

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK



ENDEMİK *SALVIA HUBERI* HEDGE TÜRÜNÜN POLİFENOL
OKSİDAZ AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAKİZE ÖZKAYA

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Yasemin TURHAN

Dr. Öğr. Üy. Dudu DEMİR

BALIKESİR, NİSAN - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

PAKİZE ÖZKAYA tarafından hazırlanan “**ENDEMİK SALVIA HUBERI HEDGE TÜRÜNÜN POLİFENOL OKSİDAZ AKTİVİTESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19.04.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

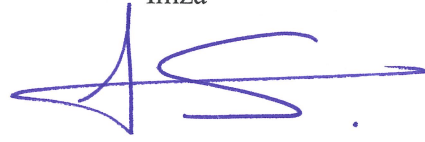
Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. Serap DOĞAN

Üye
Doç. Dr. Yasemin TURHAN

Üye
Dr. Öğr. Üy. Dudu DEMİR

İmza



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

ÖZET

**ENDEMİK *SALVIA HUBERI* HEDGE TÜRÜNÜN POLİFENOL OKSİDAZ
AKTİVİTESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
PAKİZE ÖZKAYA
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, MART - 2018

Bu çalışmada *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın (PFO) kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. PFO, *Salvia huberi* L.'den ekstrakte edilerek amonyum sülfat çöktürmesi ((NH₄)₂SO₄) ve diyaliz yoluyla kısmen saflaştırılmıştır. PFO'nun katalizleme gücünü ve substrat spesifikliğini belirlemek üzere katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanılmıştır. Enzimin optimum pH, sıcaklık ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca glutatyon ve askorbik asit kullanılarak inhibisyon tipleri belirlenmeye çalışılmıştır. *Salvia huberi* HEDGE'nin Bradford yöntemi kullanılarak protein içeriği tespit edilmiştir.

PFO; katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarına karşı aktivite göstermiştir. Enzimin katalizleme gücünü gösteren V_{MAX}/K_M değerine göre en iyi substratın pirogallol olduğu ve bunu sırasıyla katekol ve 4-metil katekolün izlediği gözlemlenmiştir. Optimum pH değerlerinin sırasıyla katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için 7.5, 5.0 ve 7.5 olduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerleri katekol substratı için 10, 4-metil katekol substratı için 25 ve pirogallol substratı için 35 °C olduğu belirlenmiştir. Optimum tampon konsantrasyonu değerleri katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratı için sırasıyla 60 mM, 100 mM ve 10 mM olduğu tespit edilmiştir. Bradford metoduna göre belirlenen toplam ham protein içeriğinin ise 930 µg/mL⁻¹ olduğu belirlenmiştir. Substrat olarak katekol ve pirogallol kullanıldığında en etkin inhibitörün askorbik asit, substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında en etkin inhibitörün glutatyon olduğu bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: *Salvia huberi* HEDGE, polifenol oksidaz, pH, sıcaklık, inhibisyon, substrat spesifikliği.

ABSTRACT

POLYPHENOLOXIDASE ACTIVITY OF ENDEMIC *SALVIA HUBERI* HEDGE

MSC THESIS

PAKIZE ÖZKAYA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF.DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, MARCH 2018

In this study, partial characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from *Salvia huberi* HEDGE was performed. PPO was partially purified by ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) precipitation and dialysis methods after being extracted from *Salvia huberi* L. In order to determine the specificity of substrate and catalysis, catechol, 4-methyl catechol and pyrogallol were used. Optimum pH, temperature and concentrations were determined. In addition, inhibition types were determined by glutathion and ascorbic acid. The protein content of *Salvia huberi* L. was also determined by Bradford method.

PFO showed enzyme activities against catechol, 4-methyl catechol and pyrogallol substrates. According to V_{max}/K_M values, representing the power of enzyme catalysis, it was observed that the best substrate was pyrogallol followed by catechol and 4-methyl catechol. Optimum pH values were found as 7.5, 5.0 and 7.5 for catechol, 4- methyl catechol and pyrogallol, respectively. Optimum temperatures were found as 10 °C for catechol, 25 °C for 4-methyl catechol and 35 °C for pyrogallol. Optimum buffer concentrations were determined as 60 mM, 100 mM and 10 mM for catechol, 4- methyl catechol and pyrogallol, respectively. According to the Bradford assay results, total protein content was found as 930 µg/ mL⁻¹. It was found the most effective inhibitor ascorbic acid using as substrate pyrogallol and catechol, the most effective inhibitor glutatyone using as substrate 4-methyl catechol.

KEYWORDS: *Salvia huberi* HEDGE, poliphenol oxidase, pH, temperature, inhibition, substrate specificity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimler	1
1.2 Adaçayı (<i>Salvia huberi</i> HEDGE)	2
1.3 Polifenol Oksidaz	5
1.3.1 Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı	6
1.3.2 Polifenol Oksidazın Bitkilerde Biyolojik Önemi.....	7
1.3.3 Polifenol Oksidaz Substratları	7
1.4 Enzimatik Kararma.....	9
1.5 Polifenol Oksidaz ile Yapılan Çalışmaların Özeti	10
1.6 Enzim Kinetiği	13
1.7 İnhibisyon	15
1.7.1 Yarışmalı İnhibisyon.....	15
1.7.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon	17
1.7.3 Karışık Tür İnhibisyon	18
1.8 Çalışmanın Amacı	20
2. MATERYAL VE METOT	21
2.1 Materyal.....	21
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkinin Temini-Analize Hazırlanması	21
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	22
2.2 Ham Ekstraktın Hazırlanması	24
2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması.....	24
2.4 Spektrofotometrik Ölçümler.....	25
2.5 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi	25
2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	26
2.7 Enzim Aktivitesine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	26
2.8 İnhibisyon	26
2.9 <i>Salvia huberi</i> HEDGE Ekstraktının Protein İçeriği	27
3. BULGULAR	28
3.1 <i>Salvia huberi</i> HEDGE Ekstraktının Toplam Protein İçeriği	28
3.2 Substrat Spesifikliği	28
3.3 Optimum pH.....	31
3.4 Optimum Sıcaklık.....	33
3.5 Optimum Tampon Konsantrasyonu	35
3.6 Polifenol Oksidazın İnhibisyonu	37
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	50
4.1 Toplam Protein Miktarı	50
4.2 Optimum pH.....	50
4.3 Optimum Sıcaklık.....	51

4.4	Optimum Tampon Konsantrasyonu	52
4.5	Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliği	52
4.6	Enzim İnhibisyonu	54
4.6.1	Yarışmal İnhibisyon.....	55
4.6.2	Yarı-yarışmal İnhibisyon	56
4.6.3	Karışık İnhibisyon.....	57
5.	SONUÇLAR.....	59
6.	KAYNAKLAR.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'nin Türkiye'de yetiştiği yerler (●).....	2
Şekil 1.2: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'nin Erzurum ve çevresinde yetiştiği yerler (●).....	3
Şekil 1.3: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'nin fotoğrafı(a).....	4
Şekil 1.4: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'nin fotoğrafı(b).....	4
Şekil 1.5: PFO'nun varlığında monofenolün difenole (Kresolaz aktivitesi) ve difenolün o-benzokinona oksidasyonu (Katekolaz aktivitesi).....	6
Şekil 1.6: Flavonoidin yapısı.....	8
Şekil 1.7: Polifenol oksidazın karamadaki rolü.....	10
Şekil 1.8: Michealis-Menten eğrisi.....	14
Şekil 1.9: Lineweaver-Burk grafiği.....	15
Şekil 1.10: Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.....	17
Şekil 1.11: Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.....	18
Şekil 1.12: Karışık tür inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.....	20
Şekil 2.1: Deneyde kullanılan substratların kimyasal yapıları.....	25
Şekil 2.2: Çalışmada kullanılan inhibitörlerin kimyasal yapıları.....	27
Şekil 3.1: Katekol substratı ile <i>Salvia huberi</i> HEDGE PFO'ı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrisi.....	30
Şekil 3.2: 4-metilkatekol substratı ile <i>Salvia huberi</i> HEDGE PFO'ı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrisi.....	30
Şekil 3.3: Pirogallol substratı ile <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrisi.....	31
Şekil 3.4: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimi.....	33
Şekil 3.5: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklık ile değişim.....	34
Şekil 3.6: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	36
Şekil 3.7: Katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	38
Şekil 3.8: Pirogallol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	40
Şekil 3.9: 4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	42
Şekil 3.10: Katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	44
Şekil 3.11: Pirogallol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	46
Şekil 3.12 : 4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.....	48

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler.....	29
Tablo 3.2: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait deneysel veriler.....	32
Tablo 3.3: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait değerler.....	34
Tablo 3.4: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin tampon konsantrasyonuna ilişkin verileri.....	35
Tablo 3.5: Katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	37
Tablo 3.6: Pirogallol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	39
Tablo 3.7: 4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	41
Tablo 3.8: Katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	43
Tablo 3.9: Pirogallol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	45
Tablo 3.10: 4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Salvia huberi</i> HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.....	47
Tablo 4.1: <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın substrat spesifikliğı.....	53
Tablo 4.2: Katekol, 4-metil katekol ve pyrogallol substratları kullanıldığında <i>Salvia huberi</i> HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın inhibisyon türleri.....	57

SEMBOL LİSTESİ

		Birimi
PFO	Polifenoloksidaz enzimi	-
E.C.	Enzim kod numarası	-
E.Ü.	Enzim ünitesi	E.Ü
V_0	Başlangıç anındaki hız	EÜ/dak mL
V_{max}	Enzimin substrata doyduğu andaki hızı	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	Süpernatant hacmi	mL
S_1	1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu	-
S_2	1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu	-

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, iki yıl boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygı değer danışman hocam; Sayın Prof. Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında asla desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet DOĞAN'a ve kullandığım bitkinin temin ve teşhisini sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Tuncay DİRMENÇİ'ye çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim boyunca her konuda bana yardımlarını eksik etmeyen sevgili hocalarım Uzman Dr. Mehmet Emin DİKEN'e ve Arş. Gör. Begümhan YILMAZ'a teşekkürlerimi bildirmek isterim.

Ayrıca gerek maddi gerek manevi destek, ilgi ve her birinin hiç bir zaman esirgemediği güler yüzlerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarım İrem AKINCI, Şeyman KIRMIZI, Nurdan AKICI, Ulaş KUMRAL ve Ahmet Cenkay ORBAY'a sonsuz teşekkürler.

Teşekkürlerimin az kalacağı tüm lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca her konuda arkamda sapasağlam duran, kocaman sevgisi, gösterdiği sabrı ve anlayışı için Kamil TOK'a her zaman minnet duyacağımı bildirmek isterim.

Hayatın bana en büyük armağanı olan, dünyaları önüme seren birtanecik ailem; babam ve annem Rafet-Naime ÖZKAYA'ya, ablam ve ağabeyim Pelin-Harun ŞENGÜL'e ve yeğenlerim Bertuğ-Zeynep-Göktuğ ŞENGÜL'e minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez aileme ithafımdır.

PAKİZE ÖZKAYA

1. GİRİŞ

Günlük hayatımızda önemli yere sahip olan enzimler ilaç, gıda, kimya endüstrisi, dericilik, boya ve temizlik maddeleri, tıp, tarım, veterinerlik, biyoloji ve biyoteknoloji bilimi gibi farklı alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı durumlarda enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar gıda endüstrisi açısından olumlu sonuçlar verirken, bazı durumlarda istenmeyen sonuçlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonun uygun şekilde yapılıp yapılmadığının tespiti için de enzimlerden faydalanılmaktadır [1]. Sebze ve meyvelerde meydana gelen kimyasal değişimler enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar ile oluşurlar. İşletmeciler ve tüketiciler için enzimatik kararlar önemli bir yer tutar. Özellikle bitki çaylarının lezzetinin ve deminin belirlenmesinde polifenol oksidaz enziminin (PFO; EC 1.14.18.1) etkisi oldukça önemlidir. Çünkü çay, kahve ve kakaonun üretiminde enzimatik kararlar istenilen önemli bir süreçtir. Siyah çayın üretimi süresince meydana gelen biyokimyasal değişimler çayın lezzetini veren teafavin ve tearubinlerin üretilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen halk arasında bitki çayı olarak kullanılan polifenol oksidazın kısmen saflaştırılması yapılarak substrat spesifikliğı, optimum pH, sıcaklık, tampon konsantrasyonu ve inhibisyon kinetiğı gibi bazı biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1 Enzimler

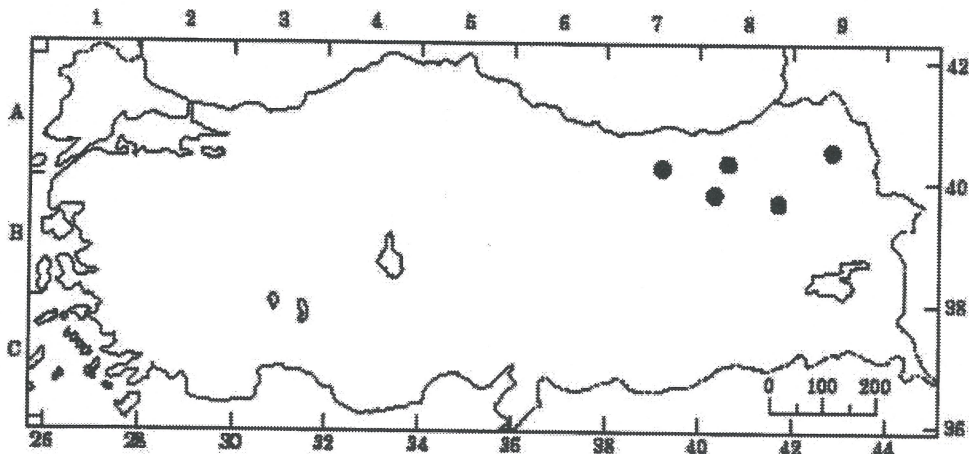
Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları 10^8 - 10^{20} kat hızlandıran hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100 verimle çalışan ve reaksiyondan hiç değişmeden çıkan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, proteinler için en özgün ve en büyük grubu oluştururlar [2]. Organizmada organik moleküllerin solunum, kas hareketleri, yapım, yıkım olayları enzimlerin yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor

olmaları, enzimlerden doğal ortamları dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı sağlamaktadır.

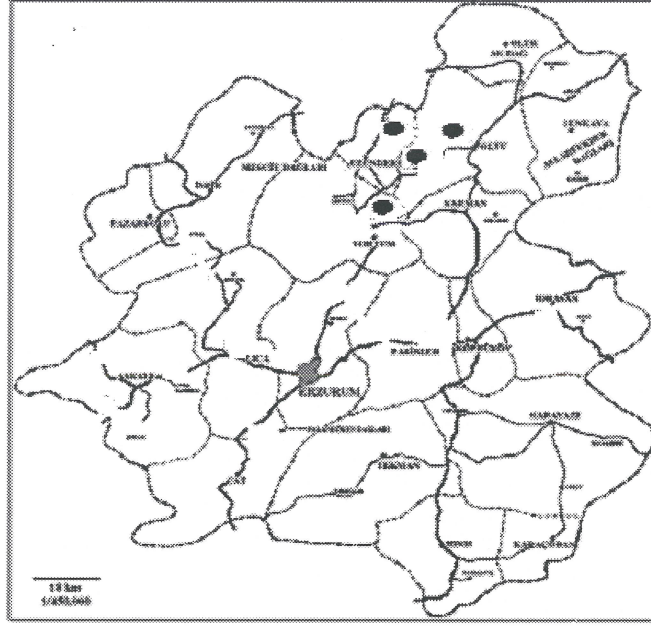
Enzimler diğer pek çok kimyasal katalizöre göre çok daha fazla üstünlük gösterirler. Kimyasal reaksiyonlara karşı spesifik olmalarında bunlardan bir tanesidir [1].

1.2 Adaçayı (*Salvia huberi* HEDGE)

Salvia huberi HEDGE, *Lamiaceae* familyasına ait, halk arasında "adaçayı" olarak adlandırılan önemli endemik bir bitkidir. *Lamiaceae* familyası yaklaşık 200 cins ve 3000 kadar tür barındırmaktadır. Türkiye’de ise en zengin familyalar arasında bulunmakla beraber takson sayısı bakımından 45 cins ve 513 tür içermektedir [3]. Yetiştığı toprağın pH’sı 7.53-7.83 aralığında olup, yine toprağı %77.27’si hafif alkali iken %22.30’u nötr durumdadır [4]. *Salvia huberi* ülkemizin Kuzey Doğu Bölgesinde Erzurum-Taşeli civarında lokalize olmaktadır. Genellikle eğimli yamaçlarda ve taşlık alanlarda gelişmektedir. Gövde yüzeyi salgı tüyleri ile kaplı olan bitkinin Ağustos sonları meyveli dönemi iken Temmuz ayı çiçeklidir ve bunun yanında bitkinin boyu 12-50 cm arasında değişmektedir [4]. Bu tür genellikle 1100-2200 m yüksekliklerde bulunmaktadır. *S. rosifoliaya* benzer, fakat çiçek sayısı daha azdır. Bitkinin gövdesi dallanmış yapıda, yarı çalimsı ve dikdörtgenimsidir [5]. Yaklaşık olarak bir çiçek durumunda 2-7 çiçek bulunmaktadır [5]



Şekil 1.1: *Salvia huberi* HEDGE’nin Türkiye’de yetiştığı yerler (●).



Şekil 1.2: *Salvia huberi* HEDGE'nin Erzurum ve çevresinde yetiştiği yerler (●).

Uçucu yağlarından dolayı Lamiaceae familyası üyeleri birçok alanda oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Kozmetik, parfümeri, ilaç ve gıda endüstrisinde yaygın olarak pek çok *Salvia* türünün uçucu yağları kullanılmaktadır [6]. Genellikle *Salvia* HEDGE türlerinde flavonlar, uçucu yağlar ve fenolik bileşikler yer almaktadır [7].

Şifalı bitkiler içerisinde yer alan *Salvia* türlerinin adaçayının zayıf hafızaları güçlendirdiği herbalist John Gerard tarafından ortaya atılmıştı. İngiliz araştırmacılar tarafından adaçayının asetilkolini zayıflatan enzimlerin etkilerini ortadan kaldırdığını, bu sebeple de Alzheimerın tedavi edilmesinde ve engellenmesinde etkili olacağı ispatlanmıştır [8].

Salvia huberi HEDGE grip, nezle, astım tedavisinde, karın ağrısı ve diş eti hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kalp ve damar hastalıklarının tedavisi için de tercih edilmektedir [9]. Aynı zamanda *Salvia* türleri yapısındaki fenolik bileşiklerden dolayı güçlü birer antioksidan etkiye de sahiptir [10]. *Salvia huberi* HEDGE nesli yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan ve ülkemizde oldukça sınırlı bölgede yetişen, ekonomik, tıbbi ve zirai açıdan büyük

öneme sahip bir bitki türüdür [4]. Şekil 1.3 (a) ve Şekil 1.4'te (b) *Salvia huberi*'nin görseline yer verilmiştir.



Şekil 1.3: *Salvia huberi* HEDGE'nin fotoğrafı (a). (Fotoğraf: T. DİRMENCİ)



Şekil 1.4: *Salvia huberi* HEDGE'nin fotoğrafı (b). (Fotoğraf: T. DİRMENCİ)

1.3 Polifenol Oksidaz

Tüm filogenetik skalada bakterilerden memelilere kadar büyük bir yere sahip olan, içeriğinde bakır bulunduran, polifenol oksidazlar olarak adlandırılan enzimler proteinlerin bir grubudur. Moleküler oksijen varlığında fenollerin oksidasyonunu katalizleme kapasitesinin bulunması, bu grubun ortak özelliğidir [11].

Birçok meyve ve bitkide gözlenen renk değişimi bir diğer adıyla enzimatik kararma olarak da bilinmektedir. Oluşan bu renk değişimlerinin nedeni enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlardır. Enzimatik kararmaya (renk değişimi) sebep olan başlıca enzim polifenol oksidazdır [12].

Polifenoloksidaz (PFO) (E.C.1.14.18.1) Polifenollerin oksidasyonunu, monofenollerin hidroksilasyonunu katalizleyen bir monooksijenazdır. PFO, oksijen yardımıyla hidrojen yakaladığından dolayı oksidoredüktaz sınıfında yer almaktadır [13]. PFO; mantarlarda, hayvansal dokularda ve yüksek bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır [14]. Bu enzim mantar ve bitkiler âlemindeki büyük yer tutan substrat spesifikliğine bağlı olarak çeşitli isimlerle de bilinmektedir. Bunlar; katekol oksidaz, monofenol oksidaz, tirozinaz, *o*-difenol oksidaz, fenolaz, *o*-fenolaz, fenolazdır [15,16]. Polifenoloksidaz, iki tip reaksiyonu katalizlemektedir. Polifenoloksidaz moleküler oksijen varlığında *o*-dihidroksi fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu (katekolaz aktivitesi) ve monofenollerin *o*-dihidroksi fenollere hidroksilasyonunu (kresolaz aktivitesi) katalizler. Meydana gelen kinonlar koyu renkli pigmentlere kondense olabileceği gibi bazı proteinlerin yapısına da bağlanabilirler [17]. Şekil 1.5'te katekolaz ve kresolaz aktivitesine ait şekle yer verilmiştir.

1.3.2 Polifenol Oksidazın Bitkilerde Biyolojik Önemi

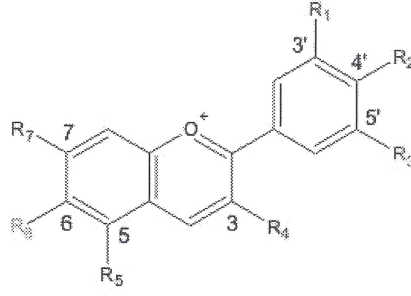
Polifenol oksidazın yapılan çalışmalar sayesinde hastalık direncine karşı önemli bir yerinin olduğu ortaya konulmuştur [13, 22]. Doğada geniş bir skalaya yayılan ve doku zedelenmelerinden kaynaklı istenmeyen renk değişimine neden olan bu enzim, bitkilerin kloroplast tilekoidlerinin membranlarında lokalize olmuştur. Örneğin patojen bakteri olan *Pseudomonas syringe*'nin sebep olduğu enfeksiyon durumunda savunma maksadıyla PFO gereğinden fazla ekspire olur. Yine buna benzer savunma durumu böcek istilası sırasında da gözlenir. PFO, yeşil şeftali aphidi, pancar kurdu, domates meyve kurdu gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı zedelenmelerden sonra ekspire olur ve böceklere karşı bir savunma geliştirir. Bunlara ek olarak Mehler reaksiyonunda PFO'nun kloroplast mezofillerinde fonksiyonel olduğu bildirilmektedir [22].

Diğer yandan ekmek, makarna gibi ürünlerin PFO aktivitesinden kaynaklı kararına gösterdiği enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan kinonların bir araya gelerek hazmolma özelliklerini ve bu arada lizin aminoasidinin faydalarını azalttığı belirtilmiştir [23]. Enzimatik kararmanın istendiği ürünler ise kakao, kahve ve çaydır. Siyah çayın üretimi boyunca oluşan biyokimyasal değişiklikler çayın lezzetini veren tearubinler ve teaflavinlerin üretilmesi bakımından önemlidir [24].

1.3.3 Polifenol Oksidaz Substratları

Basit fenoller ve flavonoid tipi fenoller bu enzimin meyve ve sebzelerde en yaygın görülen substratlarıdır. Flavonoidler, bitkilerin yenilebilir kısımları ile tohum, meyve, yaprak, kök ve gövde kısımlarında fakat konsantre bir şekilde olmayıp, çeşitli bölümlerinde homojen olarak dağılmışlardır. Polifenoller yenilebilir ürünlerin büyük bir kısmında kararmaya sebep olan reaksiyonu meydana getirirler [13]. Şekil 1.6'da flavonoidin yapısı görülmektedir.

Farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, lökoantosiyanidinler, flavonoller, sinnamik asit türevleri ve basit fenoller bitkilerde doğal olarak bulunup, besinlerin önemli bir kısmını oluştururlar [19].



Şekil 1.6: Flavonoidin yapısı.

Birçok flavonoidin hidroksilli türevleri resolsinol (A halkası) ve bir katekol birimi (B halkası) bulundurlar. Katekinlerin yapısı için geliştirilen modellerden flavonoid halkasının kırılma, parçalanma ve sentez reaksiyonları incelenmiştir. Katekinler, (+) katekin ve onun stereoizomeri (-) epikatekindir [13].

Asidik ortamda ısıtılarak antosiyanidinlere dönüşen lökoantosiyanidinler kırmızı-mavi bitki pigmentlerinin büyük bir grubudur. Lökoantosiyanidinler bütün olgunlaşmış bitkilerde ve özellikle de çiçek, meyve ve yapraklarda aynı zamanda gövde ve köklerde de yer almaktadır [13].

Antoksanin pigmentleri olarak da adlandırılan flavonoller açık yeşil renkli ve genellikle glikozidler halinde bulunurlar. Bazen enzimatik kararma reaksiyonlarına bizzat katılırlar. Sinamik asit türevleri bir flavonoid olmamasına rağmen C₆-C₃ fenil propan biriminin oluşmasında ilk olarak B halkasının sentezlenmesinde kullanıldığı belirtilmiştir [20].

Katekol en basit fenoldür çünkü hidroksilli B halkasına sahiptir. Gallik asit, hidroliz olabilen taninlerin esas birimini oluşturur. Gallik asit serbest olarak az miktarda birkaç meyvede ve diğer gıdalarda bulunur.

Birçok gıdada yer alan ve önemli bir aminoasit olan tirozin, melanin oluşumunda da klasik monohidroksifenolik bir substrattır. Ayrıca tirozinin hidroksilasyon ürünü olan dopa ve dopamin bitki dokularında bulunur [20].

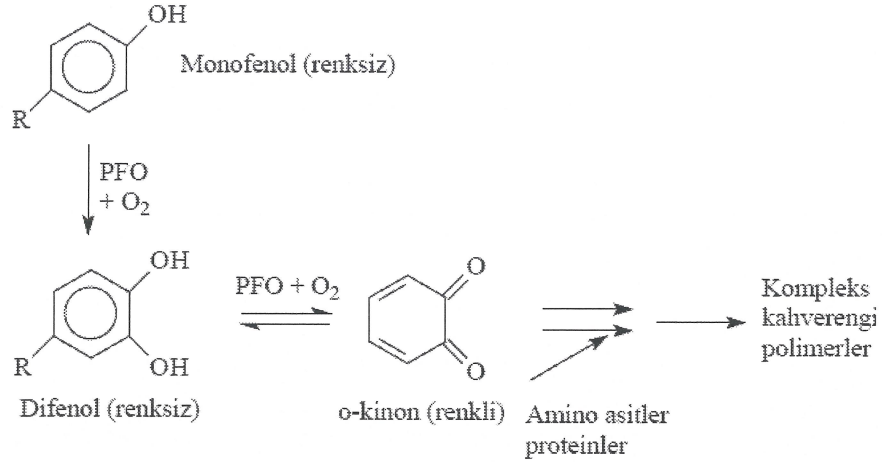
1.4 Enzimatik Kararma

Besinlerin toplanması ve depolanması sırasında gözlenen enzimatik kararma meyve ve sebzelerde dokuların bir şekilde kesilmesi, yaralanması ya da kabuklarının soyulması sonucu meydana gelebilmektedir. Bu renk değişimleri enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır [24, 25]. Gıda endüstrisinde önemli bir problem teşkil eden enzimatik kararma ya da fenolik kararma bazı ürünlerde istenmeyen tat, renk ve koku oluşumuna sebep olur. Ancak bitki çaylarının hazırlanmasında, üzümün ve eriğin olgunlaşmasında enzimatik kararma arzulanan bir prosestir. Yeşil çayın orijinal flavonoid içeriğinin %20'si fermantasyon süresince çözünmeyen ve infüzyondan sonra kahverengi çay yapraklarının kalıntılarıdır [13].

Bir diğer taraftan da enzimatik olmayan kararma indirgen şekerler ile aminoasitler arasında oluşan ve Maillard reaksiyonu olarak da tanınan bir kimyasal sürecin sonucudur. Bu reaksiyonlar oksijensiz ortamlarda etki ederler. Fakat oksijen bu reaksiyonlar için katalizör durumundadır. Enzim olmadığı durumlarda da devam eden renk bozunmaları ürünün işlenmeye başlanıp tüketimine kadar süregelirler [26]. Lakkaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz (tirozinaz) fenolik maddeleri okside etme yeteği olan enzimlerdir. Bu üç enzimin substrat tercihleri birbirine benzerdir. Bu enzimlerin ayırt edilmesi için seçilmiş inhibitörlerin kullanılması büyük yarar sağlamaktadır [27].

Polifenol oksidaz renksiz olan fenolik molekülleri okside ederek renkli ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur. Kresolaz aktivitesi için bu süreçte ilk olarak monofenoller difenollere yükseltgenir ve bunun sonucunda oluşan ürünler polifenol oksidaz vasıtasıyla *o*-kinonlara yükseltgenerek katekolaz aktivitesi oluşur. Meydana gelen *o*-kinonlar polimerize olurlar. Oluşan aminoasitler ve proteinlerle kompleks oluşturarak kahverengi pigmentlere dönüşürler. Oluşan pigmentler yüksek moleküler ağırlığa sahip birer polimerdir. Doğal flavonoid maddelerden olan sebze ve meyvelerde bol miktarda yer alan, katekinler, proantosiyanidinler (lökoantosiyanidinler), antosiyanidinler, flavonoller ile bunun yanında hidroksibenzoik, hidroksisinamik ve bunların türevleri olan çeşitli bileşikler; kafeik, ferulik, *p*-kumarik, kuinik, gallik, sinamik ve klorogenik asitler

gibi çok çeşitli basit fenolik maddeler ve polifenollerin enzimatik kararma reaksiyonlarında rol oynadığı gözlenmektedir [28].



Şekil 1.7: Polifenol oksidazın kararmadaki rolü [13].

Bazı fenolik maddeler inhibitör rolü oynarken bunun tam aksine, enzimatik kararma reaksiyonlarında birçok polifenolik madde de substrat olarak rol oynar. Şekil 1.7’de PFO enziminin kararmadaki rolü anlatılmaktadır. Enzimatik kararma reaksiyonlarının olduğu ortamda bulunan bazı maddeler, renk değişimlerinin kilit maddesi olan *o*-kinonları geriye, yani *o*-fenolik formlara indirgeme niteliğine sahiptirler. 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 [29].

1.5 Polifenol Oksidaz ile Yapılan Çalışmaların Özeti

Mayende ve arkadaşları, çürüten yapraklardan elde ettikleri termofilik *Basillus* spp.’den aldıkları selüloz ve PFO aktivitelerini ölçmüşlerdir. Bunun sonucunda selüloz ve polifenol oksidaz için sıcaklık optimumları sırasıyla 70 ve

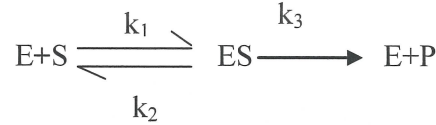
40 °C olarak belirlenmiş, maksimum selüloz aktivitesi, 1.333 mg glikoz olarak saptanmış, maksimum polifenol oksidaz aktivitesi 5.111 nmol/ ml⁻¹ dak⁻¹ olarak bulunmuş [30]. Durigan ve arkadaşları, *Averrhoa carambola* L.'nin yedi genotipinde PFO aktivitesini araştırmışlardır ve ölçümler sonucunda büyük ölçüde kararlı saptamışlar en yüksek polifenol oksidaz (PFO) konsantrasyonunu katekol ile muamelesi sonucunda gözlemişler. [31]. Nunez- Delicado ve arkadaşları, Napoleon üzümünden elde ettikleri latent PFO'yu Triton X-114 ile iki fazlı bölme yaklaşımını kullanarak elde etmişler ve optimal aktivite değerlerini bulmuşlardır, SDS yokluğunda, enzimin pH 3,0'da maksimum aktivite gösterdiği saptanmış bunun yanında substrat olarak 4-tert-bütilkatekol (TBC) kullanılarak % 0.2 SDS varlığında pH 3.0 ve pH 6.0'da kinetik olarak karakterize edildiğini gözlemişler ve enzimin oldukça ısıya kararlı olduğu ,aktivitenin% 80'inin 70 °C' de kaldığını bulmuşlar [32]. Khan ve arkadaşları, amonyum sülfatla çöktürdükleri patates proteinlerinden bir adsorbant olan celite 545 üzerinde PFO'yu direkt immobilize etmişlerdir. Sonuç olarak immobilize edilmiş PFO aktivitesinin verimi, pH 7.0 tamponu içinde maksimum olmuştur. Polifenol oksidaz aktivitesi, Triton X 100 ve Tween 20 gibi iyonik olmayan deterjanların konsantrasyonunun artmasıyla belirgin şekilde artırılmıştır [33]. 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 saptamışlardır. Patlıcan PFO'ı için optimum pH, substrat olarak katekol kullanıldığında 7.0, 4-metilkatekol kullanıldığında ise 6.0 bulunmuş bunun yanında optimum sıcaklığında her iki substrat için 30 °C bulunmuşlar. [34]. Matsui ve arkadaşları, yeşil hindistan cevizi suyundan elde ettikleri PFO ve peroksidaz enzimlerinin termal inaktivasyonlarını incelemişlerdir ve tuzlar ile enzimler arasındaki temas sayesinde, başlangıçtaki aktivitenin şiddetli bir şekilde azalmasını sağlamışlardır [35]. Sojo ve arkadaşları, muz polifenol oksidazı ile bir tetrahidroizokinolin olan salsolinolün oksidasyonunu araştırmışlar ve bu oksidasyonun pH'ya bağlı olduğunu ve özellikle asidik pH değerlerinde maksimum seviyeye ulaştığını bulmuşlar, fizyolojik koşulları taklit etmek için dopamin, reaksiyon ortamına eklendiğinde, salsolinol dopamin-kuinon ile birlikte oksitlenmiştir [36]. Nagai ve Suzuki, Çin kabağından (*Brassica rapa* L.) PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine zamanın, pH'nın, sıcaklığın, substratların ve inhibitörlerin etkilerini bulmuşlardır sonuç olarak optimum pH'ı

5.0 bulurken optimum sıcaklığı 40 °C bulmuşlardır, en etkili inhibitörler sırasıyla askorbik asit, glutatyon ve L-sistein olarak bulunmuş [37]. Büyükbayram ve arkadaşları, kırmızı şaraptaki kararlı fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan iletken kopolimerlerde PFO'nun immobilizasyonu vasıtasıyla biosensörlerin hazırlanmasını saptamışlardır, karakterizasyonlar, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) üzerine kurulmuş, enzim elektrotlarının stabilitesini ve raf ömrünü araştırmışlardır [38]. Marusek ve arkadaşları, bitki ve fungus türlerinden elde ettikleri PFO'nun karşılaştırmalı analizini çalışmışlardır, dizilim hizalamaları ve ikincil yapı tahminlerine göre, polifenol oksidazların C-terminal alanlarının üçüncül yapıda hemosiyaninininkine benzeyebileceğini sonucuna varmışlardır [39]. Maki ve Morohasi, domateste tohumların köklenmesinden sonra mikropilar endospermdeki PFO aktivitesinin arttığını bulmuşlardır ve doku baskı analizleri, aktivitenin büyük kısmının mikroskopik alanda lokalize olduğunu göstermiştir [40]. Gutes ve arkadaşları, polifenolokidaz biyosensörleri vasıtası ile fenolik bileşiklerin belirlenmesini incelemişlerdir [41]. Ünal, Anamur muzundan elde ettiği PFO'nun optimum sıcaklık, pH, termal inaktivasyon ve inhibisyon çalışmalarını saptamıştır; muz PFO aktivitesi için optimum sıcaklığı 30 °C, optimum pH aktivitesini 7.0 olarak bulmuşlardır. Bunun yanında K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8.5 mM ve 0.754 OD410 dk⁻¹, en etkili inhibitörlerin ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid olduğunu saptamışlardır [42]. Mdluli, Afrika'da yetişen *Scalerocarya birrea* subsp. *Caffra*'den elde ettiği PFO ve peroksidazı saflaştırarak karakterizasyonunu belirlemeye çalışmıştır; PFO'nun katekol için optimum pH'ını 7.0 olarak, K_M değerlerinin de kateşin, 4-metilkatekol, 3,4-dihidroksifenil propanoik asit (DHPPA) ve katekol için de sırasıyla 1.41mM, 1.43 mM, 3.73 mM ve 4.99 mM değerlerine sahip olduğunu bulmuşlardır [43]. Gui ve arkadaşları, karbondioksite maruz bırakılan elma suyundaki PFO'nun inaktivasyonunu çalışmışlardır [44]. Broothaerts ve arkadaşları, elma ve tütün yapraklarından elde edilen PFO aktivitesi üzerine TX-100, SDS, pH, substrat konsantrasyonunun ve inhibitörlerin etkisini saptamışlardır; ekstraksiyon ile Triton X-100 ilavesi sayesinde elma ve tütünden alınan PFO aktivitesinde sırasıyla % 44 ve %74 artış sağlamışlardır. Elma PFO'sunun 4-metil katekol için K_M değeri 8,1mM; tütün PFO'sunun 4-metil katekol için K_M değeri 4,3 mM olduğunu bulmuşlardır [45]. Jiang ve arkadaşları

sabunağacı meyvesinden elde ettikleri polifenoloksidazı Sephadex G–100 jelini kullanarak saflaştırmışlar sonucunda glutasyon, L-sistein ve sitrik asitin, PFO aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiğini saptamışlardır [46]. Gawlik-Dziki ve arkadaşları, brokoliden elde edilen PFO'nun karakterizasyonunu incelemişler ve maksimum aktivitenin katekol ve 4-metilkatekol substratları için pH 5,7'de ve en etkili inhibitöründe sodyum sülfat olduğunu saptamışlar [47].

1.6 Enzim Kinetiği

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon hızlarının incelenmesine enzim kinetiği denir. Biyolojik katalizörler olan enzimler substratları ile yada bazen koenzimleri ile kompleks oluştururlar. Ortamdaki tüm enzim doygunluk durumuna ulaştığında ES kompleksi oluştururlar. Aşağıdaki eşitlik enzim-substrat arasındaki reaksiyon içindir [29].



Michaelis-Menten denklemi bu kimyasal reaksiyon için aşağıdaki gibi verilebilir:

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

Burada; V_{max} , enzimin substrata doyduğu andaki hız (EÜ dak⁻¹),

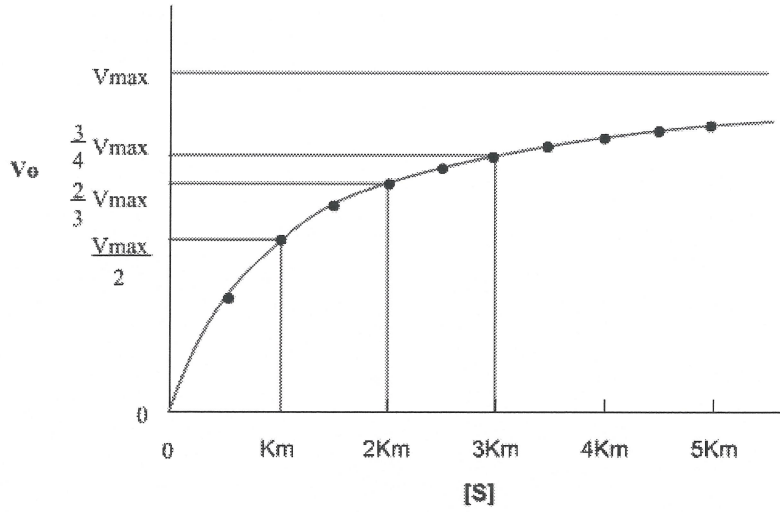
K_m , maximum hızın yarısına ulaşıldığı andaki substrat konsantrasyonu

$[S]$, substrat konsantrasyonu,

V_0 , başlangıç hızı (EÜ dak⁻¹)

Aşağıdaki şekilde enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi yer almaktadır. Substrat konsantrasyonu düşük olduğunda reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak artar bu da demektir ki reaksiyon

substrata göre birinci dereceden. Substratın konsantrasyonu arttırıldığında reaksiyon hızında bir azalma gözlenir bu durumda reaksiyon sıfır ile birinci derece arasında yer alır. Substrat konsantrasyonu daha çok arttırıldığında ise hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonu ile değişmez. Bu durumda reaksiyon sıfırncı derecededir. Sonuç olarak tüm enzim molekülleri substrat ile doymuş hale gelir.

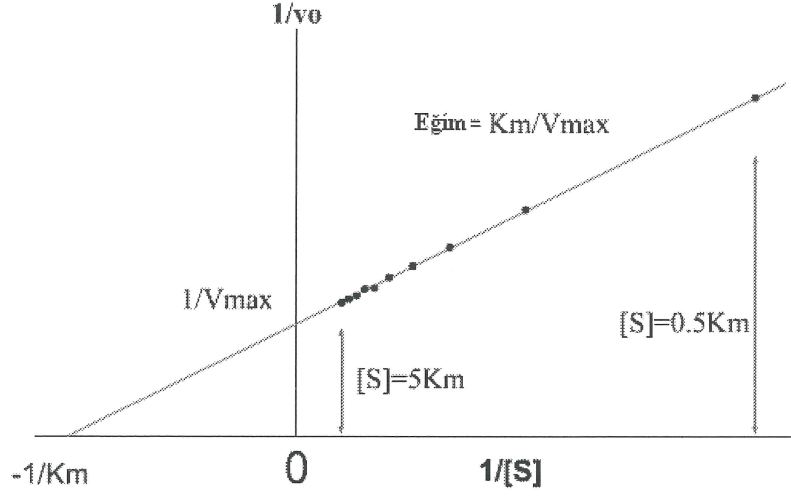


Şekil 1.8: Michealis-Menten eğrisi.

Michaelis-Menten eşitliğinin parametrelerini belirlemek için birkaç metot vardır. [S]'nin çok yüksek değerlere ulaştığındaki başlangıç hızı (V_0) V_{max} 'a yaklaşır. Bununla beraber Şekil 1.8'de gösterildiği gibi V_0 'ın [S]'ye karşı grafiğinden V_{max} 'u doğru olarak belirlemek çok zordur. V_{max} ve K_m 'nin değerlerini belirlemek için daha iyi bir metot Lineweaver-Burk tarafından geliştirilmiştir. Bu denklem Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmiş biçimidir.

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

Bu eşitlikte $1/V_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı eğrisi, eğimi K_m/V_{max} ve ekstrapolasyonu $1/V_{max}$ olan düz bir doğru verecektir. [48].



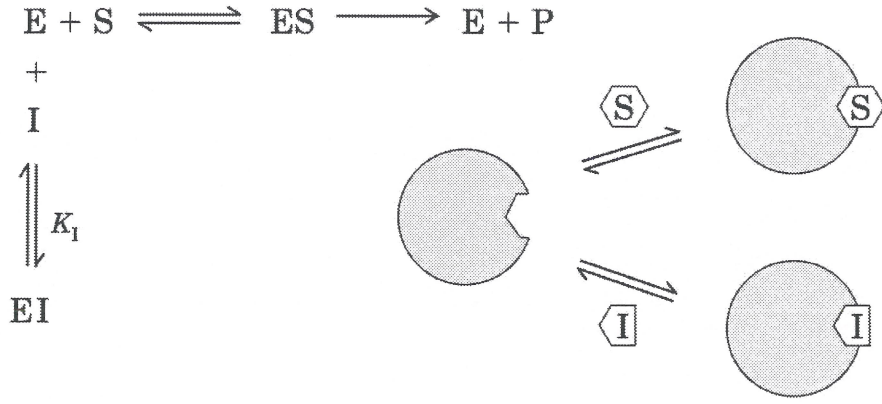
Şekil 1.9: Lineweaver-Burk grafiği [29].

1.7 İnhibisyon

Enzim inhibisyonu, enzimin katalitik ya da düzenleyici merkezleri olarak tanımlanan aktif bölgelerine spesifik olarak bağlanan inhibitörler ile enzim aktivitesinin düşürülmesi olarak tanımlanabilir. Enzimlerin bazı hücre dışı ve hücre içi aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından düşürülmesi hatta yok edilmesine "inhibisyon" denir. Bu olaya neden olan bileşiklere de "inhibitör" adı verilmektedir. Küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ve iyonlar genellikle inhibitörleri oluşturur. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da ayrışması zor olan bir kompleks oluşturur. Dönüşümlü inhibisyon ise enzim ve inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu oluşturur. Dönüşümlü inhibisyon 3'e ayrılır [48]. Bunlar; yarışmalı inhibisyon, yarı-yarışmalı inhibisyon ve karışık tür inhibisyonudur.

1.7.1 Yarışmalı İnhibisyon

İnhibisyonun bu türünde inhibitör, enzimin aktif merkezine bağlanmak için enzimin substratı ile yarışır. Aktif bölgeye ya inhibitör (engelleyici) veya substrat bağlanması gerçekleşir. Bunların ikisinde birlikte bağlanma durumu mümkün değildir.

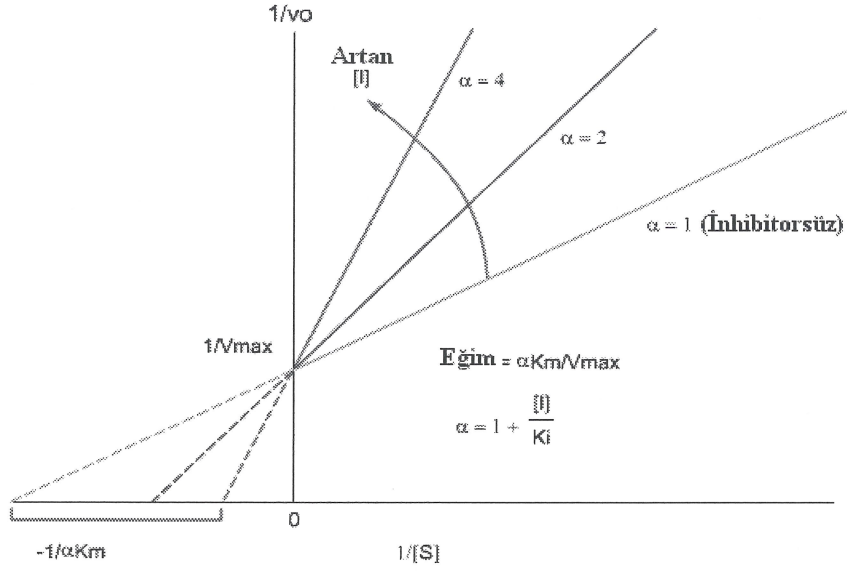


Lineweaver-Burk denklemi (yarışmalı inhibisyon için) aşağıdaki gibi olabilir:

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

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

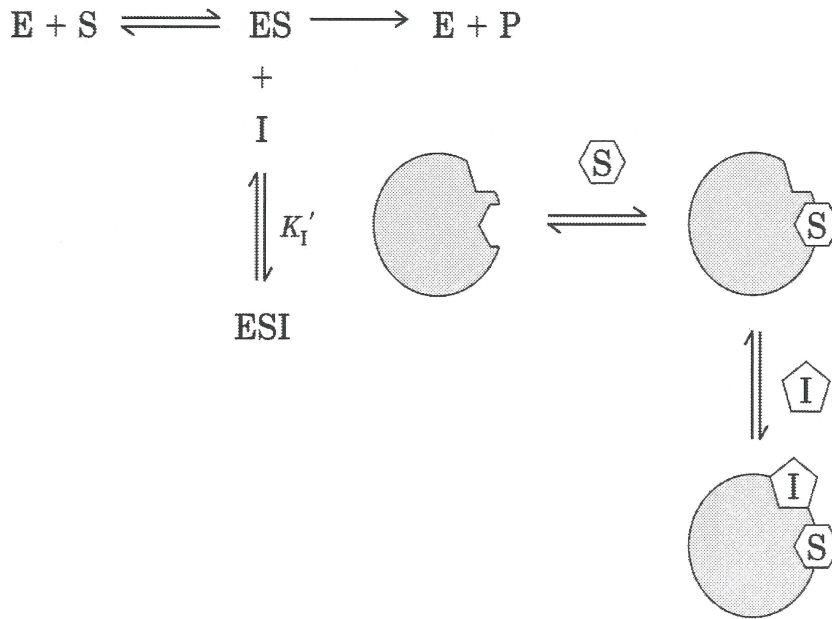
Bu eşitliğin eğrisi düz bir doğrudan oluşur ve bunun yanında eğimi $\alpha K_M/V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu maksimum $1/V_{\max}$ 'dir. Yarışmalı bir inhibitör için yukarıdaki denklem $1/V_0$ ekseninde $1/V_{\max}$ kayımına sahiptir. Bu da diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında yarışmalı inhibisyon için özel bir durum teşkil eder [13].



Şekil1.10: Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.

1.7.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda inhibitör (engelleyci) serbest olan enzime değil doğrudan enzim substrat (ES) kompleksine bağlanır.

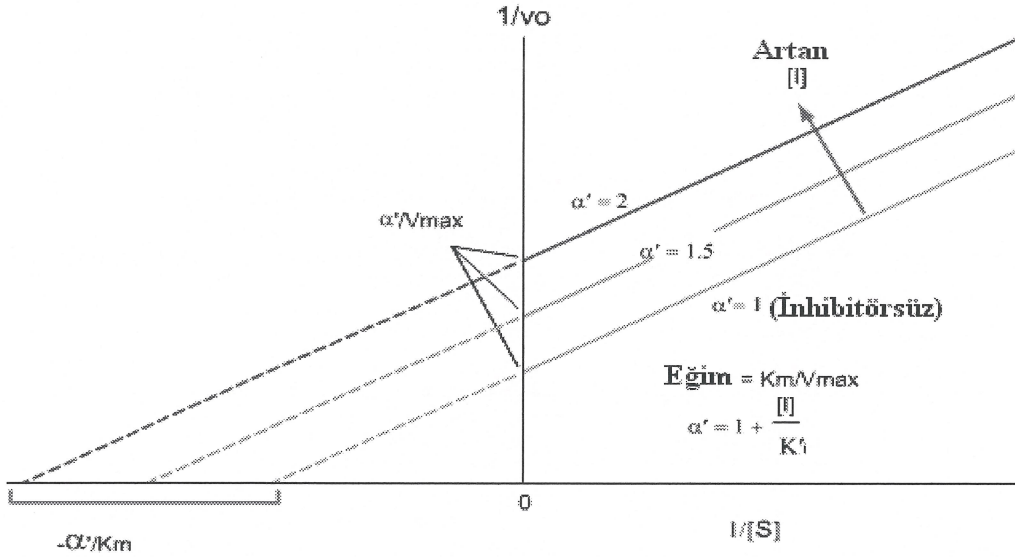


Lineweaver-Burk denklemi (Yarı-yarışmalı inhibisyon için) aşağıdaki gibidir:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

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

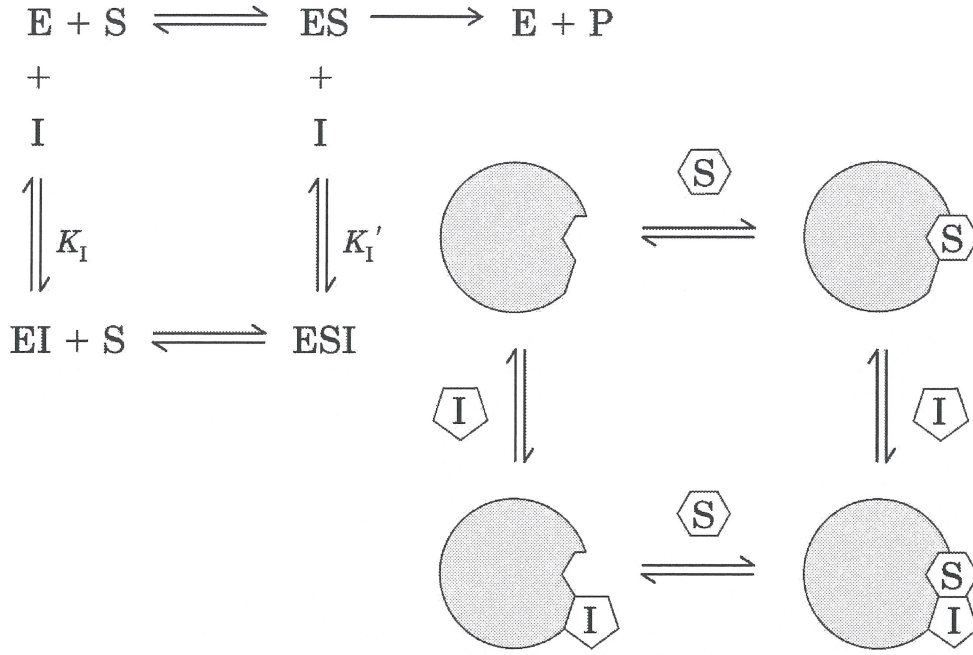
Yarı-yarışmalı inhibisyonda Lineweaver-Burk eğrisinin eğimi (K_M/V_{max}) ve ekstrapolasyonu (α'/V_{max}) olan düz bir doğrudan meydana gelir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan oluşur. Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durum meydana getirir.



Şekil 1.11: Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.

1.7.3 Karışık Tür İnhibisyon

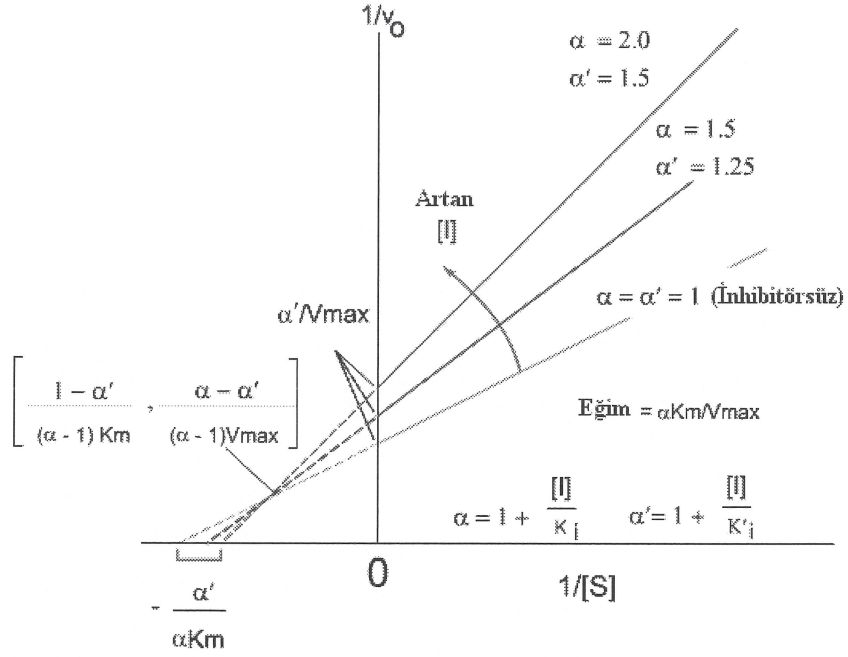
Bu tür inhibisyonda inhibitörler (engelleyci); hem enzim, hem de enzim-substrat kompleksine bağlanma gösterirler.



Lineweaver-Burk denklemi (karışık inhibisyon için) aşağıdaki gibidir:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

Bu eşitliğin eğrisinin eğimi ($\alpha K_M/V_{max}$) ve ekstrapolasyonu (α'/V_{max}) olan doğrulardan oluşur. $K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) olduğu özel durum için, kesişim $1/[S]$ ekseninde meydana geldiği gözlemlenir.



Şekil 1.12: Karışık tür inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri.

1.8 Çalışmanın Amacı

Salvia huberi HEDGE (adaçayı) günümüzde çay olarak kullanılan önemli tıbbi bir bitkidir. Alternatif tıpta kullanılan bu bitki ekonomik olarak da önemli değere sahiptir. Polifenol oksidaz birçok gıdada gözlenen enzimatik kararma reaksiyonlarını gerçekleştiren ve gıda prosesinde önemli bir enzimdir. Özellikle bitki çaylarının lezzetinin ve deminin belirlenmesinde polifenol oksidaz enziminin (PFO; EC 1.14.18.1) etkisi oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, *Salvia huberi* HEDGE'den polifenol oksidazı amonyum sülfat ve diyaliz ile saflaştırarak substrat spesifikliği, optimum pH, optimum tampon konsantrasyonu, optimum sıcaklık, inhibisyon ve protein içeriği gibi bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkinin Temini-Analize Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Salvia huberi* HEDGE Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından Erzurum yöresinden temin ve teşhis edilmiştir. Bitki -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma'dan satın alındı. Enzim analizleri ise Cary 1E g UV-Visible spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir [12].

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Potasyum fosfat
2. Sodyum hidroksit
3. Nitrik asit
4. Amonyum sülfat
5. Katekol
6. 4-metil katekol
7. Pirogallol
8. Glutasyon
9. Askorbik asit
10. Polietilen glikol
11. Commesie
12. Etanol
13. Fosfarik asit
14. Sığır serum albumin (BSA)
15. Sodyum karbonat

16. Diyaliz torbası

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Pipetler
2. Hassas terazi
3. Blender
4. Soğutmalı santrifüj
5. -80 dondurucu
6. +4 soğutucu
7. Vorteks
8. Manyetik karıştırıcı
9. pH metre
10. Lambda 35 UV/Vis spektrofometre

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0,1 M KH_2PO_4 pH :4-8 arası

13,609 gr potasyum fosfat hassas terazi ile tartıldı. Sonrasında tartılan potasyum fosfat behere alındı ve manyetik karıştırıcı üzerinde hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH'ı pH metre yardımı ile 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 olarak ayarlandı. Bu ayarlamalar NaOH ve HNO_3 ile yapıldı. Hazırlanan bu çözeltiler optimum pH'ı bulmak için kullanıldı.

Substrat Çözeltileri

0.1 M Katekol:

1,1011 gr katekol hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye eklendi. Daha sonra üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.05 M 4-metil katekol :

0,620 gr 4-metil katekol hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye eklendi. Daha sonra üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Pirogallol :

0,126 gr pirogallol hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye eklendi. Daha sonra üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

İnhibitör Çözeltileri**0.01 M Glutasyon:**

0,307 gr glutasyon hassas terazide tartılıp 100 mL'lik balon jøjeye alındı. Sonrasında üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Askorbik asit:

0,176 gr askorbik asit hassas terazide tartılıp 100 mL'lik balon jøjeye alındı. Sonrasında üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Protein Tayini İçin**Coomassie Brilliant-Blue G-250 Reaktifi:**

0,1 gr Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL'lik etanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine 100 ml de fosfarik asit eklenir. Daha sonra da saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

Bovin Serum Albumin (BSA)

0,1 gr BSA tartılıp 100 ml saf su içerisinde çözdürüldü.

2.2 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Toplandıktan hemen sonra -80 °C de saklanan *Salvia huberi* HEDGE örneklerinden 10 gr alınmıştır. Üzerine 4 gr polietilen glikol, 10 mM askorbik asit ve 100 ml pH'ı 7 olan fosfat tamponundan eklenip 2 dakika boyunca bir blender yardımıyla homojenize edildi. Daha sonra bir tülbent ile bu homojenat süzüldü. Süzüntü eşit bir şekilde santrifüj tüplerine alındı. 5000 rpm de 15 dakika süre ile +4 ° C'de santrifüj edildi [12, 49]. Sonrasında elde edilen süpernatant 1 gün boyunca diyaliz tamponu (0.01 M pH'ı 7.0) içinde diyalize bırakıldı. Diyaliz sonrasında ekstrakt çalışmanın devamı için kullanıldı [29].

2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması

Diyaliz sonrasındaki ekstraktın amonyum sülfat doygunluğunun test edilmesi için %60 ve %80 de denendi. %80 doygunlukta en iyi amonyum sülfat miktarının olduğu belirlendi. Çöktürme için kullanılacak (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) miktarı belirlendi. Bu miktar aşağıdaki formül ile belirlenmektedir

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

Bu formüle göre;

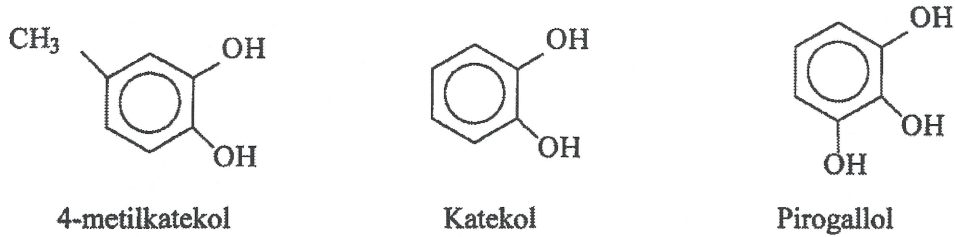
- V : Süpernatant hacmini,
- S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğunu,
- S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğunu göstermektedir.

Tartılan amonyum sülfat, erlen içerisindeki ham ekstrakta, magnetik karıştırıcı üzerinde buz banyosu içinde azar azar eklenir. Bu süreç yaklaşık olarak 45 dakikayı bulur. Çünkü içindeki katı partiküllerin tamamen çözünmesi gereklidir. Bu işlemden sonra oluşan süspansiyon santrifüj tüplerine yine eşit miktarlarda olacak şekilde alındı ve 60 dakika boyunca +4

°C’de 15000 g’de santrifüj edildi [50]. Santrifüj sonrasında üstteki sıvı kısım atıldı, altta kalan çökelek 2 mL pH’ı 7.0 olan 5 mM fosfat tamponunda çözündürüldü. Bu çözelti diyaliz torbasına alındı ve 24 saatlik diyalize bırakıldı. Kısmen saflaştırılmış olan PFO deneylerin devamında kullanıldı.

2.4 Spektrofotometrik Ölçümler

Spektrofotometrik analizler totalde 3 mL hacimli, 1 cm ışık olan kuartz bir küvet içinde gerçekleştirildi. Ölçümler Lambda 35 UV/Vis Spektrofotometrede alındı. Analizler 2,3 mL fosfat tamponu, 0,6 mL substrat ve 0,1 mL enzim karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu karışımda enzim en son ilave edildi ve küvet hızlıca karıştırılarak absorban ölçümü yapıldı. Ölçümlerde kullanılan substratlar ve absorbanları ise ; katekol 420 nm, 4-metil katekol 420 nm ve son olarak da pyrogallol de 320 nm’de 2 dakika süre ile ölçümler gerçekleştirildi. Enzim ünitesi, 1 mL enzim çözeltisi için 1 dak’da absorbansta oluşan 0,001’lik değişme olarak tanımlanmıştır[51].



Şekil 2.1: Deneyde kullanılan substratların kimyasal yapıları.

2.5 Enzim Aktivitesine pH’ın Etkisi

Salvia huberi HEDGE örneğinden meydana gelen PFO enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri için 4-8 aralığında olan pH değerliğine sahip 0,1 M fosfat tampon hazırlandı. Tampon çözeltilerin pH ayarları NaOH ve HNO₃ ile yapıldı. Substrat olarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanıldı.

Optimum pH için karışım miktarları 2,3 mL tampon, 0,6 mL substrat, 0,1 mL enzimden oluşturuldu. Ölçümler üçer kez tekrarlandı [34].

2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

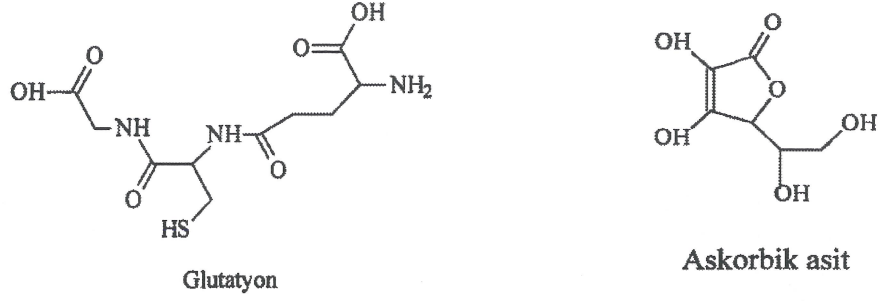
PFO, enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 10-25-35-45-55 ve 65 °C arasındaki değerlerde ölçülerek gerçekleştirildi. Tampon çözeltilerin ve substratların sıcaklığı su banyosu yardımı ile ayarlandı. Substrat olarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanılırken reaksiyon karışımında yine 2,3 mL tampon, 0,6 mL substrat, 0,1 mL enzim kullanılarak aktivite ölçümü alındı.

2.7 Enzim Aktivitesine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

Salvia huberi HEDGE bitkisinden elde edilen PFO enziminin optimum aktivite gösterdiği tampon konsantrasyonu 10-40-60-80-100 mM değerlerinde ölçümler yapılarak tespit edildi. Aktivite ölçümündeki reaksiyon karışımı 2,3 mL tampon, 0,6 mL substrat ve 0,1 mL enzimden oluşturuldu. Bu veriler için substrat olarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanıldı.

2.8 İnhibisyon

Polifenol oksidaz enziminin inhibisyonu için glutatyon ve askorbik asit inhibitörleri kullanıldı. İnhibisyon çalışması katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak yapıldı. Reaksiyon karışımı 0,1 M fosfat tamponu, farklı konsantrasyonlardaki substrat ve inhibitör bunun yanında yine 0,1 mL enzim çözeltisi olacak şekilde ayarlandı. İnhibisyon sabitleri (K_i), iki inhibitör içinde Lineweaver-Burk eğrilerinden hesaplanarak elde edildi.



Şekil 2.2: Çalışmada kullanılan inhibitörlerin açık yapıları.

2.9 *Salvia huberi* HEDGE Ekstraktının Protein İçeriği

Salvia huberi HEDGE bitki ekstraktının proteğin içeriğini belirlemek için Bradford Yöntemi kullanıldı. Bu yöntem kısa sürede uygulanmasından ve protein boya kompleksinin çözeltide uzun süre kalmasından dolayı tercih edilmiştir. Yöntem, Coomanssie Brillant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasında yer almaktadır [52].

Otomatik pipet yardımı ile herbir deney tüpüne sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL olacak şekilde 1 mL’inde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden eklendi. İçerisinde albumin çözeltisi bulunan tüpler 5 mM pH’sı 7,0 olan fosfat tamponuyla 0.1 mL’ye tamamlandı. Coomanssie Brillant Blue G-250 içeren reaktiften her bir tüpe 5 mL eklendi ve bu tüpler vorteks ile 1 dakika boyunca karıştırıldı. Çözelti 15 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbans 595 nm’de ölçüldü. Kör olarak 0,1 mL saf su kullanıldı. Ölçümler 96’lık well-platede 3 tekrarlı yapıldı. Üç ölçümün ortalaması alındıktan sonar standart grafik yardımı ile absorbans değerlerine karşılık oluşan protein miktarı belirlendi.

3. BULGULAR

Çalışmanın bu bölümünde deneyler sonucunda elde edilen veriler yer almaktadır.

3.1 *Salvia huberi* HEDGE Ekstraktının Toplam Protein İçeriği

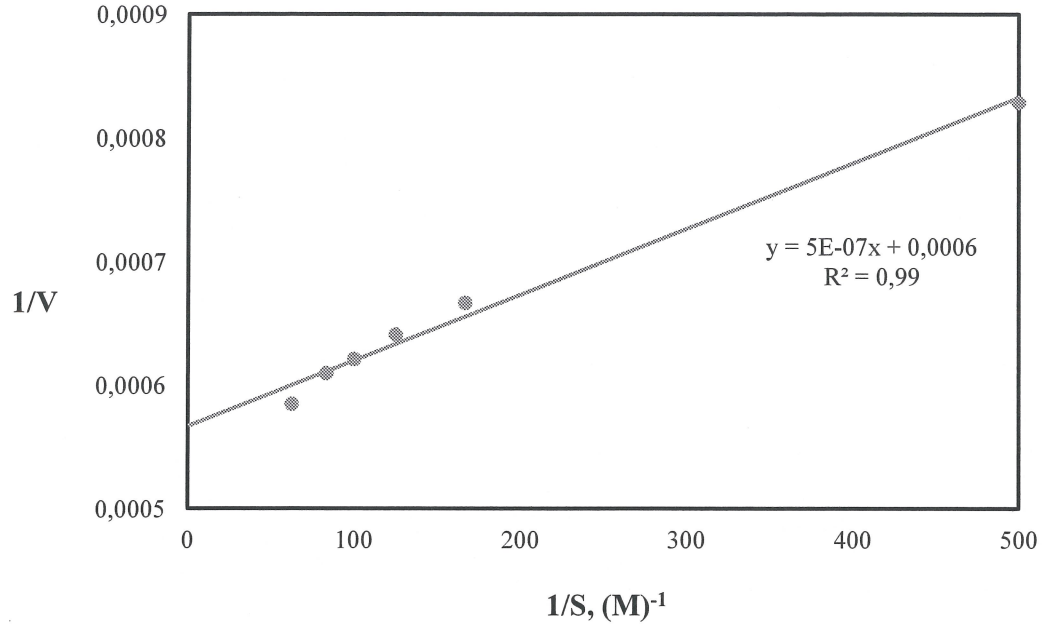
Bu çalışmada Bradford yöntemine göre, ham ekstrakt içerisindeki toplam protein içeriği belirlenmiştir [52]. *Salvia huberi* HEDGE ekstraktındaki protein içeriği $930 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır.

3.2 Substrat Spesifliği

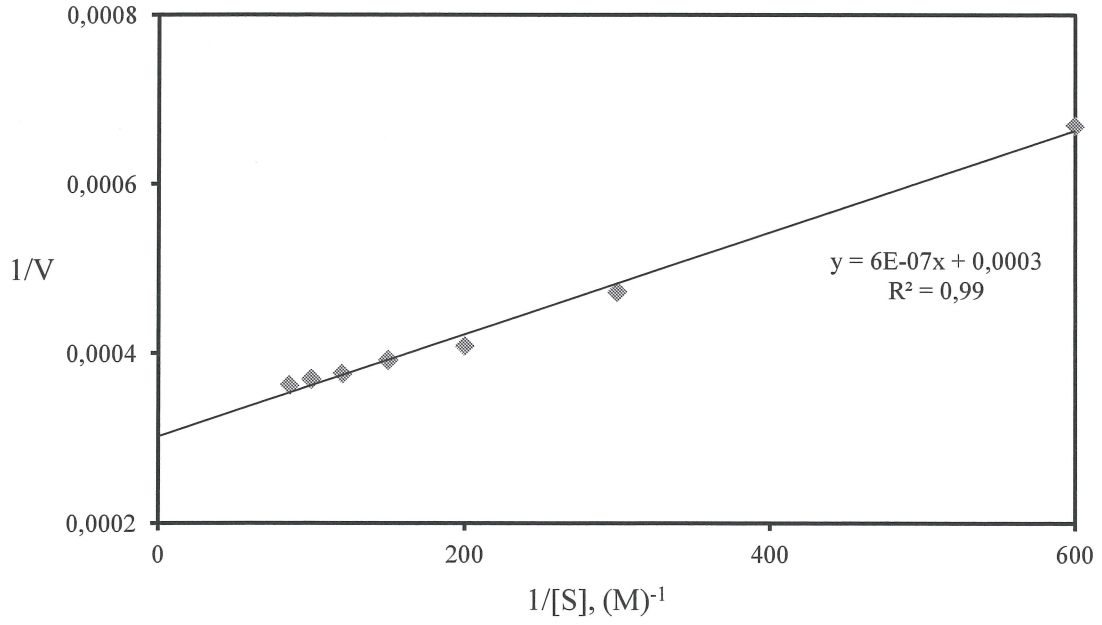
Salvia huberi HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesini tayin etmek için substrat olarak; katekol, 4-metil katekol, ve pirogallol kullanılmıştır. Deneysel olarak elde edilen veriler Tablo 3.1' de ve Şekil 3.1- 3.3'de yer almıştır.

Tablo 3.1: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik

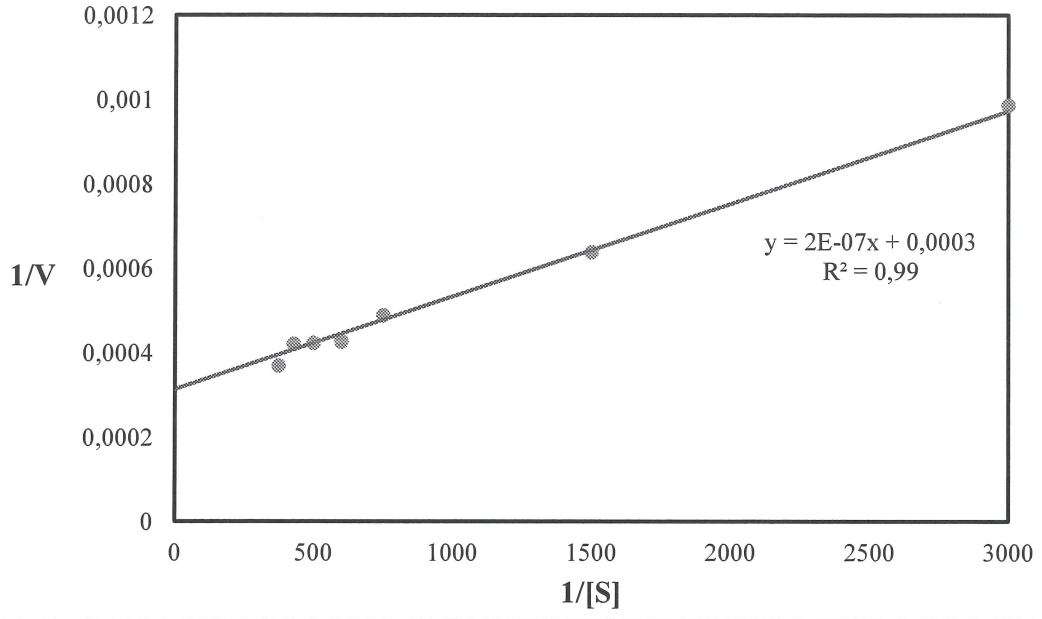
Substratlar	[S] (M) × 10 ³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] M ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ × 10 ⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	V _{max} /K _M (EÜ dak ⁻¹ Mm ⁻¹)	R ²
4-metilkatekol	1,66	1495	600	6,7	3333	2,00	1666	0,99
	3,33	2117	300	4,7				
	5,00	2447	200	4,1				
	6,67	2550	150	3,9				
	8,33	2661	120	3,8				
	10,0	2706	100	3,7				
11,67	2760	86	3,6					
Katekol	2,0	1206	500	8,29	1666	0,83	2008	0,98
	6,0	1500	167	6,67				
	8,0	1560	125	6,41				
	10,0	1610	100	6,21				
	12,0	1640	83	6,1				
	16,0	1710	63	5,85				
Pirogallol	0,33	1014	3000	9,86	3333	0,66	5050	0,99
	0,66	1567	1500	6,38				
	1,33	2048	750	4,88				
	1,66	2347	600	4,26				
	2,00	2366	500	4,23				
	2,33	2379	429	4,20				
2,66	2710	375	3,69					



Şekil 3.1: Katekol substratı ile *Salvia huberi* HEDGE PFO'ı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrisi.



Şekil 3.2: 4-metilkatekol substratı ile *Salvia huberi* HEDGE PFO'ı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrisi.



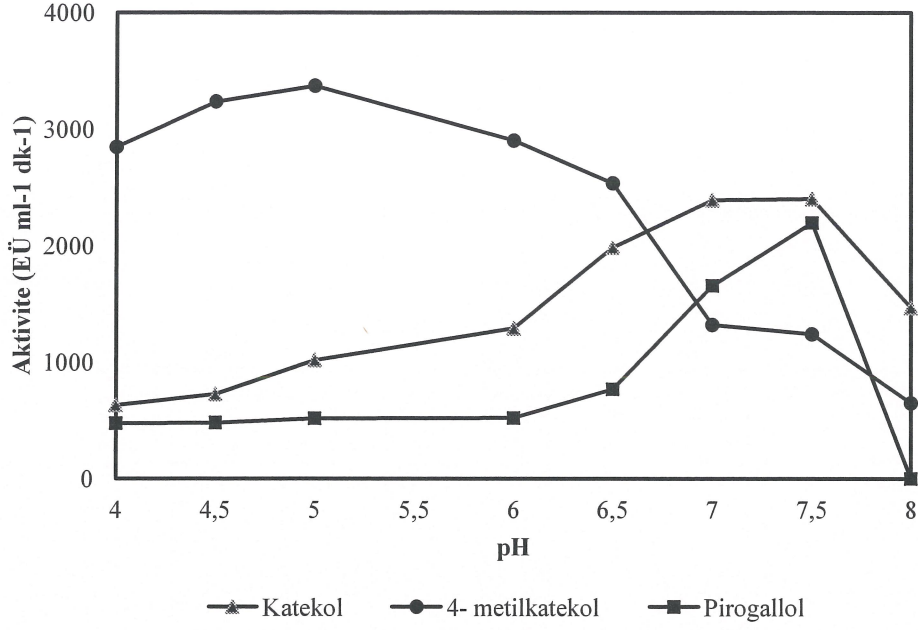
Şekil 3.3: Pirogallol substratı ile *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazı için çizilmiş $1/[S]$ - $1/V_0$ eğrisi.

3.3 Optimum pH

Optimum pH verileri *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz için katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları kullanılarak bulunmuştur. Elde edilen değerler Tablo 3.2 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.2: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait deneysel veriler.

pH	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metil katekol	Pirogallol
4,0	632	2845	475
4,5	725	3236	481
5,0	1017	3370	518
6,0	1290	2901	521
6,5	1984	2535	768
7,0	2392	1321	1657
7,5	2403	1240	2196
8,0	1468	649	0



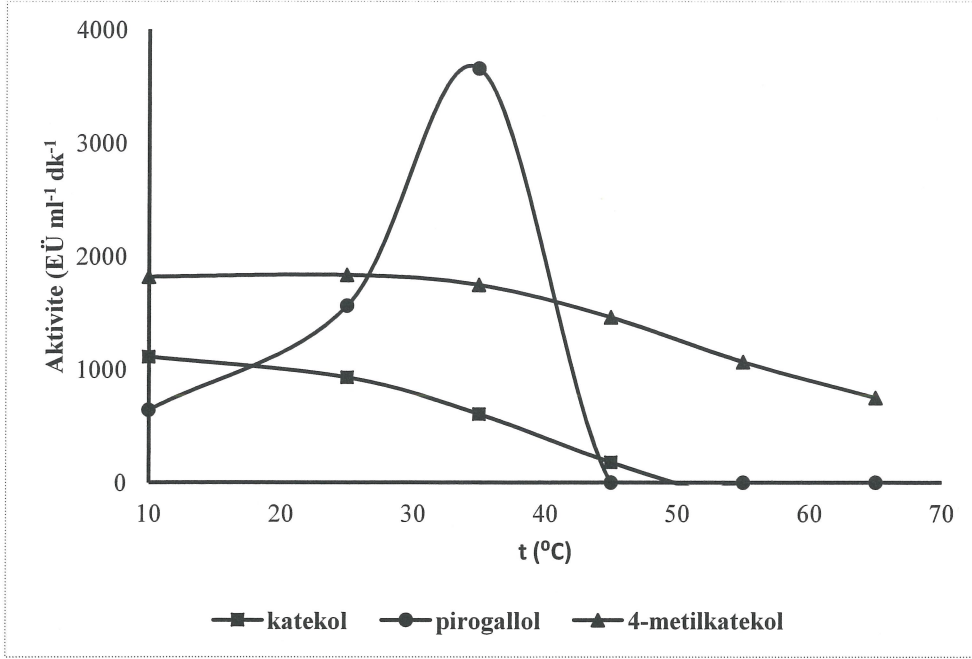
Şekil 3.4: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimi.

3.4 Optimum Sıcaklık

Sıcaklık değişimi 10, 25, 35, 45, 55, 65 °C'de incelenen *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucu elde edilen değerler Tablo 3.3 ve Şekil 3.5'te verilmiştir. Şekil 3.5'te görüldüğü gibi katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklık değerleri sırası ile 10, 25, 35 °C olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.3: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait değerler.

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metil katekol	Pirogallol
10	1110	1817	641
25	928	1833	1561
35	605	1746	3656
45	178	1458	—
55	—	1064	—
65	—	748	—



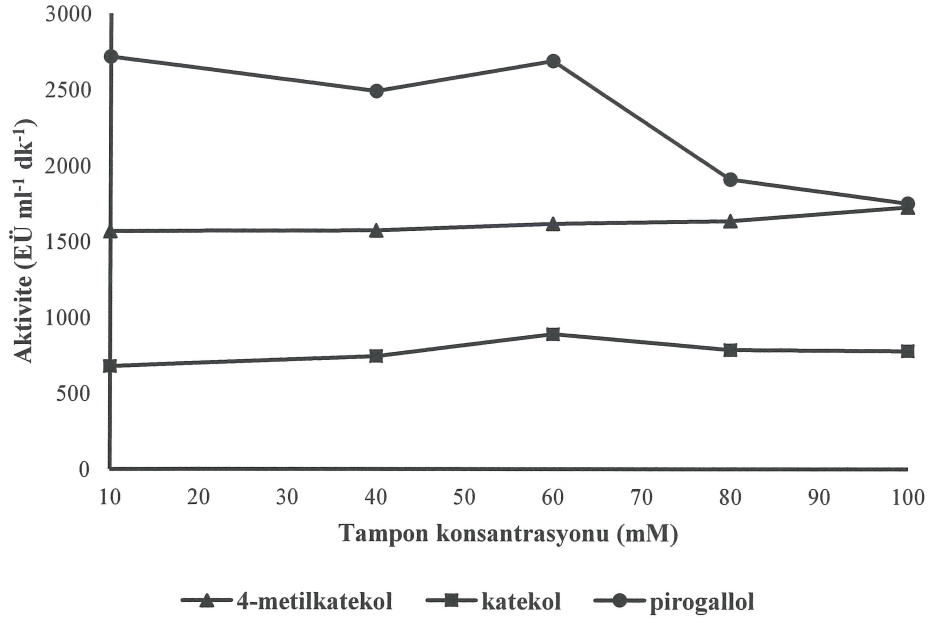
Şekil 3.5: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi.

3.5 Optimum Tampon Konsantrasyonu

Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin optimum tampon konsantrasyonu 10, 40, 60, 80, 100 mM' da incelenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 3.4'te ve Şekil 3.6'da verilmiştir. Şekil 3.6'dan da anlaşılacağı gibi katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için optimum tampon konsantrasyonları sırasıyla 60, 100 ve 10 mM'dır.

Tablo 3.4: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin tampon konsantrasyonuna ilişkin verileri.

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metil katekol	Pirogallol
10	678	1567	2717
40	743	1572	2489
60	888	1617	2688
80	785	1635	1908
100	778	1726	—



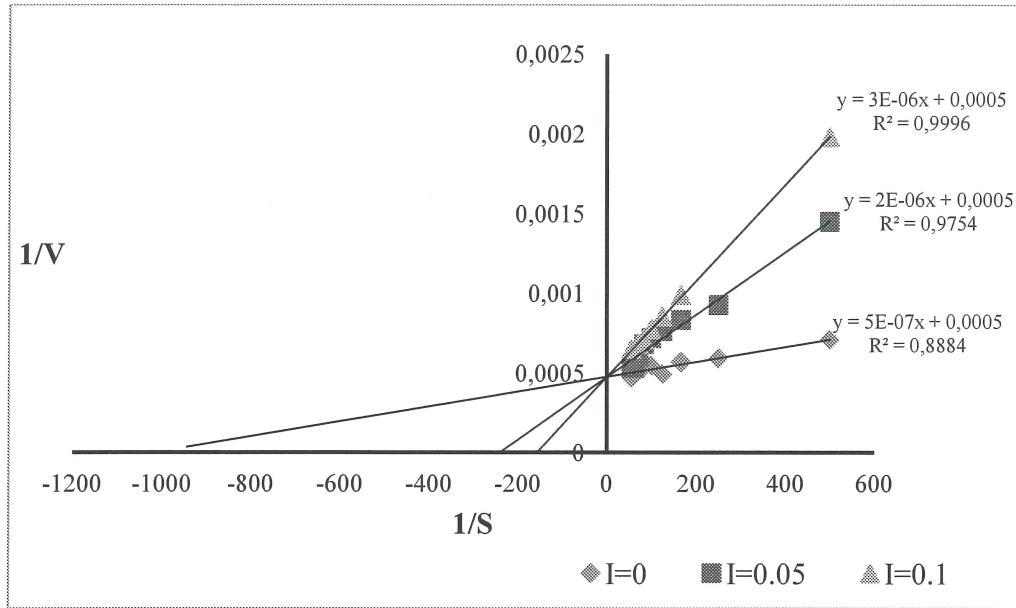
Şekil 3.6: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin tampon konsantrasyonu ile değişimi.

3.6 Polifenol Oksidazın İnhibisyonu

Salvia huberi HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın inhibisyonu için katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları ile glutatyon ve askorbik asit inhibitörleri kullanılmıştır. Elde edilen değerler Tablo 3.5-3.10'da verilip Şekil 3.7-3.12'de grafik edilmiştir.

Tablo 3.5: Katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel

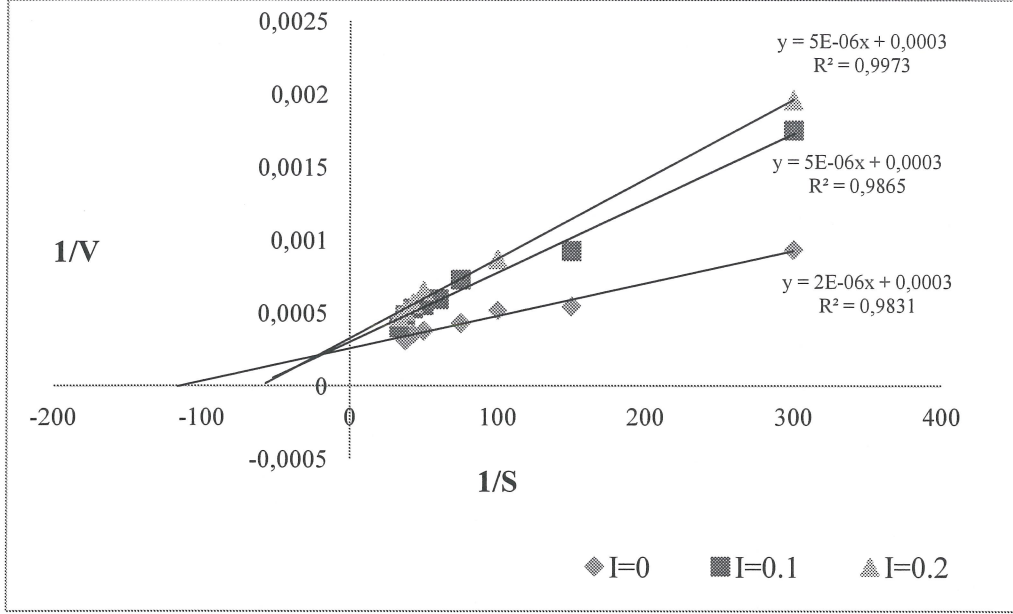
[I] (M)	[S] (M) × 10 ³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ × 10 ⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²					
0	2	1410	500	7,1	2000	0,001		0,99					
	4	1690	250	5,9									
	6	1760	167	5,7									
	8	2020	125	5,0									
	10	1830	100	5,5									
	12	1850	83	5,4									
	14	1900	71	5,3									
	16	1980	63	5,1									
	18	2140	56	4,7									
	1,67 × 10 ⁻⁴	2	690	500					14,5			1,67 × 10 ⁻⁴	0,97
		4	1080	250					9,3				
		6	1200	167					8,3				
		8	1310	125					7,6				
		10	1390	100					7,2				
		12	1470	83					6,8				
		14	1660	71					6,0				
		16	1890	63					5,3				
		18	1870	56					5,3				
2,33 × 10 ⁻⁴		2	505	500	19,8			2,33 × 10 ⁻⁴	0,99				
		6	1010	167	9,9								
		8	1170	125	8,5								
		10	1290	100	7,8								
		12	1400	83	7,1								
		14	1470	31	6,8								
		18	1540	56	6,5								



Şekil 3.7: Katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.

Tablo 3.6: Pirogallol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.

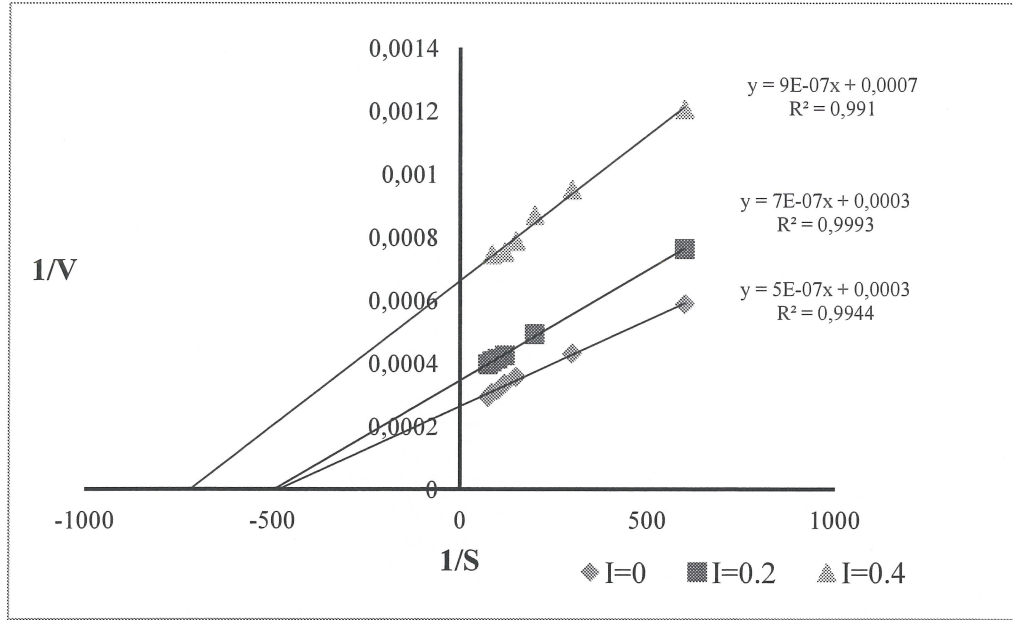
[I] (M)	[S] (M) × 10 ³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ × 10 ⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	3,33	1070	300	9,3	333	0,007	—	0,98
	6,67	1830	150	5,5				
	10,00	1930	100	5,2				
	13,3	2320	75	4,3				
	20,0	2640	50	3,8				
	23,3	2790	43	3,6				
	26,7	3190	38	3,1				
	3,33	570	300	17,5				
3,3 × 10 ⁻⁴	6,67	1080	150	9,3	—	—	1,4 × 10 ⁻⁴	0,98
	13,3	1370	75	7,3				
	16,7	1680	60	6,0				
	20,0	1810	50	5,5				
	23,3	1880	43	5,3				
	26,7	2060	38	4,9				
	30,0	2490	33	4,0				
	3,33	510	300	19,6				
6,7 × 10 ⁻⁴	10,0	1150	150	8,7	—	—	4,9 × 10 ⁻¹	0,99
	20,0	1530	50	6,5				
	23,3	1770	43	5,6				
	26,7	1940	38	5,2				
	30,0	2110	33	4,7				



Şekil 3.8: Pirogallol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.

Tablo 3.7: 4-metil katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

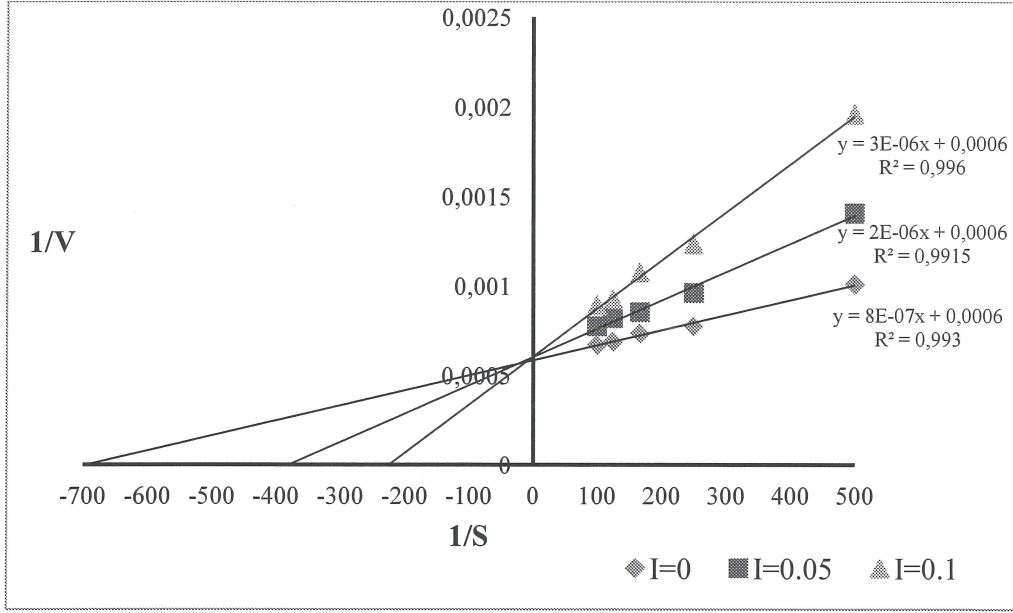
[I] (M)	[S] (M) × 10 ³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) × 10 ⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	1,67	1700	600	5,9	3333	2	—	0,99
	3,33	2320	300	4,3				
	6,67	2800	150	3,6				
	8,33	2970	120	3,4				
	10,00	3180	100	3,1				
	11,7	3250	86	3,1				
	15,00	3410	75	2,9				
6,7 × 10 ⁻⁴	1,67	1310	600	7,6	—	—	6,7 × 10 ⁻⁴	0,99
	5,00	2030	200	4,9				
	8,33	2350	120	4,3				
	10,00	2410	100	4,1				
	11,7	2460	86	4,1				
	13,3	2520	75	4,0				
13,3 × 10 ⁻⁴	1,67	829	600	12,1	—	—	13,3 × 10 ⁻⁴	0,99
	3,33	1052	300	9,5				
	5,00	1150	200	8,7				
	6,67	1270	150	7,9				
	8,33	1330	120	7,5				
	11,7	1340	86	7,5				



Şekil 3.9: 4-metil katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.

Tablo 3.8: Katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.

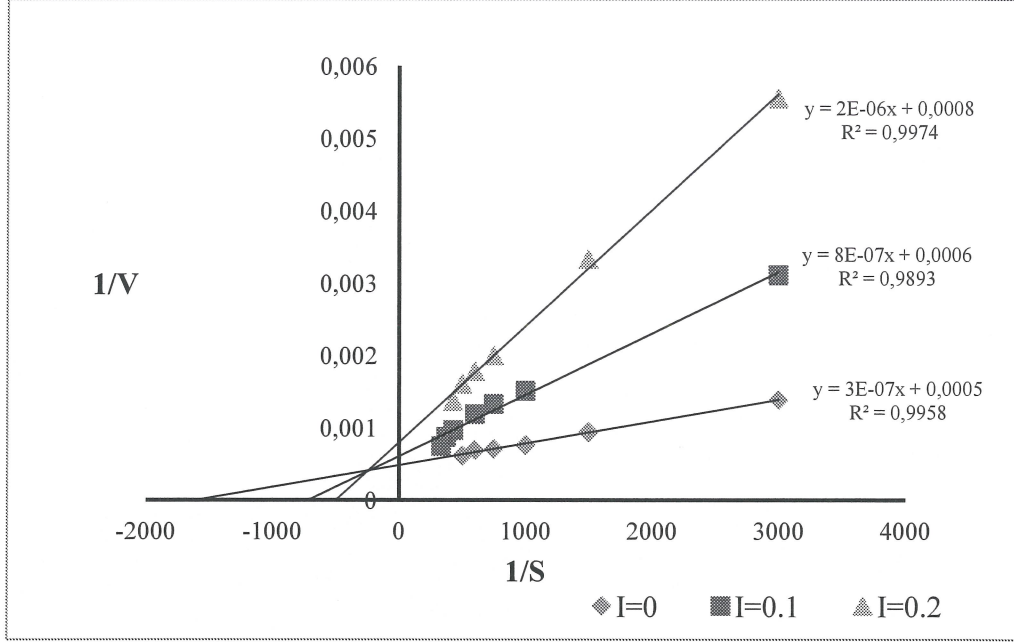
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^3$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/ V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) $\times 10^4$	V^{\max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_I (M)	K_I (M)	R^2
0	2	990	500	10,1	1666	0,0013	—	—	0,99
	4	1290	250	7,75					
	6	1360	167	7,35					
	8	1450	125	6,9					
	10	1490	100	6,71					
$8,33 \times 10^{-5}$	2	710	500	14,08	—	—	$3,25 \times 10^{-5}$	$8,33 \times 10^{-5}$	0,99
	4	1040	250	9,62					
	6	1170	167	8,55					
	8	1220	125	8,2					
	10	1290	100	7,75					
$1,67 \times 10^{-4}$	2	510	500	19,61	—	—	$4,35 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-4}$	0,99
	4	810	250	12,35					
	6	930	167	10,75					
	8	1080	125	9,26					
	10	1120	100	8,93					



Şekil 3.10: Katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0$ - $1/[S]$ eğrileri.

Tablo 3.9: Pirogallol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.

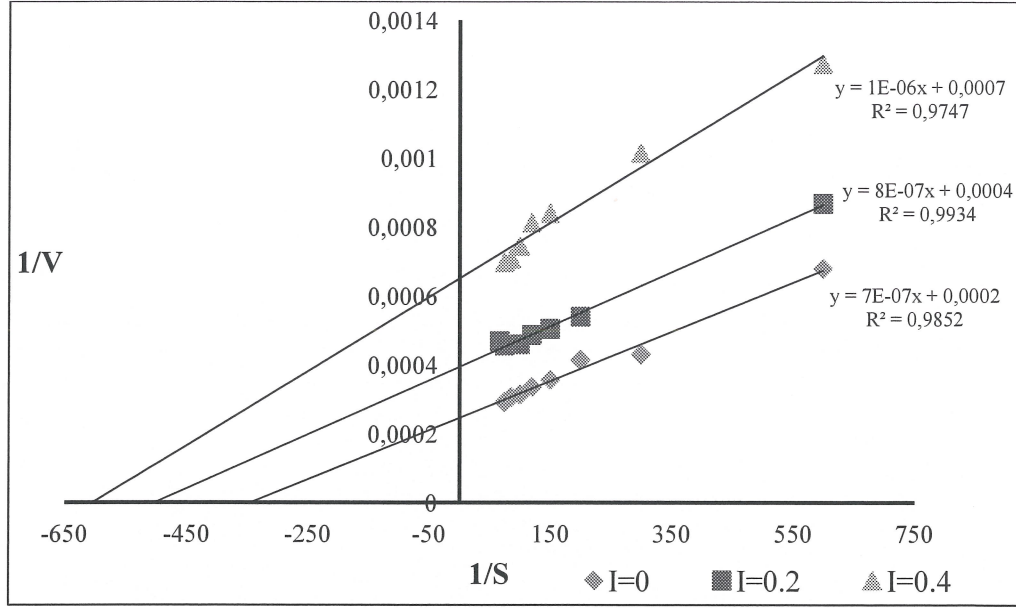
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^3$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	$1/V_0$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) $\times 10^4$	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	K_i (M)	R^2
0	0,33	720	3000	13,9	2000	6×10^{-3}	—	—	0,99
	0,67	1060	1500	9,4					
	1,0	1310	1000	7,6					
	1,33	1410	750	7,1					
	1,67	1440	600	6,9					
	2	1620	500	6,2					
$1,7 \times 10^{-4}$	0,33	320	3000	31,2	—	—	$6,39 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,98
	1,0	660	1000	15,2					
	1,33	750	750	13,3					
	1,67	840	600	11,9					
	2,33	1030	428	9,7					
	2,67	1140	375	8,8					
3,0	1340	333	7,5						
$3,3 \times 10^{-4}$	0,33	180	3000	55,6	—	—	$4,95 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	0,99
	0,67	300	1500	33,3					
	1,33	500	750	20,0					
	1,67	560	600	17,9					
	2,0	620	500	16,1					
	2,33	728	428	13,7					



Şekil 3.11: Pyrogallol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.

Tablo 3.10: 4-metil katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler.

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^3$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) $\times 10^4$	V ^{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	1,66	1470	600	6,8	5000	0,0035	—	0,98
	3,33	2320	300	4,3				
	5,0	2410	200	4,1				
	6,66	2800	150	3,5				
	8,33	2970	120	3,3				
	10,0	3180	100	3,1				
	11,6	3250	86	3,08				
	13,3	3410	75	2,9				
	1,66	1150	600	8,7				
	5,0	1850	200	5,4				
$3,33 \times 10^{-4}$	6,6	1980	150	5,1	—	—	$1,67 \times 10^{-4}$	0,99
	8,3	2050	120	4,8				
	10,0	2170	100	4,6				
	13,3	2190	75	4,5				
	15,0	2130	67	4,7				
	1,66	785	600	12,7				
	3,33	984	300	10,1				
	6,66	1190	150	8,4				
	8,33	1230	120	8,1				
	10,0	1340	100	7,4				
$6,67 \times 10^{-4}$	11,6	1410	86	7,1	—	—	$1,91 \times 10^{-4}$	0,97
	13,3	1430	75	6,9				



Şekil 3.12: 4-metil katekol substratı kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Toplam Protein Miktarı

Salvia huberi HEDGE'nin ham ekstraktındaki toplam protein içeriği $930 \mu\text{g/mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu tespit Coomasie Brilliant Blue (CBB) G-250 solüsyonu olan asidik bir boya ile Bradford metoduna göre yapılmış olup spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Diğer pek çok protein tayin yöntemine kıyasla bu yöntemi üstün kılan ise; çözeltide, protein-boya kompleksinin kalınımının uzun sürmesi, bozucu faktörlerin yer almaması ve hassasiyetinin 1-100 μg arasında olmasıdır [52]. Aminoasit dizilerine bağlı olan protein içeriği bitkiden bitkiye farklılık gösterirken bunun yanında çevresel faktörlerden de etkilenmektedir [53]. Literatüre göre biberiyenin protein içeriği 0,69 mg/mL[54], fesleğenin 1,83 mg/mL [13], oğul otunun 2,30 mg/mL [55], yenilebilir mantarın (*Lactarius eucalypti*) 1,47 mg/mL [56], muşmulanın (*Mespilus germanica L.*) 3,552 mg/mL [57] , muzun 1,5-2,1 mg/mL [58], Nevşehir patatesinde 0,993 mg/mL [59] olduğu saptanmıştır.

4.2 Optimum pH

Her bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için pH'ın belirlenebilmesi adına ortamda belirli oranda H^+ ve OH^- iyonları konsantrasyonu olması gerekir. En uygun pH değeri enzimin en yüksek aktivite gösterdiği noktaya göre optimum pH olarak adlandırılır [60]. İlk olarak pH'ın artmasıyla enzimin aktivitesi maksimum seviyeye ulaşırken sonraki aşamada bazik alanda sıfıra doğru düşer. pH aralığının daralmasının sebepleri; substratın iyonlaşması, substratın enzime bağlanması, proteinin yapısında gerçekleşen etkiler ve enzimin katalitik aktivitesidir [61]. Genel olarak enzim aktivitesi pH'ın yükselmesiyle artarken, düşmesiyle de azalarak sıfıra doğru ilerler. Bunun yanında amino grup yan zincirlerinin veya substratın iyonlaşması için de pH oldukça önemli bir rol almaktadır [62]. Bundan dolayı her bir farklı substrat için bir pH değeri yer almaktadır.

Salvia huberi L. PFO'nun optimum pH değeri 4,0-8,0 aralığında fosfat tamponu kullanılarak belirlenmiştir. *Salvia huberi* HEDGE (adaçayı) PFO'nun optimum pH'ını belirlemek için katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılmıştır. *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen deney sonuçlarına göre optimum pH katekol substratı için 7,5; 4-metil katekol substratı için 5,0; pirogallol substratı için ise yine 7,5 olarak belirlendi.

Substrat olarak katekol kullanıldığında *Salvia* türleri için optimum pH (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq., *Salvia tomentosa* Miller) 7,0 [63], biberiye için optimum pH 8,0 [54], oğul otu için optimum pH 6,5 [55], fesleğen için optimum pH 8,0 [13], Türk çayı için optimum pH 6,0 [64], kekik için optimum pH 6,5 [12], kivi için optimum pH 7,3 [65], buriti meyvesi için optimum pH 7,0 [66], patlıcan için optimum pH 7,0 [34], erik için optimum pH 6,0 [67], yaban mersini için optimum pH 5,5 [68] olarak bulunmuştur.

Substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında kekikte optimum pH 5,5 [12], biberiyede optimum pH 7,0 [54], oğul otunda 4,0 [55], fesleğende 6,0 [13], elma suyunda optimum pH 4,7 [69], çilekte optimum pH 4,5 [50], buğday için optimum pH 5,6 [70], enginar için optimum pH 5,0 [28], marul için optimum pH 6,5 olarak bulunmuştur [29].

Substrat olarak pirogallol kullanıldığında biberiye için optimum pH 8,0 [54], kekikte optimum pH 6,5 [12], fesleğende optimum pH 9,0 [13], oğul otunda optimum pH 8,5 [55], kuşburnu için optimum pH 7,0 [20], marul için optimum pH 7,5 [29], Amasya elması için optimum pH 8,6 [71], Çin lahanası için optimum pH 5,0 olarak belirlenmiştir [72]. Polifenol oksidaz enzimi için daha önceki yapılmış çalışmalarda göz önünde tutularak optimum pH'ın kullanılan substrata ve enzimin kaynağına bağlı olarak farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir [73].

4.3 Optimum Sıcaklık

Salvia huberi HEDGE polifenol oksidaz aktivitesinin 3 farklı substrat ile sıcaklık değişimi Şekil 3.5'te yer almıştır. Adaçayı, kullanılan 3 farklı substrat ile de 10-65 °C arasında aktivite göstermiştir. Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol

substratları için *Salvia huberi* HEDGE PFO'nun optimum sıcaklık verileri sırasıyla 10, 25 ve 35 °C olarak tespit edilmiştir.

Literatür taraması yapıldığında katekol substratı için optimum sıcaklık değeri defne yaprağında 40 °C [74], kekikte 40° C [12], *Salvia* türlerinde (*Salvia viridis* L, *Salvia virgata* Jacq., *Salvia tomentosa* Miller) 40 °C [63], biberiyede 20 °C [54], fesleğende 40 °C [13], oğul otunda 40 °C [55] olduğu bulunmuştur. 4-metilkatekol substratı için optimum sıcaklık kekikte 25 °C [12], biberiyede 20 °C [54], fesleğende 20 °C [13], oğul otunda 50 °C [55], çay yaprağında 30° C [75], dutta 20° C olduğu gözlemlenmiştir [76]. Pirogallol substratı için fesleğende 50 °C [13], oğul otunda 60 °C [55], biberiyede 30 °C [54] olduğu saptanmıştır.

4.4 Optimum Tampon Konsantrasyonu

Asitlik ve bazlık değişmelerine karşı direnen, yani az miktarda kuvvetli asit veya kuvvetli baz ilavesiyle pH'ı yaklaşık olarak sabit kalan çözeltilere tampon çözeltiler ; bu direnmeye de tampon etkisi denir [2].

Salvia huberi HEDGE polifenol oksidaz aktivitesinin 3 farklı substrat ile tampon konsantrasyonu değişimi Şekil 3.6'da yer almıştır. Adaçayı, PFO'nun kullanılan 3 farklı substrat ile 10-100 mM arasında aktivite gösterdiği gözlenmiştir. *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazının optimum tampon konsantrasyonları katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için sırasıyla 60, 100 ve 10 mM olduğu belirlenmiştir .

4.5 Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliği

Salvia huberi HEDGE, PFO'nun substrat ile spesifikliğini belirlemek amacıyla di- ve trifenolik substratlar kullanılmıştır. *Salvia huberi* PFO'ı katekol, 4-metil katekol gibi difenolik, pirogallol gibi trifenolik substratlara karşı aktivite göstermiştir. Kayısı ve enginar gibi *Salvia huberi* HEDGE polifenol oksidazı da incelenmiş ve substratları için difenolaz ve trifenolaz aktivite gösterdiği gözlenmiştir [34, 28, 70]. *Salvia huberi* HEDGE PFO'nun doyunluk eğrilerinin

difenolik ve trifenolik substratlar için Michaelis-Menten eğrilerini sergilediği gözlemlenmiştir. Kinetik analizler için her bir substratın çeşitli konsantrasyonlardaki hızları Lineweaver-Burk denlemi kullanılarak hesaplanmıştır. V_{max}/K_M (katalizleme gücü) değeri ile substrat spesifikliğı belirlendi. Yani enzimin katalizleme gücü ve substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Buna göre en etkin substratın pyrogallol olduğu bunu takiben ise sırasıyla katekol ve 4-metil katekolün izlediğı belirlenmiştir. Tablo 4.1'de V_{max}/K_M değerleri ve 3 farklı substrat için de hesaplanmış Michaelis-Menten sabitleri yer almaktadır. Tablo 4.1'den de anlaşılacağı gibi substrat olarak pirogallol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 3333 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 0,66 mM ve 5050 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; substrat olarak katekol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 2000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 0,83 mM ve 2008 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; ve substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 3333 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 2 mM ve 1666 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu bulunmuştur.

Literatüre göre oğul otunun V_{MAX} , K_M ve V_{MAX}/K_M değerleri sırasıyla substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında 1111,1 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 11,1 mM ve 100 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; substrat olarak katekol kullanıldığında 10000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 20 mM ve 500 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; substrat olarak pirogallol kullanıldığında 2500 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 50 mM ve 50 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu belirlenmiştir [55]. Kekikte V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerleri sırasıyla substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında 50000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 0,20 mM ve 250 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu [12], substrat olarak katekol kullanıldığında kekikte 50000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 0,10 mM ve 500 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ [12], *Salvia viridis* L.'de 7305 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 5,4 mM ve 1352 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹, *Salvia virgata* Jacq'de 2949 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 23,2 mM ve 127,1 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹, *Salvia tomentosa* Miller'da 11198 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 6,7 mM ve 1671,3 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ [63] olduğu; substrat olarak pirogallol kullanıldığında kekikte 10000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 0,01 mM ve 1000 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu tespit edilmiştir [12].

Tablo 4.1: *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen polifenol oksidazın substrat spesifikliği.

Substratlar	V_{max} (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max}/K_M (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹ mM ⁻¹)
Katekol	2000	0,83	2008
4-metil katekol	3333	2	1666
Pirogallol	3333	0,66	5050

4.6 Enzim İnhibisyonu

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler arasında ışık, ısı, pH ve bazı fiziksel faktörler, enzim konsantrasyonu, zaman, substrat konsantrasyonu, hormonlar, reaksiyon ürünleri, çeşitli iyonların varlığı, bazı biyokimyasal faktörler ve inhibitörler ya da inhibitör etkisi gösteren bileşikler yer alır. Bir çok madde enzimin aktivitesini, substratın enzime bağlanmasını ve/veya enzimin turnover sayısının etkilenmesi ile değişim gösterir. Modölatör olarak bilinen bu maddeler iki gruba ayrılırlar. Enzimlerin aktivitesini arttıran gruplara aktivatör adı verilirken, enzimatik tepkimeleri yavaşlatan veya

durduran moleküler ajanlara ise inhibitörler denmektedir. Neredeyse bütün hücrel süreçleri katalizleyen enzimler böylelikle hücrel sistemleri de kontrol altına alabilirler [2]. Yapısal olarak pek çok inhibitör enzimin substratı ile benzerlik gösterir. Bitkilerin enzimatik kararması oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktantları ortamdaki yok ederek ve aynı zamanda PFO inhibitörlerini kullanarak geciktirilebilir ya da tamamen önlenir. Bitkilerin işlem görmeleri esnasında ortamdaki oksijenin tamamen giderilmesi, oksijenin atmosferdeki mevcudiyetinden dolayı oldukça güçtür [77]. Bir metaloprotein olan ve prostetik grup olarak bakır içeren PFO; tropolon ve EDTA gibi metal şelatlayıcı ajanlar ve askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar tarafından inhibisyona uğratılabilir. Buna benzer inhibitörlerden bazıları basit olmayan bir etki ile *o*-kinonları *o*-difenollere indirgerken aynı zamanda bununla birlikte enzim üzerinde direkt olarak inhibitör etkisiyle veya renkli bileşik ürünleri veren kinonlarla reaksiyon vererek kimyasal bir etki gösterirler. Pek çok durumda bir inhibitör için yalnızca tek bir spesifik mekanizmadan bahsetmek doğru değildir[78].

Glutasyon, vücudun kendi ürettiği güçlü antioksidanlardan biri olup, tüm organ ve dokuları serbest radikallerin neden olacağı zararlı etkilere karşı korur. Askorbik asit ise; bir çok gıdada katkı maddesi olarak kullanılmakla birlikte oksidasyon önleyici görevi de üstlenmektedir. Yani kullanıldığı gıdanın ömrünün daha uzun olmasını ve saklama koşullarına dayanıklılığını sağlar. Bu çalışmada da inhibitör olarak glutasyon ve askorbik asit kullanılmıştır. Katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları kullanılarak *Salvia huberi* HEDGE PFO'nun bu inhibitörler ile inhibisyonu incelenmiştir.

4.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

Yarışmalı inhibisyon için genel reaksiyon şeması ve Linewaver-Burk denklemi yukarıda verilmişti. Linewaver-Burk denkleminin eğrisi, eğimi $\alpha K/V_{max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{max}$ olan düz bir doğru verecektir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için Linewaver-Burk eğrileri $1/V_0$ eksenindeki $1/V_{max}$ noktasında kesişirler. Diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında çeşitli inhibitör konsantrasyonlarındaki Linewaver-Burk

eğrilerinin $1/V_{max}$ 'da kesişmesi yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [29].

Tablo 4.2'den de anlaşıldığı gibi substrat olarak katekol kullanıldığında glutatyon inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı olduğu tespit edilmiştir. Literatürde Ayyıldız ve arkadaşları oğul otu PFO'ı için substrat olarak katekol kullandığında glutatyon ve sodyum azid inhibitörünü, substrat olarak 4-metil katekol kullandığında glutatyon ve sodyum azid inhibitörünü, substrat olarak pirogallol kullandığında ise askorbik asit ve sodyum azid inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyon gösterdiğini belirlemişlerdir [55]. Doğan ve arkadaşları biberiyede substrat olarak katekol, 4-metil katekol ve pirogallol kullanıldığında L-sistein inhibitörünü yarışmalı inhibisyon tipine örnek olarak bulmuştur [54]. Ng ve Wong patlıcan polifenol oksidazı için substrat olarak katekol kullandığında sodyum disülfid, substrat olarak 4-metil katekol kullandığında ise askorbik asit inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyon tipine ait olduğunu rapor etmişlerdir [79]. Turan ve arkadaşları fesleğen PFO'ı için substrat olarak katekol kullandığında glutatyon, L-sistein, tropolon, askorbik asit ve gallik asit; substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında L-sistein, tropolon, 1,4-ditiyoeritrol, askorbik asit ve sodyum azid; substrat olarak pirogallol kullanıldığında askorbik asit inhibitörünün yarışmalı tür inhibisyon olduğunu belirlemişlerdir [13]. Altunkaya ve arkadaşları çay PFO'ı için katekol kullanıldığında askorbik asit ve sistein inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyon olduğunu belirlemişlerdir [64]. Doğan ve arkadaşları, karabaş kekiğinin polifenol oksidazı için substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında L-sistein inhibitörünü, substrat olarak katekol kullanıldığında L-sistein ve glutatyon inhibitörünü, substrat olarak pirogallol kullanıldığında L-sistein ve glutatyon inhibitörlerinin yarışmalı tip inhibisyon gösterdiklerini bulmuşlardır [80].

4.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

İnhibitörün serbest enzime bağlanmayıp doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanmasına yarı-yarışmalı inhibisyon denir. Bu mekanizmanın anlaşılması, inhibitör için bağ noktası sadece substratla etki kurduğunda sağlanabilir. Bunun yanında oluşan yapı, çok kararlı olduğu için ürüne dönüşme

gözlenmez. Yarı-yarışmalı inhibisyon için inaktif yapının oluşumu ve Lineweaver-Burk denklemi de daha önce verilmiştir. Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi K_M/V_{max} ve ekstrapolasyonu α'/V_{max} olan düz bir doğrudan oluşmaktadır. Ayrıca çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelirler. Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durum teşkil eder. Yarı-yarışmalı inhibisyonda, inhibitör enzimin katalitik fonksiyonunu etkiler ancak substrata bağlanmasını etkilemez [29].

Tablo 4.2'den de anlaşıldığı gibi substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında glutatyon ve askorbik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarı-yarışmalı olduğu tespit edilmiştir. Literatür taraması yapıldığında Turan ve arkadaşları fesleğen polifenol oksidazı için katekol substratı kullanıldığında 4-amino benzoik asit inhibitörünün, substrat olarak 4-metil katekol substratı kullanıldığında gallik asit inhibitörünün, substrat olarak pirogallol kullanıldığında 4-amino benzoik asit ve tropolon inhibitörlerinin yarı-yarışmalı inhibisyon olduğu bulunmuştur [13]. Arslan ve Doğan tarafından mantar polifenol oksidazı için substrat olarak katekol ve pirogallol kullanıldığında 2,3-diaminopropionik asidin yarı-yarışmalı bir inhibisyon sergilediği bulunmuştur [81]. Turan ve arkadaşları fesleğen PFO'ı için substrat olarak katekol kullandığında 4-amino benzoik asit inhibitörünü, substrat olarak 4-metil katekol kullandığında gallik asit inhibitörünü, substrat olarak pirogallol kullandığında tropolon ve 4-amino benzoik asit inhibitörlerini yarı-yarışmalı inhibisyon türü olarak saptamışlardır [13].

4.6.3 Karışık İnhibisyon

Karışık tür inhibisyonda genellikle inhibitör hem enzim-substrat kompleksine hem de katalize katılım gösteren enzimin aktif noktalarına bağlanma gösterir. Bu tür inhibisyonun Lineweaver-Burk denklemi ise daha önce verilmişti. Lineweaver-Burk denkleminin eğrisinin, eğimi $\alpha K_M/V_{max}$ ve ekstrapolasyonu α'/V_{max} olan düz bir şekilde doğru verecektir. İnhibitörün farklı konsantrasyonları için bu eşitliğin eğrileri $1/V_0$ ekseninin solunda kesişen birbirine benzer doğrulardan meydana geldiği belirlenir.

Tablo 4.2’den de anlaşıldığı üzere substrat olarak katekol kullanıldığında askorbik asit inhibitörünün, substrat olarak pirogallol kullanıldığında glutatyon ve askorbik asit inhibitörlerinin karışık inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde Ayyıldız, oğul otu polifenol oksidazı için substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında askorbik asit inhibitörünün karışık inhibisyon olduğunu bulmuştur [55]. Doğan ve arkadaşları, marul PFO’sunda substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında tropolon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörünün, katekol substratı kullanıldığında glutatyon ve askorbik asit inhibitörlerinin, pirogallol substratı kullanıldığında askorbik asit inhibitörünün karışık tür inhibisyon olduğunu rapor etmiştir [29]. Doğan ve arkadaşları, Karabaş kekiğinde yaptıkları çalışmada substrat olarak 4-metil katekol kullanıldığında glutatyon inhibitörünün karışık tip inhibisyon gösterdiğini belirlemişlerdir [80].

Tablo 4.2: Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanıldığında *Salvia huberi* HEDGE’den edilen polifenol oksidazın inhibisyon türleri.

Substrat	İnhibitör	İnhibisyon Türü
Katekol	Askorbik asit	Karışık
4-metil katekol	Askorbik asit	Yarı-yarışmalı
Pirogallol	Askorbik asit	Karışık
Katekol	Glutatyon	Yarışmalı
4-metil katekol	Glutatyon	Yarı-yarışmalı
Pirogallol	Glutatyon	Karışık

5. SONUÇLAR

Salvia huberi HEDGE, PFO'nın özellikleri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, *Salvia huberi* HEDGE, PFO'u kısmen saflaştırılarak bazı biyokimyasal parametreleri incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar şunlardır:

- *Salvia huberi* HEDGE'den kısmi olarak saflaştırılan PFO için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Her bir substrat için optimum pH değeri sırasıyla 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol için 5.0, 7.5, 7.5 iken optimum sıcaklık değerleri de sırasıyla 25, 10 ve 35 °C olarak belirlenmiştir.
- *Salvia huberi* HEDGE'den elde edilen PFO için tespit edilen optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Optimum şartlarda 4-metil katekol, katekol ve pirogallol substratları için K_M değerleri sırasıyla 2, 0.83, 0.66 mM ve V_{max} değerleri sırasıyla 3333, 2000, 3333 EU mL⁻¹ dak⁻¹ olarak tespit edilmiştir.
- *Salvia huberi* HEDGE, PFO'nun substrat spesifikliğı belirlenmiş ve bu bitkiye ait PFO için en iyi substratın pirogallol olduğu bunu sırasıyla katekol ve 4-metil katekolün takip ettiği bulunmuştur.
- Ayrıca *Salvia huberi* HEDGE bitkisinin total protein içeriğı de belirlenmiştir. Bitkiye ait ham ekstraktaki toplam protein içeriğı 930 µg/mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Öztan, D., “Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflastırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı”. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Ankara, (2007)
- [2] Nelson, D., Cox, M., “Lehninger Biyokimyanın İlkeleri”, Kılınç, N., 975-8982- 18-4, Palme Yayıncılık, Ankara, (2005), 244-269
- [3] Akman, Y., Ketenoglu, O., Kurt, L., Güney, K., Hamzaoglu, E. ve Tuğ, M., 2007. Angiospermae (Kapalı) Tohumlular, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [4] Kaderoğlu, N., Erzurum ve Çevresinde Yetişen Endemik *Salvia huberi* Hedge Türünün Morfolojisi, Ekolojisi ve Fizyolojisi Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, 2009.
- [5] Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2016, 25 (Özel sayı-2): 340-345
- [6] Bağcı, E, Koçak, A., *Salvia palaestina* Bentham ve *S. tomentosa* Miller türlerinin uçucu yağ kompozisyonu, kemotaksonomik bir yaklaşım. Fırat Üniv Fen ve Müh Bil Dergisi 2008; 20: 35-41.
- [7] Şengöz, H., Bütün Hastalıklara Karşı Şifalı Bitkiler ve Tedavi Yolları. Nesil Yayınları, İstanbul, 2000.
- [8] Duke, J.A., 2006. Yeşil Eczane. Pegasus Yayınları, İstanbul.
- [9] Tuzlacı, E., 2006. Şifa Niyetine Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları. Alfa Yayınları, İstanbul.
- [10] Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z., "phenols, proanthocyanidis, flavones and flavonols İn some plant materials and their antioxidant activities", *Food Chemistry*, 89, 191- 198, 2005.
- [11] Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X., “ The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco ” *Acta Biochimica Polonica*. 49(4), 1029-1035, 2002.
- [12] Dogan, S., Dogan, M., Arslan, O., “Characterization of polyphenol

- oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* var. *subisophyllus*)". *Advances in Food Science* (2003) 25(2), 56-64.
- [13] Turan, P., *Ocimum basilicum* L. Polifenol Oksidazının Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2005.
- [14] Eskin, N.A.M., *Biochemistry of Foods*, San Diego, California, USA (1990).
- [15] Mayer, A.M., and Harel, E., "Polyphenol oxidase in plants", *Phytochemistry*, 18, 193-215 (1979).
- [16] Vaughn, K.C., and Duke, S.O., "Function of polyphenol oxidase in higher plants", *Physiologia Plantarum*, 60, 106-112 (1984)
- [17] Bais H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M., "Root specific elicitation and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum*", *Plant Physiol. Biochem.*, (2002) 40, 983-995.
- [18] Satiawatoharaphang, C., Rymal, K.S., Dozier, J., "Polyphenol oxidase system in red delicious apples", *J. Food Sci.*, (1976).
- [19] Doğan, S., "*Origanum* L. (*Lamiaceae*) Taksonlarının (*Origanum onites* L. Ve *Origanum vulgare* L. spp. *hirtum* (Link) Ietswaar) Çevre Faktörleriyle Olan İlişkilerinin ve PFO Aktivitesinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, Haziran, (2002).
- [20] Şakiroğlu, H., "Kuşburnu meyvesinde izole edilen polifenoloksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [21] Sherman, T., O., Vaughn, K., C., Duke, S., O., "A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase", *Phytochemistry*, 30, 2499-2506, (1991).
- [22] Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J. C., "Suppression of polyphenol oxidase increases stress tolerance in tomato" *Plant Science*. 167 (2004), 693-703.
- [23] Oynan, M., Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Ve Yenedünya (*Eriobotrya japonica*) Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Özelliklerinin

- İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Aralık, (2000), 27.
- [24] Keskin, H., Erkmen, G. Besin Kimyası. T.C..İstanbul Üniversitesi Sıra no:3450, Mühendislik Fakültesi No:72. Güryay Matbaacılık Tic. Lmt. Şti., İstanbul, 270-274, (1987).
- [25] Keles, F., “Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerine Araştırmalar I Genel Özellikler” *Doğa D2*, 10(2) (1986), 224-234.
- [26] Lee, M-K., Park, I., “Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction product” *Food Chemistry*. 91 (2005), 57-61.
- [27] Lee, C.Y., Withaker, J. R., “Enzymatic Browning and Its Prevention” *American Chemical Society*, Washington, DC, (1995).
- [28] Ertürk, H., *Cynara scolymus* L. Bitkisinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Temmuz, (2004).
- [29] Salman, U., “*Lactuca sativa* L.’den Elde Edilen Polifenoloksidazın Kısmi Karakterizasyonu ”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [30] Mayende, L., Wilhelmi, B. S., Pletschke, B. I., “Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from termophilic *Basillus* spp. isolated from compost” *Soil Biology & Biochemistry* . (2006).
- [31] Durigan, F., Mattiuz B. H., James , T., “Cultivar affects browning susceptibilty of fresh cut star fruit slices” *Sci. Agric*, (Piracicorba, Braz) 63(1) ,1-4, (2006).
- [32] Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M., “ Charecterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape” *Food Chemistry*. (2006).
- [33] Khan, A. A., Akhtar, S., Husain, Q., "Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractioned proteins of potato (*Solanum tuberrasum*)" *Journal of Molecular Catalysis*. 40, 58-63, 2006.
- [34] Dogan, M., Arslan, O., Dogan, S., “Substrat specificity , heat inactivation

- and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars.”
International Journal of Food Science and Technology. 37, 415-423,
(2002).
- [35] Matsui, K. N., Granado, L. M., Oliveria de, P.V., Tadini, C. C.,
Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in
green coconut water simulated solutions *LWT*. (2006).
- [36] Sojo, M.N., 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.*, 48,147-
151 (2000).
- [37] Nagai, T., Suzuki, N., “Partial Purification of Polyphenol oxidase from
Chinese Cabbage *Brassica rapa* L.”, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3922-
3926, (2001).
- [38] Böyükbayram, A. E., Kıralp, S., Toppare, L., Yagci, Y., Preparation of
biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting
copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red
wine *Biochemistry*. 69, 164-171, (2006).
- [39] Marusek , C. M., Trobaugh , N. M., Flurkey, W. H., Inlow, J. K.,
Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species
Journal of Inorganic Biochemistry. 100, 108-123, (2006).
- [40] Maki, H., Morohashi, Y., Development of polyphenol oxidase activity
in the micropylar endosperm of tomato seeds *Journal of Plant
Physiology*. 163, 1-10 (2006).
- [41] Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S., del Valle, M., Determination of
phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and
artificial neural network analysis *Biosensors and Bioelectronics*. 20,
1668-1673, (2005).
- [42] Ünal, M. Ü., Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana
(*Musa cavendishii*) *Food Chemistry*. (2005).
- [43] Mdluli, K.M., Partial purification and characterisation of polyphenol
oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp.

- Caffra)” *Food Chemistry*. 92, 311-323, (2005).
- [44] Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z., “ Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide” *Food Chemistry*,. (2006).
- [45] Broothaerts, W., McPherson, J., Li, B., Randal, E., Lane, W.D., Wiersma, P.A., “Fast Apple (*Malus × domestica*) and Tobacco(*Nicotina Tobacum*) Leaf Polyphenol Oxidase Activity Assay for Screening Transgenic Plants” *J. Agric. Food Chem.*, 48(12), 5924-5928, (2000).
- [46] Jiang, Y., Fu, J., Zauberman, G., Fuchs, Y., “Purification of polyphenol oxidase and browning control of litch fruit by glutathione and citric acid”, *J. Agric Food Chem.*, 79, 950-954, (1999).
- [47] Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., “Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets”, *Food Chem.*, 105, 1047-1053, (2007).
- [48] Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., US,(2003).
- [49] Panskul, N., Leelasert, B., Rakariyatham , N., Effect of L- Cysteine Potassium metabisulfite, Ascorbic Acid and Citric Acid on Inhibition of Enzymatic Browning in Longon *Chiang Mai J. Sci.* 33(1), 137-141, (2006).
- [50] Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M. W., “Strawberry polyphenol oxidase: extraction and partial characterization”, *Journal of Food Science*, **55**, 1320-1325, (1990).
- [51] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., "Polyphenol oxidase from *Allium* sp." *J. Agric Food Chem*, 45(8), 2861-2863 (1997).
- [52] 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).
- [53] Lin, J-Y., Tang, C-Y., Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruit and vegetables, as well as their stimulator, effects on mouse splenocyte proliferation *Food Chemistry*. (2006).
- [54] Doğan, S., Diken, M. E., Turhan, Y., Alan, Ü., Doğan, M. and Alkan, M., Characterization and inhibition of *Rosmarinus officinalis* L.

polyphenoloxidase. *Eur Food Res. Technol*, 233:293-301, (2011).

- [55] Ayyıldız, Y., "Melissa officinalis L. Subsp. Officinalis'ten elde edilen polifenoloksidazın karakterizasyonu ve fenolik madde içeriğinin belirlenmesi", Yüksek Lisans, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, 2008.
- [56] Kuyumcu, İ., " Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Lactarius eulcalypti* O.K. MILL & R.N. HİLTON'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" , Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2014.
- [57] Demir, Ö., " Muşmula (*Mespilus germanica* L.) Meyvelerinin Olgunlaşması Sırasındaki Polifenol Oksidazın Karakterizasyonu", Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2006.
- [58] Cheynier, V., Fulerand, H., Guyot, S., Oszmianski, J., 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).
- [59] Tozak, K.Ö., " Purification of polyphenol oxidase from Nevşehir potato (*Solanum Tuberosum* L.) by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties" Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray, 2013.
- [60] Eisenmesser, E.Z., "Intrinsic Dynamics Of An Enzyme Underlies Catalysis" Brandeis University Howard Hughes Medical Institute , Waltham, Massachusetts 02454, USA. (2005).
- [61] Alyward, F., Haisman, D.R., "Oxidation system in fruits and vegetables their relation to quality of pressured products" *Adv. Food. Res.*, (1969) 17, 1-76.
- [62] Onsa, G. H., bin Sari, N., Selamat, J., Bakar, J., "Latent Polyphenol Oxidases from Sago log (*Metroxylo sagu*) : Partial Prrification, Activation and Some Properties" *J.Agric. Food Chem.* 48 (10) (2000), 5041-5045
- [63] Gündoğmaz, G., Doğan, S., Arslan, O., " Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various *Salvia* Species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller)" , *Food Sci Tech.*

- Int.*, 9(4), 309, (2003).
- [64] Altunkaya, A., "Partial Purification And Characterization Of Polyphenoloxidase From Turkish Tea Leaf (*Camellia Sinensis L.*)", *International Journal of Food Properties*, 17:7, 1490-1497, (2014).
- [65] Park, E.Y., Luh, B.S., "Polyphenol oxidase of kiwi fruit", *Journal of Food Science*, **50**, 678, (1985).
- [66] Carvalho, J.O., Orlanda, J.F.F., "Heat Stability And Effect Of pH On Enzyme Activity Of Polyphenol Oxidase In Buriti Fruit Extract". *Food Chem.*, 233, 159-163, (2017).
- [67] Ioniță, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stănciuc, I., "Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*)". *Process Biochemistry*. 56, 177-185, (2017).
- [68] Terefe, N.S., Delon, A., Buckow, R., Versteeg, C., (2015). "Blueberry Polyphenol Oxidase: Characterization and The Kinetics Of Thermal And High Pressure Activation and Inactivation". *Food Chem.*, 188, 193-200.
- [69] Février, H., Quéré, J.M., Bail, G.L., Guyot, S., "Polyphenol profile, PPO activity and pH variation in relation to colour changes in a series of red-fleshed apple juices". *LWT - Food Science and Technology*. 85, 353-362, (2017).
- [70] Hidalgo, A., Brusco, M., Plizzari, L., Brandolini, A., "Polyphenol oxidase, alpha-amylase and beta-amylase activities of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two year study". *Journal of Cereal Science*. 58, 51-58, (2013).
- [71] Arslan. O., Temur, A., Tozlu, Y., "Polyphenol oxidase from Malatya Apricot", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1239-1241 (1998).
- [72] Hadler, J., Tamuli, P., & Bhaduri, A. N., "Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf". *Journal of Nutritional Biochemistry*. 9, 75, (1998).
- [73] Duangmal, K., Owusu Apenten R.K., "A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano)", *Food Chem.*, 64, 351-359 (1999).
- [74] Çınar, S., Aydemir, T., (2002). "Polifenol oksidazın defne yapraklarından

- izolasyonu ve karakterizasyonu." *XVI Ulusal Kimya Kongresi*, Konya, Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 31.
- [75] Ünal, Ü.M., Yabancı, S.N., Şener, A., (2011). "Extraction, partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from tea leaf" *Research*, 36(3), 137-144, University of Cukurova, Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering.
- [76] Arslan, O., Erzen, 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).
- [77] Roudsari, M. H., Signoret, A., Crovet, J., "Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties." *Food Chemistry*. 7 (1981), 227- 235.
- [78] da Cruz Viera, I., Fatibello-Filho, O., "L-cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure" *Analytica Chimica Acta*. 399 (1999), 287-293.
- [79] Ng, A. W. R. and Wong, C. W. (2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from round brinjal (*S. melongena* var. *depressum*). Department of Biotechnology, Faculty of Applied Sciences, UCSI University, Malaysia, 833-838.
- [80] Doğan, S., Turan.P., Doğan, M., " Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymbra spicata* L. var. *spicata* ", *Process Biochemistry*, 41, 2379-2385, (2006).
- [81] Arslan, O., and Doğan S., "Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid" *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 85 (2005),1499-1504.