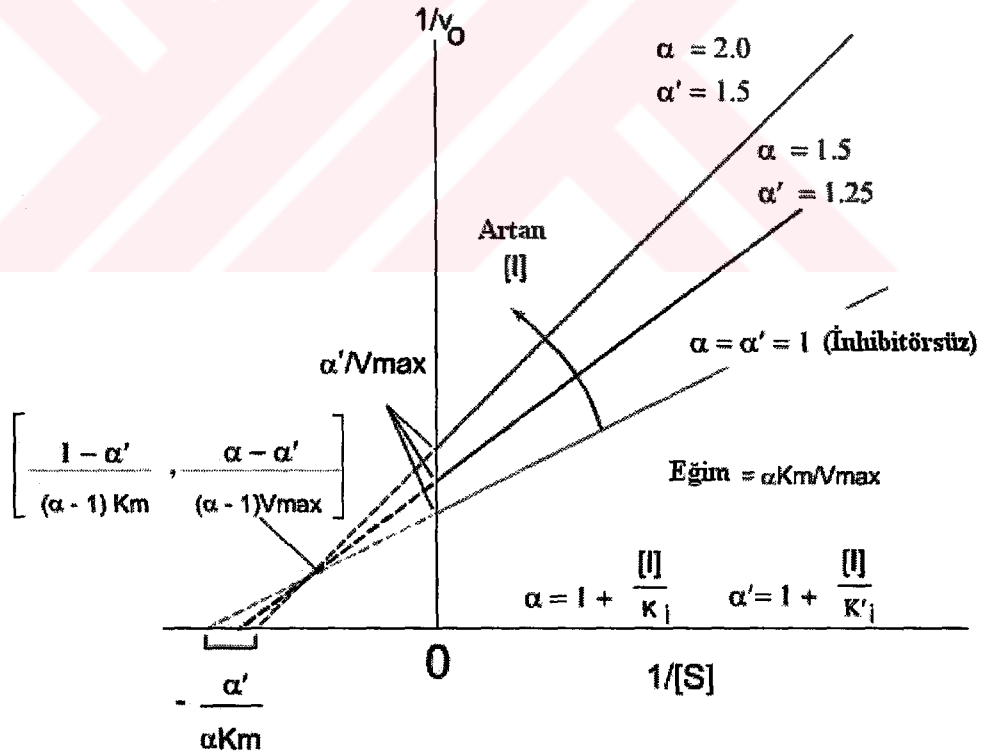
Şekil 1.7 Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

1.6.3 Karışık-Tür İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda inhibitör hem enzim ve hemde enzim-substrat kompleksine bağlanabilir. Karışık-tür inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}} \quad (1.10)$$

Bu eşitliğin eğrisi eğimi $(\alpha K_M/V_{max})$ ve ekstrapolasyonu (α'/V_{max}) olan doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.8). $[I]$ 'nın farklı değerleri için (1.10) eşitliği, bu eşitliğin $1/v_0$ ekseninin solunda kesişen bir seri benzer doğruları tanımladığını gösterir. $K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) olduğu özel durum için, kesişim $1/[S]$ eksenindedir. Bu durumda inhibisyon çeşiti yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır.



Şekil 1.8 Karışık-tür inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

1.7 Polifenol Oksidaz İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda polifenol oksidaz ile ilgili yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmektedir.

Doğan ve arkadaşları, farklı patlıcan kültürlerinden PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, substrat spesifikliğı ve ısı inaktivasyonu gibi bazı kinetik parametrelerin etkilerini incelemişler[18]; Coetzer ve arkadaşları, domates polifenol oksidazından elde edilen sense ve antisense RNA ile patatesteki enzimatik kararmanın kontrol mekanizmasını incelemişler[19]; Yang ve arkadaşları muz kabuğundan (*Musa sapientum* L.) PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve bazı özelliklerini incelemişler[20]; Nagai ve Suzuki, Çin kabağundan (*Brassica rapa* L.) PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine zamanın, pH'nın, sıcaklığın, substratların ve inhibitörlerin etkilerini incelemişler[21]; Pérez-Gilabert ve arkadaşları, mantardan (*Terfezia claveryi* Chatin) polifenol oksidazı kısmen saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemişler[22]; Carvajal-Millán ve arkadaşları, gelişim ve depolama süresince N-(2-kloro-4-pyridyl)-N-fenilüre ile etkilenen üzümdeki polifenol oksidaz aktivitesinin renk değişimlerinin ve dehidrotasyonun değişimi üzerine çalışmalar yapmışlar[23]; Sojo ve arkadaşları, muz polifenol oksidazı ile bir tetrahidroizokinolin olan salsolinol'ün oksidasyonunu incelemişler ve bu oksidasyonun pH'ya bağlı olduğunu ve özellikle asidik pH değerlerinde bir maksimuma eriştiğini bulmuşlar[24]; Chang ve arkadaşları, sekiz şeftali kültivarının antioksidant potansiyelini, fenolik bileşikleri belirleyerek ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunun inhibisyonunu inceleyerek tayin etmeye çalışmışlar[25]; Broothaerts ve arkadaşları elma ve tütün yapraklarından elde edilen PFO aktivitesi üzerine TX-100, SDS, pH, substrat konsantrasyonunun ve inhibitörlerin etkisini incelemişler[26]; Onsa ve arkadaşları, Hint irmiğinden PPO'yu kısmen saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemişler[27]; González ve arkadaşları, böğürtlendeki peroksidaz ve PPO aktivitesini karakterize etmeye çalışmışlar[28]; Jiang ve arkadaşları sabunağacı meyvesinden elde ettikleri polifenol oksidazı Sephadex G-100 jelini kullanarak saflaştırmışlar[29]; Rodriguez-López ve arkadaşları bir mikro dalga fırını kullanarak mantardan elde ettikleri PFO'nun termal

inaktivasyonunu incelemişler ve hızlı bir mikro dalga prosedürünün kullanılması ile enzimin antioksidant içeriğinin arttığını ve kararmanın azaldığını bulmuşlardır[30].

1.8 Çalışmanın Amacı

Ocimum basilicum L., Lamiaceae familyasının *Ocimum* genusuna ait bir yıllık ve otsu bitkidir ve içerdiği yüksek orandaki esansiyel yağlarından dolayı yaygın bir şekilde kültürü yapılmaktadır. *Ocimum basilicum* L. taze, kurutulmuş ve dondurulmuş olarak tüketilmektedir. *Ocimum basilicum* L. ekstraktlarının fenolik madde içerikleri yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu bitkinin fenolik maddelerce zengin olması, hasatı ve kurutulması sırasında bazı istenmeyen renk değişimlerine neden olmaktadır. Polifenol oksidaz sebze ve meyvelerin depolanma sürecinde ortaya çıkan kararına olaylarını katalizleyen önemli enzimlerden birisidir. Bu nedenle *Ocimum basilicum* L.'nin hasadından sonraki işlemlerde kararmasını önlenmesi yada azaltılması önemlidir. Enzimatik kararmanın derecesi fenolik bileşiklerin miktarına, doğasına, oksijenin varlığına, indirgen maddeye, metalik iyonlara, pH'ya, sıcaklığa ve reaksiyonun başlıca sorumlusu olan polifenol oksidaza bağlıdır[4]. Enzimatik kararına işletmeciler ve tüketiciler için önemli bir ekonomik problemdir.

Bu çalışmanın amacı *Ocimum basilicum* L.'den polifenol oksidazı amonyum sülfat, diyaliz ve afinite kromatografisi ile saflaştırarak substrat spesifikliği, optimum pH, sıcaklık, ısı inaktivasyonu ve inhibisyon kinetiği gibi bazı kinetik özelliklerini incelemektir. Ayrıca, *Ocimum basilicum* L.'nin toplam fenolik ve protein içeriği de tespit edilmektedir. Bu şekilde *Ocimum basilicum* L.'den karakterize edilen PFO'nun aktivitesinin kontrol altına alınması daha etkili bir biçimde olacaktır. Elde edilen veriler depolama süresince kararmanın önlenmesi amacıyla geliştirilen etkili metotlar için de faydalı olacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Ocimum basilicum* L. Aydın'da tarladan toplandı ve -80 °C'de muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma Chem. Co. ve Merck'den temin edildi. Enzim analizleri Carry |1E|g UV-Visible spektrometresi kullanılarak belirlendi.

2.2 Ham Ekstraktların Hazırlanması

Taze olarak toplanan *Ocimum basilicum* L. bitkisinin yaprakları ham ekstrat hazırlanması için -80 °C'de bekletildi. 10 g bitki örneği, 10 mM askorbik asit ve 4 g polietilenglikol bulunan 100 mL pH'ı 6,5 olan fosfat tamponunda 2 dakika süreyle bir blender yardımıyla homojenize edildi. Enzim ekstraksiyonundaki polifenol oksidaz aktivitesine iyon etkisini engellemek amacıyla tampon konsantrasyonu 0,1 M seçildi[31]. Elde edilen homojenat, bir tülbentten süzüldü. Süzüntü, 15 000 x g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen ham ekstrakt aşağıdaki saflaştırma işlemlerinde kullanıldı.

2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması

Ham ekstraktı % 80 amonyum sülfat doygunluğuna getirmek için aşağıdaki denklem kullanılarak ilave edilmesi gereken katı amonyum sülfat miktarı hesaplandı.

$$g_{[(NH_4)_2SO_4]} = \frac{1.77V(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2} \quad (2.1)$$

Burada, V: süpernatantın hacmi (mL); S₁, 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu; ve S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğudur.

Ham ekstraktın hacmi kullanılarak hesaplanan amonyum sülfat, düşük devirde magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılan ham ekstraktın üzerine buz banyosunda yavaş yavaş ilave edilerek çözüldü. Sonuçta % 80 doygunluğa getirilen süspansiyon, 60 dakika süre ile +4 °C'de 15 000 x g'de santrifüj edildi[32]. Sıvı kısım atılarak, tüpte kalan çökelek, pH'ı 7,0 olan 5 mM fosfat tamponunun çözünebildiği en az miktarında çözüldü[14]. Elde edilen enzim çözeltisi 5 mM pH'ı 6,5 olan fosfat tamponuna karşı 24 saat süreyle diyaliz edildi. 24 saat boyunca diyaliz tamponu çözeltisi 4 defa değiştirildi. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4 °C'de gerçekleştirildi[14]. Kısmen saflaştırılmış olan polifenol oksidaz, deneylerde enzim kaynağı olarak kullanıldı[33].

2.4 Afinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi Arslan ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. Bu metota afinite jeli, Sepharose-4B matriksinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra tirozinle kovalent modifikasyonu ile sentezlendi[34].

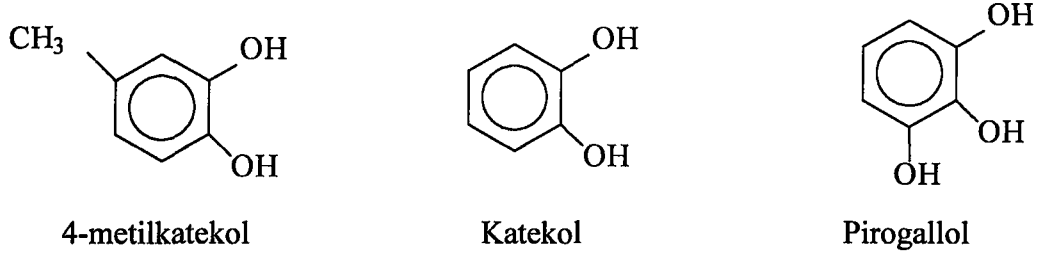
2.5 Elektroforez

Ocimum basilicum L. polifenol oksidazı, afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra sodyum dodesil sülfat poliakrilamide jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak saflık derecesi kontrol edildi[35].

2.6 Spektrofotometrik Ölçümler

Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla 4-metilkatekol, katekol, pirogallol, L-dopa, L-tirozin, p-kresol ve gallik asit substrat olarak denendi. *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz enzimi, bu substratlardan L-dopa, L-tirozin, p-kresol ve gallik asite karşı aktivite göstermedi. Kinetik deneyler spektrofotometrik olarak incelendi. Bu amaçla 4-metilkatekol ve katekol substratları için 420 nm'de, pirogallol substratı için 320 nm'de 2 dakika süre ile absorbanstaki artış ölçüldü. Çalışmada kullanılan substratların açık yapıları Şekil

2,1'de verilmektedir. Reaksiyon, 1cm ışık yollu kuvartz küvet içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyonun toplam hacmi her ölçüm için 3 mL olarak sabit tutuldu. Enzim ünitesi, 1 mL enzim çözeltisi için 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001'lik değişme olarak tanımlanmıştır[8,18].



Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan substratların açık yapıları

2.7 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

Polifenol oksidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerini belirlemek için 4-metilkatekol, catekol ve pirogallol substratları kullanıldı. Deney, pH 4-6 aralığında 0,1 M asetat ve pH 6-9 aralığında 0,1 M fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltilerin pH'ları 0,1 M NaOH ve HNO₃ çözeltileri kullanılarak ayarlandı[18].

2.8 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Polifenol oksidaz enziminin 4-metilkatekol, catekol ve pirogallol substratlarıyla maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkları tespit etmek için deneyler 10-60 °C aralığında spektrofotometrik olarak yapıldı. Ölçümlerde kullanılan substrat ve tampon çözeltilerinin sıcaklığı bir su banyosu yardımıyla ayarlandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği küvet içerisindeki çözeltilerin sıcaklığı istenilen sıcaklığa geldikten sonra, enzim çözeltisi ilave edildi. Kuvartz küvetteki enzim, substrat ve tamponun hacimleri her ölçüm için 3 mL olarak sabit tutuldu[36].

2.9 Isı İnaktivasyonu

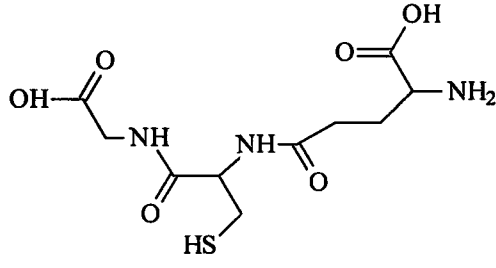
Polifenol oksidaz enziminin ısı inaktivasyonunu incelemek için 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanıldı. 35, 55 ve 75 °C sıcaklıklarda enzim çözeltisi 1 saat süreyle etüvde inkübe edildi. Her 10 dakikada bir enzim çözeltisinden alınıp buz banyosunda soğutulduktan sonra sabit tampon ve substrat konsantrasyonlarında aktivite belirlendi[18].

2.10 İnhibisyon

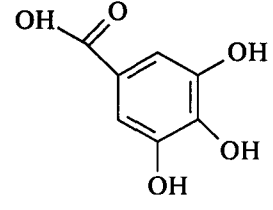
4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının inhibisyonu, 1,4-ditiyoeritrol, 4-aminobenzoik asit, askorbik asit, gallik asit, glutatyon, L-sistein, sodyum azid, tropolon, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve salisilik asit inhibitörleri kullanılarak incelendi. EDTA ve salisilik asit inhibitörlerinin, *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz enzimini inhibe etmediği belirlendi. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları Şekil 2.2'de verilmiştir. Deneyle, sabit inhibitör konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. Her bir inhibitör için inhibisyon sabitleri (K_i), Lineweaver-Burk eğrilerinden hesaplandı[37].

2.11 *Ocimum basilicum* L. Ekstraktının Protein İçeriği

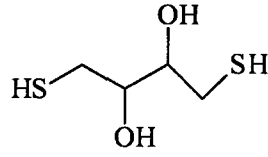
Ocimum basilicum L. ekstraktının protein içeriği, standart olarak bovin serum albumin kullanılarak Bradford metoduna göre tayin edildi[38]. Bu yöntem, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin sözkonusu olmaması ve protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır[14].



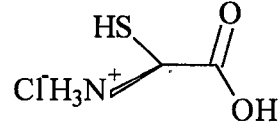
Glutatyon



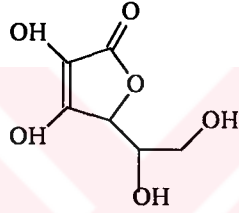
Gallik asit



1,4-ditiyoeritrol



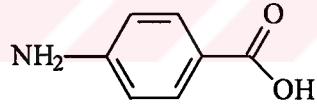
L-sistein



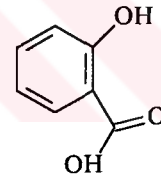
Askorbik asit

NaN₃

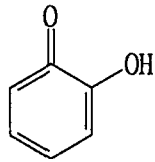
Sodyum azid



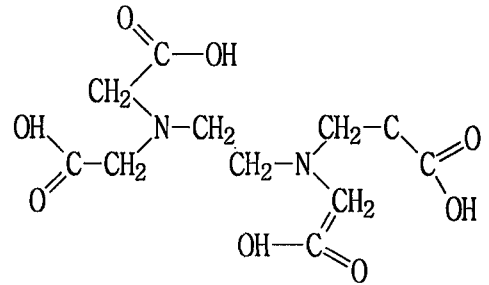
4-aminobenzoik asit



Salisilik asit



Tropolon



EDTA

Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları

1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L alındı. 5 mM fosfat tamponu (pH=6,5) ile tüm tüplerin hacimleri 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak 0,1 mL fosfat tamponu bulunan tüp kullanıldı. Hazırlanan enzim çözeltisinden 3 ayrı tüpe 0,1'er mL alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifi ilave edilip vortekste karıştırıldı. 30 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. Üç ölçümün ortalaması alınarak, bu absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı[14].

2.12 *Ocimum basilicum* L. Ekstraktının Toplam Fenolik Madde İçeriği

Ocimum basilicum L. ekstraktının toplam fenolik madde içeriği, Singleton ve Rossi'nin metoduna göre Folin-Ciocalteu belirteci kullanılarak belirlendi. 2 g bitki örneği oda sıcaklığında % 80'lik sulu etanol içersininde homojenize edildi, homojenat 15 dakika 10000 x g ve +4 $^{\circ}$ C'de santrifüj edildi, ve elde edilen süpernatant başka bir kaba alınarak saklandı. Geriye kalan çöküntü % 80'lik sulu etanol içerisinde iki kez daha ekstrakte edildi, süpernatantlar birleştirildi, ağzı açık bir kap içerisinde süpernatantlar oda sıcaklığında tüm çözücüsü uçuncaya kadar kurutuldu. Cam kaptaki kuru kalıntı 5 mL distile su içerisinde çözüldü ve bu ekstratın 100 μ L'si distile su ile 3 mL'ye seyreltildi. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifinin 0,5 mL'si bu karışıma ilave edildi. 3 dakika bekledikten sonra % 20'lik sodyum karbonatın 2 mL'si ilave edildi ve elde edilen karışım bir vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 60 dakika sonra Carry |1E|g UV-Visible spektrometresi kullanılarak 650 nm'de ölçüldü. Standart kalibrasyon eğrisi katekol kullanılarak hazırlandı. Sonuç, 100 g taze bitki ağırlığı başına mg katekol olarak verildi[39].

3. BULGULAR

Bu bölümde, çalışmalar sonucu elde edilen deneysel veriler sunulmaktadır.

3.1 *Ocimum basilicum* L. Ekstraktlarının Toplam Protein ve Fenolik Madde İçerikleri

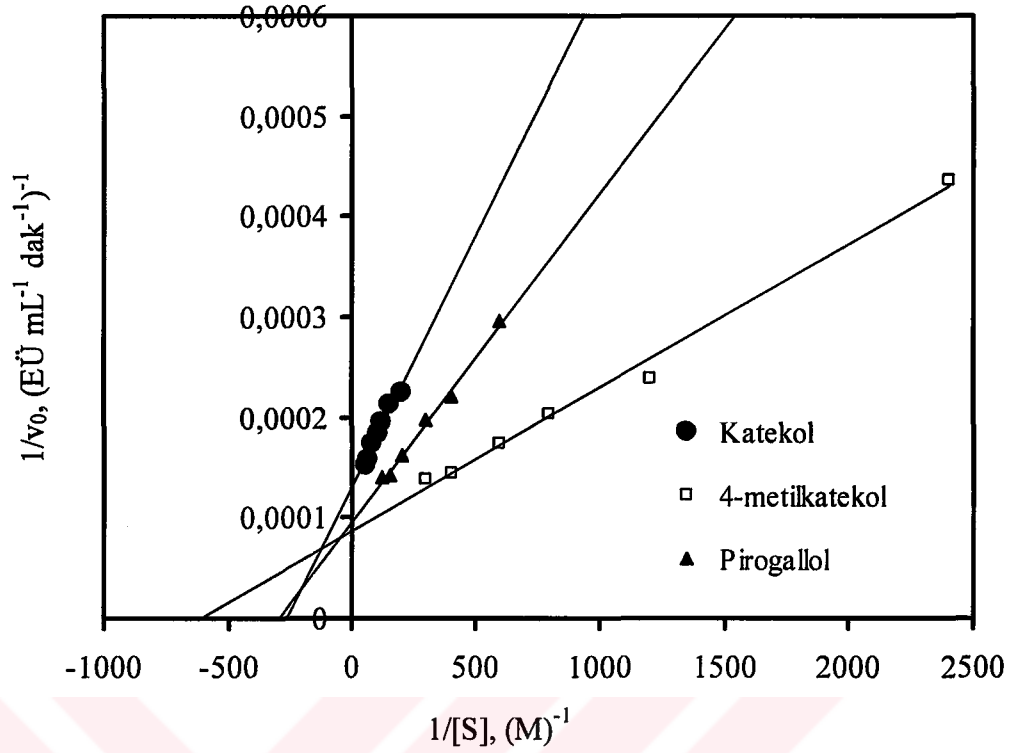
Ham ekstrakt içerisindeki protein içeriği Bradford yöntemine göre[38] ve toplam fenolik madde içeriği ise Singleton ve Rossi yöntemine göre[39] belirlenmiştir. Bu çalışmada *Ocimum basilicum* L. ekstraktlarındaki protein içeriği $8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve toplam fenolik madde içeriği yaklaşık olarak bitkinin 100 g yaş ağırlığı başına 280 mg olarak bulunmuştur.

3.2 Substrat Spesifikliği

Ocimum basilicum L.'den elde edilen polifenol oksidaz enzimi aktivitesini belirlemek için 4-metilkatekol, katekol, pirogallol, L-tirozin, L-dopa, p-kresol ve gallik asit substratlar olarak kullanılmıştır. *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz enziminin L-tirozin, L-dopa, p-kresol ve gallik asit substratlarına karşı aktivite göstermediği bulunmuştur. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.1'de verilerek Şekil 3.1'de grafik edilmiştir.

Çizelge 3.1 *Ocimum basilicum* L' den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler

Substratlar	[S] (mM)	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ x 10 ⁺⁴	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max}/K_M (EÜ dak ⁻¹ mM ⁻¹)	R^2
4-metilkatekol	0,42	2288	2400	4,37	11586	1,62	7143	0,9927
	0,83	4172	1200	2,40				
	1,25	4930	800	2,03				
	1,67	5780	600	1,73				
	2,50	6952	400	1,44				
	3,33	7288	300	1,37				
Katekol	5,00	4446	200	2,25	6941	2,77	2500	0,9975
	6,67	4708	150	2,12				
	8,33	5129	120	1,95				
	10,00	5477	100	1,83				
	13,33	5785	75	1,73				
	16,67	6327	60	1,58				
20,00	6594	50	2,25					
Pirogallol	1,67	3387	600	2,95	10369	3,42	3030	0,9949
	2,50	4537	400	2,20				
	3,33	5075	300	1,97				
	5,00	6153	200	1,63				
	6,67	7063	150	1,42				
	8,33	7163	120	1,40				



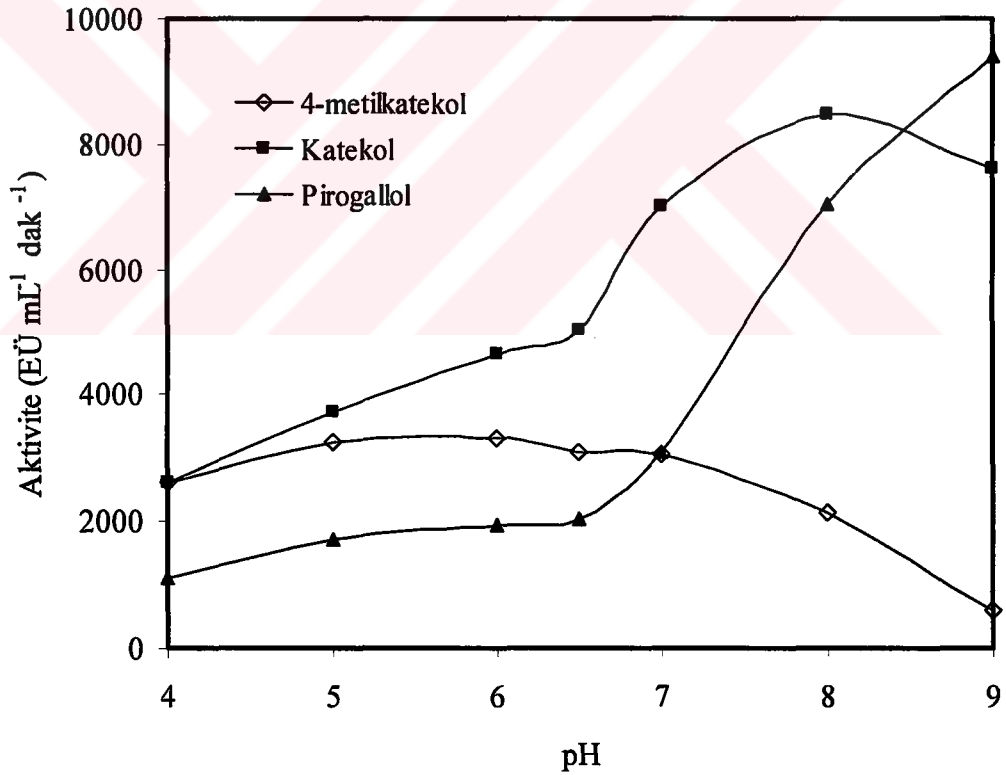
Şekil 3.1 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları ile *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için çizilmiş $1/[S]$ - $1/v_0$ eğrileri

3.3 Optimum pH

Ocimum basilicum L.'den elde edilen polifenol oksidazın optimum pH değerleri 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.2'de verilmektedir. Şekil 3.2, substratlara bağlı olarak pH'ın aktivite ile değişimini göstermektedir.

Çizelge 3.2 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait deneysel veriler

pH	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	4-metilkatekol	Katekol	Pirogallol
4,0	2608	2602	1114
5,0	3242	3731	1724
6,0	3323	4658	1934
6,5	3079	5037	2032
7,0	3043	6997	3081
8,0	2137	8465	7035
9,0	600	7621	9401



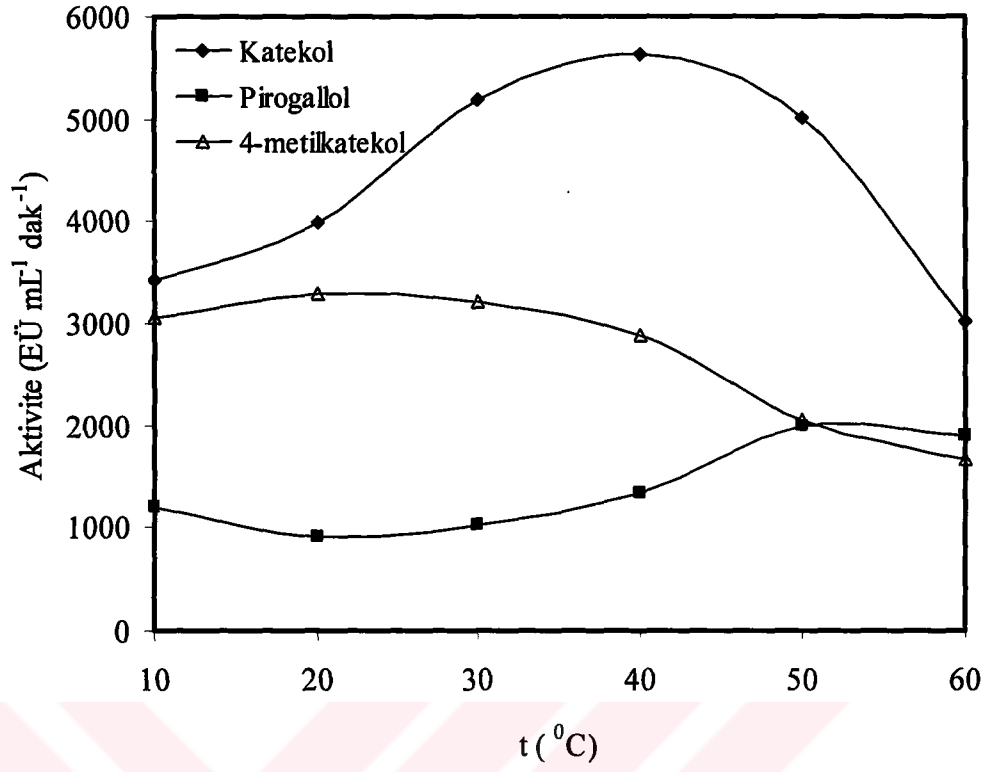
Şekil 3.2 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimi

3.4 Optimum Sıcaklık

4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi değişik sıcaklıklarda incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.3'de verilerek Şekil 3.3'de grafik edilmiştir. Şekil 3.3, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişimini göstermektedir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol substratı için optimum sıcaklığın 20 °C, katekol substratı için 40 °C ve pirogallol için 50 °C olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.3 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait deneysel veriler

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	4-metilkatekol	Katekol	Pirogallol
10	3064	3428	1207
20	3296	3985	908
30	3217	5195	1035
40	2877	5636	1329
50	2047	5016	1994
60	1665	3024	1893



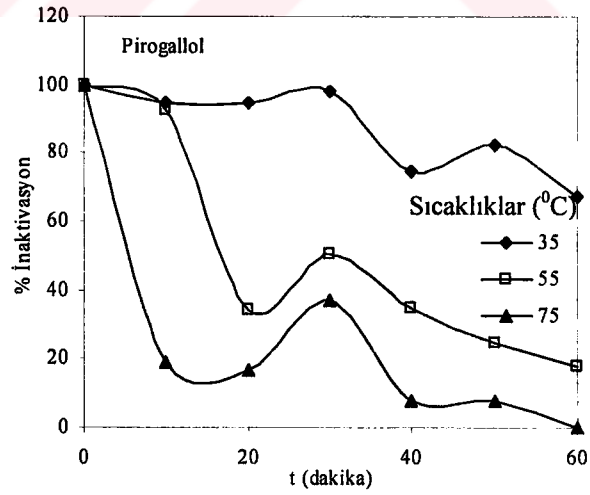
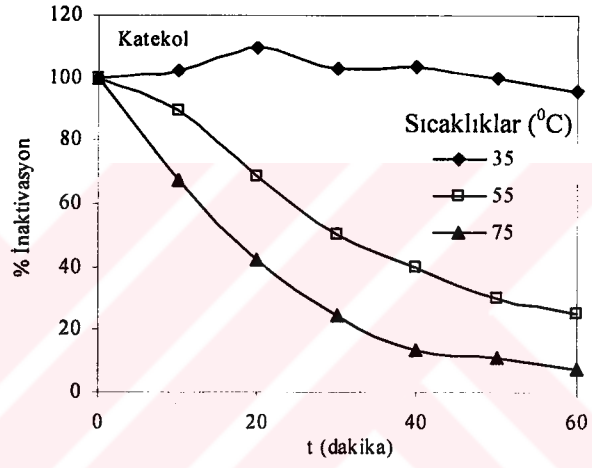
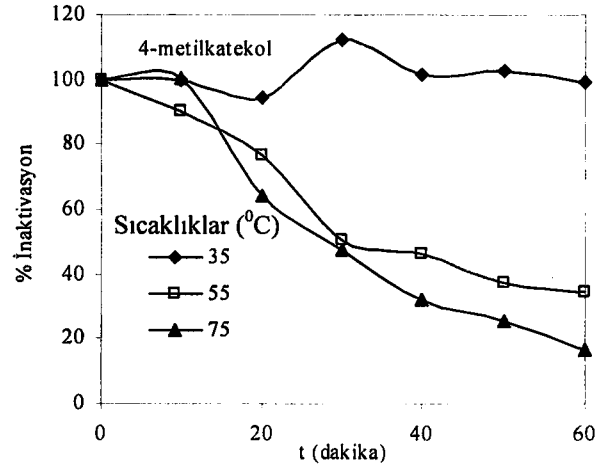
Şekil 3.3 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

3.5 Termal İnaktivasyon

Ocimum basilicum L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin termal denaturasyonu artan sıcaklığın ve inaktivasyon süresinin bir fonksiyonu olarak incelendi. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.4'de verilerek Şekil 3.4'de grafik edilmiştir. Deneysel bulgular, artan sıcaklık ve inaktivasyon süresi ile enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 3.4 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz enziminin termal denatürasyonu için elde edilmiş deneysel veriler

Substratlar	Zaman (dak)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)				% İnaktivasyon			
		35 °C	55 °C	75 °C	75 °C	35 °C	55 °C	75 °C	75 °C
4-metilkatekol	0	4223	3792	3840	3840	100	100	100	100
	10	4203	3431	3848	3848	100	90	100	100
	20	3997	2895	2463	2463	95	76	64	64
	30	4735	1904	1832	1832	112	50	48	48
	40	4293	1754	1240	1240	102	46	32	32
	50	4348	1426	977	977	103	38	25	25
	60	4198	1297	647	647	99	34	17	17
Katekol	0	7260	4799	7464	7464	100	100	100	100
	10	7444	4297	5030	5030	103	90	67	67
	20	7977	3289	3134	3134	110	69	42	42
	30	7474	2418	1833	1833	103	50	25	25
	40	7495	1921	1005	1005	103	40	13	13
	50	7229	1445	818	818	100	30	11	11
	60	6945	1213	571	571	96	25	8	8
Pirogallol	0	3881	2250	3372	3372	100	100	100	100
	10	3688	2077	2396	2396	95	92	19	19
	20	3688	772	644	644	95	34	17	17
	30	3801	1132	576	576	98	50	37	37
	40	2888	781	1240	1240	74	35	8	8
	50	3189	560	271	271	82	25	8	8
	60	2619	404	260	260	67	18	0	0



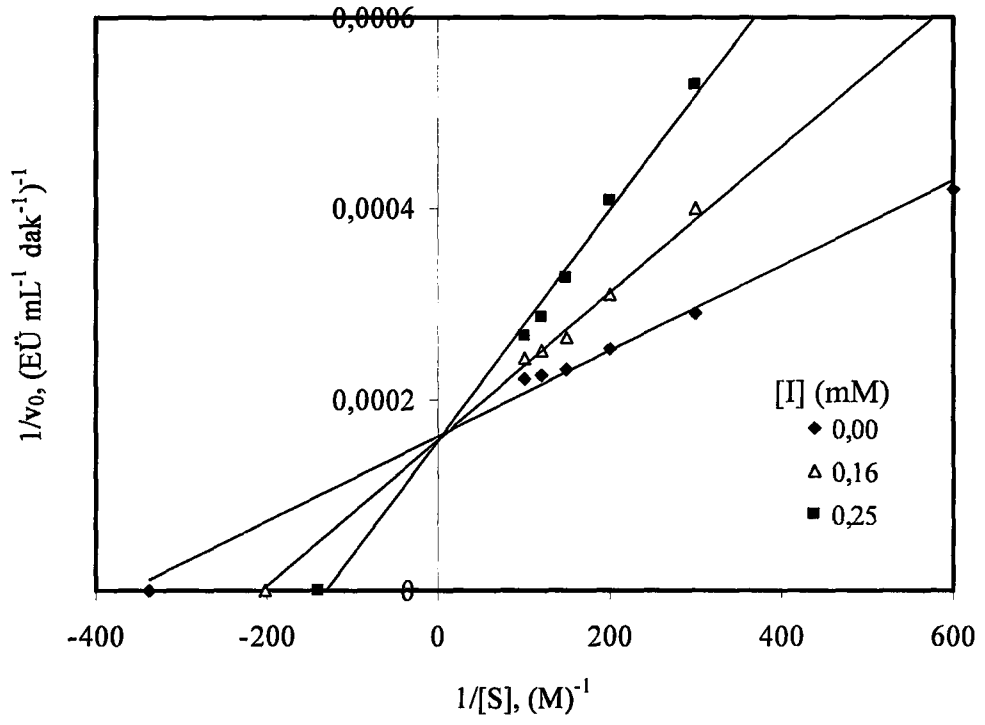
Şekil 3.4 *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin termal denatürasyonuna ait eğriler

3.6 Polifenol Oksidazın İnhibisyonu

İnhibisyon çalışmalarında 4-metilkatekol ve katekol substratları için 1,4-ditiyoeritrol, 4-aminobenzoik asit, askorbik asit, gallik asit, glutatyon, L-sistein, sodyum azid, tropolon, EDTA ve salisilik asit; pirogallol substratı için ise 4-aminobenzoik asit, askorbik asit, glutatyon, L-sistein, sodyum azid, tropolon, EDTA ve salisilik asit inhibitör olarak kullanıldı. Deneysel sonuçlar, Çizelge 3.5-3.26'da verilir, Şekil 3.5-3.26'da grafik edilmiştir. EDTA ve salisilik asit inhibitörlerinin, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazını inhibe etmediği bulunmuştur.

Çizelge 3.5 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

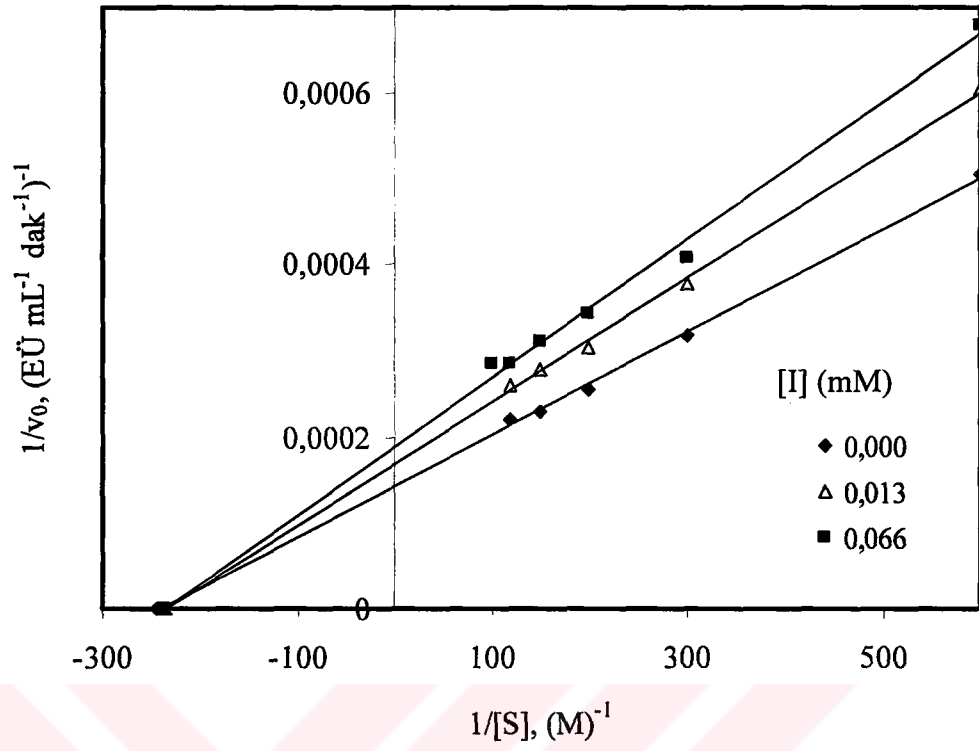
[I] (M) $\times 10^{+3}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+3}$	R^2
-	1,67	2386	600	4,19	6159	2,70	-	0,9936
	3,33	3447	300	2,90				
	5,00	3946	200	2,53				
	6,67	4333	150	2,31				
	8,33	4427	120	2,26				
	10,00	4533	100	2,21				
1,66	1,67	1631	600	6,13	-	-	2,31	0,9985
	3,33	2500	300	4,00				
	5,00	3222	200	3,10				
	6,67	3777	150	2,65				
	8,33	3991	120	2,51				
	10,00	4115	100	2,43				
2,50	3,33	1892	300	5,29	-	-	1,47	0,9949
	5,00	2455	200	4,07				
	6,67	3061	150	3,27				
	8,33	3499	120	2,86				
	10,00	3744	100	2,67				



Şekil 3.5 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.6 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

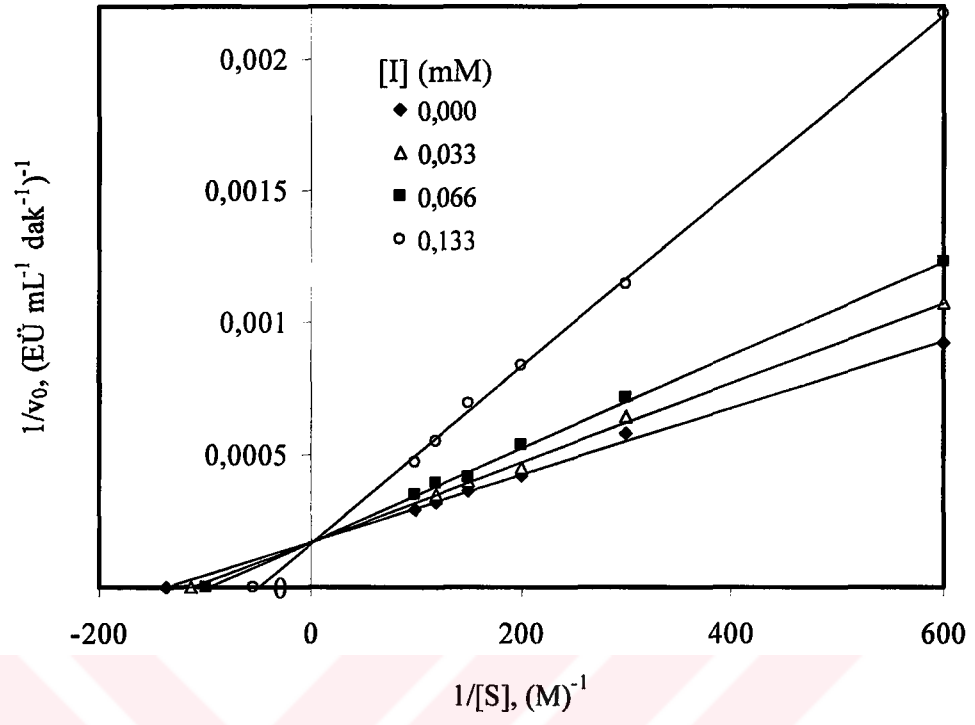
[I] (M) $\times 10^{-5}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) \times 10^{-4}	R^2
-	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1979 3158 3936 4367 4547 4683	600 300 200 150 120 100	5,05 3,17 2,54 2,29 2,20 2,14	7026	4,21	-	0,9988
0,66	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1652 2639 3282 3586 3863 3773	600 300 200 150 120 100	6,05 3,79 3,05 2,79 2,59 2,65	-	-	4,00	0,9993
1,33	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1470 2457 2924 3222 3506 3502	600 300 200 150 120 100	6,80 4,07 3,42 3,10 2,85 2,86	-	-	4,00	0,9962



Şekil 3.6 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.7 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

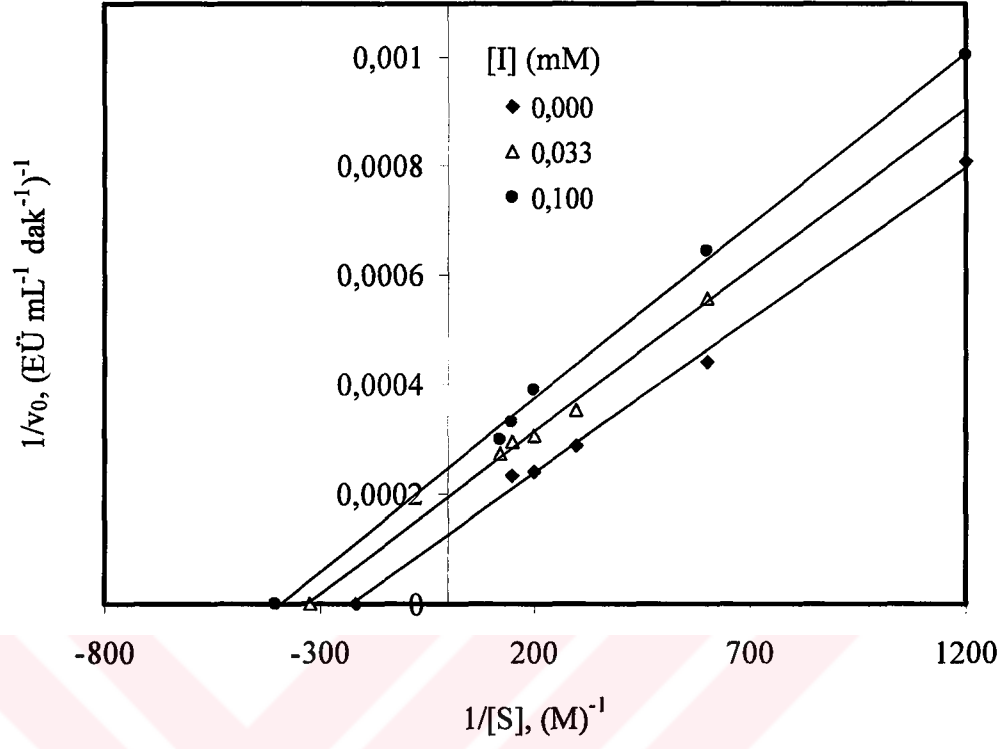
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	1,67	1085	600	9,22	5780	7,28	-	0,9983
	3,33	1735	300	5,76				
	5,00	2387	200	4,19				
	6,67	2766	150	3,62				
	8,33	3111	120	3,21				
	10,00	3411	100	2,93				
0,33	1,67	935	600	10,70	-	-	1,68	0,9985
	3,33	1552	300	6,44				
	5,00	2213	200	4,52				
	6,67	2501	150	4,00				
	8,33	2841	120	3,52				
	10,00	3411	100	2,93				
0,66	1,67	816	600	12,25	-	-	1,68	0,9990
	3,33	1400	300	7,14				
	5,00	1865	200	5,36				
	6,67	2412	150	4,15				
	8,33	2567	120	3,90				
	10,00	2869	100	3,49				
1,33	1,67	460	600	21,74	-	-	0,96	0,9991
	3,33	873	300	11,45				
	5,00	1200	200	8,33				
	6,67	1438	150	6,95				
	8,33	1830	120	5,46				
	10,00	2118	100	4,72				



Şekil 3.7 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.8 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

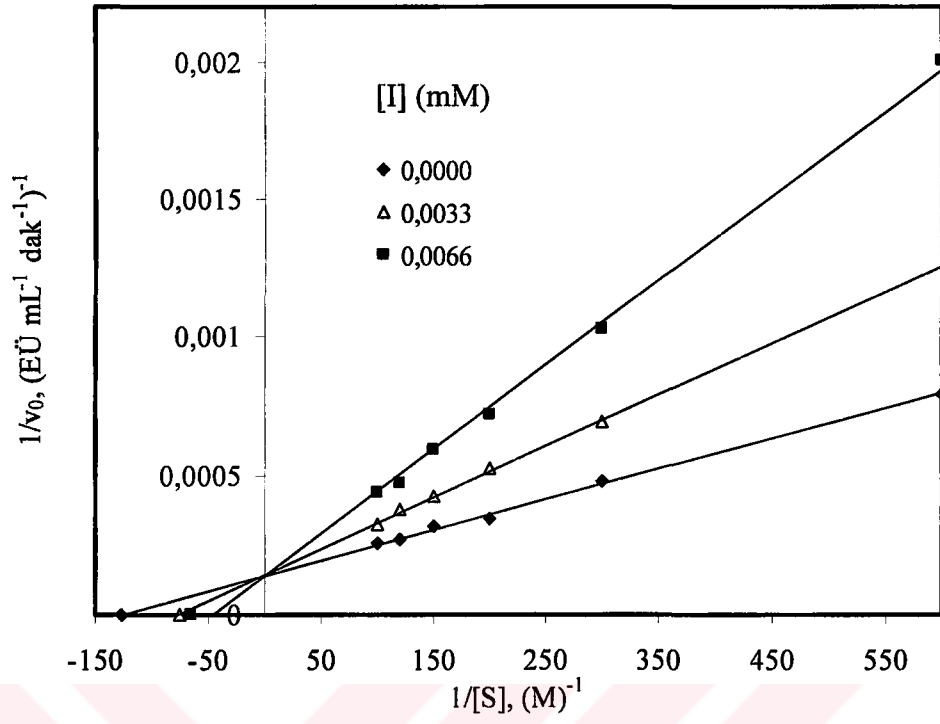
[I] (M) $\times 10^{+4}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+4}$	R^2
-	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	1238 2272 3459 4149 4258 4375	1200 600 300 200 150 120	8,08 4,40 2,89 2,41 2,35 2,29	7861	4,71	-	0,9966
0,33	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	1098 1796 2831 3273 3394 3655	1200 600 300 200 150 120	13,97 5,57 3,53 3,06 2,95 2,74	-	-	0,63	0,9958
1,00	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	994 1554 1993 2570 3010 3365	1200 600 300 200 150 120	10,06 6,44 5,02 3,89 3,32 2,97	-	-	1,06	0,9977



Şekil 3.8 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.9 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

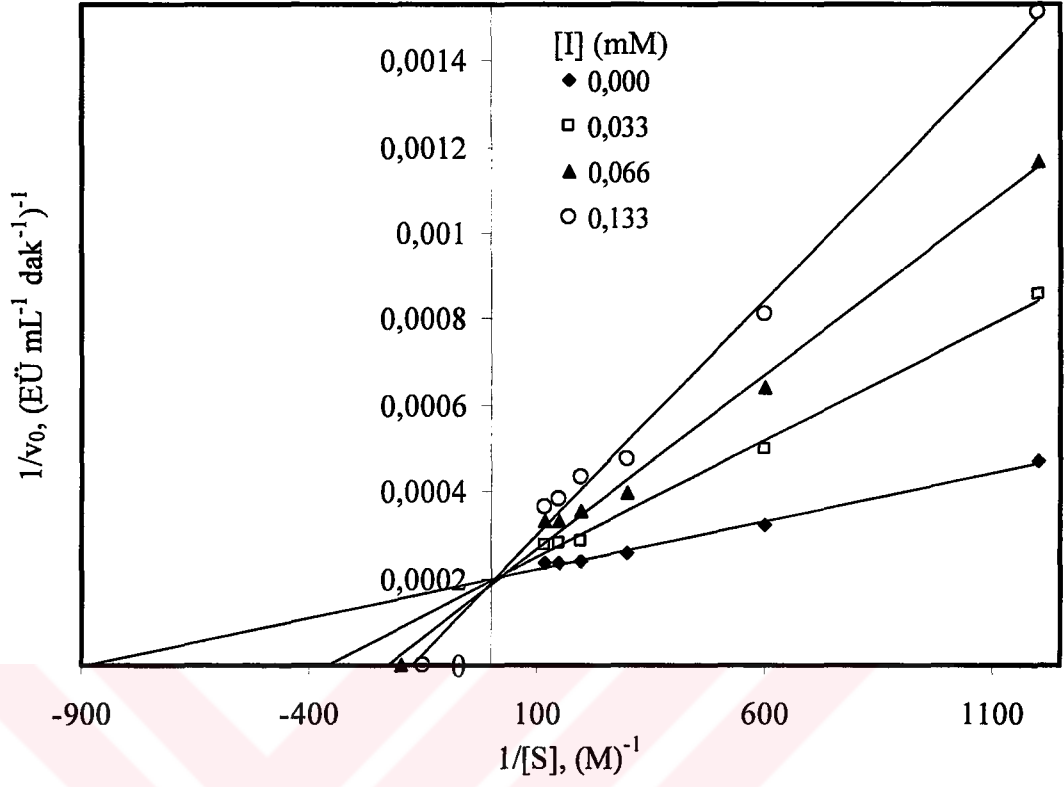
[I] (M) $\times 10^{+5}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+5}$	R^2
-	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1257 2092 2896 3150 3723 3937	600 300 200 150 120 100	7,96 4,78 3,45 3,17 2,69 2,54	7077	7,78	-	0,9986
3,33	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1439 1917 2365 2659 3114	300 200 150 120 100	6,95 5,22 4,23 3,76 3,21	-	-	4,72	0,9990
6,66	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	498 974 1394 1697 2115 2295	600 300 200 150 120 100	20,08 10,27 7,17 5,89 4,73 4,36	-	-	3,71	0,9967



Şekil 3.9 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.10 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

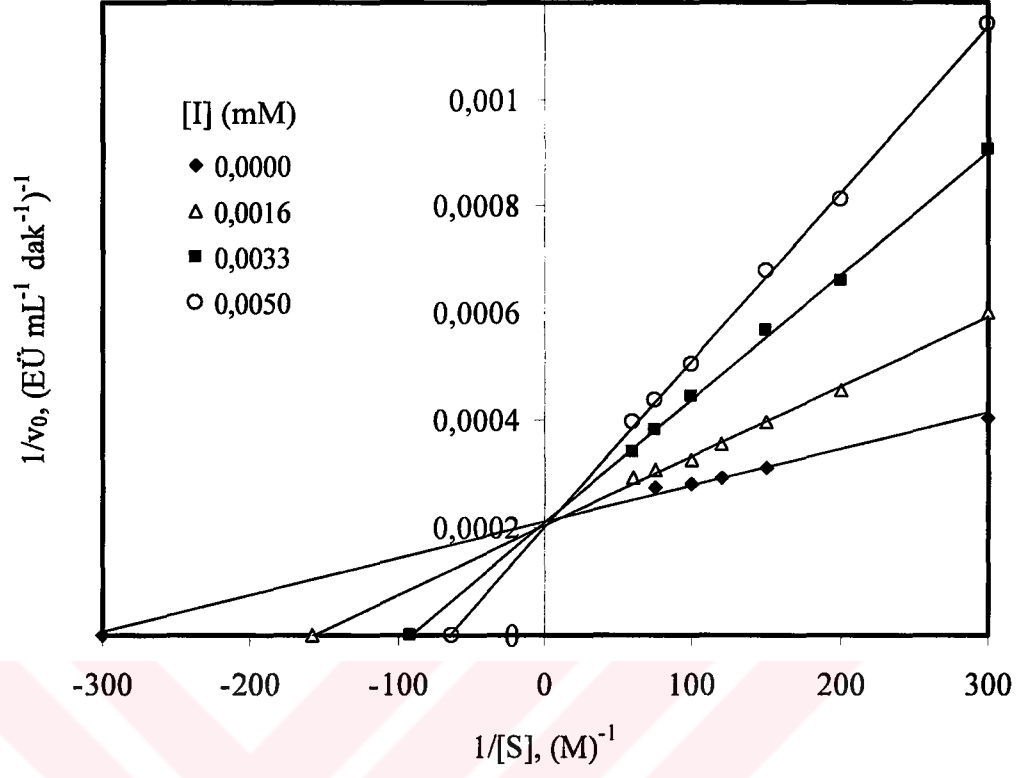
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M ⁻¹)	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	2131 3111 3875 4197 4268 4253	1200 600 300 200 150 120	4,69 3,21 2,58 2,38 2,34 2,35	5056	1,12	-	0,9931
0,33	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	1168 2013 3140 3487 3548 3587	1200 600 300 200 150 120	8,56 4,97 3,18 2,87 2,82 2,79	-	-	5,26	0,9947
0,66	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	857 1558 2529 2832 3007 3007	1200 600 300 200 150 120	11,67 6,42 3,95 3,53 3,33 3,33	-	-	1,69	0,9913
1,33	0,83 1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	661 1235 2101 2320 2602 2738	1200 600 300 200 150 120	15,13 8,10 4,76 4,31 3,84 3,65	-	-	1,17	0,9940



Şekil 3.10 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.11 4-metilcatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

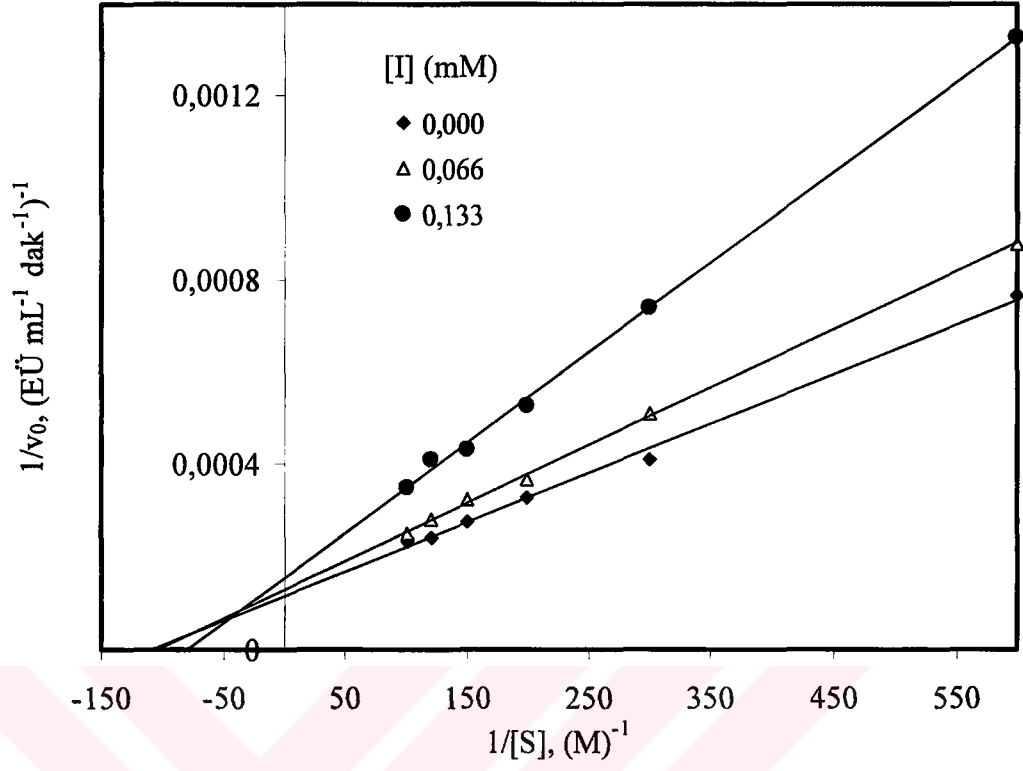
[I] (M) $\times 10^6$	[S] (M) $\times 10^3$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^4$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^6$	R^2
-	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 13,3	2464 3029 3198 3399 3537 3633	300 200 150 120 100 75	4,06 3,30 3,13 2,94 2,83 2,75	4737	3,31	-	0,9960
1,66	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7	1659 2193 2517 2807 3048 3251 3413	300 200 150 120 100 75 60	6,03 4,56 3,97 3,56 3,28 3,08 2,93	-	-	1,93	0,9980
3,33	3,3 5,0 6,7 10,0 13,3 16,7	1106 1515 1765 2239 2627 2915	300 200 150 100 75 60	9,04 6,60 5,67 4,47 3,81 3,43	-	-	1,46	0,9990
5,00	3,3 5,0 6,7 10,0 13,3 16,7	877 1233 1473 1982 2276 2522	300 200 150 100 75 60	11,40 8,11 6,79 5,05 4,39 3,97	-	-	1,44	0,9990



Şekil 3.11 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum L.*'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.12 4-metilcatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

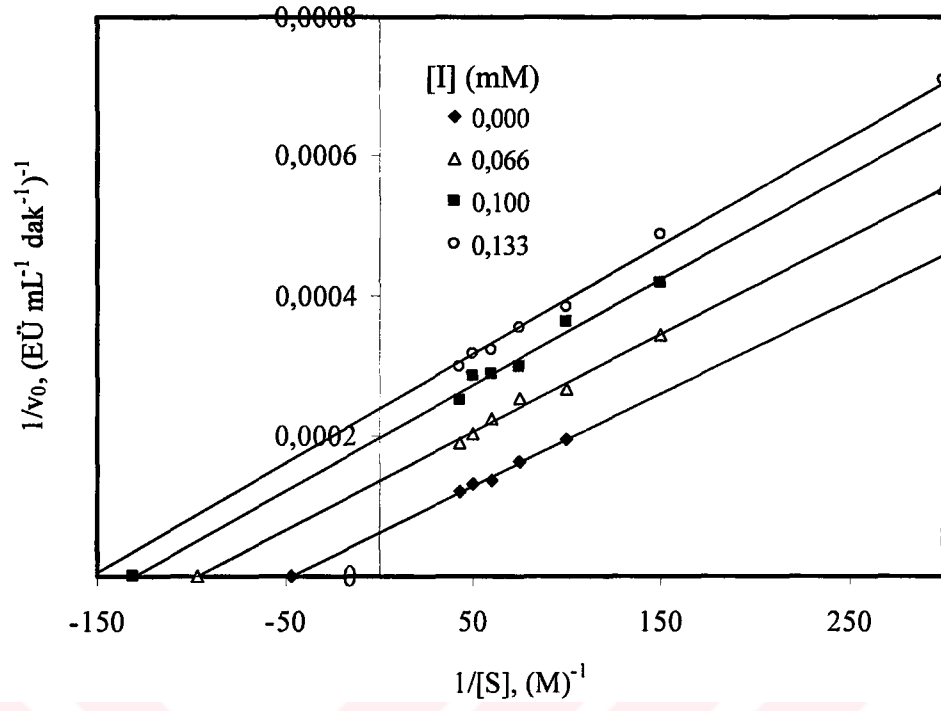
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	K_i' (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1310 2431 3030 3600 4106 4325	600 300 200 150 120 100	7,63 4,11 3,30 2,78 2,44 2,31	8688	9,55	-	-	0,9963
0,66	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1139 1954 2733 3067 3572 4020	600 300 200 150 120 100	8,78 5,12 3,66 3,26 2,80 2,49	-	-	0,48	0,58	0,9987
1,33	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	753 1352 1897 2313 2440 2844	600 300 200 150 120 100	13,28 7,40 5,27 4,32 4,10 3,52	-	-	0,17	0,40	0,9985



Şekil 3.12 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.13 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

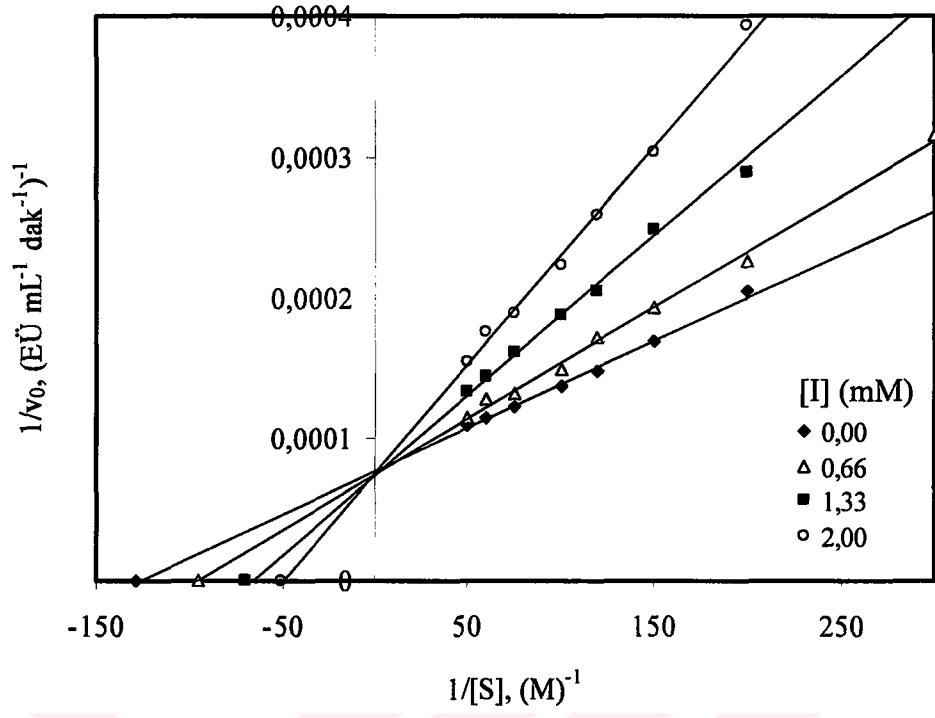
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-5}$	R^2
-	10,0	5176	100	1,93	16183	21,28	-	0,9975
	13,3	6135	75	1,63				
	16,7	7429	60	1,35				
	20,0	7643	50	1,31				
	23,3	8449	42	1,18				
0,66	3,3	1813	300	5,52	-	-	5,59	0,9980
	6,7	2923	150	3,42				
	10,0	3762	100	2,66				
	13,3	3943	75	2,54				
	16,7	4471	60	2,24				
	20,0	4970	50	2,01				
	23,3	5269	42	1,90				
1,00	6,7	2391	150	4,18	-	-	4,57	0,9940
	10,0	2769	100	3,61				
	13,3	3348	75	2,99				
	16,7	3493	60	2,86				
	20,0	3510	50	2,85				
	23,3	3991	42	2,51				
	1,33	3,3	1410	300				
6,7		2057	150	4,86				
10,0		2608	100	3,83				
13,3		2836	75	3,53				
16,7		3117	60	3,21				
20,0		3155	50	3,17				
23,3		3366	42	2,97				



Şekil 3.13 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.14 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

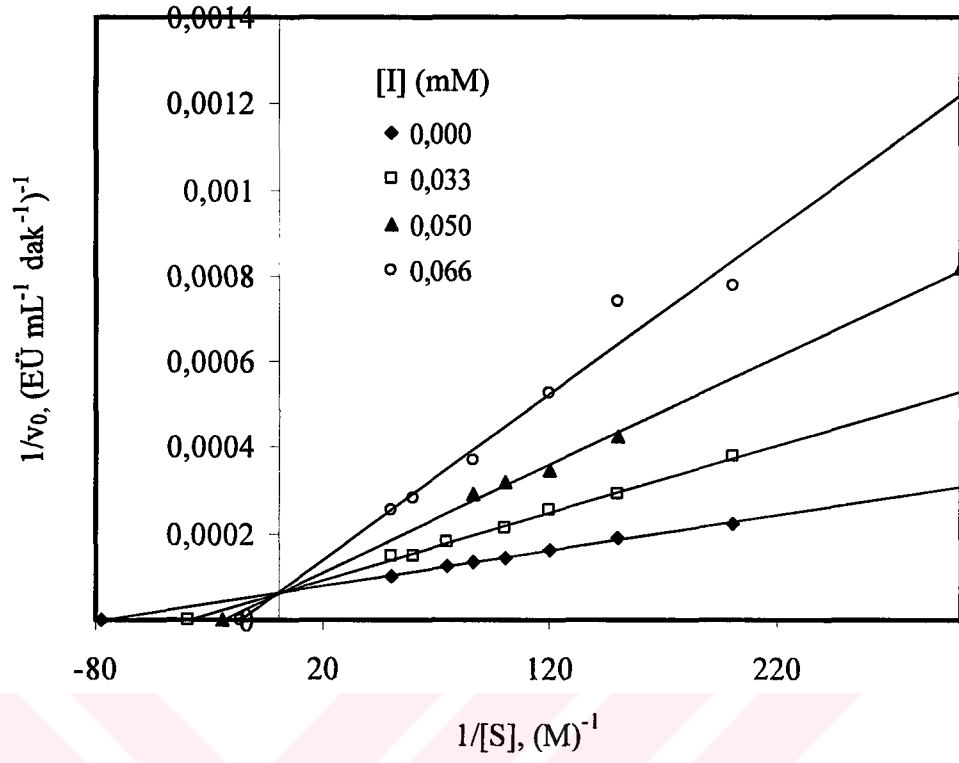
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	5936 6754 7251 8147 8709 9108	150 120 100 75 60 50	1,68 1,48 1,38 1,23 1,15 1,10	12836	7,84	-	0,9980
0,66	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	3169 4440 5183 5845 6684 7582 7840 8685	300 200 150 120 100 75 60 50	3,16 2,25 1,93 1,71 1,50 1,32 1,28 1,15	-	-	2,00	0,9979
1,33	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	2354 3454 4039 4899 5343 6219 6949 7523	300 200 150 120 100 75 60 50	4,25 2,90 2,48 2,04 1,87 1,61 1,44 1,33	-	-	1,60	0,9971
2,00	5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	2544 3296 3872 4494 5310 5682 6456	200 150 120 100 75 60 50	3,93 3,03 2,58 2,23 1,88 1,76 1,55	-	-	1,28	0,9975



Şekil 3.14 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.15 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

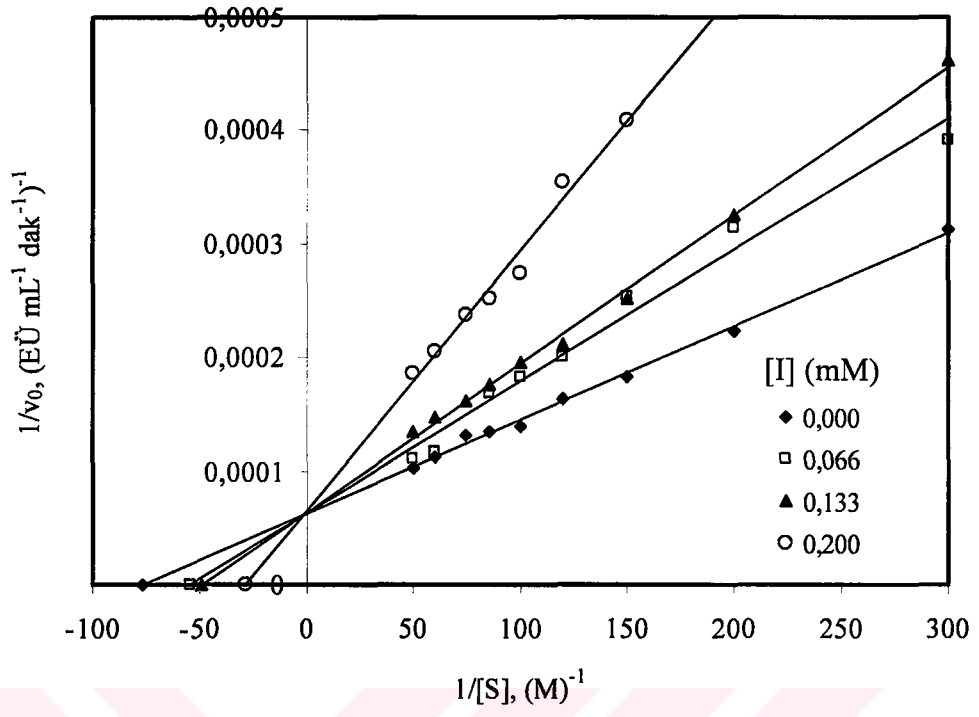
[I] (M) $\times 10^{+5}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+5}$	R^2
-	5,00	4470	200	2,24	15847	12,93	-	0,9980
	6,67	5280	150	1,89				
	8,33	6260	120	1,60				
	10,00	6890	100	1,45				
	11,67	7460	86	1,34				
	13,33	7920	75	1,26				
	20,00	9930	50	1,01				
3,33	5,00	2640	200	3,79	-	-	3,63	0,9970
	6,67	3460	150	2,89				
	8,33	3920	120	2,55				
	10,00	4710	100	2,12				
	13,33	5510	75	1,81				
	16,67	6680	60	1,50				
	20,00	6820	50	1,47				
5,00	3,33	1220	300	8,20	-	-	2,40	0,9980
	6,67	2360	150	4,24				
	8,33	2870	120	3,48				
	10,00	3150	100	3,17				
	11,67	3440	86	2,91				
6,66	5,00	1290	200	7,75	-	-	1,79	0,9960
	6,67	1350	150	7,41				
	8,33	1900	120	5,26				
	11,67	2710	86	3,69				
	16,67	3560	60	2,81				
	20,00	3910	50	2,56				



Şekil 3.15 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın gallik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.16 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

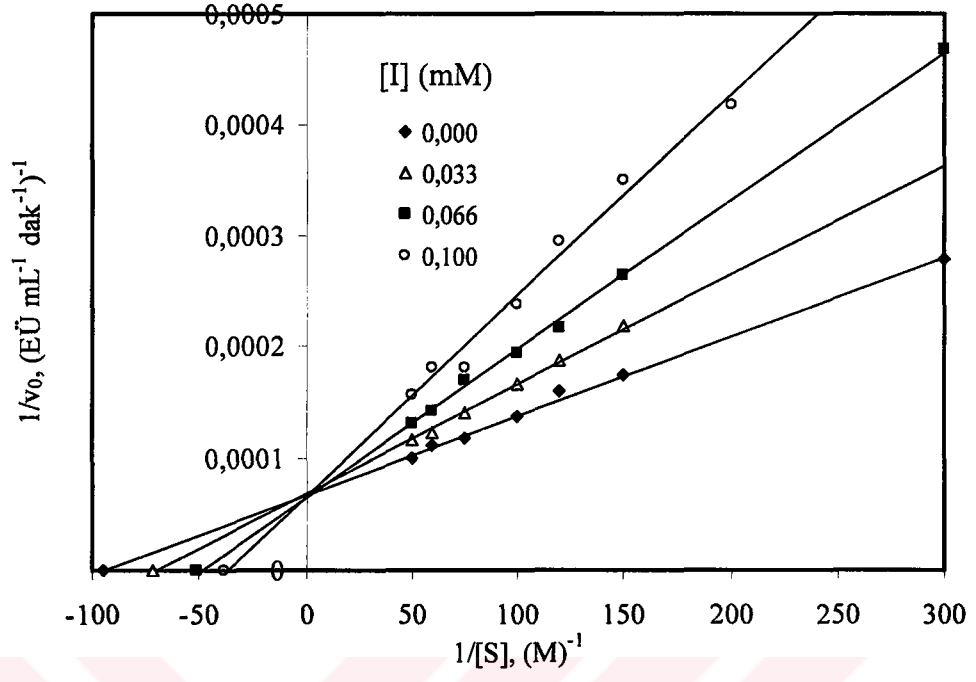
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	3200 4500 5480 6120 7140 7430 7640 8900 9720	300 200 150 120 100 86 75 60 50	3,13 2,22 1,82 1,63 1,40 1,35 1,31 1,12 1,03	15893	13,03	-	0,9970
0,66	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 11,7 16,7 20,0	2560 3190 3940 4990 5480 5920 8590 9050	300 200 150 120 100 86 60 50	3,91 3,13 2,54 2,00 1,82 1,69 1,16 1,10	-	-	1,63	0,9864
1,33	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	2170 3070 3980 4730 5100 5660 6180 6780 7430	300 200 150 120 100 86 75 60 50	4,61 3,26 2,51 2,11 1,96 1,77 1,62 1,47 1,35	-	-	2,25	0,9982
2,00	6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	2450 2820 3640 3970 4220 4880 5360	150 120 100 86 75 60 50	4,08 3,55 2,75 2,52 2,37 2,05 1,87	-	-	1,12	0,9929



Şekil 3.16 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.17 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

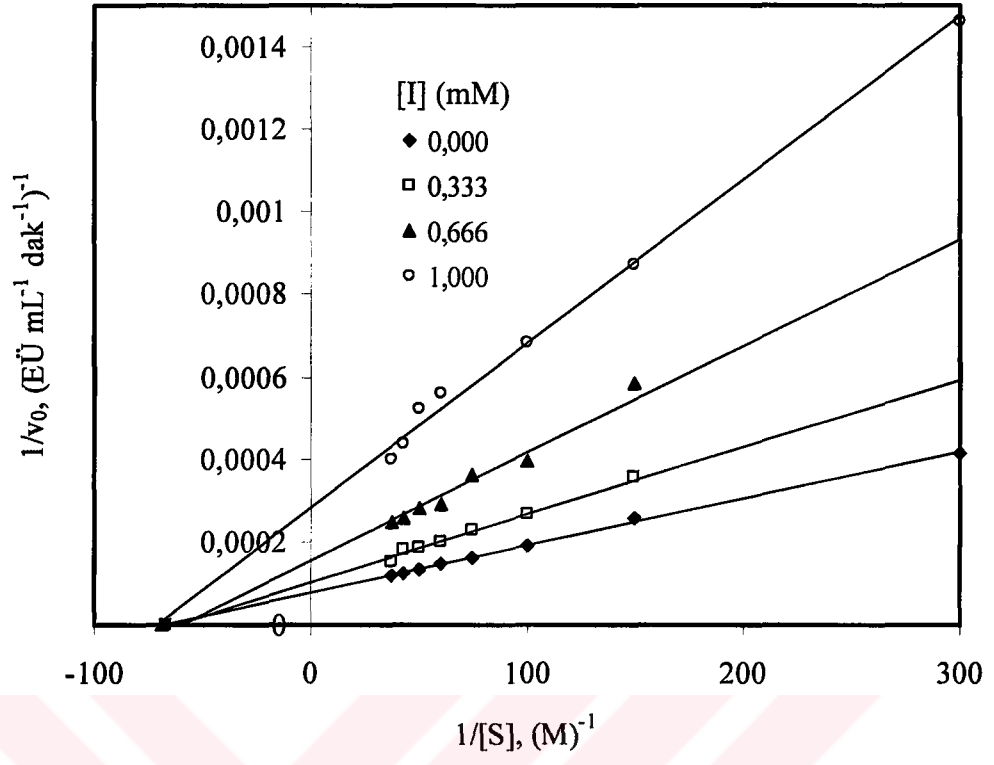
[I] (M) $\times 10^{+4}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+5}$	R^2
-	3,3 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	3592 5736 6256 7263 8480 8896 9974	300 150 120 100 75 60 50	2,78 1,74 1,60 1,38 1,18 1,12 1,00	14749	10,40	-	0,9980
0,33	6,7 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	4578 5325 6003 7093 8114 8588	150 120 100 75 60 50	2,18 1,88 1,67 1,41 1,23 1,16	-	-	8,76	0,9980
0,66	3,3 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	2138 3783 4602 5146 5866 7001 7584	300 150 120 100 75 60 50	4,68 2,64 2,17 1,94 1,70 1,43 1,32	-	-	7,62	0,9980
1,00	5,0 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	2391 2859 3392 4209 5503 5506 6358	200 150 120 100 75 60 50	4,18 3,50 2,95 2,38 1,82 1,82 1,57	-	-	6,51	0,9920



Şekil 3.17 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.18 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

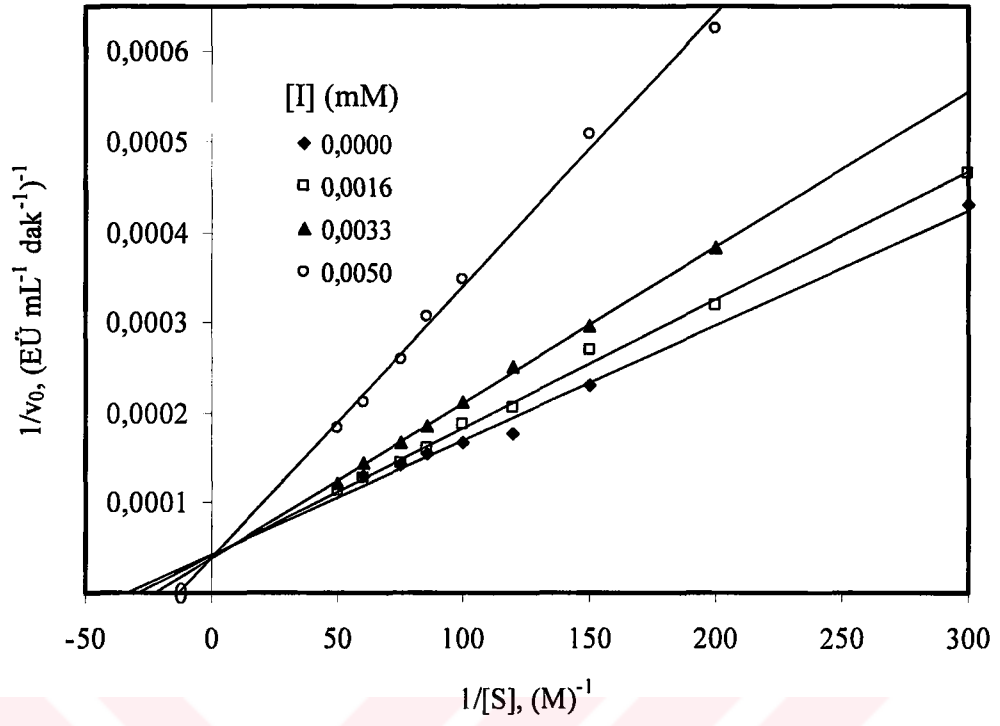
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	3,3 6,7 10,0 13,3 16,7 20,0 23,3 26,7	2420 3901 5297 6239 6769 7466 8098 8514	300 150 100 75 60 50 43 38	4,13 2,56 1,89 1,60 1,48 1,34 1,23 1,17	12944	14,60	-	0,9980
3,33	6,7 10,0 13,3 16,7 20,0 23,3 26,7	2827 3749 4361 4976 5334 5577 6488	150 100 75 60 50 43 38	3,54 2,67 2,29 2,01 1,87 1,79 1,54	-	-	7,55	0,9970
6,66	6,7 10,0 13,3 16,7 20,0 23,3 26,7	1712 2537 2782 3469 3543 3883 4056	150 100 75 60 50 43 38	5,84 3,94 3,59 2,88 2,82 2,58 2,47	-	-	5,13	0,9820
10,0	3,3 6,7 10,0 16,7 20,0 23,3 26,7	683 1147 1462 1784 1909 2301 2506	300 150 100 60 50 43 38	14,64 8,72 6,84 5,61 5,24 4,35 3,99	-	-	3,98	0,9958



Şekil 3.18 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.19 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

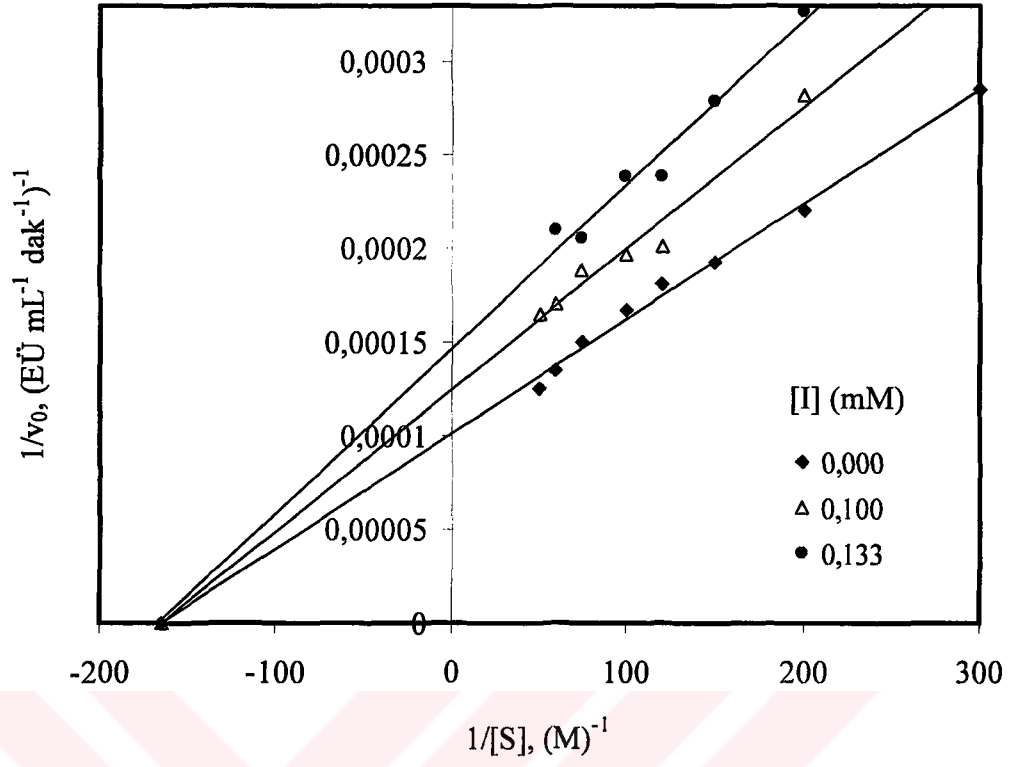
[I] (M) $\times 10^{-6}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-5}$	R^2
-	3,3 6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7	2330 4330 5650 5970 6480 7080 7760	300 150 120 100 86 75 60	4,29 2,31 1,77 1,68 1,54 1,41 1,29	23732	30,20	-	0,9925
1,66	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	2150 3130 3700 4840 5370 6230 6980 7860 8880	300 200 150 120 100 86 75 60 50	4,65 3,19 2,70 2,07 1,86 1,61 1,43 1,27 1,13	-	-	1,48	0,9965
3,33	5,0 6,7 8,3 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	2620 3380 3990 4710 5400 5970 6940 8280	200 150 120 100 86 75 60 50	3,82 2,96 2,51 2,12 1,85 1,68 1,44 1,21	-	-	0,94	0,9989
5,00	5,0 6,7 10,0 11,7 13,3 16,7 20,0	1600 1970 2870 3270 3870 4740 5470	200 150 100 86 75 60 50	6,25 5,08 3,48 3,06 2,58 2,11 1,83	-	-	0,37	0,9945



Şekil 3.19 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.20 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

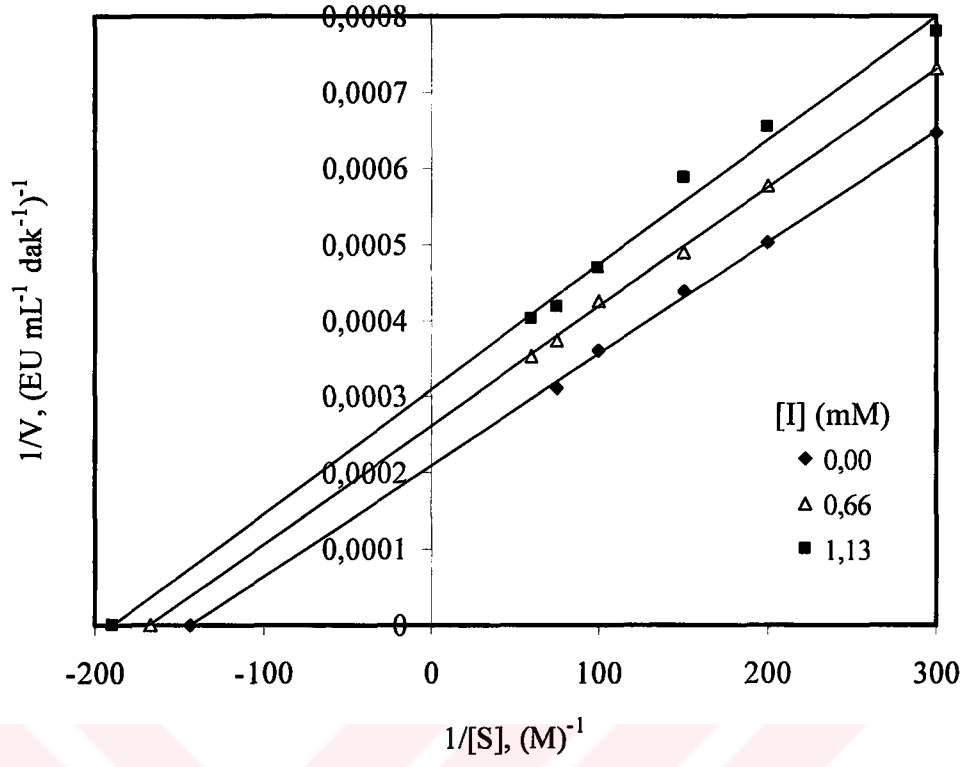
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	3,3 5,0 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	3500 4542 5198 5531 5987 6664 7369 7978	300 200 150 120 100 75 60 50	2,86 2,20 1,92 1,81 1,67 1,50 1,36 1,25	9911	6,10	-	0,9933
1,00	5,0 8,3 10,0 13,3 16,7 20,0	3541 4961 5084 5309 5857 6062	200 120 100 75 60 50	2,82 2,02 1,97 1,88 1,71 1,65	-	-	3,73	0,9925
1,33	5,0 6,7 8,3 10,0 13,3 16,7	3061 3585 4186 4198 4878 4768	200 150 120 100 75 60	3,27 2,79 2,39 2,38 2,05 2,10	-	-	3,65	0,9903



Şekil 3.20 Katekol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 1,4-ditiyoeritrol inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.21 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

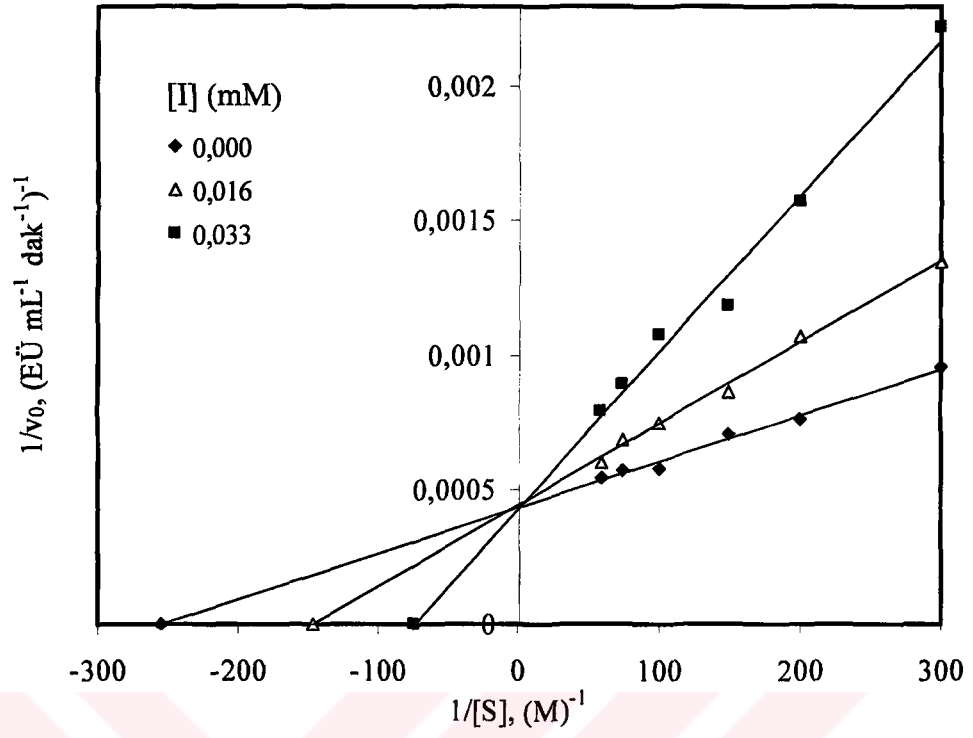
[I] (M) $\times 10^{-3}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-3}$	R^2
-	3,3	1549	300	6,46	4779	6,99	-	0,9990
	5,0	1998	200	5,01				
	6,7	2292	150	4,36				
	10,0	2783	100	3,59				
	13,3	3215	75	3,11				
	16,7	3652	60	2,74				
0,66	3,3	1371	300	7,29	-	-	2,71	0,9990
	5,0	1737	200	5,76				
	6,7	2048	150	4,88				
	10,0	2349	100	4,26				
	13,3	2675	75	3,74				
	16,7	2828	60	3,54				
1,33	3,3	1281	300	7,81	-	-	2,77	0,9940
	5,0	1528	200	6,54				
	6,7	1707	150	5,86				
	10,0	2141	100	4,67				
	13,3	2398	75	4,17				
	16,7	2493	60	4,01				



Şekil 3.21 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.22 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

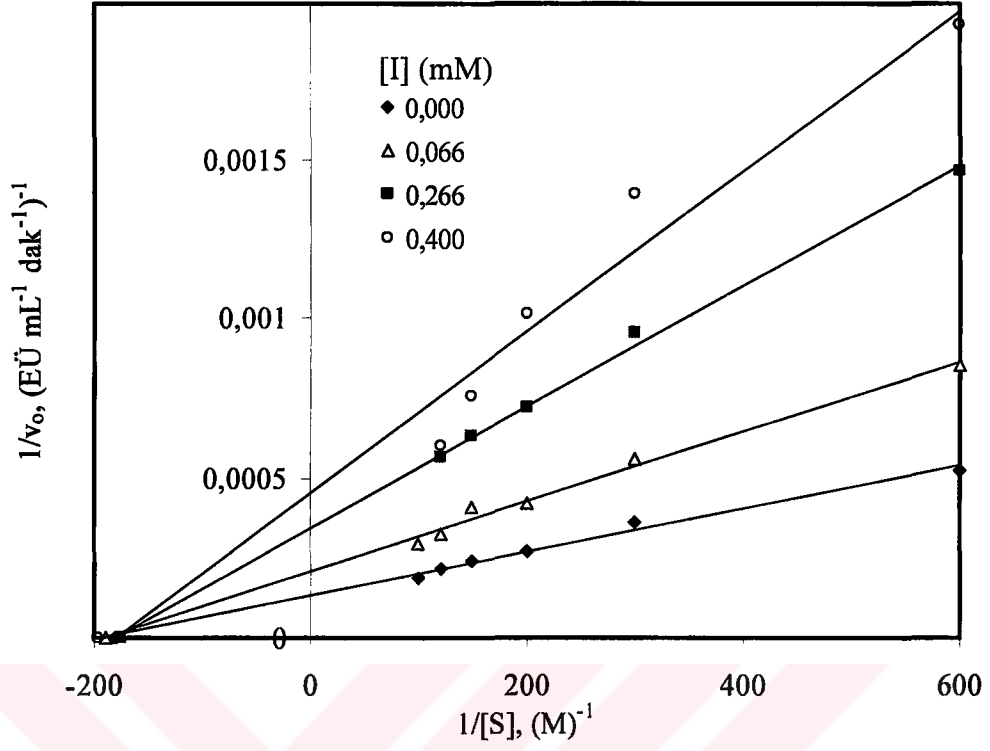
[I] (M) $\times 10^{-5}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-5}$	R^2
-	3,3	1046	300	9,56	2291	3,91	-	0,9970
	5,0	1304	200	7,67				
	6,7	1415	150	7,07				
	10,0	1713	100	5,84				
	13,3	1740	75	5,75				
	16,7	1830	60	5,46				
1,66	3,3	744	300	13,44	-	-	2,20	0,9970
	5,0	933	200	10,72				
	6,7	1155	150	8,66				
	10,0	1331	100	7,51				
	13,3	1456	75	6,87				
	16,7	1654	60	6,05				
3,33	3,3	450	300	22,22	-	-	1,39	0,9920
	5,0	637	200	15,70				
	6,7	848	150	11,79				
	10,0	932	100	10,73				
	13,3	1125	75	8,89				
	16,7	1267	60	7,89				



Şekil 3.22 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.23 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

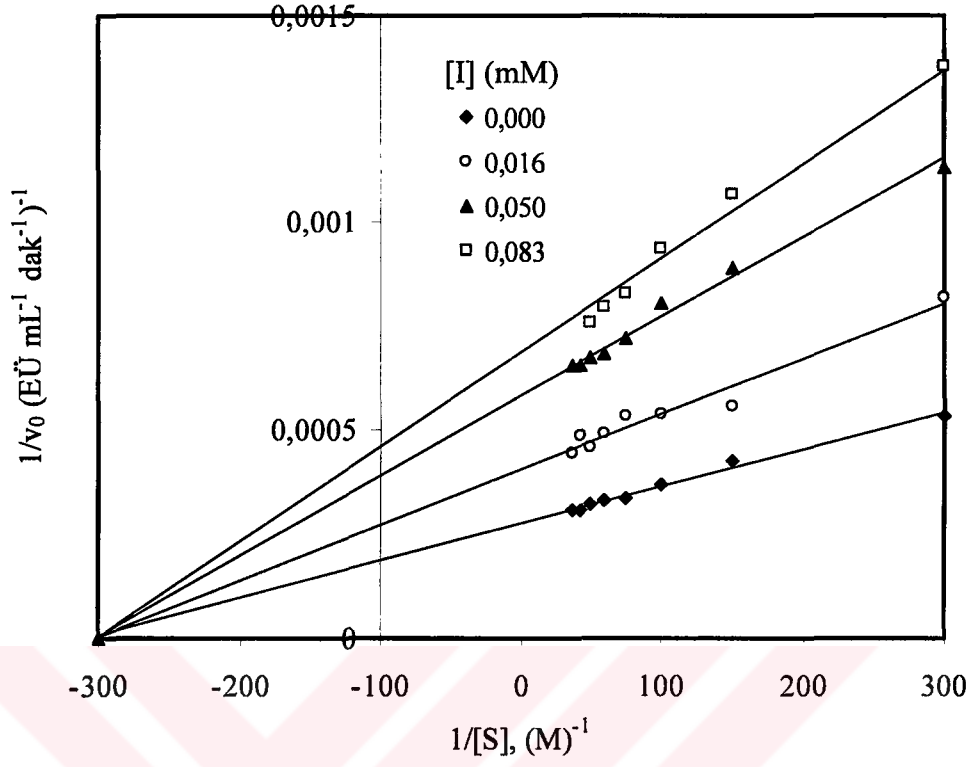
[I] (M) $\times 10^{-4}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-4}$	R^2
-	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1916 2782 3724 4123 4642 5302	600 300 200 150 120 100	5,22 3,59 2,69 2,43 2,15 1,89	7518	5,26	-	0,9920
0,66	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33 10,00	1173 1802 2396 2439 3111 3433	600 300 200 150 120 100	8,53 5,55 4,17 4,10 3,21 2,91	-	-	1,19	0,9920
2,66	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	685 1052 1390 1589 1775	600 300 200 150 120	14,60 9,51 7,19 6,29 5,63	-	-	1,55	0,9970
4,00	1,67 3,33 5,00 6,67 8,33	520 718 989 1324 1675	600 300 200 150 120	19,23 13,93 10,11 7,55 5,97	-	-	1,54	0,9670



Şekil 3.23 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın L-sistein inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.24 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

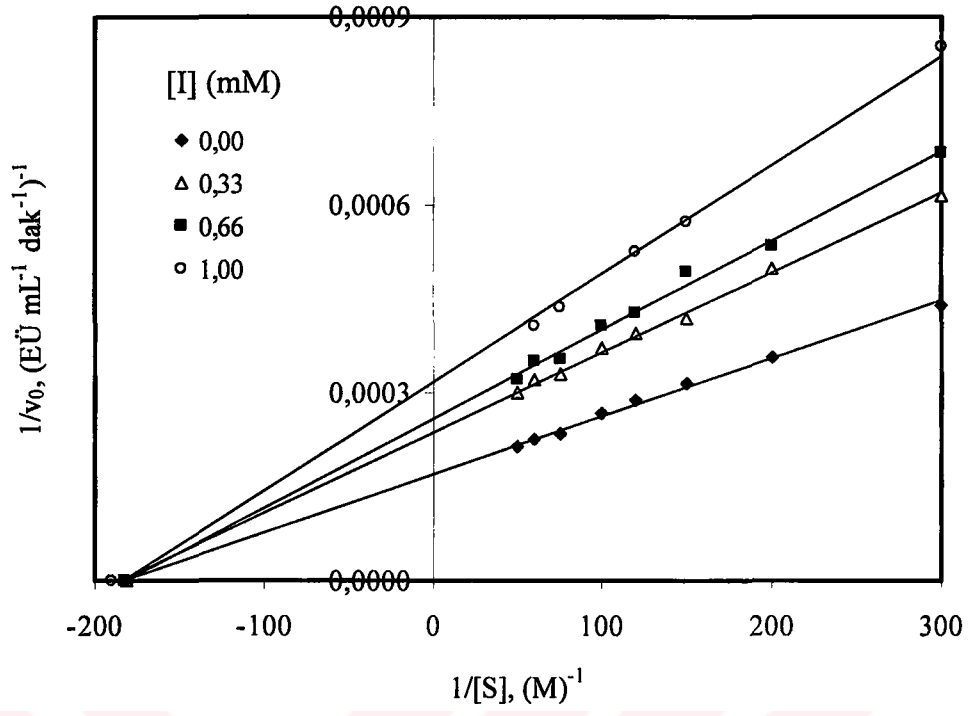
[I] (M) $\times 10^{-5}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-5}$	R^2
-	3,33 6,67 10,00 13,33 16,67 20,00 23,33 26,67	1876 2354 2730 2985 3053 3115 3294 3274	300 150 100 75 60 50 43 38	5,33 4,25 3,66 3,35 3,28 3,21 3,04 3,05	3648	3,24	-	0,9880
1,66	3,33 6,67 10,00 13,33 16,67 20,00 23,33 26,67	1223 1797 1869 1879 2047 2189 2071 2261	300 150 100 75 60 50 43 38	8,18 5,56 5,35 5,32 4,89 4,57 4,83 4,42	-	-	3,35	0,9593
5,00	3,33 6,67 10,00 13,33 16,67 20,00 23,33 26,67	883 1124 1245 1392 1463 1489 1528 1529	300 150 100 75 60 50 43 38	11,33 8,90 8,03 7,18 6,84 6,72 6,54 6,54	-	-	4,32	0,9960
8,33	3,33 6,67 10,00 13,33 16,67 20,00	725 936 1070 1211 1259 1323	300 150 100 75 60 50	13,79 10,68 9,35 8,26 7,94 7,56	-	-	5,17	0,9940



Şekil 3.24 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.25 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

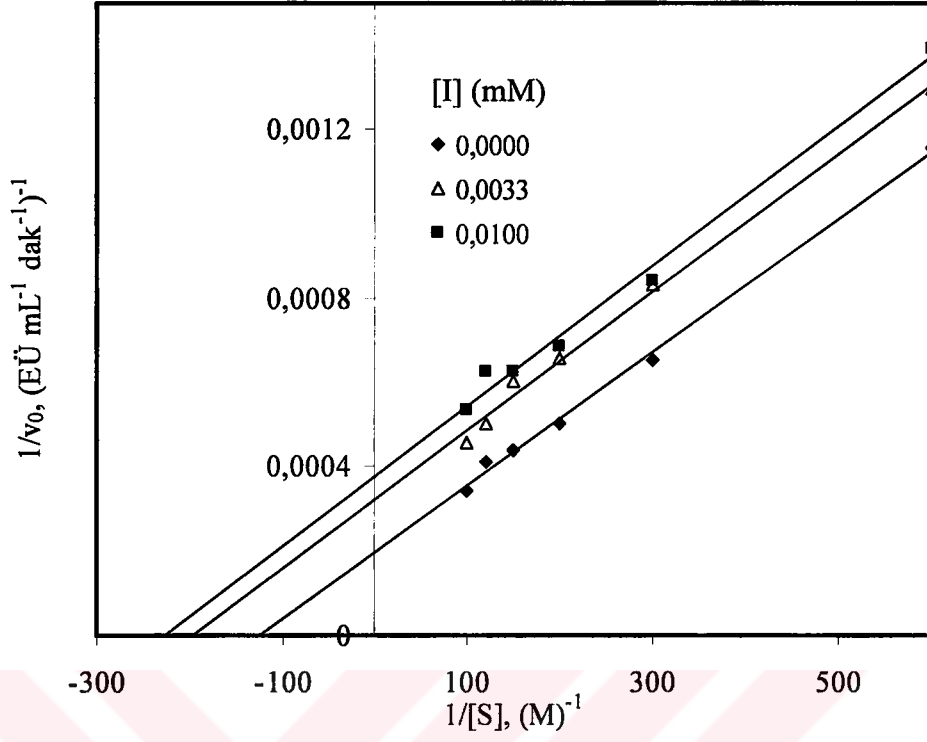
[I] (M) $\times 10^{+3}$	[S] (M) $\times 10^{+3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{+4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+3}$	R^2
-	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	2282 2802 3163 3467 3752 4254 4413 4670	300 200 150 120 100 75 60 50	4,38 3,57 3,16 2,88 2,67 2,35 2,27 2,14	5872	5,46	-	0,9978
0,33	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	1627 2003 2390 2528 2684 3028 3130 3335	300 200 150 120 100 75 60 50	6,15 4,99 4,18 3,96 3,73 3,30 3,19 3,00	-	-	0,91	0,9985
0,66	3,33 5,00 6,67 8,33 10,00 13,33 16,67 20,00	1464 1870 2023 2335 2450 2835 2846 3122	300 200 150 120 100 75 60 50	6,83 5,35 4,94 4,28 4,08 3,53 3,51 3,20	-	-	1,31	0,9967
1,00	3,33 6,67 8,33 13,33 16,67	1175 1743 1898 2294 2458	300 150 120 75 60	8,51 5,74 5,27 4,36 4,07	-	-	1,21	0,9982



Şekil 3.25 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın sodyum azid inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.26 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M) $\times 10^{-5}$	[S] (M) $\times 10^{-3}$	v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ v_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-4}$	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{-5}$	R^2
-	1,67	868	600	11,52	5116	8,09	-	0,9968
	3,33	1539	300	6,50				
	5,00	1988	200	5,03				
	6,67	2294	150	4,36				
	8,33	2425	120	4,12				
	10,00	2915	100	3,43				
0,33	1,67	773	600	12,94	-	-	0,51	0,9940
	3,33	1203	300	8,31				
	5,00	1526	200	6,55				
	6,67	1657	150	6,04				
	8,33	1991	120	5,02				
	10,00	2187	100	4,57				
1,00	1,67	719	600	13,91	-	-	1,09	0,9907
	3,33	1194	300	8,38				
	5,00	1462	200	6,84				
	6,67	1601	150	6,25				
	8,33	1605	120	6,23				
	10,00	1869	100	5,35				



Şekil 3.26 Pirogallol substratı kullanılarak *Ocimum basilicum* L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/v_0-1/[S]$ eğrileri

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği

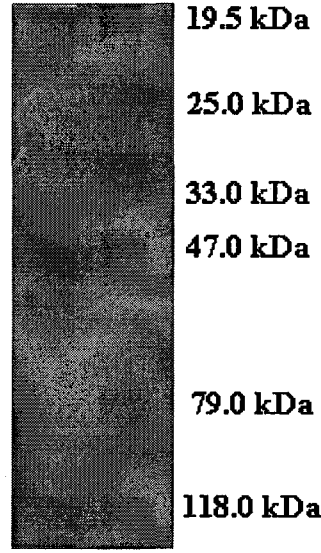
Fenolik maddeler bitki, sebze ve meyvelerin önemli bileşenleridirler. Bu bileşikler hidroliz ya da oksidasyonla kolaylıkla bozunabilirler ve aynı zamanda çeşitli moleküllerle kovalent bağlı ürünler ve kovalent bağlı olmayan kompleksler oluşturabilirler[40]. Genelde toplam fenolik madde içeriği, bitkilerin, meyvelerin ve sebzelerin kararma derecesine çok önemli katkılar yapar ve böylece *Ocimum basilicum* L.'nin kararmasında önemli rol oynarlar. Enzimatik kararma ile fenolik madde içeriği arasındaki ilişki çok sayıda bitkilerle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda toplam fenolik madde içeriğinin elma ve üzüm gibi bazı meyvelerin kararmasına önemli bir katkı yaptığı söylenebilir[41]. Enzimatik kararma substrat seviyesini, enzim aktivitesini, askorbik asit ve diğer inhibitörlerin varlığını yada kararma reaksiyonunu etkileyen faktörler gibi birkaç parametreyi içeren kompleks bir proses olarak göz önüne alınabilir[43]. Bu çalışmada *Ocimum basilicum* L. ekstraktlarındaki toplam fenolik madde içeriğini yaklaşık olarak bitkinin 100 g yaş ağırlığı başına 280 mg olarak bulduk. Taze zerdaçal, brokoli, tomates ve Hint yerelması gibi sebzelerin toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 176, 88, 68 ve 92 mg[42] olarak bulunmuştur. Bu sebzelerin toplam fenolik madde içerikleri *Ocimum basilicum* L.'ninkinden daha düşüktür. Diğer taraftan, nane (400 mg), havuç (350 mg), soğan (349 mg), pancar (323 mg)[42]ve enginar (425 mg)[43] gibi sebzelerin toplam fenolik madde içerikleri ise *Ocimum basilicum* L. için elde edilmiş değerden daha büyüktür. Bu sonuçlara göre *Ocimum basilicum* L.'nin fenolik madde içeriği bakımından zengin olduğu söylenebilir.

4.2 Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Çizelge 4.1, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının saflaştırma basamaklarını göstermektedir. Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi sonuçta polifenol oksidaz 11,5 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış polifenol oksidaz enzimi sodyumdodesilsülfat-poliakrilamitjel elektroforezinde tek band olarak elde edilmiş ve bu enzimin molekül ağırlığı protein kiti kullanılarak tayin edilmiştir. Şekil 4.1'den görüldüğü gibi *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının molekül ağırlığı 54 kDa olarak belirlenmiştir. Literatürde belirtilmiş bazı türlerin molekül ağırlıkları ise 59 kDa (*Vicia faba* L.)[44], 53 kDa (hurma)[27], 58 kDa (mantar)[45], 56 kDa (marul)[46], 72 kDa (çay)[47], 42 kDa (ayçiçeği)[48], 65 kDa (elma)[49,50], 41 ve 62±2 kDa (muz)[51], 39 kDa (kabak)[52], 120±3 kDa (fasulye)[53], 57 kDa (enginar)[43]'dir. Deneysel sonuçlar *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının molekül ağırlığının *Vicia faba* L., hurma, mantar, enginar ve marul polifenol oksidazının molekül ağırlığına yaklaşık olarak eşit olduğunu fakat çay, ayçiçeği, elma, muz, kabak ve fasulyeninkinden farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının saflaştırılması

Ekstraksiyon türü	Ekstrakt	Protein	Aktivite	Spesifik aktivite	Saflaştırma
	hacmi (mL)	konsantrasyonu ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(EÜ mL^{-1})	(EÜ μg^{-1} protein)	derecesi
Ham ekstrakt	75,0	693,0	3695	5,33	---
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	12,2	2265,0	7619	3,36	0,6
Diyaliz	12,1	1831,0	9438	5,15	1,5
Afinite	2,4	8,9	530	59,46	11,5



Şekil 4.1. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için SDS-PAGE

4.3 Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliği

Ocimum basilicum L. polifenol oksidazının substrat spesifikliğini belirlemek için mono-, di- ve trifenolik substratlar test edildi. 4-metilkatekol ve katekol gibi difenolik ve pirogallol gibi trifenolik substratlar, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı ile önemli bir şekilde oksitlenirken L-tirozin gibi monofenolik substrata karşı herhangi bir aktivite göstermedi. Mantar, patates, fasulye gibi bazı bitki polifenol oksidazları hem monofenollerin hidroksilasyonunu ve hemde difenollerin oksidasyonunu katalizler. Bununla birlikte birçok polifenol oksidaz monofenol oksidaz aktivitesi göstermez[54]. Enginar ve kayısı gibi çeşitli kaynaklardan elde edilmiş enzimlere benzer olarak *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı incelenmiş substratlar için difenolaz ve trifenolaz aktivite göstermektedir[18,43,55]. Difenolik ve trifenolik substratlar için substrat doygunluk eğrileri *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının basit Michaelis–Menten eğrileri sergilediğini göstermektedir (eğriler gösterilmemiştir). Her bir substratın çeşitli konsantrasyonları için ölçülmüş reaksiyon hızlarının kinetik analizleri için Lineweaver-Burk denklemi kullanıldı ve bu denklemin eğiminden ve ekstrapolasyonundan V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı. Bu sabitleri belirlemek için kullanılan doğruların regrasyon sabitleri Çizelge 4.2’de verilmektedir. Substrat spesifikliği, katalizleme gücü olarak bilinen V_{max}/K_m oranına göre belirlendi[33]. İncelenmiş substratlar için K_m değerleri 1,62–3,42 mM

aralığındadır. Bu çalışmada *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için elde edilmiş K_m değerleri, substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak Amasya elması için elde edilmiş 3,1 mM[56], çilek için elde edilmiş 2,71 mM[32] ve elma için elde edilmiş 4,0 mM[57] değerlerine; substrat olarak katekol kullanılarak Yali şeftalisi için elde edilen 5,5 mM[58] ve kayısı için elde edilen 6,6 mM değerlerine[55]; ve substrat olarak pirogallol kullanılarak enginar için elde edilen 5,2 mM[43], kekik için elde edilen 5,5 mM[36] ve Yali şeftalisi için elde edilen 2,6 mM[58] değerlerine benzerdir. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için elde edilen K_m değerleri substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak kekik için elde edilen 9,8 mM[36] ve enginar için elde edilen 11,6 mM[43] değerlerinden; substrat olarak katekol kullanılarak Amasya elması için elde edilen 34 mM[59], elma için elde edilen 180 mM[57], kekik için elde edilen 18 mM[33], kabak için elde edilen 682,5 mM[21] ve Stanley eriği için elde edilen 20 mM[59] değerlerinden; ve substrat olarak pirogallol kullanılarak çay yaprağı için elde edilen 17,8 mM[60], Amasya elması için elde edilen 27 mM[56], kabak için elde edilen 15,4 mM[21] ve ıspanak için elde edilen 15,7 mM[61] değerlerinden daha düşüktür. Daha düşük K_m değerinden dolayı 4-metilkatekol, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı tarafından en yüksek hızda oksitlenmektedir. Pirogallol substratı ile karşılaştırıldığında 4-metilkatekol, yaklaşık iki kat daha düşük bir K_m değerine sahiptir. Bu çalışmada 4-metilkatekol *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için en iyi substrat iken katekol en zayıf substrattır. Yine katalitik güç olarak adlandırılan V_{max}/K_m oranı, 4-metilkatekolün, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için en uygun fenolik substrat olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.2). Benzer sonuçlar Doğan ve arkadaşları tarafından patlıcan[18] ve Dinçer ve arkadaşları tarafından muşmula[62] için bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlar 4-metilkatekol ve katekol gibi *o*-difenollerin çeşitli kaynaklardan elde edilen difenolazlar için en etkin substratlar olduğunu gösteren önceki çalışmalarla uyum içindedir[18,43,62].

Çizelge 4.2. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının substrat spesifikliği

Substratlar	V_{max} (EÜ dak ⁻¹)	K_m (mM)	R^2	V_{max}/K_m (EÜ dak ⁻¹ mM ⁻¹)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
4-metilkatekol	11586	1,62	0,9927	7143	20	6
Katekol	6941	2,77	0,9975	2500	40	8
Pirogallol	10369	3,42	0,9949	3030	50	9

4.4 Optimum pH

Ortamın pH değeri enzim aktivitesini önemli bir şekilde etkilemektedir. Artan pH değeri ile enzim aktivitesi ilk önce bir maksimum değere erişir ve daha sonra bazik bölgede sıfır değerine doğru azalır. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için optimum pH değerleri, 4-9 aralığında belirlendi. Şekil 3.2, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için pH optimum eğrilerini göstermektedir. Genelde *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı 4-metilkatekol durumunda geniş bir pH aralığında aktivite göstermesine rağmen maksimum aktivite pH 6'da gözlenmektedir. Katekol ve pirogallol durumunda maksimum enzim aktivitesi dar bir pH aralığında gözlenmektedir. Katekol için optimum pH 8 iken pirogallol için 9'dur. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının 4-metilkatekol ile daha etkin bir şekilde etkileştiği ve diğer iki substrattın aksine çok daha düşük pH değerlerinde 4-metilkatekolün oksidasyonunu katalizlediği sonucunu çıkarabiliriz. Ekstraksiyon metoduna, ölçüm için kullanılmış substratlara ve bitki hücrelerinde enzimin lokalizasyonuna bağlı olarak optimum pH'nın çeşitli bitki kaynakları arasında değişebileceği belirtilmektedir[63]. Literatürde çeşitli kaynaklardan elde edilmiş polifenol oksidazlar için farklı optimum pH değerleri rapor edilmektedir. Örneğin, substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak çilek için 4,5[32], patlıcan için 6,0[18], kuşburnu için 8,5[64] ve enginar için 5,0[43] optimum pH değerleri; substrat olarak katekol kullanılarak çilek için 5,5[32], DeChaunac üzümü için 6,0[65], Amasya elması[55], *Anethum graveolens* L. [65] ve patlıcan için 7,0[18], *Allium* sp. için 7,5[8], kuşburnu için 8,5[64] ve enginar için 7,0[43] optimum pH değerleri; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında kuşburnu için 7,0[64], Amasya elması için 8,6[55] ve enginar için 8,0[43] optimum pH değerleri elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalardan polifenol oksidaz enzimleri için optimum pH'nın enzimin kaynağına ve kullanılmış substrata bağlı olarak değiştiği görülmektedir[67].

4.5 Optimum Sıcaklık

Şekil 3.3, farklı substratlar için *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimini göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı, 10 ile 60 °C aralığında aktivite göstermektedir.

Ocimum basilicum L. polifenol oksidazının optimum sıcaklık değeri kullanılan substratlara bağlı olarak değişmektedir. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20, 40 ve 50 °C olarak belirlendi. Benzer sonuçlar substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında dut[68] ve kuşburnu[64] için, ve substrat olarak katekol kullanıldığında kekik[33] için bulunmuştur. Deneysel sonuçlar *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının optimum sıcaklık değerinin kullanılmış substrata bağlı olduğunu göstermektedir. Literatürde muşmula polifenol oksidazı için en yüksek aktivitenin sırasıyla katekol ve 4-metilkatekol substratları kullanıldığında 55 ve 35 °C[62]; ve kuşburnu polifenol oksidazı için en yüksek aktivitenin katekol substratı kullanıldığında 25 °C olduğu belirtilmektedir[64].

4.6 Termal İnaktivasyon

Şekil 3.4'den görüldüğü gibi *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlarının varlığında tipik bir sıcaklığa bağlı inaktivasyon eğrisi sergilemektedir. Enzim, pH 6,5'de 60 dakika farklı sıcaklıklarda inkübe edildi ve soğutulduktan sonra geri kalan enzim aktivitesi, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlendi. Kullanılmış substratlar için *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı benzer davranış sergiledi. Tüm substratlar için enzim aktivitesi artan sıcaklık ve inaktivasyon zamanı ile enzimin ısıl denatürasyonundan dolayı azaldı. Enzimin 35 °C'de incelenmiş zaman aralığında oldukça kararlı olduğu ve 60 dakikalık zaman periyodunda aktivitesini koruduğu gözlemlendi. İncelenmiş üç substrat için enzim aktivitesi 55 ve 75 °C'lerde artan inaktivasyon zamanı ile azaldı. Enzim aktivitesi 55 °C'de 30 dakikalık inkübasyon zamanının sonunda yaklaşık % 50 oranında ve 75 °C'de, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için sırasıyla, 55, 80 ve 70 oranında azalma gösterdi. Bu enzimin daha yüksek sıcaklıklarda hızlı bir şekilde denatüre olduğunu göstermektedir. İlave inkübasyon zamanı, 55 ve 75 °C'de enzimin termal kararlılığını etkiledi. 55 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda difenolaz aktivitesi enzimin ısıl denatürasyonundan ya da artan sıcaklıkla enzimin üçlü yapısında meydana gelen konformasyonel değişimlerden dolayı azalmaktadır[67]. Deneysel bulgular *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının ısıya duyarlı olduğunu göstermektedir. Literatürde

çeşitli kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların ısıya duyarlılığı bitkinin olgunluğuna ve enzimin farklı moleküler formlarına bağlı olabileceği rapor edilmektedir[69].

4.7 Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu, katalitik yada düzenleyici merkezler olarak adlandırılan bölgelere inhibitörlerin spesifik olarak bağlanması sonucu enzim aktivitesinin azaltılması yada yok edilmesi olayı olarak tanımlanabilir. Pek çok madde substratın bağlanmasını ve/veya turnover sayısını etkileyen bir yolla enzime bağlanarak enzimin aktivitesini değiştirir. Bu yolla enzimin aktivitesini azaltan maddeler inhibitörler olarak bilinir. Enzim aktivitesindeki azalmaya sıcaklık, pH, iyon şiddeti, çözücünün polaritesi de önemli katkı yapar. Böyle etkiler enzim inhibisyonu olarak düşünülmez ve gözlenmiş inhibisyonun nedeni olarak dikkate alınmazlar. Spesifik bir inhibitörün enzime bağlanma şekli elde edilmiş verilerin yorumlanmasında çok önemlidir. Çoğu inhibitörler enzime veya enzim-substrat kompleksine 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. Birçok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzeyen maddelerdirler. Bu maddeler substratla karşılaştırıldığında ya hiç reaksiyon vermezler ya da çok yavaş reaksiyon verirler[11].

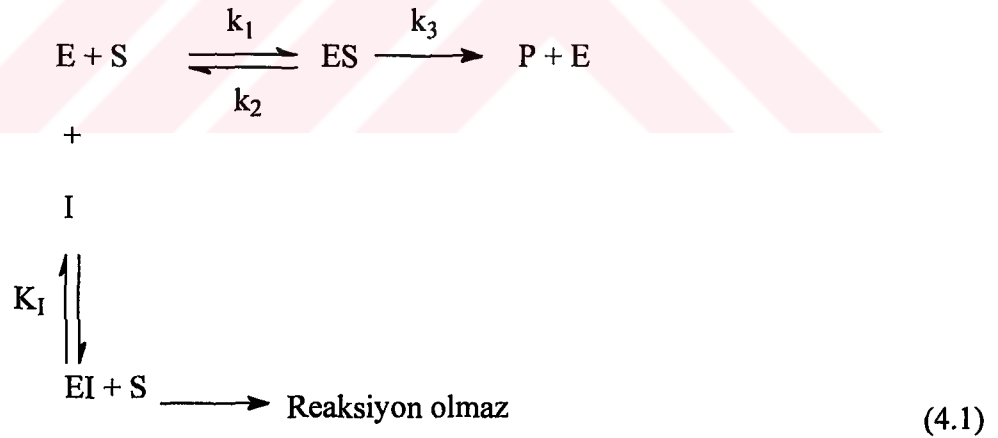
Meyve, sebze ve bitkilerin enzimatik kararması, oksijen ve fenolik bileşikler gibi bazı maddeleri gidererek ya da polifenol oksidaz inhibitörleri kullanılarak tamamen giderilebilir ya da elimine edilebilir. Proses süresince meyve, sebze ve bitkilerden oksijenin tam eliminasyonu mümkün değildir. Çünkü oksijen her zaman ortamda mevcut olarak bulunmaktadır[70]. Enzimatik kararmanın inhibisyonu, i.) polifenol oksidazın inaktivasyonunun, ii.) substratlardan birinin eliminasyonunun (O_2 yada polifenoller) ve iii.) sekonder reaksiyonlarda renkli ürünlerin oluşumunu inhibe etmek için enzimin reaksiyon ürünleri üzerine inhibitörlerin hareketinin bir sonucu olabilir[71].

4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak kısmen saflaştırılmış *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidaz enziminin aktivitesine L-

sistein, EDTA, askorbik asit, gallik asit, 1,4-ditiyoeritrol, tropolon, glutasyon, sodyum azid, benzoik asit, salisilik asit ve 4-aminobenzoik asit gibi çeşitli inhibitörlerin etkileri belirlendi. Deneysel sonuçlar EDTA, salisilik asit ve benzoik asitin *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidaz aktivitesini inhibe etmediğini gösterdi. Daha önceki araştırmacılar inhibitör reaksiyon mekanizmasının kullanılan indirgeyici reaktife, kullanılmış polifenol oksidazın kaynağına ve kullanılan substrata bağlı olarak farklı olabileceğini belirtmektedirler[72]. Spesifik bir inhibitör ile enzimatik kararmanın önlenmesi tek bir mekanizmayı içerebilir ya da iki veya daha fazla inhibitör mekanizmasının bir sonucu olarak meydana gelebilir. Enzim inhibitörlerinin etkin olarak rol oynadığı çeşitli mekanizmalar vardır. Enzim inhibisyonu için en önemli üç kinetik model yarışmalı inhibisyon, yarı-yarışmalı inhibisyon ve karışık-tür inhibisyonudur[17].

4.7.1 Yarışmalı İnhibisyon

Yarışmalı inhibisyon için genel şema aşağıdaki reaksiyon ile verilebilir:



Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eşitliği aşağıdaki gibi verilebilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}
 \quad (4.2)$$

Burada

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (4.3)$$

(4.2) eşitliğine göre $1/v_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı eğrisi eğimi $\alpha K_M / V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{\max}$ olan düz bir doğru verecektir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için (4.2) eşitliği, $1/v_0$ ekseninde $1/V_{\max}$ kayımına sahiptir. Bu, diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur. Bu tür inhibisyonda büyük miktarlarda substrat inhibitörle yer değiştirdiğinde inhibisyon türü değişmez. Sadece Michaelis-Menten sabiti inhibisyondan etkilenir[17]. İki yada üç farklı inhibitör konsantrasyonunun varlığında çeşitli substratların değişen en az 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidaz enzimi için Lineweaver-Burk eğrileri Bulgular kısmında verilmektedir. Şekil 3.5-3.26 ve Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'den görüldüğü gibi, substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında glutatyon, L-sistein, tropolon, askorbik asit, 1,4-ditiyoeritrol ve sodyum azid inhibitörleri için; substrat olarak katekol kullanıldığında glutatyon, L-sistein, tropolon, askorbik asit ve gallik asit inhibitörleri için, ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında askorbik asit inhibitörü için inhibisyon türünü yarışmalı inhibisyon olarak bulduk. Yarışmalı inhibisyon türlerini gösteren şekillerden de görüldüğü gibi bu tür inhibisyonda V_{\max} değeri değişmezken K_m değeri artmaktadır. Bu sonuç yarışmalı inhibisyona özgü olduğundan *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı ile katalizlenen inhibitör ve substrat arasındaki reaksiyonun yarışmalı inhibisyon olduğunu söyleyebiliriz. Yukarıdaki sonuçlardan inhibisyon türünün kullanılan substrata bağlı olarak değiştiği söylenebilir. Benzer sonuçlar substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında L-sistein, 1,4-ditiyoeritrol ve sodyum azid inhibitörleri ile *Cynara scolymus* L. polifenol oksidaz enzimi için[43]; substrat olarak katekol kullanıldığında L-sistein, 1,4-ditiyoeritrol ve askorbik asit inhibitörleri ile fasulye tohumu polifenol oksidazı[53], L-sistein, tropolon, 1,4-ditiyoeritrol ve askorbik asit inhibitörleri ile *Cynara scolymus* L. polifenol oksidaz enzimi, tropolon inhibitörü ile patates polifenol oksidaz enzimi[73], glutatyon ve L-sistein inhibitörleri ile dut polifenol oksidaz enzimi için[68]; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında L-sistein, tropolon, 1,4-

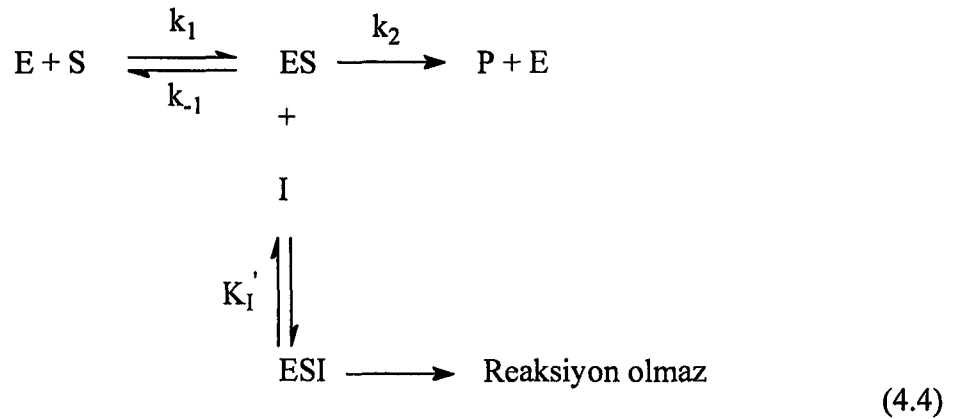
ditiyoeritrol, askorbik asit ve sodyum azid inhibitörleri ile *Cynara scolymus* L. polifenol oksidaz enzimi için[43] bulunmuştur. Ayrıca, Jonavitz-Klapp ve arkadaşları substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak polifenol oksidaz enzimi üzerine bazı karboksilik asitlerin inhibisyonunun yarışmalı inhibisyon olduğunu buldular[74]. Yine bu çalışmada kullanılmış inhibitörler için yüzde inhibisyon ve K_i değerleri 4-metilkatekol için Çizelge 4.3, katekol için Çizelge 4.4 ve pirogallol için Çizelge 4.5’de verilmektedir. Bu tür inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif merkezine bağlanmak için enzimin substratı ile yarışır. Enzimin aktif bölgesine ya substrat ya da inhibitör bağlanır. Her ikisinde birlikte bağlanması mümkün değildir. Bu tür inhibisyonda inhibitör yapı itibarı ile substrata benzediğinden substratın aktif bölgeye bağlanması önlenmiş olur. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör, substratın bağlanması için mevcut olan serbest enzimin konsantrasyonunu azaltacak şekilde hareket eder. Bu tür inhibisyonda substrat konsantrasyonu arttırılırsa inhibitörün etkisi yok edilebilir[17]. Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5’de *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı için verilen yarışmalı inhibisyon sabitleri (4.2) eşitliği ile deneysel verilerin fit edilmesi sonucunda elde edildi.

İnhibitörün reaksiyon mekanizması, kullanılmış indirgeyici reaktife bağlı olarak farklı olabilmektedir. L-sisteinin inhibisyon hareketi oldukça komplekstir. L-sistein fenolik bileşiklerle başka maddeler oluşturur. Bu bileşiklerin bazılarının yapısı oldukça iyi bilinmektedir. Örneğin, 5-S-sisteinil-3,4-dihidroksitoluen, 4-metilkatekolden; 2-S-sisteinilklorogenik asit, klorogenik asitten oluşturulmaktadır. Bu maddeler kinonlarla non-enzimatik oksidasyon reaksiyonları kadar, enzimatik oksidasyon reaksiyonlarına da katılırlar. Sisteinin etki derecesinin ve inhibisyon türünün, inhibitörün doğasından başka aktiviteyi belirlemek için kullanılan metoda da bağlı olduğu bulunmuştur[11]. Askorbik asit polifenol oksidaz tarafından oluşturulmuş kinonları tekrar polifenollere indirger. Böylece askorbik asit enzimatik kararmanın önlenmesi için sadece geçici bir durum sağlar. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında enzimin inaktivasyonuna da neden olmaktadır[71]. Tiyol bileşikleri ile inhibisyon, ya kinonlarla ilave bir reaksiyon sonucunda oluşan kararlı renksiz ürünlerle ya da metabisülfid gibi polifenol oksidazın aktif merkezine bağlanma ile gerçekleşir[53]. Benzoik asit türevleri ile polifenol oksidaz enziminin inhibisyonu daha önce birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir

ve -COOH grubu direk olarak benzen halkasına bağlandığında daha fazla inhibisyonun meydana geldiği bulunmuştur. Bununla birlikte inhibisyon türünün kullanılmış substrata ve enzime bağlı olarak yarışmalı, yarı-yarışmalı ya da karışık-tür olabileceği bulunmuştur. İnhibisyon türü ne olursa olsun, asit inhibitör, aktif noktadan farklı bir noktaya tutunur ve substratın enzime bağlanmasını sterik engeller vasıtasıyla ya da protein konformasyonundaki değişmelerle engeller[75]. Bakır içeren bir metalo enzime sodyum azidin toksitesi esas olarak enzimin aktif bölgesindeki metal ile güçlü koordinasyon kabiliyetinden dolayıdır. Bakır amin oksidaz ve azid arasındaki reaksiyonda muhtemelen tirozinin bakıra bağlanması engellenir. Bu olay, bu ana ara ürünün oluşumunu önler ve oksidaz aktivitesini inhibe eder[76]. Glutasyon doğrudan enzimi etkilemez ve oksijen ile oksitlenmiş olan fenole bağlı olarak ya uyarılır ya da inhibe edilir[11].

4.7.2 Yarı-Yarışmalı İnhibisyon

Yarı yarışmalı inhibisyonunda 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 aşağıdaki reaksiyonla gösterilebilir:



Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eşitliği aşağıdaki denklem ile verilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}} \quad (4.5)$$

Burada,

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (4.6)$$

Çizelge 4.3 4-metilkatekol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşiti

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon çeşidi	R^2	% inhibisyon
Glutasyon	$6,66 \times 10^{-5}$	$0,48 \times 10^{-4}$	Karışık	0,9994	6
	$1,33 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^{-4}$		0,9982	16
L-sistein	$3,33 \times 10^{-5}$	$4,72 \times 10^{-5}$	Yarışmalı	0,9992	21
	$6,66 \times 10^{-5}$	$3,71 \times 10^{-5}$		0,9983	42
Tropolon	$1,66 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$	Yarışmalı	0,9980	9
	$3,33 \times 10^{-6}$	$1,46 \times 10^{-6}$		0,9990	22
	$5,00 \times 10^{-6}$	$1,44 \times 10^{-6}$		0,9990	27
1,4-ditiyoeritrol	$1,66 \times 10^{-3}$	$2,31 \times 10^{-3}$	Yarışmalı	0,9985	10
	$2,50 \times 10^{-3}$	$1,47 \times 10^{-3}$		0,9949	18
4-aminobenzoik asit	$0,66 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-4}$	Yarışmasız	0,9993	20
	$1,33 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-4}$		0,9962	26
Askorbik asit	$3,33 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-4}$	Yarışmalı	0,9985	14
	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-4}$		0,9990	28
	$1,33 \times 10^{-4}$	$9,66 \times 10^{-5}$		0,9991	58
Gallik asit	$3,33 \times 10^{-5}$	$6,35 \times 10^{-5}$	Yarı-yarışmalı	0,9959	17
	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-4}$		0,9978	24
Sodyum azid	$3,33 \times 10^{-5}$	$5,26 \times 10^{-4}$	Yarışmalı	0,9989	3
	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-4}$		0,9990	18
	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-4}$		0,9818	42

Çizelge 4.4 Katekol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşidi

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon çeşidi	R^2	% inhibisyon
Glutasyon	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-4}$	Yarışmalı	0,9864	07
	$1,33 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-4}$		0,9982	24
	$2,00 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$		0,9929	45
L-sistein	$3,33 \times 10^{-5}$	$8,76 \times 10^{-5}$	Yarışmalı	0,9980	14
	$6,66 \times 10^{-5}$	$7,62 \times 10^{-5}$		0,9980	24
	$1,00 \times 10^{-4}$	$6,51 \times 10^{-5}$		0,9920	37
Tropolon	$1,66 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-5}$	Yarışmalı	0,9965	18
	$3,33 \times 10^{-6}$	$9,39 \times 10^{-6}$		0,9989	40
	$5,00 \times 10^{-6}$	$3,66 \times 10^{-6}$		0,9945	60
1,4-dithiyoeritrol	$1,00 \times 10^{-4}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Yarışmasız	0,9925	25
	$1,33 \times 10^{-4}$	$3,05 \times 10^{-4}$		0,9903	33
4-aminobenzoik asit	$6,66 \times 10^{-5}$	$5,59 \times 10^{-5}$	Yarı-yarışmalı	0,9980	38
	$1,00 \times 10^{-4}$	$4,57 \times 10^{-5}$		0,9940	53
	$1,33 \times 10^{-4}$	$4,65 \times 10^{-5}$		0,9980	61
Askorbik asit	$6,66 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-4}$	Yarışmalı	0,9979	05
	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-4}$		0,9971	18
	$2,00 \times 10^{-4}$	$1,28 \times 10^{-4}$		0,9975	30
Gallik asit	$3,33 \times 10^{-5}$	$3,63 \times 10^{-5}$	Yarışmalı	0,9970	28
	$5,00 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-5}$		0,9980	57
	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,79 \times 10^{-5}$		0,9690	61
Sodyum azid	$3,33 \times 10^{-4}$	$7,55 \times 10^{-4}$	Yarışmasız	0,9970	29
	$6,66 \times 10^{-4}$	$5,13 \times 10^{-4}$		0,9820	53
	$1,00 \times 10^{-3}$	$3,98 \times 10^{-4}$		0,9958	74

Çizelge 4.5 Pirogallol substratı kullanılarak farklı inhibitörler ile elde edilmiş polifenol oksidazın K_i değerleri ve inhibisyon çeşiti

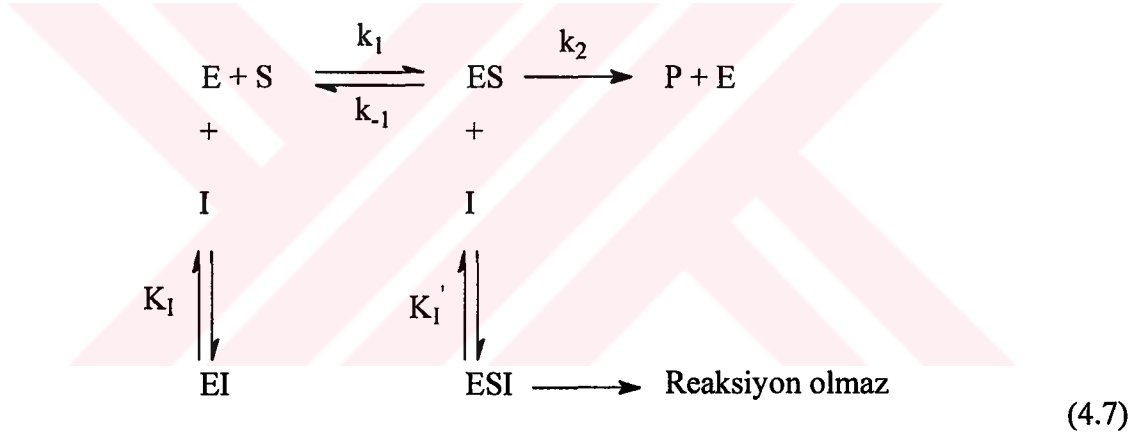
İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon çeşidi	R^2	% inhibisyon
Glutasyon	$1,66 \times 10^{-5}$	$3,35 \times 10^{-5}$	Yarışmasız	0,9593	31
	$5,00 \times 10^{-5}$	$4,32 \times 10^{-5}$		0,9960	54
	$8,33 \times 10^{-5}$	$5,17 \times 10^{-5}$		0,9940	58
L-sistein	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-4}$	Yarışmasız	0,9920	33
	$2,66 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$		0,9970	62
	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-4}$		0,9670	64
Tropolon	$3,33 \times 10^{-6}$	$5,10 \times 10^{-6}$	Yarı-yarışmalı	0,9940	25
	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,24 \times 10^{-5}$		0,9969	36
4-aminobenzoik asit	$6,66 \times 10^{-4}$	$2,71 \times 10^{-3}$	Yarı-yarışmalı	0,9990	23
	$1,33 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-3}$		0,9940	32
Askorbik asit	$1,66 \times 10^{-5}$	$2,20 \times 10^{-5}$	Yarışmalı	0,9970	29
	$3,33 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-5}$		0,9920	57
Sodyum azid	$3,33 \times 10^{-4}$	$9,10 \times 10^{-4}$	Yarışmasız	0,9990	29
	$6,66 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-3}$		0,9980	34
	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-3}$		0,9890	43

Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi K_M/V_{max} ve ekstrapolasyonu α'/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, inhibitör enzimin katalitik fonksiyonunu etkiler ancak substrata bağlanmasını etkilemez[17]. Bulgular kısmındaki Şekillerden ve Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'den görüldüğü gibi substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında gallik asit inhibitörü ile; substrat olarak katekol kullanıldığında 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında 4-aminobenzoik asit ve tropolon inhibitörleri ile polifenol oksidazın inhibisyonunun yarı-yarışmalı olduğunu bulduk.

Arslan ve arkadaşları substrat olarak katekol kullanarak p-aminobenzensulfonamid ve sulfosalisalik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarı-yarışmalı olduğunu buldular[68]. Ayrıca mantar polifenol oksidazı için substrat olarak L-tirozin ve L-DOPA kullanılarak agartinin yarı-yarışmalı inhibisyon sergilediği bulunmuştur. Yine mantar polifenol oksidazı için substrat olarak katekol ve pirogallol kullanıldığında 2,3-diaminopropionik asidin yarı-yarışmalı bir inhibisyon sergilediği Arslan ve Doğan tarafından bulunmuştur[38].

4.7.3 Karışık-Tür İnhibisyon

İnhibitör, hem enzim ve hemde enzim-substrat kompleksine bağlandığından aşağıdaki reaksiyon yazılabilir:



Burada hem EI ve hemde ESI, enzimin inaktif kompleksleridir. Karışık-tür inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (4.8)$$

Bu eşitliğin eğrisi eğimi $\alpha K_m/V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu α'/V_{\max} olan düz bir doğru verecektir. İnhibitörün farklı konsantrasyonları için bu eşitliğin eğrileri $1/v_0$ ekseninin solunda kesişen birbirine benzer doğrulardan meydana gelir. $K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) olduğu özel durum için, kesişim $1/[S]$ eksenindedir. Bu durumda inhibisyon çeşidi yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır. Bu tür inhibisyonda, inhibitörün

enzimin aktif bölgesine bağlanmadığı fakat başka bir noktaya bağlandığı farz edilmektedir. Bu kompleks oluşumu enzimin konformasyonunu değiştirdiğinden substrat aktif noktaya bağlanamaz. Bu tür inhibisyonda iki inhibisyon sabiti elde edilir. K_i ve K_i' sabitleri aynı değere sahip iseler, karışık-tür inhibisyon yarışmasız inhibisyon olarak düşünülebilir. Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'den ve Bulgular kısmında verilen Şekiller'den görüldüğü gibi substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında askorbik asit inhibisyonu için; substrat olarak katekol kullanıldığında sodyum azid ve 1,4-ditiyoeritrol inhibitörleri için; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında glutatyon, L-sistein ve sodyum azid inhibitörleri için yaklaşık olarak aynı K_i ve K_i' değerleri elde edildiği için inhibisyon türünün yarışmasız inhibisyon olduğu söylenebilir. Doğan ve arkadaşları substrat olarak 4-metilkatekol kullanarak tropolon ve askorbik asit inhibitörleri için; substrat olarak katekol kullanarak glutatyon ve sodyum azid inhibitörleri için; ve substrat olarak pirogallol kullanarak glutatyon inhibitörü için inhibisyon türünü yarışmasız inhibisyon olarak buldular[43]. Ayrıca palmiye polifenol oksidazı için substrat olarak 4-metilkatekol kullanarak p-kumarik asit ve sinamik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmasız inhibisyon olduğu bulunmuştur[77]. Deneysel verileri inhibisyon eşitlikleri ile fit etmek için lineer regrasyon metodu kullanılmıştır. Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilen lineer regrasyon katsayıları inhibisyon türünü belirlemek için kullanıldı. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi, regrasyon katsayısı değerlerinin 0,96–0,99 aralığında olması deneysel verilerin ilgili inhibisyon eşitlikleri ile daha iyi fit edildiğini göstermektedir.

4.8 Sonuçlar

Ocimum basilicum L. polifenol oksidazının karakterizasyonu ve saflaştırılması ilk kez rapor edilmektedir. *Ocimum basilicum* L., zengin bir fenolik madde içeriğine sahiptir. *Ocimum basilicum* L.'den polifenol oksidaz amonyumsülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak üç aşamalı bir saflaştırma prosedürü sonucunda 11,5 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül ağırlığı 54 kDa olarak tayin edildi. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının bir difenolaz ve en etkin substratın 4-metilkatekol olduğu ve bunu pirogallol ve katekolun izlediği bulundu. 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için K_m değerleri sırasıyla, 1,62, 2,77 ve 3,42 mM olarak; optimum pH

değerleri sırasıyla; 6,0, 8,0 ve 9,0 olarak; ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20, 40 ve 50 °C olarak bulundu. Enzim aktivitesi kullanılan tüm substratlar için artan sıcaklık ve inaktivasyon zamanı ile enzimin ısıl denatürasyonundan dolayı azaldı. *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazı substratlar olarak 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol kullanılarak çeşitli inhibitörlerle önemli bir şekilde inhibe edildi. İnhibisyon türünün kullanılan substrata ve enzime bağlı olarak yarışmalı, yarı-yarışmalı, karışık-tür ya da yarışmasız olabileceği belirlendi. Tropolonun, *Ocimum basilicum* L. polifenol oksidazının en etkin inhibitörü olduğu bulundu.



5. KAYNAKLAR

- [1] Cemeroglu, B., "Meyve ve Sebze İşletme Teknolojisi", Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No: 6, 1988.
- [2] Keha, E., ve Küfrelioğlu, İ., "Biyokimya", pp.97-147, Şafak Yayınevi, Erzurum, 1997.
- [3] Gregory, R.P.F., and Bendall, D.S., "The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis*, L.)", *Biochem J.*, **101**, 569 (1966).
- [4] Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M., "Root specific elicitation and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum*", *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 983-995 (2002).
- [5] Lewinsohn, E., Ziv-Raz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitsh, D., Ravid, U., Putievsky, E., Pichersky, E., Shoham, Y., "Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities", *Plant Science*, **160(1)**, 27-35 (2000).
- [6] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., "Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions", *Food Chemistry*, **83(4)**, 547-550 (2003).
- [7] Mayer, A.M., and Harel, E., "Polyphenol oxidase in plants", *Phytochemistry*, **18**, 193-215 (1979).
- [8] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., "Polyphenol oxidase from *Allium* sp." *J. Agric. Food Chem.*, **45(8)**, 2861-2863 (1997).
- [9] Eskin, N.A.M., *Biochemistry of Foods*. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA (1990).
- [10] Vaughn, K.C., and Duke, S.O., "Function of polyphenol oxidase in higher plants", *Physiologia Plantarum*, **60**, 106-112 (1984).
- [11] Lee, C.Y., and Whitaker, J.R., "Enzymatic browning and its prevention", *American Chemical Society*, Washington, DC, (1995).
- [12] Satiawatharaphang, C., Rymal, K.S., Dozier, J., "Polyphenol oxidase system in red delicious apples", *J. Food Sci.*, (1976).

- [13] Ragazzi, E., and Veranese, G., "Ricerhe sulle fenol oksidasie sul contenuto in o-difenol delle olive", *Ann. Chim.*, **57**, 1476 (1967).
- [14] Şakiroğlu, H., "Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenoloksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, Nisan (1994).
- [15] Macrea, A.R., and Duqqueby, R.G., "Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase", *Phytochemistry*, **7**, 855 (1968).
- [16] Keskin, H., Besin Kimyası. T.C. İstanbul Üniversitesi Sıra No:3450, Mühendislik Fakültesi No:72, Güray Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., İstanbul, (1987).
- [17] Voet, D., and Voet, J.G. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. US, (2003).
- [18] Doğan, M., Arslan, O., and Doğan, S. "Substrate specificity heat inactivation and inhibition of polyphenoloxidase from different aubergine cultivars", *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 415-423 (2002).
- [19] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavék, J., and Tumer, N., "Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenoloxidase". *J.Agric. Food Chem.*, **49**, 652- 657 (2001).
- [20] Yang, Chang-Peng; Fujita, S.; Kohno, K.; Kusubayashi, A.; Ashrafuzzaman, M.D.; and Hayashi, N., "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel", *J. Agric. Food Chem*, **49**, 1446–1449 (2001).
- [21] Nagai, T., and Suzuki, N., "Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L". *J.Agric. Food Chem*, **49**, 3922-3926 (2001).
- [22] Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., and Garcia-Carmona, F.. "Partial Purification, Characterization, and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia clavaryi* Chatin) Polyphenol Oxidase", *J.Agric. Food Chem.*, **49**, 1922-1927 (2001).
- [23] Carvajal-Millan, E., Carvallo, T., Orozco, A., Martinez, A., Tapia, I., Guerrero, V.M., Rascon-Chu, A., Llamas, J., and Gardea, A.A., "Polyphenol Oxidase Activity, Color Changes, and Dehydration in Table Grape Rachis during Development and Storage As Affected by N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea". *J.Agric. Food Chem.*, **49**, 946-951 (2001).

- [24] Sojo, M.M., Nunuz-Delicado, E., Sanchez-Ferrer, A., and Garcia-Carmona, F., "Oxidation of Salsolinol by Banana Pulp Polyphenol Oxidase and Its Kinetics Synergism with Dopamine", *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5543-5547 (2000).
- [25] Chang, S., Tan C., Frankel, E.N., and Barrett, D.M., "Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars", *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 147-151 (2000).
- [26] Broothaerts, W., McPherson, J., Li, B., Randal, E., Lane, W.D., and Wiersma, P.A., "Fast Apple (*Malus x domestica*) and Tobacco (*Nicotina tabacum*) Leaf Polyphenoloxidase Activity Assay for Screening Transgenic Plants", *J. Agric. Food Chem.*, **48(12)**, 5924-5928 (2000).
- [27] Onsa, G.H., Bin Saari, N., Selamat, J., and Bakar, J. "Latent Polyphenoloxidases from Sago Log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation, and some", *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5041-5045 (2000).
- [28] González, E.M., de Ancos, B., and Cano, M.P., "Partial characterization of polyphenoloxidase activity in raspberry fruits", *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4068-4072 (1999).
- [29] Jiang, Y., Fu, J., Zauberman, G., and Fuchs, Y., "Purification of Polyphenol Oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid", *Journal of the Food and Agriculture*, **79**, 950-954 (1999).
- [30] Rodriguez-Lopez, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Devecce, C., Sanchez-Hernandez, D., de los Reyes, E., and Garcia-Carmona, F., "Thermal Inactivation of Mushroom Polyphenoloxidase Employing 2450 MHz Microwave Radiation", *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3028-3035 (1999).
- [31] Angleton E.L., and Flurkey W.H., "Activation and alteration of plant and fungal polyphenol oxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis", *Phytochemistry*, **23**, 2723-2725 (1984).
- [32] Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M.W., "Strawberry polyphenol oxidase: extraction and partial characterization", *Journal of Food Science*, **55**, 1320-1325 (1990).
- [33] 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).
- [34] Erzençin, M., "Farklı kaynaklardan afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Temmuz (2002).

- [35] Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage", *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- [36] Doğan, S., Doğan, M., and Arslan O., "Characterization of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* var. *subisophyllus*)", *Advances in Food Science*, **25**(2), 56-64 (2003a).
- [37] 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*. (2005), (in press).
- [38] 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).
- [39] Singleton, V.L., and Rossi, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American Journal of Enology*, **16**, 144-158 (1965).
- [40] 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.
- [41] Coseteng, M.Y., Lee, C.Y., "Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning", *J Food Sci.*, **52**, 85-989 (1987).
- [42] Kaur, C., Kapoor, H.C., "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables", *Int. J. Food Sci. Technol*, **37** (2), 153-161 (2002).
- [43] Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., and Arslan, O., "Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.)", *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 776-785 (2005).
- [44] Lanker, T., King, T.G., Arnold, S.W., Flurkey, W.H., *Physiol. Plantarum*, **69**, 323 (1987).
- [45] Espin, J.C., van Leeuwen, J., Wichers, H.J., "Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(9), 3509-3517 (1999).
- [46] Fujita, S., Tono, T., "Purification and properties of polyphenol oxidase in

- bead lettuce (*Lactuca sativa*)", *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 115-123 (1991).
- [47] Halder, J., Tamuli, P., Bhaduri, A.N., "Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*)", *Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**, 75-80 (1998).
- [48] Raymond, J., Rakariyathan, N., Azanza, J.L., "Purification and some properties of polyphenol oxidases from sunflower seeds", *Photochemistry*, **34**, 927-932 (1993).
- [49] Murata, M.; Kurokami, C.; Homma, S.; Matsushashi, C., "Immunochemical and immunohistochemical study of apple chlorogenic acid oxidase", *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1385-1390 (1993).
- [50] Murata, M., Kurokami, C., Homma, S., "Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*)", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1705-1710 (1992).
- [51] Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C., Constantinides, S.M., "Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L)", *J. Food Sci.*, **46**, 150-155 (1981).
- [52] Fujita, S., Saari, N.B., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., Tono, T., "Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.)", *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1138-1142 (1995).
- [53] Paul, B., and Gowda, L.R., "Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dalichos lablab*)", *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3839-3846 (2000).
- [54] Anosike, E.O., and Ayabene, A.O., *Phytochemistry*, **20**, 2625 (1981).
- [55] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, Ý., "Polyphenol oxidase from Malatya Apricot", *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1239-1241 (1998).
- [56] Oktay, M., Küfreviöglu, I., Kocacaliskan, I., Sakiroglu, H., "Polyphenol oxidase from Amasya apple", *Journal of Food Science*, **60**, 495-499 (1995).
- [57] Rocha, A.M.C.N., Pilar-Cano, M., Galeazzi, M.A.M., Morais, A.M.M.B., "Characterization of "Starking" apple polyphenoloxidase", *J.Sci. Food Agric.*, **77**, 527-534 (1998).
- [58] Zhou, H., Feng, X., "Polyphenol oxidase from Yali pear (*Pyrus Bretschneiderl*)", *J. Sci. Food Agric.*, **57**, 307-313 (1991).
- [59] Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., "Characterization of polyphenol

- oxidase from Stanley plums”, *Journal of Food Science*, **57**, 1177-1179 (1992).
- [60] Halder, J., Tamuli, P., Bhaduri, A.N., “Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*)”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**, 75-80 (1998).
- [61] Golbeck, J.H., Cammarata, K.V., “Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the nativ chloroplast enzyme”, *Plant Physiol.*, **67**, 877-884 (1981).
- [62] Dinçer, B., Çolak, A., Aydın, N., Kadıoğlu, A., Güner, S., “Chracterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae)”, *Food Chemistry*, **77**, 1-7 (2002).
- [63] Alyward, F., Haisman, D.R., “Oxidation system in fruits and vegetablestheir relation to the quality of pressured products”, *Adv. Food. Res.*, **17**, 1-76, 253 (1969).
- [64] Sakiroglu, H., Küfrevioglu, I.Ö., Kocacaliskan, I., Oktay, M., Onganer, Y., “Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem*, **44**, 2982-2986 (1996).
- [65] Lee, C.Y., Smith, N.L., Pennesi, A.P., “Polyphenol oxidase from DeChaunac grapes”, *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 987-991 (1983).
- [66] Arslan, O., Tozlu, I., “Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from *Anethum graveolens* L. Ital”, *J. Food Sci.*, **9(3)**, 249-253 (1997).
- [67] Duangmal, K., 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).
- [68] Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S., Özensoy, Ö., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties”, *Food Chemistry*, **88**, 479-484 (2004).
- [69] Park, E.Y., Luh, B.S., “Polyphenol oxidase of kiwifruit”, *Journal of Food Science*, **50**, 679–684 (1985).
- [70] Roudsari M.H., Signoset A., and Crovzet J., “Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties”, *Food Chemistr.*, **7**, 227-235 (1981).
- [71] Augustin M.A., Ghazali H.M., and Hashim H., “Polyphenol oxidase from Guava (*Psidium guajava* L.)”, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1259-1265 (1985).
- [72] Espin J.C., Jolivet S., and Wichers H.J., “Inhibition of mushroom PPO by

- agartine”, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2976-2980 (1998).
- [73] Sanchez-Ferrer A., Laveda F., and Garcia-Carmona F., “Cresolase activity of potato tuber partially purified in a two-phase partition system”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1225-1228 (1993).
- [74] Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Goupy P.M., and Nicolas J.J., “Kinetic studies on apple polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1437-1441 (1990).
- [75] Pifferi P.G., Baldassari L., and Cultrera R., “Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits”, *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 263-270 (1974).
- [76] Schwartz B., Olgin A.K., and Klinman J.P., “The role of copper in topa quinone biogenesis and catalysis, as probed by azide inhibition of a copper amine oxidase from yeast”, *Biochemistry*, **40**, 2954-2963 (2001).
- [77] Robert C., Rouch C., and Cadet F., “Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) PPO by carboxylic acids”, *Food Chemistry*, **59(3)**, 355-360 (1997).