

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

***MELISSA OFFICINALIS* L. SUBSP. *OFFICINALIS*'TEN ELDE
EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZİN KARAKTERİZASYONU VE
FENOLİK MADDE İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin AYYILDIZ

Balıkesir, Temmuz-2008

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

MELISSA OFFICINALIS L. SUBSP. *OFFICINALIS*'TEN ELDE
EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZİN KARAKTERİZASYONU VE
FENOLİK MADDE İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin AYYILDIZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap DOĞAN

Sınav Tarihi: 08.08.2008

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Serap DOĞAN (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Baki ÇİÇEK

Yrd Doç. Dr. Zeliha ERDOĞAN

Balıkesir, Ağustos-2008

ÖZET

MELISSA OFFICINALIS L. SUBSP. OFFICINALIS' TEN ELDE EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZIN KARAKTERİZASYONU VE FENOLİK MADDE İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

Yasemin AYYILDIZ

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir 2008

Bu çalışmada *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (Oğul otu)'ten polifenoloksidaz (PFO) amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleri ile kısmen saflaştırıldı, karakterize edildi ve fenolik ve protein içeriği belirlendi. Oğul otu PFO'sunun substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, ısı inaktivasyonu ve I_{50} değerleri belirlendi. Oğul otundan elde edilen PFO'nun katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratlarına karşı aktivite gösterdiği fakat L-tirozin ve gallik aside karşı aktivite göstermediğı bulundu. Enzimin katalizleme gücünü gösteren V_{max}/K_M değerlerine göre en iyi substratın katekol olduğu ve bunu 4-metilkatekol ve piragallol substratlarının izlediğı belirlendi. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in protein ve fenolik madde içeriğı de tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriğı Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak 100 g taze bitki için 280 mg olarak bulunmuştur. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in protein içeriğı Bradford metodu kullanılarak 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak tespit edilmiştir. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen PFO enzimi için katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanıldığında optimum pH'nın sırasıyla 6,5, 4,0 ve 8,5; optimum sıcaklığın ise 40, 50 ve 60°C olduğu belirlendi. Termal inaktivasyonda ise katekol, 4-metilkatekol, piragallol substratları kullanıldığında artan inkübasyon süresin ve sıcaklığa paralel olarak PFO aktivitesinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Askorbik asit, benzoik asit, glutatyon, sodyum azid, gallik asit ve L-glutamik asit oğul otundan kısmen saflaştırılan PFO'nun inhibisyonu için inhibitörler olarak denenmiştir. Elde edilen deneysel verilere göre gallik asit ve L-glutamik asidin oğul otu PFO'sunu inhibe etmediğı gözlemlenmiştir. Belirtilen substratlar kullanılarak her bir inhibitör için inhibisyon türü belirlenmiştir. Deneysel sonuçlara göre en güçlü inhibitörün glutatyon olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* / polifenol oksidaz / substrat spesifikliğı / pH / sıcaklık / ısı inaktivasyonu / inhibisyon / fenolik içerik.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLOXIDASE OBTAINED FROM *MELISSA OFFICINALIS* L. SUBSP. *OFFICINALIS* AND DETERMINATION OF ITS PHENOLIC CONTENT

Yasemin AYYILDIZ

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Master Thesis / Supervisor: Associate.Prof. Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir-Turkey, 2008

In this study, polyphenoloxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm) was partially purified by ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) and dialysis, respectively, characterized and its phenolic and proteine contents were determined. It was determined the substrate specificity, optimum pH, optimum temperature, heat-inactivation and I₅₀ values of polyphenoloxidase of lemon balm. PPO activity was determined using catechol, 4-methylcatechol, pyrogallol, L-tyrosine and gallic acid as substrates. PPO of lemon balm showed no activity toward the L-tyrosine and gallic acid. According to V_{max}/K_M values catechol was the best substrat, followed by 4-metylcatechol and pyrogallol. The total phenolic and protein contents of *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* were also determined. The total phenolic content was determined according to the Folin-Ciocalteu method and it was found to be 280 mg/100 g on a fresh weight basis; and protein content according to Bradford method and 230 µg/mL per 100 g on a fresh weight. The optimum pH values of *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PPO using catechol, 4-methyl catechol and pyrogallol as substrates were 6,5, 4,0 and 8.5; and the optimum temperature values 40, 50 and 60 °C, respectively. It was observed that the enzyme activity especially decreased with increase in temperature and inactivation time for all substrates.

Inhibition of lemon balm PPO was investigated using inhibitors such as ascorbic acid, benzoic acid, glutathione, sodium azide, gallic acid and L-glutamic acid. The presence of gallic acid and L-glutamic acid did not cause the inhibition of lemon balm PPO. It was determined type of inhibition for each inhibitor using sellected substrates. From the results it can be said that the most effective inhibitor was glutathione.

KEY WORDS: *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* / polyphenoloxidese/ substrat specificity / pH / temperature / inactivation / inhibition / phenolic content.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.2 Polifenoloksidaz	2
1.2.1 Polifenoloksidazın Tabiattaki Dağılımı	3
1.2.2 Bitkilerde Polifenoloksidazın Biyolojik Önemi	3
1.2.3 Polifenoloksidazın Substratları	4
1.2.4 Polifenoloksidaz İle Yapılan Çalışmaların Özeti	5
1.3 <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i>	7
1.3.1 <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> ile Yapılan Çalışmanın Özeti	7
1.4 Enzimatik Kararma	8
1.5 Enzim Kinetiği	10
1.6 İnhibisyon	12
1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon	13
1.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon	14
1.6.3 Karışık Tür İnhibisyon	15
1.7 Çalışmanın Amacı	17
2. MATERYAL VE METOT	19
2.1 Materyal	19
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.2 Ham Ekstratın Hazırlanışı	20
2.3 Polifenoloksidazın Kısmen Saflaştırılması	20
2.4 Spektrofotometrik Ölçümler	21
2.5 Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi	21
2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	22
2.7 Termal İnaktivasyon	22
2.8 İnhibisyon	22
2.9 Protein İçeriği	22

2.10 Toplam Fenolik Madde İçeriği	23
3. BULGULAR	25
3.1 <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> Ekstraktının Toplam Protein ve Fenolik Madde İçeriği	25
3.2 Substrat Spesifikliği	25
3.3 Optimum pH	27
3.4 Optimum Sıcaklık	29
3.5 Termal İnavtasyon	30
3.6 Polifenoloksidazın İnavtasyonu	33
3.7. I ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	59
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	69
4.1 Toplam Fenolik Madde ve Protein Miktarı	69
4.2 Optimum pH	70
4.3 Optimum Sıcaklık	71
4.4 Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliği	71
4.5 Termal İnavtasyon	72
4.6 Enzim İnavtasyonu	73
4.6.1 Yarışmalı İnavtasyon	74
4.6.2 Karışık-Tür İnavtasyon	75
4.7 I ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	77
5. KAYNAKLAR	78

SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>	<u>Birimi</u>
PFO	Polifenoloksidaz enzimi	-
E.C.	Enzim kod numarası	-
E.Ü.	Enzim ünitesi	E.Ü
I_{50}	% 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu	mol/L
V_0	Başlangıç anındaki hız	EÜ/dak mL
V_{max}	Enzimin substrata doydugu 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	-

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Şekil 1.1 PFO'nun varlığında monofenolün difenole (Kresolaz aktivitesi) ve difenolün <i>o</i> -benzokinona oksidasyonu (Katekolaz aktivitesi)	2
Şekil 1.2	Flavonoidin yapısı	4
Şekil 1.3	<i>Melissa officinalis</i> L subsp. <i>officinalis</i> ' in fotoğrafı	8
Şekil 1.4	Enzimatik karamada polifenoloksidazın rolü	9
Şekil 1.5	Michaelis-Menten grafiği	11
Şekil 1.6	Lineweaver-Burk grafiği	13
Şekil 1.7	Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	15
Şekil 1.8	Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	16
Şekil 1.9	Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	17
Şekil 3.1	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> polifenoloksidazı için çizilmiş $1/[S]-1/V_0$ eğrileri	27
Şekil 3.2	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimi	28
Şekil 3.3	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi	30
Şekil 3.4	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> polifenoloksidaz aktivitesinin termal denaturasyonuna ait eğriler	32
Şekil 3.5	Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	36
Şekil 3.6	Katekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	38
Şekil 3.7	Katekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	41
Şekil 3.8	Katekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	44
Şekil 3.9	4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	46
Şekil 3.10	4-metilkatekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	48
Şekil 3.11	4-metilkatekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	51
Şekil 3.12	4-metilkatekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	53
Şekil 3.13	Piragallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	55
Şekil 3.14	Piragallol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	57
Şekil 3.15	Piragallol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	59
Şekil 3.16	Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutatyon inhibitörlerinin konsantrasyonu	61

Şekil 3.17	ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler	62
Şekil 3.18	Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutatyon inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler	64
Şekil 3.19	Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyonunu gösteren grafikler	65
Şekil 3.20	Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutatyon inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler	67
Şekil 3.21	Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler	68

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Enzimatik kararma inhibitörleri	10
Çizelge 3.1	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'in PFO aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler	26
Çizelge 3.2	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler	28
Çizelge 3.3	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait veriler	29
Çizelge 3.4	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> polifenoloksidazının termal denatürasyonu için elde edilen deneysel veriler	31
Çizelge 3.5	Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	34
Çizelge 3.6	Katekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	37
Çizelge 3.7	Katekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	39
Çizelge 3.8	Katekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	42
Çizelge 3.9	4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	45
Çizelge 3.10	4-metilkatekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	47
Çizelge 3.11	4-metilkatekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	49
Çizelge 3.12	4-metilkatekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	52
Çizelge 3.13	Piragallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	54
Çizelge 3.14	Piragallol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	56
Çizelge 3.15	Piragallol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler	58
Çizelge 3.16	Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde aktivasyon değerleri	60
Çizelge 3.17	Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde	63

Çizelge 3.18	aktivasyon değerleri Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde aktivasyon değerleri	66
Çizelge 4.1	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidazın substrat spesifikliği	73
Çizelge 4.2	Substrat olarak katekol kullanıldığında <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri	75
Çizelge 4.3	Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri	76
Çizelge 4.4	Substrat olarak piragallol kullanıldığında <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> 'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri	76
Çizelge 4.5	<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> PFO'sunun inhibitörlere bağlı olarak I_{50} değeri	77

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren, içtenliğiyle bana zaman ayıran ve emek harcayan Tez Danışmanım Sayın Doç. Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında her konuda bana yardımlarını eksik etmeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Mehmet DOĞAN'a ve Arş.Gör. Pınar BEYLİ'ye çok teşekkür ederim.

Bu yaşıma kadar maddi ve manevi her konuda benim yanımda olan sevgili anneme, her zaman varlığını hep yanımda hissettiğim rahmetli babam Yusuf AYYILDIZ'a hayatımın sonuna dek minnettar kalacağım. Bu tez onlara ithafımdır.

Balıkesir, 2008

Yasemin AYYILDIZ

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozomlar) küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil ederler [1]. Organizmadaki organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi olaylar enzimlerin yardımıyla gerçekleşir.

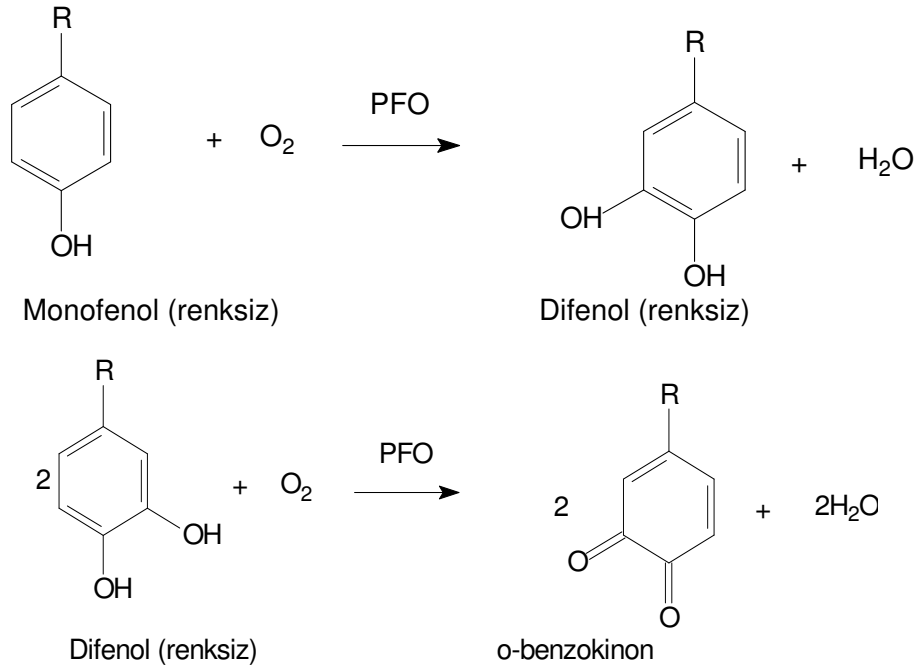
Enzimlerin diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlüğü vardır. Bunlardan birisi de belirli kimyasal reaksiyonlara karşı spesifik olmalarıdır [2]. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalizlerler. Biyokimyasal katalizörler olan enzimler, reaksiyon hızını 10^{20} kat kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^3 kat kadar arttırabilmektedir [2].

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlı olması nedeniyle hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen oluşmaz ve kendiliğinden reaksiyon meydana gelemez.

Günlük yaşamımızda önemli role sahip olan enzimler çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bugün, ilaç, gıda, kimya endüstrisi, dericilik, boya ve temizlik maddeleri, tıp, tarım, veterinerlik, biyoloji ve biyoteknoloji bilimi gibi farklı alanlarda enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonun uygun şekilde yapılıp yapılmadığının tespiti için de enzimlerden faydalanılmaktadır [2].

1.2 Polifenoloksidaz

Birçok bitkide ve meyvede enzimatik kararma genel adıyla bilinen renk değişimleri gözlenmektedir. Meydana gelen renk değişimlerinin sebebi enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlardır. Enzimatik kararmaya neden olan başlıca enzim polifenoloksidazdır [3]. Polifenoloksidaz (E.C.1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksidoredüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir [4]. Polifenoloksidaz, bitki ve mantarlardaki geniş substrat spesifikliğine bağlı olarak tirozinaz, fenolaz, katekoloksidaz, katekolaz, monofenol oksidaz, *o*-difenoloksidaz ve ortofenolaz gibi isimlerle de bilinmektedir [2]. Polifenoloksidaz, iki tip reaksiyonu katalizlemektedir. Polifenoloksidaz moleküler oksijen varlığında monofenollerin *o*-dihidroksi fenollere hidroksilasyonunu (kresolaz aktivitesi) ve *o*-dihidroksi fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu katalizler (katekolaz aktivitesi) (Şekil 1.1). Meydana gelen kinonlar koyu renkli pigmentlere kondenze olabileceği gibi bazı proteinlerin yapısına da bağlanabilir [5].



Şekil 1.1 PFO'nun varlığında monofenolün difenole (Kresolaz aktivitesi) ve difenolün *o*-benzokinona oksidasyonu (Katekolaz aktivitesi)

Polifenoloksidaz ilk olarak mantarlarda keşfedilen yaygın bir enzimdir. Bunlar bitkideki plastidlerin ve kloroplastların içinde bulunmasına rağmen olgunlaşmış bitkinin stoplazmasında serbest olarak bulunur. Bu enzim, bitkinin mikrobiyal ve viral enfeksiyonlara, kötü iklim koşullarına karşı direnci açısından önemli bir role sahiptir. Ayrıca PFO'nun faaliyeti sonucu suda çözünmeyen polimerler oluşmakta bu da zedelenmiş dokularda oluşabilecek enfeksiyonların yayılmasını önlemektedir [4].

1.2.1 Polifenoloksidazın Tabiattaki Dağılımı

Polifenoloksidaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. PFO ilk kez Schoenbein tarafından 1856 yılında yemeklik mantarda bulunmuştur [2]. Ayrıca mikroorganizmalarda ve özellikle mantar ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunur. PFO'nun varlığına kabuklu deniz hayvanlarının bazılarında da (beyaz karides, küçük karides) rastlanılmıştır [6]. Ayrıca PFO, böceklerde dış iskeletin gelişmesine yardımcı olurken sentezlenen melanin sayesinde mikroorganizmaları hapsederek koruma sağlamaktadır. İnsanlarda ise bu enzim cildin, saçın ve gözün pigmentasyonundan sorumludur [7].

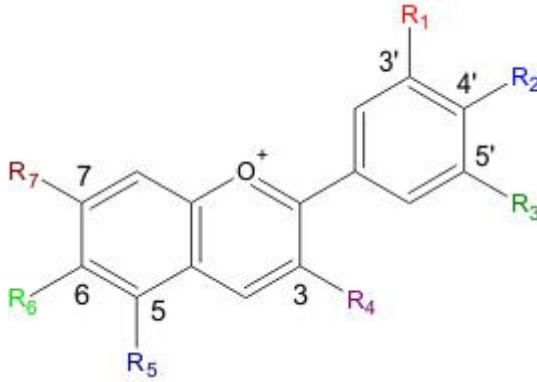
1.2.2 Bitkilerde Polifenoloksidazın Biyolojik Önemi

Polifenoloksidazın canlı ve sağlam hücrelerdeki rolü yapılan çalışmalarda tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat yapılan ilk çalışmalar solunum ya da lignin biyosentezinde görev aldığını göstermektedir. Bitkilerde meydana gelen mekanik zararlara ve virüs, bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı bitkinin direnç göstermesinde etkili bir role sahiptir [4–8]. Patojen bakterilerin örneğin, *Pseudomonas syringe*'nin yol açtığı enfeksiyon durumunda savunma amacıyla PFO gereğinden fazla ekspire olur. Ayrıca yine benzer bir savunma durumu böcek istilaları sırasında da görülür. Pancar kurdu, domates kurdu, yeşil seftali aphidi gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı yaralanmalardan sonra ekspire olan PFO, böceklere karşı bir savunma oluşturmaktadır [8].

1.2.3 Polifenoloksidazın Substratları

Meyve ve sebzeler çeşitli fenolik maddeler içermektedir. Bunlardan bazıları polifenoloksidaz enziminin de substratlarıdır. Genellikle flavonoid tipi fenollerle, basit fenoller yiyeceklerimizde bulunurlar.

Bitkilerde doğal olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, lökoantosiyandinler, antosiyandinler, flavonoller, sinamik asit türevleri ve basit fenoller besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler [6]. Şekil 1.2, flavonoidin genel yapısını göstermektedir.



Şekil 1.2 Flavonoidin yapısı

Flavonoidlerin çoğunun hidroksilli türevleri, resorsinol (A halkası) ve bir katekol birimi (B halkası) içerirler. Flavonoid halkasının kırılma, parçalanma ve sentez reaksiyonları incelenerek katekinlerin yapısı için model geliştirilmiştir. Katekinler, (+) katekin ve onun stereoizomeri (-) epikatekin olarak bulunmuştur. Lökoantosiyandinlerin stereo kimyası, katekinlerin stereo kimyası kadar araştırılmamıştır.

Lökoantosiyandinler, asidik ortamda ısıtılma işlemi ile antosiyandinlere dönüşebilmektedir. Antosiyandinler, kırmızı-mavi bitki pigmentlerinin büyük bir grubudur. Tüm gelişmiş bitkilerde, çoğunlukla çiçek, meyve ve yapraklarda, aynı zamanda gövdede ve köklerde bulunur.

Flavonoller, antoksanin pigmentleri olarak da adlandırılır. Genellikle glikozidler halinde bulunurlar ve renkleri açık yeşildir. Bazı durumlarda kararma reaksiyonlarına bizzat katılırlar. Sinamik asit türevleri bir flavonoid değildir. Fakat flavonoid bileşiklerinin C₆-C₃ fenil propan biriminin oluşmasında, önce B halkasının sentezlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir [9]. Sinamik asidin yiyeceklerdeki önemli üyesi olan kloragenik asit kafeik asitle quinik asidin 3-depsitidir.

Doğal olarak oluşan flavonoidlerin birçoğu katekol gibi hidroksilli B halkasına sahiptir. Katekol bu yüzden en basit fenoldür. Gallik asit, hidroliz olabilen taninlerin esas birimini oluşturur. Gallik asit serbest olarak az miktarda birkaç meyvede ve diğer gıdalarda bulunur.

Tirozin, birçok gıda da bulunan önemli bir aminoasittir ve melanin oluşumunda klasik bir monohidroksifenolik bir substrattır. Tirozinin hidroksilasyon ürünü olan dopa ve dopamin bitki dokularında bulunur [9].

1.2.4 Polifenoloksidaz İle İlgili Çalışmaların Özeti

Lee, sıcaklık işlemine tabii tutulmuş soğan ekstraktları ile muz PFO'sunu inhibe etmiş [10]; Fu ve arkadaşları, elma PFO'suna ClO₂'nin inhibisyon etkisini incelemiş ve ClO₂ konsantrasyonunun 0–60 mg/L'ye çıkarıldığında PFO aktivitesinin kayda değer şekilde azaldığını bulmuşlar [11]; Munoz ve arkadaşları, Esculatini, mantar PFO'sunda ve atkuyruğu peroksidazında inhibitör olarak denemişler ancak substrat etkisi gösterdiğini bulmuşlar [12]; Matsui ve arkadaşları, Hindistan cevizi suyundaki PFO ve POD enzimlerinin mikrodalga ile inaktivasyon için yeterli sıcaklık değerlerinin seçimini yapmışlar [13]; Munoz ve arkadaşları, klorogenik asidin PFO, POD ve o-kinonun kinetik karakterizasyonuna ve oksidasyonuna etkisini incelemişler [14]; 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 belirlemişler [15]; Orenes-Piñero ve arkadaşları, *Streptomyces antibioticus*'ten elde edilen tirozinazın siklodekstrin etkisine göre difenolaz aktivitesinin karakterizasyonunu yapmışlar [16]; Pozo–Insfran ve

arkadaşları, üzüm suyuna yoğun CO₂ konsantrasyonu verilmesi durumunda polifenolik ve antioksidan değişimlerini incelemişler [17]; Nũñez-Delicado ve arkadaşları, Napolyon üzümünden PFO'nun karakterizasyonunu yapmışlar ve PFO'nun asidik pH'da yüksek affinite gösterdiğini, 70 °C'de aktivitesinin % 80'ini koruduğunu tespit etmişler [18]; González ve arkadaşları, böğürtlenden PFO ve POD enzimlerinin karakterizasyonunu yapmışlar, maksimum PFO aktivitesinin katekol ve 4-metilkatekol substratları ile gözlendiğini belirlemişler [19]; Doğan ve arkadaşları, farklı patlıcan kültürlerinden PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, substrat spesifikliği ve ısı inaktivasyonu gibi bazı kinetik parametrelerin etkilerini incelemişler [20]; Coetzer ve arkadaşları, domates polifenoloksidazından elde edilen sense ve antisense RNA ile patatesteki enzimatik kararmanın kontrol mekanizmasını incelemişler [21]; Yang ve arkadaşları, muz kabuğundan (*Musa sapientum* L.) PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve bazı özelliklerini incelemişler [22]; Nagai ve Suzuki, Çin kabağında (*Brassica rapa* L.) PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine zamanın, pH'nın, sıcaklığın, substratların ve inhibitörlerin etkilerini incelemişler [23]; Pérez-Gilabert ve arkadaşları, mantardan (*Terfezia claveryi* Chatin) polifenoloksidazı kısmen saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemişler [24]; Carvajal-Millán ve arkadaşları, gelişim ve depolama süresince N-(2-kloro-4-pyridyl)-N-fenilüre ile etkilenen üzümdeki polifenoloksidaz aktivitesinin renk değişimlerinin ve dehidrotasyonun değişimi üzerine çalışmalar yapmışlar [25]; Sojo ve arkadaşları, muz polifenoloksidazı ile bir tetrahidroizokinolin olan salsolinolün oksidasyonunu incelemişler ve bu oksidasyonun pH'ya bağlı olduğunu ve özellikle asidik pH değerinde bir maksimuma eriştiğini bulmuşlar [26]; Chang ve arkadaşları, sekiz şeftali kültürünün, antioksidan potansiyelini, fenolik bileşikleri belirleyerek ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunun inhibisyonunu inceleyerek tayin etmeye çalışmışlar [27]; Broothaerts ve arkadaşları, elma ve tütün yapraklarından elde edilen PFO aktivitesi üzerine TX-100, SDS, pH, substrat konsantrasyonunun ve inhibitörlerin etkisini incelemişler [28]; Onsa ve arkadaşları, Hint irmiğinden PFO'yu kısmen saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemişler [29]; González ve arkadaşları, böğürtledeki peroksidaz ve PFO aktivitesini karakterize etmeye çalışmışlar [30]; Jiang ve arkadaşları sabunağacı meyvesinden elde ettikleri polifenoloksidazı Sephadex G-100 jelini kullanarak saflaştırmışlar [31]; Rodriguez-

López ve arkadaşları, bir mikrodalga fırın kullanarak mantardan elde ettikleri PFO'nun termal aktivasyonunu incelemişler ve hızlı bir mikrodalga prosedürünün kullanılması ile enzimin antioksidant içeriğinin arttığını ve karamanın azaldığını bulmuşlardır [32].

1.3 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*, Lamiaceae familyasının *Melissa* genusundan çok yıllık otsu bir bitkidir. Türkiye'de "Oğul otu, Limon otu veya Kovan otu" olarak da bilinmektedir. Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesinde doğal olarak yetişir. İspanya ve Doğu Avrupa ülkelerinde kültürü yapılır. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* 60–100 cm yüksekliğinde ve oldukça küçük sarımtırak beyaz veya pembe renkte çiçeklere sahiptir. İçerdiği yüksek orandaki esansiyel yağlardan dolayı kültürü yapılmaktadır. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* türünün antimikrobiyal, antifungal, antipasmotik, analjezik, sinir sistemi uyarıcısı, sedatif, stomaşik ve antikonvulzan aktiviteleri olduğu da bilinmektedir [33]. Ayrıca fenolik maddece yüksek değere sahip olan bitki ekstraktları lipitlerin oksidatif degradasyonunu önledikleri için besinsel değeri ve kaliteyi arttırmaları. Bu yüzden özellikle gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler. Gıda sanayinde baharat halinde, ekstrakt veya uçucu yağı likör, alkolsüz içecek, fırın ürünleri, dondurma ve şekerlemelerde kullanılır. Bunun yanında parfümeri, kozmetik sanayi ve eczacılıkta kullanılmaktadır [34]. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* ekstraktlarında bulunan fenolik madde içeriğinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu da bilinmektedir [35]. Şekil 1.3, *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in fotoğraflarını göstermektedir.

1.3.1 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* ile Yapılan Çalışmaların Özeti

Medina ve arkadaşları, Slovak orijinli *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in yaprağında, hasat zamanında rosmarinik asit miktarının bitki gelişimine etkisini incelemişler [36]; Szöllösi ve arkadaşları, FRAP metodunu kullanarak, çeşitli tıbbi bitkilerde ve çaylarda (*Melissa officinalis* L.) bulunan toplam antioksidant değerini belirlemek istemişler ve sonuç olarak ta FRAP metodunun bitki homojenatı

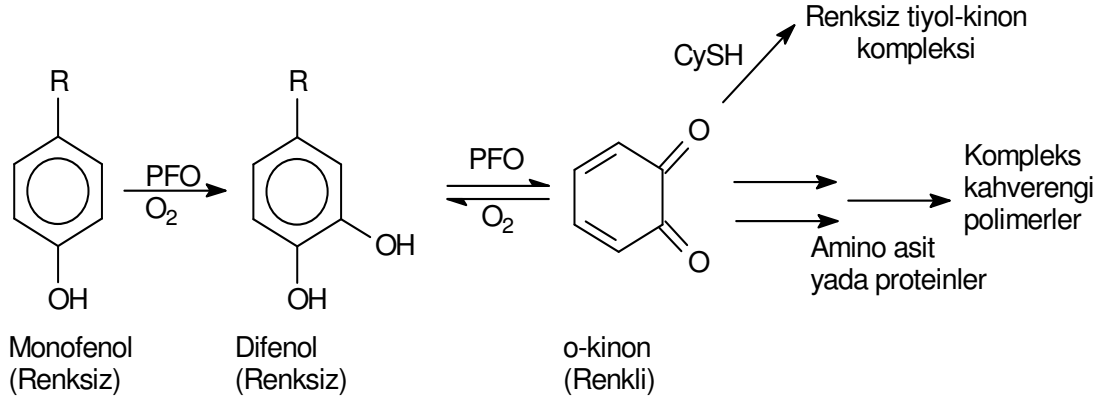
ya da ürünler gibi taze ve akışkan biyolojik sıvılarda antioksidant duyarlılığının fazla olduğunu bulmuşlar [37]; Silva ve arkadaşları, indol-3 asetik asit ve benzilaminpürinin *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* bitkisindeki esansiyel yağların yapısına ve bitkinin büyümesine olan etkisini incelemişler [38]; Kennedy ve arkadaşları, *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*' in hafif yatıştırıcı ve sakinleştirici olarak kullanıldığını ve bitkisel ilaçlardaki fiziksel strese olan etkisini belirlemeye çalışmışlar [39]; Adzet ve arkadaşları (1992), İspanya'nın Ebro-Delta bölgesinde yetiştirilen *M. officinalis*'in 28 tipinin hasat zamanı ve yaprak pozisyonu dikkate alınarak yapılan çalışmada içerdiği uçucu yağ ve uçucu yağın bileşenlerinin miktarının yıl ve gün içerisindeki hasat zamanına ve bitkinin hasat edilen kısmına göre önemli derecede değişiklik gösterdiğini bulmuşlar [40].



Şekil 1.3 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in fotoğrafı

1.4 Enzimatik Kararma

Enzimatik kararma, çoğunlukla bitkisel ürünlerin toplanması, depolanması ve saklanması sırasında oluşan mekanik etkilerle dokuların zarar görmesi sonucu ürünün renk, koku ve tadında değişikliklere sebep olur. Taze meyve ve sebzeler içerdikleri fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile renk değişimi gösterirler. Bu oksidasyonu sağlayan başlıca PFO enzimidir. Bir diğer adı da Tirozinaz olan bu enzim monofenollerin difenollere hidroksilasyonunu sağlar (Kresolaz aktivitesi). Bunun için moleküler oksijeni kullanır. Kresolaz aktivitesi sonucu oluşan ürünler *o*-kinonlara yükseltgenir (Katekolaz aktivitesi). Renkli olan *o*-kinonlar ya polimerize olurlar ya da aminoasit veya proteinlerle birleşerek kahverengi pigmentleri oluştururlar. Bu olay enzimatik kararmanın ilk aşamasıdır [41] (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Enzimatik kararmada polifenoloksidazın rolü

Meydana gelen bu pigmentler yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerlerdir. Enzimatik kararmada ilk adım *o*-kinonların oluşmasıdır. *O*-kinonlar ise *o*-dihidroksi ünitesi içeren her çeşit fenolik maddeyi içermektedir [41]. Sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan doğal flavonoid maddelerden katekinler, lökoantosiyandinler, antosiyandinler, flavonoller ile ayrıca hidroksibenzoik, hidroksisinamik ve bunların türevlerinin enzimatik kararma reaksiyonlarında rol oynadığı görülmektedir [6].

Bazen enzimatik kararma reaksiyonlarının oluştuğu ortamlarda bazı maddeler renk değişimlerinin kilit maddesi olan *o*-kinonları geriye yani *o*-fenolik forma döndürebilirler. Bu durumda enzimatik kararma durmakta ve renk değişimi olmamaktadır. En önemli indirgen askorbik asittir. Ayrıca askorbik asit ortamdaki oksijeni indirgeyerek kararma reaksiyonunu farklı bir yoldan da engellemektedir.

PFO aktivitesini inhibe etme yeteneği olan birçok bileşik bilinmesine karşın, bu inhibitörlerin enzimatik kararmayı kontrol edebilme yetenekleri inhibitör, substrat ve O₂ konsantrasyonuna, pH'ya, sıcaklığa ve enzimin kaynağına bağlı olarak farklılık gösterir. PFO, siyanür, karbonmonoksit, sodyumdietilditiyokarbamat, tropolon, 2-merkaptobenzotiyazol, azid ve EDTA gibi çeşitli ajanlar tarafından inhibe edilmektedir. Ayrıca tuzlarda dahil olmak üzere bazı inorganik iyonlar da tirozinazı inhibe edebilmekte ancak NaCl hariç bu bileşiklerin birçoğu toksik olduğundan kullanımları sınırlıdır. Taze soyulmuş sebze ve meyvelerin kararmasını önlemek için

kullanışlı olan NaCl, düşük konsantrasyonlarda zayıf bir inhibitördür. Çizelge 1.1’de enzimatik esmerleşmeyi inhibe eden ajanlar genel olarak gruplandırılmıştır.

Çizelge 1.1 Enzimatik kararın inhibitörleri

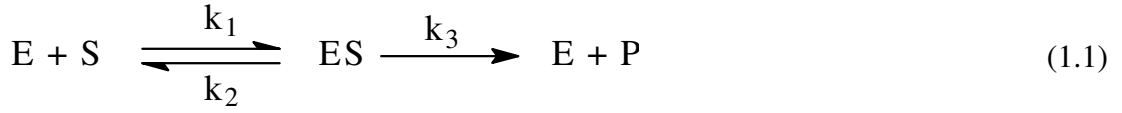
Bileşenler	Örnek	Etkisi
İndirgeyici ajanlar	Sülfütlü ajanları, askorbik asit ve analogları, sistein, glutatyon	Oksijenin uzaklaştırılması
Şelat oluşturan ajanlar	Fosfataz, EDTA, organik asit	Metallerin uzaklaştırılması
Asitlendiriciler	Sitrik asit, fosforik asit	pH’yı düşürür
Enzim inhibitörleri	Aromatik karboksilik asitler, peptide substitise	Enzimle reaksiyona girerler

Diğer yandan enzimatik olmayan kararın diye bilinen bir grup renk değişimleri de vardır. Bunlar kısaca şekerler ve amin grupları arasında meydana gelen ve Maillard reaksiyonu olarak da bilinen bir dizi kimyasal sürecin sonucudur. Maillard reaksiyonu dışında da askorbik asit mekanizması ve etkin aldehit teorisi, karamelizasyon, okside lipidler tarafından kararın polimerlerin şekillenmesi şeklinde beş farklı mekanizmanın kontrolündedir [10].

Meyve ve sebzelerdeki renk bozulmaları, ürünün işlenmeye başlanmasından tüketimine kadar sürebilir. Özellikle uygun olmayan şartlar altında uzun süre depolamada bu tür renk değişimleri daha büyük boyutlar kazanır [9].

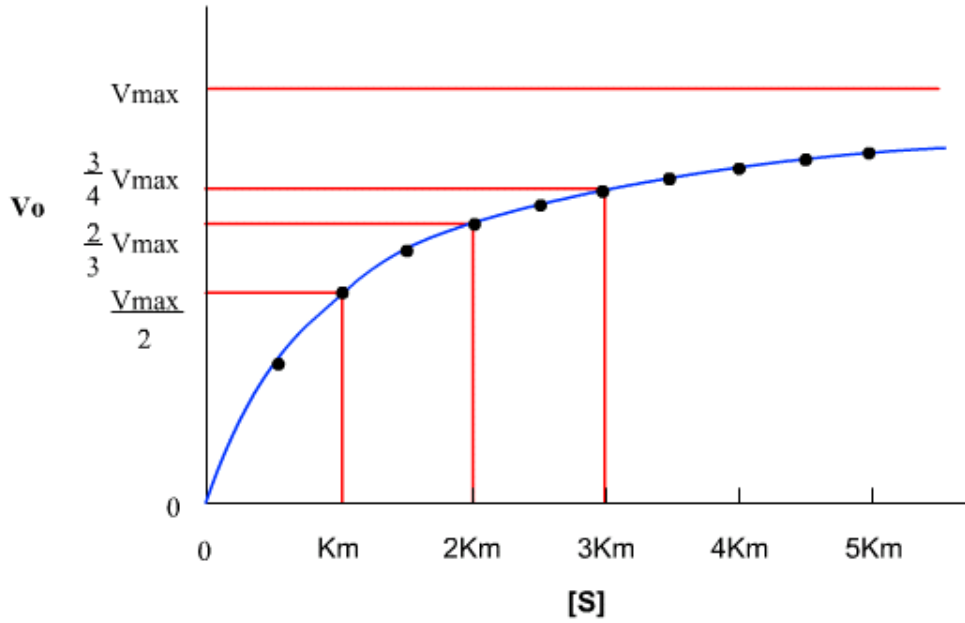
1.5 Enzim Kinetiği

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir “Enzim-Substrat Kompleksi” oluşturur, daha sonra bu kompleks, ürün ve enzime dönüşür. Enzim kinetiğinin mekanizması aşağıdaki gibidir:



Burada ES kompleksi, E ve S'den k_1 hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise k_2 hızında geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca "Kararlı Hal İlkesine" göre ES'nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur yani derişimi değişmez [1].

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon veya eğri elde edilir (şekil 1.5).



şekil 1.5 Michaelis-Menten grafiği

Bu kimyasal reaksiyon için Michaelis-Menten denklemini aşağıdaki gibi verilebilir:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M} \quad (1.2)$$

Burada V_{max} , hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi, K_M (Michaelis –Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_M , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli kinetik sabitlerdir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_M$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılmaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_M$ 'dir. $V=V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılan Lineweaver- Burk denklemidir.

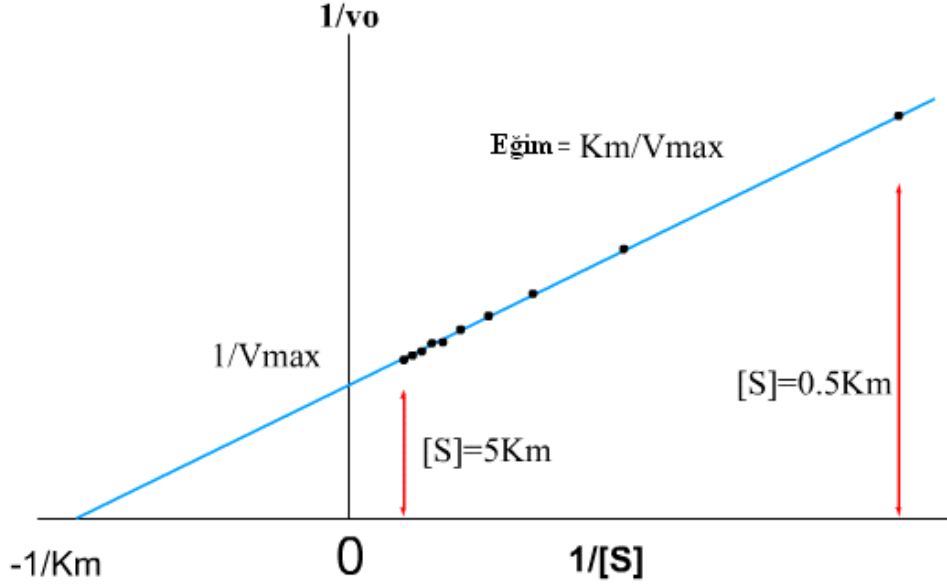
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.3)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_0$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_M/V_{max} 'ı verir [30] (Şekil 1.6).

1.6 İnhibisyon

Enzim inhibisyonu, enzimin katalitik yada düzenleyici merkezleri olarak tanımlanan aktif bölgelerine spesifik olarak bağlanan inhibitörler ile enzim aktivitesinin azaltılması olarak tanımlanabilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ve iyonlardır. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ya da dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Birçok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzeyen maddelerden oluşur. Bunlar substratla karşılaştığında ya hiç reaksiyon vermezler ya da çok yavaş reaksiyon verirler. Enzim inhibitörleri çeşitli

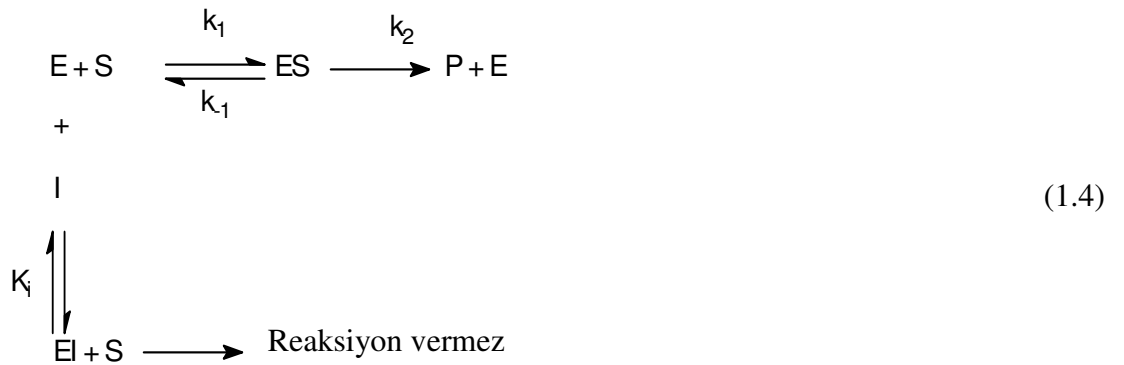
mekanizmalarda etkin olarak görevlidir [42]. Enzim, substrat ve inhibitör arasındaki mekanizma çeşitleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.6 Lineweaver-Burk grafiği

1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

İnhibisyonun bu türünde inhibitör enzimin aktif merkezine bağlanmak için enzimin substratı ile yarışır. Aktif bölgeye ya inhibitör ya da substrat bağlanabilir. Her ikisininde birlikte bağlanması mümkün değildir.



Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

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

Burada,

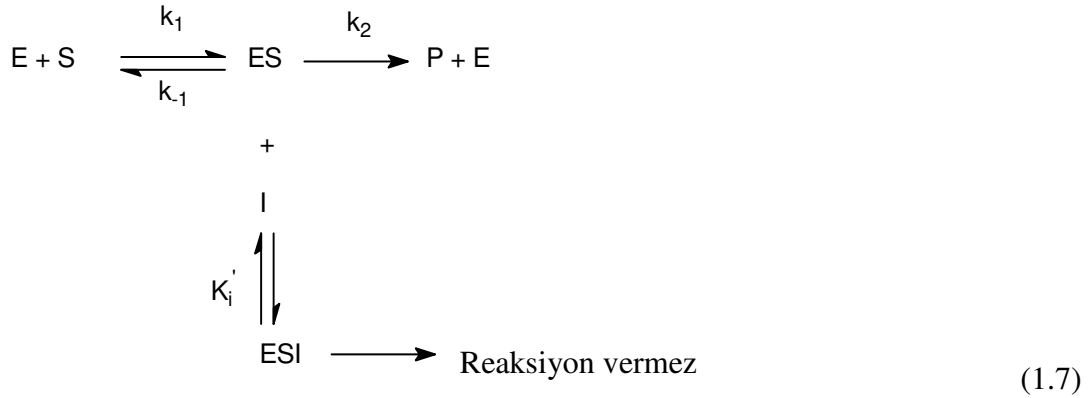
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (1.6)$$

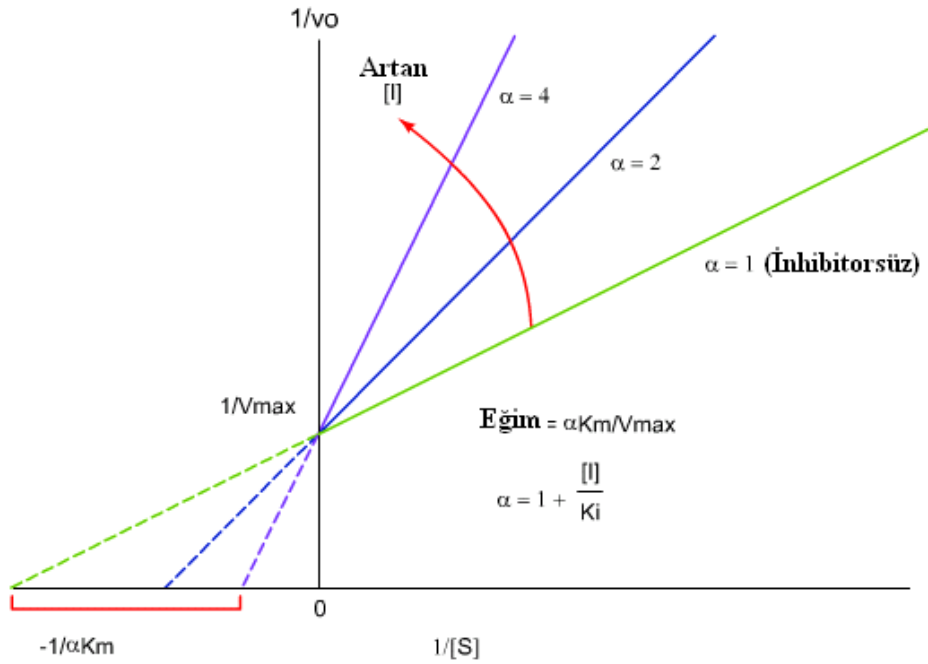
Denklem (1.5)'e göre oluşan eğrinin eğimi $\alpha K_M/V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{\max}$ olan düz bir doğruyu verecektir.

Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri, $1/V_0$ ekseninde $1/V_{\max}$ noktasında kesişir (Şekil 1.7). Bu diğer inhibisyon çeşitleriyle karşılaştırıldığında yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [35].

1.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

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





Şekil 1.7 Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

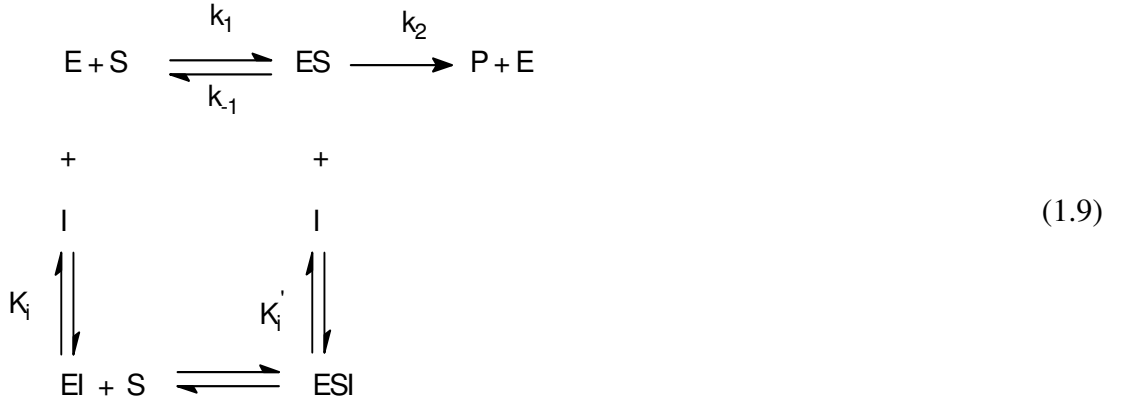
Bu tür inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemini aşağıdaki gibidir:

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

Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi (K_M/V_{\max}) ve ekstrapolasyonu (α'/V_{\max}) olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.8). Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur [35].

1.6.3 Karışık İnhibisyon

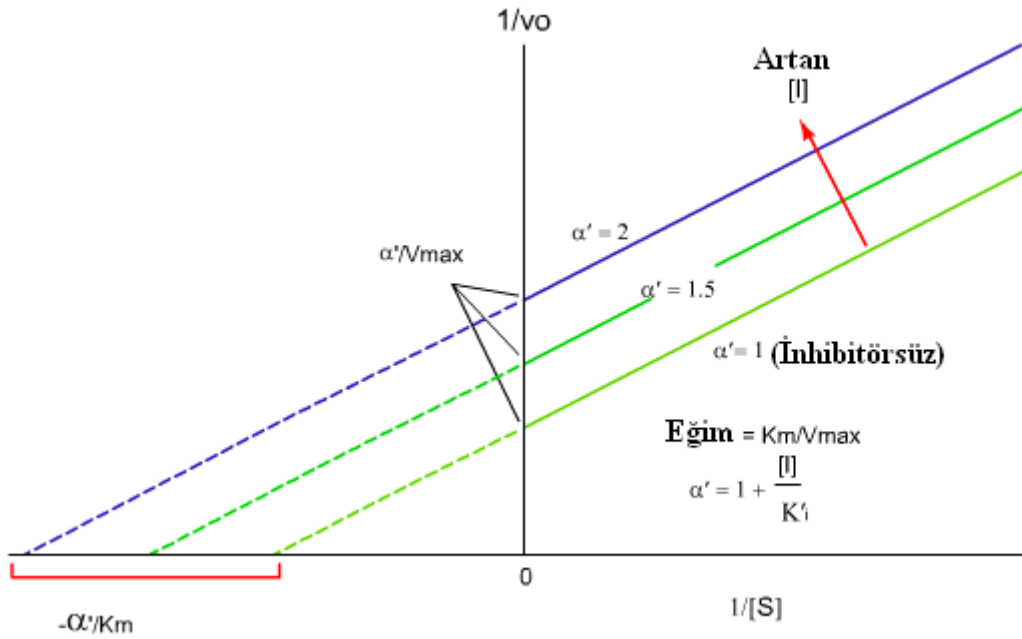
Bu tür inhibisyonda inhibitörler hem enzim hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilirler.



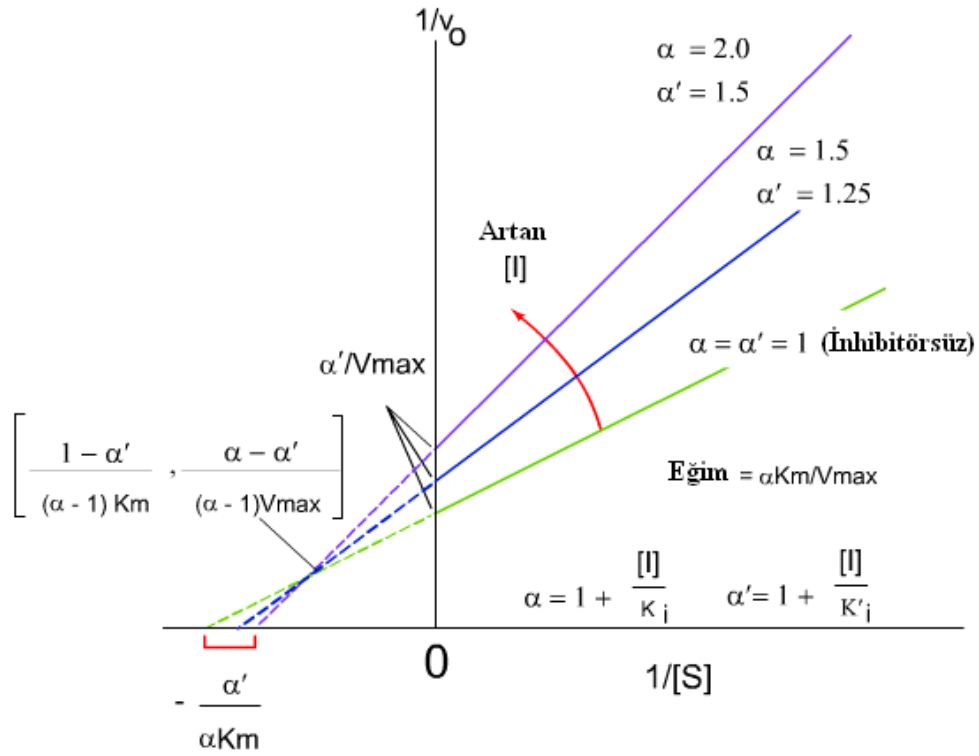
Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki şekilde verilebilir:

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

Bu eşitliğin eğrisi eğimi $(\alpha K_M/V_{\max})$ ve ekstrapolasyonu (α'/V_{\max}) olan doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.9). $K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) olduğu özel durum için, kesişim $1/[S]$ eksenindedir. Bu durumda inhibisyon çeşidi yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır [35].



Şekil 1.8 Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri



Şekil 1.9 Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

1.7 Çalışmanın Amacı

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* (oğul otu) günümüzde çay ve baharat olarak kullanılan önemli bir tıbbi bitkidir. Ekonomik olarak önemli bir değere sahip olan bu bitki alternatif tıpta da kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde enzimler, özellikle son yıllarda tüketiciye cazip gelecek ve yüksek besleyicilik değerine sahip gıdaların geliştirilmesi ve üretiminde gittikçe artan bir öneme sahip olmaya başlamışlardır. Polifenoloksidaz gıdalarda enzimatik kararma ya da fenolik kararmaya neden olduğundan dolayı gıda endüstrisinde oldukça önemli bir problem teşkil etmektedir. Gıda endüstrisinde bu enzimlerin ürünleri yalnızca gıdaların tadını, kokusunu ve rengini etkilemekle kalmayıp aynı zamanda gıdanın içermiş olduğu proteinlere bağlanarak besin değerini oldukça düşürmektedir.

Enzimatik kararma; sebze ve meyvelerde meydana gelen renk değiştirme olayıdır. Bu olay enzimatik ve/veya enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlarla gerçekleşir. Enzimatik olarak gerçekleşen kararmalara başlıca polifenoloksidaz

enzimi sebep olur. Bu enzim genellikle meyve ve sebzelerin toplanma ve depolanma sürecinde gerçekleşen kararmayı katalizler. Kararmanın sebep olduğu hoş olmayan koku ve görüntü özellikle işletmeci ve tüketiciler için önemli, ekonomik bir problem teşkil eder. Bu nedenle *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in toplanmasından sonraki işlemlerde kararmasının önlenmesi ya da azaltılması önemlidir. Yapılan literatür taramalarında oğul otu PFO'su ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada oğul otunun PFO aktivitesinin ve fenolik madde içeriğinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, PFO'nun substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, termal inaktivasyon ve inhibisyonu gibi bazı kinetik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca oğul otunun içermiş olduğu protein ve fenolik madde içeriğı de belirlenmiştir. Elde edilecek veriler ile oğul otunun ekonomik değerinin ve ihracat payındaki miktarının daha da artacağı, ülke ekonomisine ve aynı zamanda gıda teknolojisine önemli katkılarının olacağı düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* bitkisi Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi bahçesinden toplandı. Taze bitki - 80 °C'de saklandı. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma'dan satın alındı. Enzim aktiviteleri ise Cary | 1E | g UV-Visible (Varian, Avustralya) spektrofotometre kullanılarak belirlendi [3].

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Katekol
2. 4-metilkatekol
3. Piragallol
4. Glutasyon
5. Askorbik asit
6. Benzoik asit
7. Sodyum azid
8. L-tirozin
9. Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
10. Disodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4)
11. Sodyum hidroksit (NaOH)
12. Sodyum asetat (NaCH_3COO)
13. Nitrik asit (HNO_3)
14. Sodyum karbonat
15. Serum albümin
16. Coomassie Brilliant-Blue G- 250
17. Folin- Ciocalteau belirteci
18. Sodyum karbonat (Na_2CO_3)

19. L-glutamik asit
20. Gallik asit

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Cary | 1E | g UV –Visible : Varian
2. pH-metre : Orion 920A
3. Sabit sıcaklık banyosu : Temperature Junior TE-85
4. Otomatik pipetler : Brand
5. Terazî : Libror AEG-220/ Shimadzu
6. Blender : Warning
7. Etüv : Memmert
8. Soğutmalı santrifüj : Sigma 3K 30
9. Mağnetik karıştırıcı : Heildolph
10. Vorteks : Nüve NM 100

2.2 Ham Ekstratların Hazırlanışı

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'in yaprakları toplandıktan hemen sonra -80 °C'de saklandı. 20 g bitki örneği 10 mM askorbik asit ve 4 g polietilenglikol içeren 100 mL pH'sı 6,5 olan fosfat tamponunda 2 dakika süreyle bir çelik blendır ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzöldü. Süzöntü, santrifüj tüplerine alındı ve tüplerin ağırlıkları hassas bir terazide eşitlenerek 15000 x g'de 10 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edildi. Oluşturulan enzimin PFO aktivitesine iyon etkisini engellemek için tampon konsantrasyonu 0,1 M seçildi [43]. Santrifüj sonrası üst kısımları süzölerek elde edilen süpernatant kısmi saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu [3,44].

2.3 Polifenoloksidazın Kısmen Saflaştırılması

Hazırlanmış olduğumuz süpernatant katı amonyum sülfat ile %80 doygunluğa getirildi. Bunun için;

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

formülü ile kullanılması gereken amonyum sülfat miktarı belirlendi. Burada V, süpernatantın hacmini; S₁, 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyumunu; S₂ ise 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyumunu göstermektedir.

Hazırladığımız katı amonyum sülfat, magnetik karıştırıcıda, buz banyosu üzerinde olan ham ekstrakta yavaş yavaş eklendi. Süspansiyon % 80 doyumla geldiğinde 60 dakika boyunca +4 °C'de 15000 x g'de santrifüj edildi [45]. Oluşan çökelek pH 'sı 7.0 olan 5 mM fosfat tamponunda çözünebildiği en az miktarda çözüldü [9].

Elde ettiğimiz enzim çözeltisi 5 mM fosfat tamponunda 24 saat boyunca diyaliz edildi. Bu süre içinde diyaliz tamponu 4 kez değiştirildi. Diyaliz magnetik karıştırıcıda +4 °C'de buzdolabında gerçekleştirildi, kısmen saflaştırılan PFO deneylerde kullanıldı [4].

2.4 Spektrofotometrik Ölçümler

Reaksiyon 1 cm ışık olan 3 mL hacimli kuvarz küvet içinde, Cary | 1E | g-UV-Visible spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. PFO'nun substrat spesifikliğini belirlemek için katekol, 4-metilkatekol, piragallol, L-tirozin ve gallik asit substratları kullanıldı. Analiz karışımı genel olarak 2,3 mL fosfat tamponu; 0,6 mL substrat ve 0,1 mL enzim karışımından meydana geldi. Enzim çözeltisi reaksiyon karışımına en son ve hızlı bir şekilde ilave edildi.

2.5 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

Katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratlarıyla optimum pH çalışması yapıldı ve pH 4.0–9.0 aralığında değerlendirildi. Tampon çözeltilerinin pH ayarları 0,1 M NaOH ve HNO₃ çözeltileri kullanılarak yapıldı. Enzim aktivitesinin pH ile

değişimini belirleyebilmek için pH 4.0–6.0 aralığında 0,1M asetat ve pH 6.0–9.0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı.

2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen PFO için substrat olarak katekol, 4-metilkatekol ve pirigallol kullanılarak optimum sıcaklık çalışması yapıldı. 10-70 °C arasındaki farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Substrat ve tamponların sıcaklıkları termostatlı bir su banyosunda ayarlandı. Enzim en son olarak eklenip hemen ölçüm alındı. Reaksiyon karışımı 2,3 mL tampon, 0,6 mL substrat ve 0,1 mL enzim çözeltisini içerdi. Deneyleerin tümünde aynı enzim stoku kullanıldı [46].

2.7 Termal İnaktivasyon

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen PFO enziminin termal inaktivasyonunu belirlemek için 35–75 °C sıcaklık aralığı seçildi. Bu çalışma için deney tüplerine koyulan enzim çözeltisi sabit zaman aralıklarında çeşitli sıcaklıklarda inkübe edildi ve buz banyosunda soğutuldu. 2,3 mL tampon çözeltisi, 0,6 mL substrat ve 0,1 mL enzim çözeltisi kullanılarak aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler iki kez tekrarlandı [46].

2.8 İnhibisyon

Polifenoloksidazın inhibisyonu için askorbik asit, glutatyon, benzoik asit, sodyum azid, gallik asit ve L-glutamik asit inhibitörler olarak kullanıldı. Tüm inhibitörler katekol, 4-metilkatekol ve pirigallol substratları için farklı konsantrasyonlarda çalışıldı. Enzim çözeltisi 0,1'er mL eklendi [47].

2.9 Protein İçeriği

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* ekstraktının protein içeriği belirlenirken Bradford Metodu kullanıldı. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni,

çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin söz konusu olmaması ve protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Ayrıca yöntemin hassasiyeti 1–100 µg arasındadır. Kalibrasyon için bovin serum albumin kullanılmıştır [35].

Deney tüplerine 1 mL’inde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL pipet ile konuldu. Tüplerin hacimleri 0,1 mL’ye 5 mM lık pH ’sı 6,5 olan fosfat tamponuyla tamamlandı. Daha sonra 5 mL Coomassie Brilliant-Blue G–250 reaktifi tüm tüplere eklenip 1 dakika boyunca vorteks yardımıyla karıştırıldı. 30 dakika karanlıkta bekletilen çözeltiden, 595 nm’de ölçüm yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kör olarak ilk tüp yani 0,1 mL tampon ve 5 mL boya içeren çözelti kullanıldı [35].

Hazırlanan enzim ekstratından 3 ayrı tüpe 0,1’er mL alınarak üzerine 5’er mL Coomassie Brilliant-Blue G–250 reaktifi eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra 595 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Üç ölçümün ortalaması alındıktan sonra absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı [48].

2.10 Toplam Fenolik Madde İçeriği

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* ekstraktının toplam fenolik madde içeriği, Singleton ve Rossi’nin metoduna göre Folin-Ciocalteu belirteci kullanılarak belirlendi. 2 g bitki örneği oda sıcaklığında % 80’lik 100 mL sulu etanol içerisinde eklenerek karışım bir çelik blendır içinde homojenize edildi [49].

Homojenat 15 dakika 10000 x g ve +4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj edilen solüsyonun üst kısmı bir kaba alınarak saklandı. Tüpte kalan çökelek yine % 80’lik 100 mL sulu etanol içerisinde iki kez daha ekstrakte edildikten sonra tüm süpernatantlar birleştirilip bir litrelik bir beher içine alındı. Beher oda sıcaklığında içindeki tüm çözelti uçuncaya kadar iki gün boyunca buharlaşmaya bırakıldı. Cam kaptaki kuru kalıntı 5 mL distile su içerisinde çözüldü. Ekstraktın 100 µL’si distile suyla 3 mL’ye seyreltildi. Üzerine 0,5 mL Folin–Ciocalteu reaktifi eklendi. 3 dakika bekledikten sonra % 20’lik 2 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edildi ve

vorteks yardımıyla karıştırıldı. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 60 dakika beklendikten sonra 650 nm’de spektrometrik olarak ölçüldü. Standart kalibrasyon eğrisi, katekol kullanılarak hazırlandı. Sonuç, 100 g taze bitki ağırlığı başına mg katekol olarak verildi [49].

Standart kalibrasyon eğrisi çizilirken 0.05 M’lık katekol çözeltisi hazırlandı. 11 farklı tüpe sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L katekol eklendi. Tüplerin hacmi distile suyla 3 mL’ye seyreltildikten sonra üzerine 0.5 mL Folin–Ciocaltau reaktifi eklendi. 3 dakika bekledikten sonra % 20’lik 2 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 60 dakika sonra tüplerin köre karşılık absorbans değerleri 650 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kör olarak içerisinde Folin–Ciocaltau reaktifi, distile su ve sodyum karbonat karışımı bulunan tüp kullanıldı [49].

3. BULGULAR

3.1 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* Ekstraktlarının Toplam Protein ve Fenolik Madde İçeriği

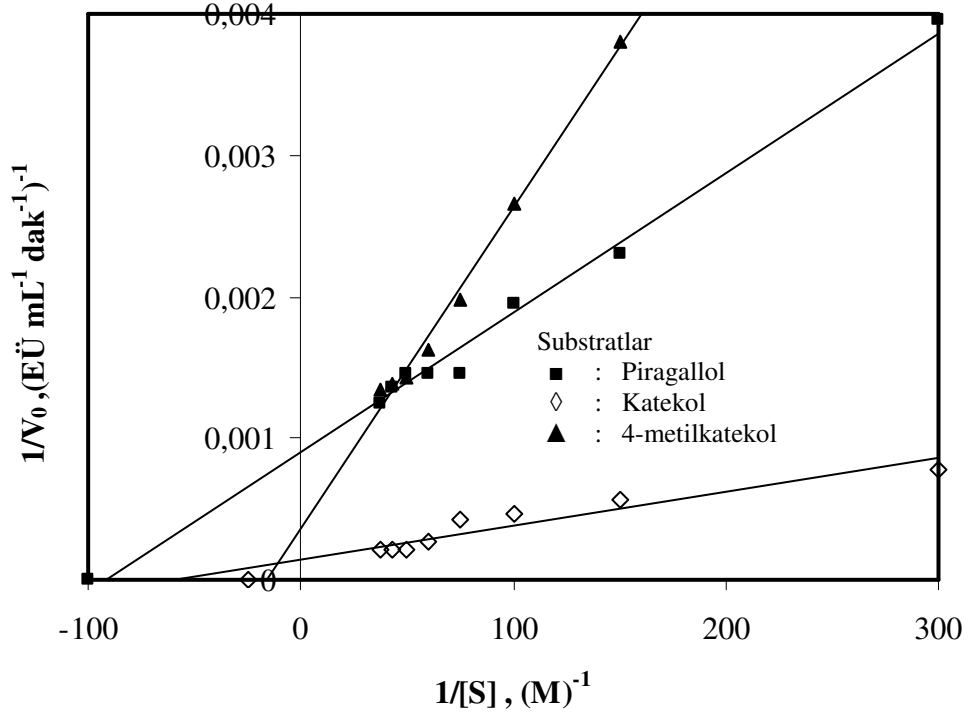
Bradford yöntemi ve Singleton-Rossi yöntemleri ile belirlenen protein ve fenolik madde içerikleri ham ekstrattan elde edilmiştir [49,50]. Elde ettiğimiz sonuçlara göre ham ekstratta 230 µg mL⁻¹ protein ve 280 mg 100 g⁻¹ toplam fenolik madde içeriğinin bulunduğu belirlenmiştir.

3.2 Substrat Spesifikliği

Katekol, 4-metilkatekol, piragallol, gallik asit ve L-tirozin substratları *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin tayininde kullanılmıştır. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidazın gallik asit ve L-tirozin substratlarına karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'in PFO aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler

Substratlar	[S] (M)×10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ x10 ⁺⁴ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	V _{max} /K _M (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹ mM ⁻¹)	R ²
4-metilkatekol	3,33	253	300	39,53	1111,1	11,1	100	0,9929
	6,66	433	150	23,09				
	10,00	513	100	19,49				
	13,33	685	75	14,60				
	16,66	687	60	14,56				
	20,00	690	50	14,49				
	23,33	737	42,8	13,57				
	26,67	801	37,5	12,48				
Katekol	3,33	1294	300	7,73	10000	20	500	0,9035
	6,66	1759	150	5,69				
	10,00	2122	100	4,71				
	13,33	2340	75	4,27				
	16,66	3780	60	2,65				
	20,00	4588	50	2,18				
	23,33	4590	42,8	2,18				
	26,67	4649	37,5	2,15				
Piragallol	3,33	56	300	17,52	2500	50	50	0,9910
	6,66	263	150	38,02				
	10,00	376	100	26,60				
	13,33	505	75	19,80				
	16,66	613	60	16,31				
	20,00	703	50	14,22				
	23,33	721	42,8	13,87				
	26,67	741	37,5	13,50				



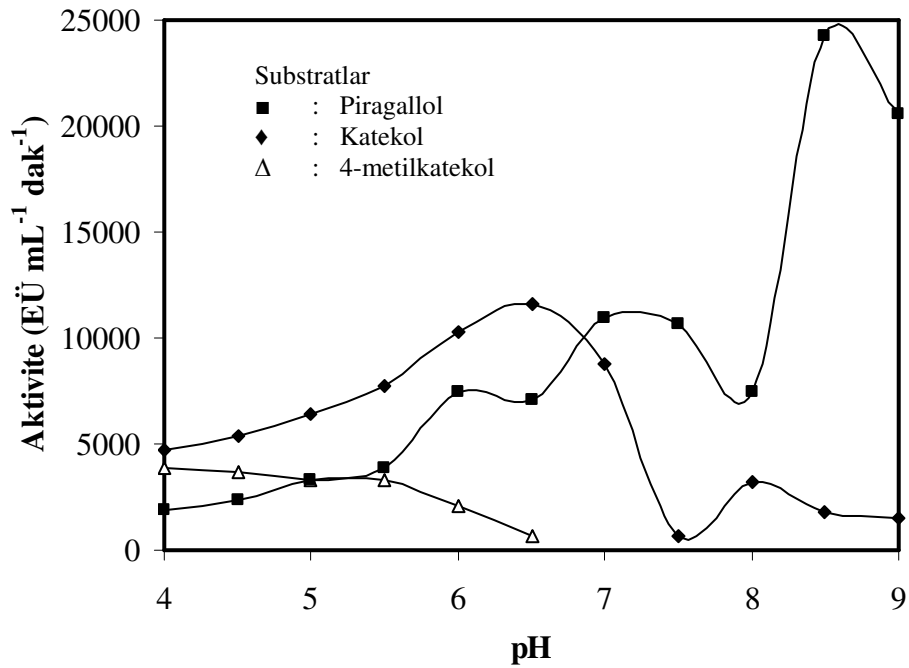
Şekil 3.1 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* polifenoloksidazı için çizilmiş $1/[S]$ - $1/V_0$ eğrileri

3.3 Optimum pH

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* bitkisinden elde edilen polifenoloksidazın optimum pH değerleri katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanılarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler Çizelge 3.2 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler

pH	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metilkatekol	Piragallol
4,0	4737	3906	1921
4,5	5366	3684	2325
5,0	6397	3348	3258
5,5	7771	3344	3869
6,0	10257	2105	7414
6,5	11569	628	7055
7,0	8769	-	10972
7,5	6880	-	10648
8,0	3214	-	7456
8,5	1773	-	24274
9,0	1520	-	20553



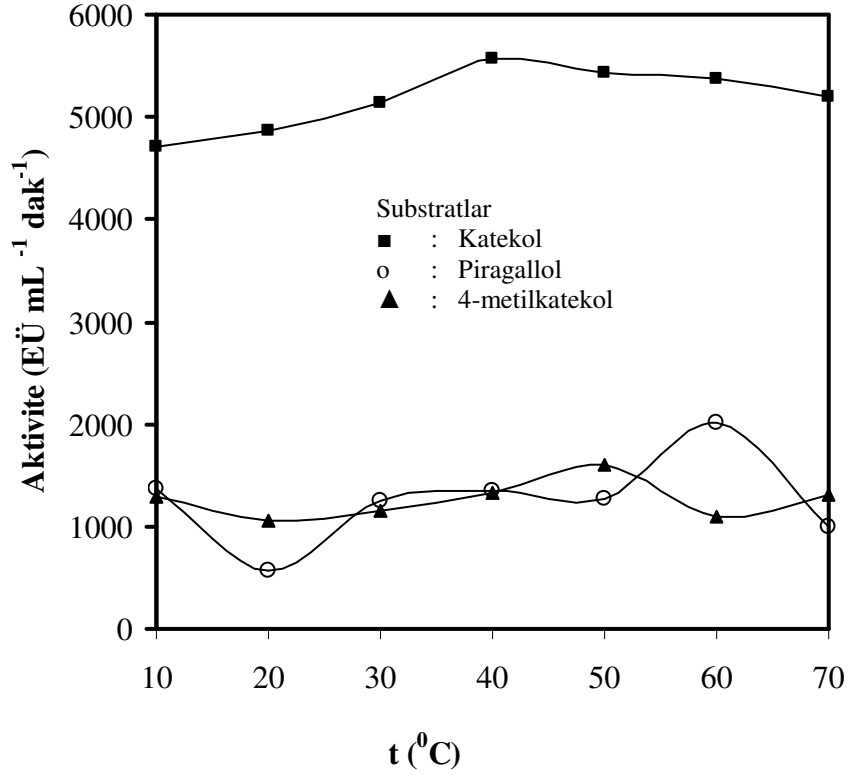
Şekil 3.2 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimi

3.4 Optimum Sıcaklık

Katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanılarak *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'lerde incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.3'te verilerek Şekil 3.3'de grafik edilmiştir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi katekol, 4-metilkatekol ve piragallol için optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 40, 50 ve 60 °C olduğu bulundu.

Çizelge 3.3 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait veriler

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metilkatekol	Piragallol
10	4705	1285	1370
20	4864	1059	574
30	5142	1145	1256
40	5573	1333	1358
50	5433	1608	1274
60	5365	1094	2011
70	5200	1310	993



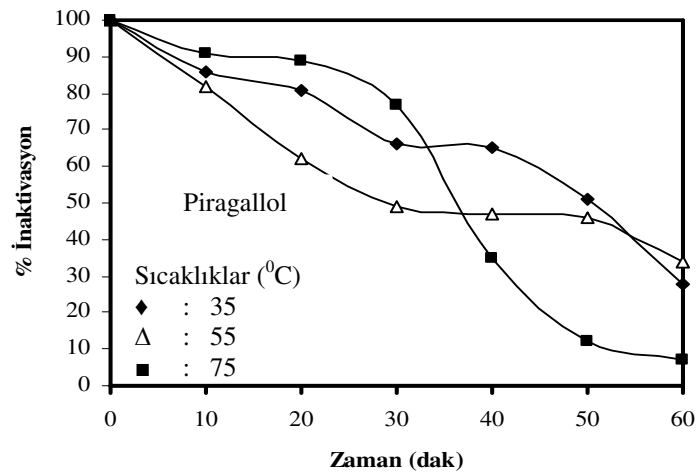
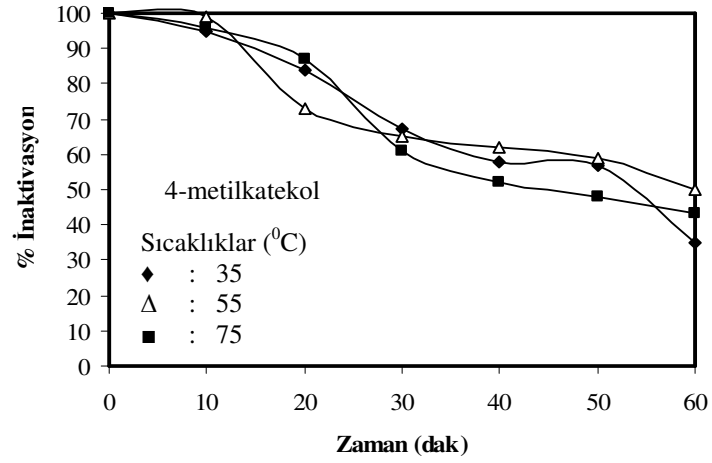
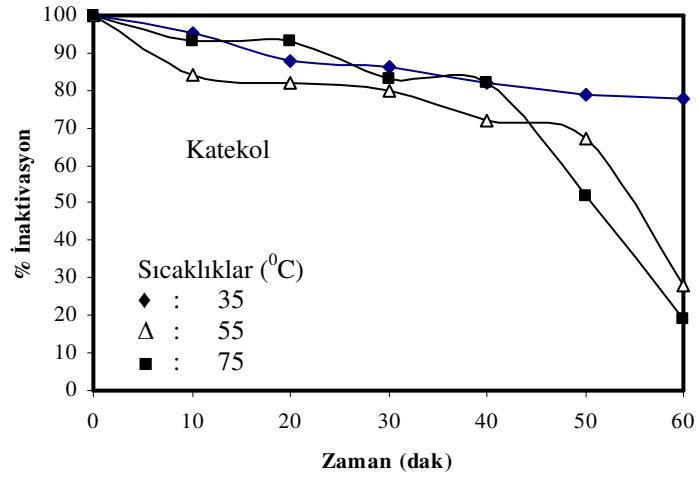
Şekil 3.3 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

3.5 Termal İnaktivasyon

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin termal denatürasyonu artan sıcaklığın ve inaktivasyon süresinin bir fonksiyonu olarak incelendi. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.4'te verilerek Şekil 3.4'de grafik edildi. Deneysel bulgular tüm substratlar için artan sıcaklık ve inaktivasyon süresi ile enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 3.4 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* polifenoloksidazının termal denatürasyonu için elde edilen deneysel veriler

Substratlar	Zaman (dak)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
		35 ⁰ C	55 ⁰ C	75 ⁰ C
Katekol	0	6000	6000	6000
	10	5978	5366	5622
	20	5463	5289	5614
	30	5413	5242	5344
	40	5293	5020	5315
	50	5228	4869	4437
	60	5177	575	2722
4-metilkatekol	0	6000	6000	6000
	10	1792	1872	1916
	20	1578	1389	1652
	30	1270	1223	1148
	40	1107	1174	989
	50	1077	1124	904
	60	673	948	826
Piragallol	0	6000	6000	6000
	10	5603	5345	5958
	20	5282	4051	5850
	30	4315	3199	5054
	40	4279	3086	2320
	50	3322	3000	788
	60	1858	2233	500



Şekil 3.4 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* polifenoloksidaz aktivitesinin termal denaturasyonuna ait eğriler

3.6 Polifenoloksidazın İnhibisyonu

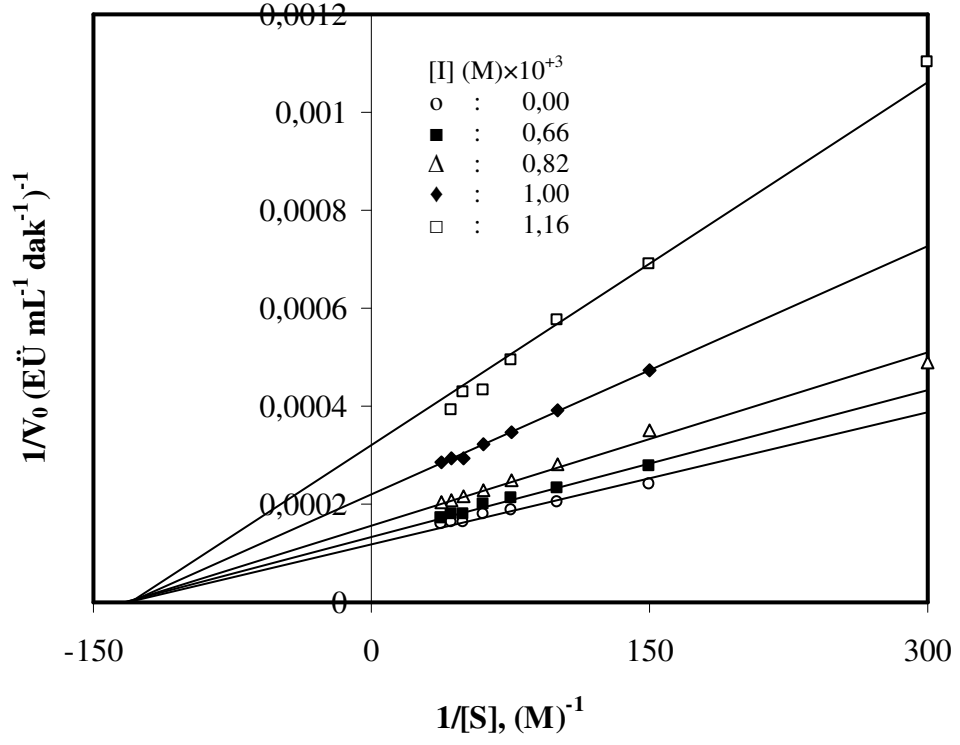
Askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri ile polifenoloksidazın inhibisyonu katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler sırasıyla Çizelge 3.5-3.15’de verilmiş olup, Şekil 3.5–3.15’da grafik edilmiştir.

Çizelge 3.5 Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M) $\times 10^{+3}$	R^2
-	3,33	3986	300	2,51	10000	9	-	0,9858
	6,66	4176	150	2,39				
	10,00	4879	100	2,05				
	13,33	5361	75	1,87				
	16,66	5601	60	1,79				
	20,00	6159	50	1,62				
	23,33	6056	42,8	1,65				
	26,66	6207	37,5	1,61				
$0,66 \times 10^{-3}$	3,33	3017	300	3,31	-	-	$5,9 \times 10^{-3}$	0,9979
	6,66	3600	150	2,78				
	10,00	4329	100	2,31				
	13,33	4746	75	2,11				
	16,66	5031	60	1,99				
	20,00	5565	50	1,80				
	23,33	5632	42,8	1,78				
	26,66	5800	37,5	1,72				
$0,83 \times 10^{-3}$	3,33	2042	300	4,90	-	-	$7,4 \times 10^{-3}$	0,9909
	6,66	2858	150	3,50				
	10,00	3545	100	2,82				
	13,33	3990	75	2,51				
	16,66	4389	60	2,28				
	20,00	4589	50	2,18				
	23,33	4790	42,8	2,09				
	26,66	4903	37,5	2,04				

Çizelge 3.5'in devamı

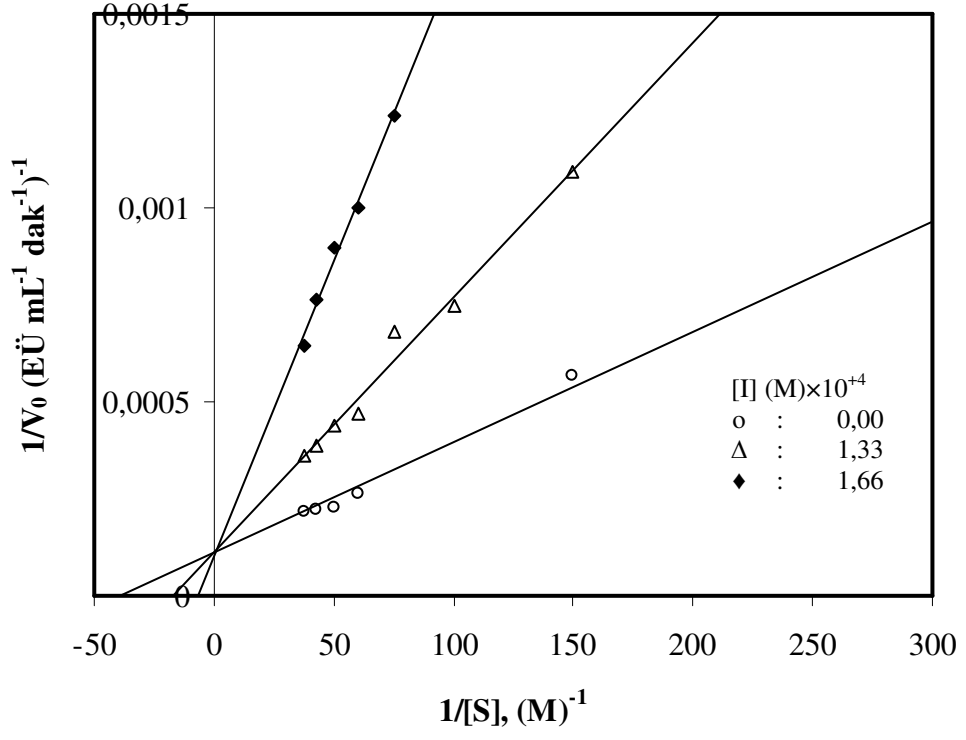
[I] (M)	[S] (M) ×10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	1/V ₀ ×10 ⁺⁴ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)×10 ⁺³	R ²
1,00×10 ⁻³	3,33	1233	300	8,11	-	-	0,8×10 ⁻³	0,9999
	6,66	2106	150	4,75				
	10,00	2559	100	3,91				
	13,33	2897	75	3,45				
	16,66	3102	60	3,22				
	20,00	3400	50	2,94				
	23,33	3401	42,8	2,94				
	26,66	3476	37,5	2,88				
1,16×10 ⁻³	3,33	909	300	11,00	-	-	0,9×10 ⁻³	0,9893
	6,66	1451	150	6,89				
	10,00	1740	100	5,75				
	13,33	2019	75	4,95				
	16,66	2322	60	4,31				
	20,00	2340	50	4,27				
	23,33	2563	42,8	3,90				
	26,66	2802	37,5	3,57				



Şekil 3.5 Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.6 Katekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	1294	300	7,73	10000	30	-	0,9822
	6,66	1759	150	5,69				
	10,00	2222	100	4,50				
	13,33	2340	75	4,27				
	16,66	3780	60	2,65				
	20,00	4388	50	2,28				
	23,33	4490	42,8	2,23				
	26,66	4649	37,5	2,15				
$1,33 \times 10^{-4}$	3,33	63	300	15,87	-	-	$9,9 \times 10^{-5}$	0,9812
	6,66	915	150	10,93				
	10,00	1338	100	7,47				
	13,33	1465	75	6,83				
	16,66	2122	60	4,71				
	20,00	2292	50	4,36				
	23,33	2593	42,8	3,86				
	26,66	2767	37,5	3,61				
$1,66 \times 10^{-4}$	3,33	354	300	28,2	-	-	$2,9 \times 10^{-5}$	0,9878
	6,66	496	150	20,2				
	10,00	25	100	40,0				
	13,33	899	75	11,12				
	16,66	999	60	10,01				
	20,00	1112	50	8,99				
	23,33	1313	42,8	7,62				
	26,66	1556	37,5	6,43				



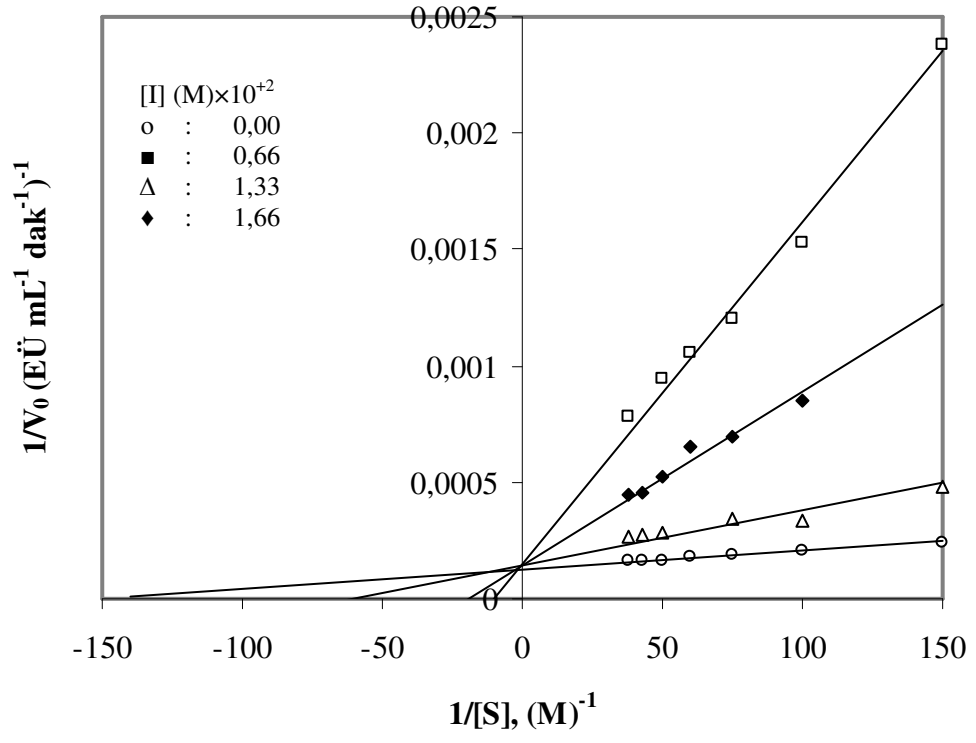
Şekil 3.6 Katekol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.7 Katekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	3986	300	2,51	10000	8	-	0,9932
	6,66	4176	150	2,39				
	10,00	4879	100	2,05				
	13,33	5361	75	1,87				
	16,66	5601	60	1,79				
	20,00	6159	50	1,62				
	23,33	6056	42,8	1,65				
	26,66	6207	37,5	1,61				
0,66 $\times 10^{-2}$	3,33	1163	300	8,60	-	-	4,4 $\times 10^{-3}$	0,9343
	6,66	2083	150	4,80				
	10,00	2978	100	3,36				
	13,33	2936	75	3,41				
	16,66	3210	60	3,12				
	20,00	3478	50	2,88				
	23,33	3603	42,8	2,78				
	26,66	3902	37,5	2,56				
1,33 $\times 10^{-2}$	6,66	1000	150	1	-	-	1,7 $\times 10^{-3}$	0,9833
	10,00	1177	100	8,5				
	13,33	1444	75	6,93				
	16,66	1530	60	6,54				
	20,00	1896	50	5,27				
	23,33	2191	42,8	4,56				
	26,66	2239	37,5	4,47				

Çizelge 3.7'nin devamı

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^3$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
1,66 $\times 10^{-2}$	3,33	400	300	25,00	-	-	1,4 $\times 10^{-3}$	0,9917
	6,66	420	150	23,81				
	10,00	654	100	15,29				
	13,33	834	75	11,99				
	16,66	949	60	10,54				
	20,00	1062	50	9,42				
	23,33	1768	42,8	5,66				
	26,66	1274	37,5	7,85				



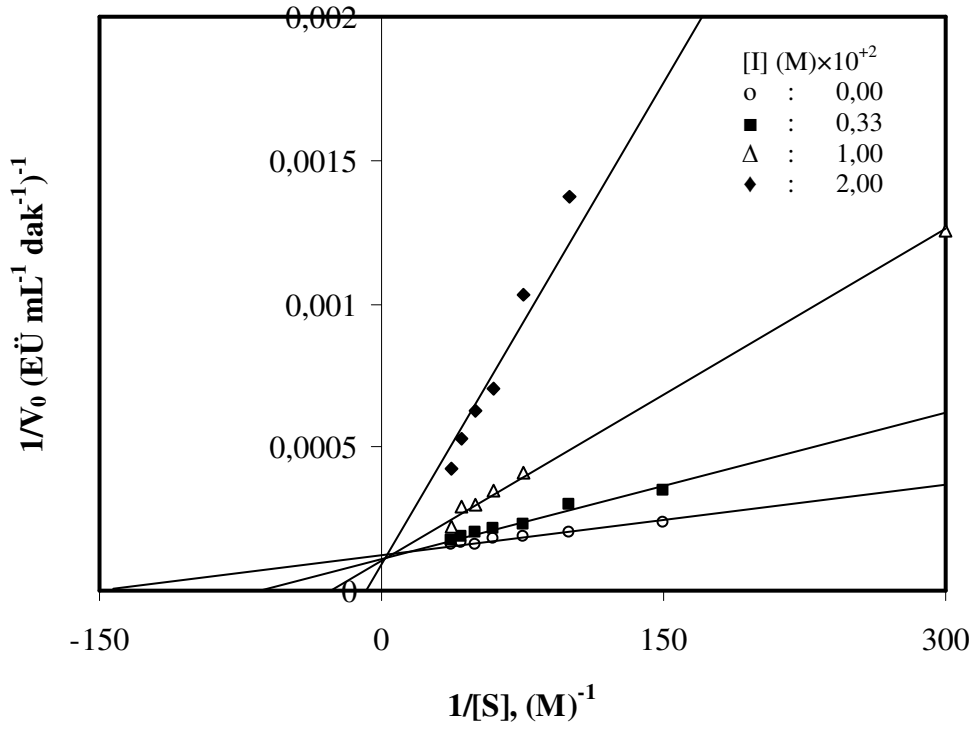
Şekil 3.7 Katekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.8 Katekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	3986	300	2,51	10000	8	-	0,9939
	6,66	4176	150	2,39				
	10,00	4879	100	2,05				
	13,33	5361	75	1,87				
	16,66	5601	60	1,79				
	20,00	6159	50	1,62				
	23,33	6056	42,8	1,65				
	26,66	6207	37,5	1,61				
0,33 $\times 10^{-2}$	3,33	1108	300	9,03	-	-	2,2 $\times 10^{-3}$	0,9884
	6,66	2860	150	3,50				
	10,00	3324	100	3,01				
	13,33	4333	75	2,31				
	16,66	4567	60	2,19				
	20,00	4986	50	2,01				
	23,33	5383	42,8	1,86				
	26,66	5667	37,5	1,76				
1,00 $\times 10^{-2}$	3,33	796	300	12,56	-	-	2,5 $\times 10^{-3}$	0,9980
	6,66	1076	150	9,29				
	10,00	1495	100	6,69				
	13,33	2426	75	4,12				
	16,66	2864	60	3,49				
	20,00	3334	50	3,00				
	23,33	3411	42,8	2,93				
	26,66	4518	37,5	2,21				

Çizelge 3.8'in devamı

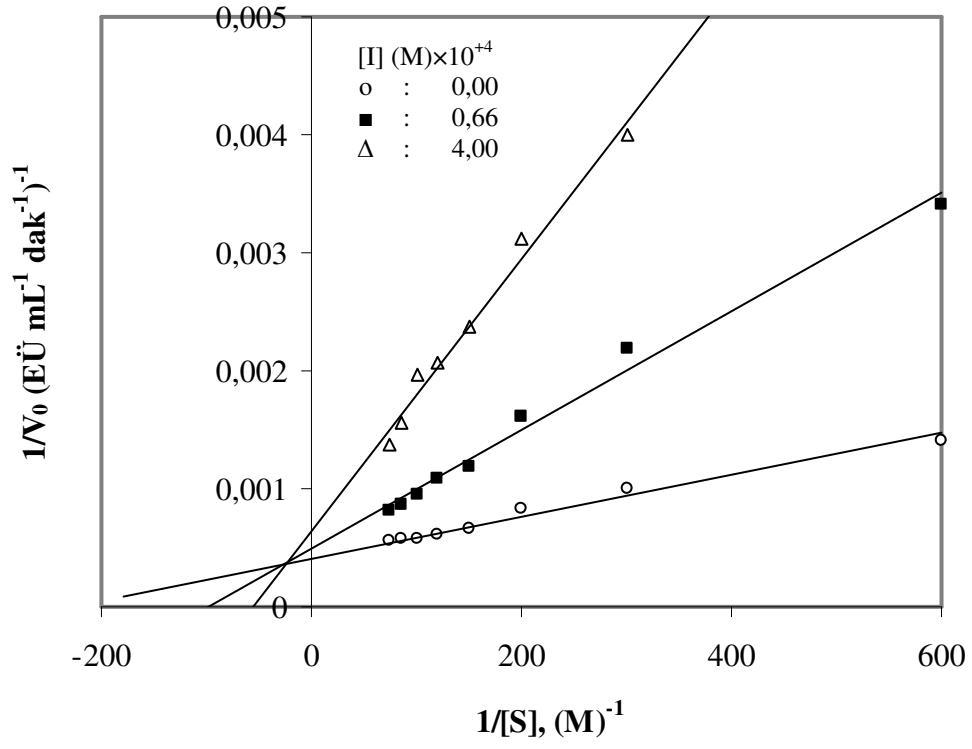
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
2,00×10 ⁻²	3,33	294	300	34,01	-	-	1,7×10 ⁻³	0,9919
	6,66	634	150	15,77				
	10,00	727	100	13,76				
	13,33	970	75	10,31				
	16,66	1427	60	7,01				
	20,00	1597	50	6,26				
	23,33	1887	42,8	5,30				
	26,66	2352	37,5	4,25				



Şekil 3.8 Katekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.9 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

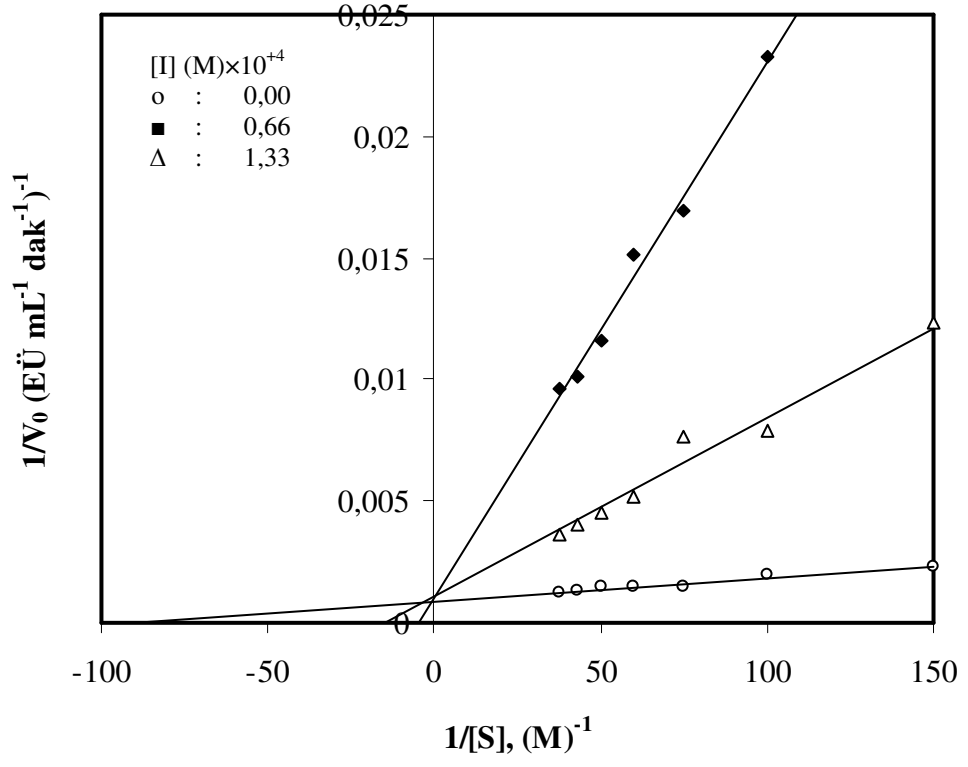
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	1,66	715	600	13,99	2500	5	-	0,9807
	3,33	995	300	10,05				
	5,00	1214	200	8,24				
	6,66	1517	150	6,59				
	8,33	1617	120	6,18				
	10,00	1735	100	5,76				
	11,66	1718	85,7	5,82				
	13,33	1793	75	5,58				
0,66 $\times 10^{-4}$	1,66	294	600	34,01	-	-	0,44 $\times 10^{-4}$	0,9870
	3,33	456	300	21,93				
	5,00	621	200	16,10				
	6,66	837	150	11,95				
	8,33	918	120	10,89				
	10,00	1055	100	9,48				
	11,66	1158	85,7	8,64				
	13,33	1217	75	8,22				
4 $\times 10^{-4}$	1,66	14	600	714,29	-	-	1,00 $\times 10^{-4}$	0,9811
	3,33	250	300	40,00				
	5,00	320	200	31,25				
	6,66	420	150	23,81				
	8,33	482	120	20,75				
	10,00	509	100	19,65				
	11,66	643	85,7	15,55				
	13,33	732	75	13,66				



Şekil 3.9 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.10 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	253	300	39,53	1111	11	-	0,9863
	6,66	433	150	23,09				
	10,00	513	100	19,49				
	13,33	685	75	14,60				
	16,66	687	60	14,56				
	20,00	690	50	14,49				
	23,33	737	42,8	13,57				
	26,66	801	37,5	12,48				
0,66 $\times 10^{-4}$	3,33	20	300	500,00	-	-	1,1 $\times 10^{-5}$	0,9802
	6,66	81	150	123,46				
	10,00	127	100	78,74				
	13,33	131	75	76,34				
	16,66	194	60	51,55				
	20,00	221	50	45,25				
	23,33	249	42,8	40,16				
	26,66	277	37,5	36,10				
1,33 $\times 10^{-4}$	3,33	6	300	1666,6	-	-	7,0 $\times 10^{-6}$	0,9948
	6,66	36	150	277,7				
	10,00	43	100	232,5				
	13,33	59	75	169,4				
	16,66	66	60	151,5				
	20,00	86	50	116,2				
	23,33	99	42,8	101,0				
	26,66	104	37,5	96,15				



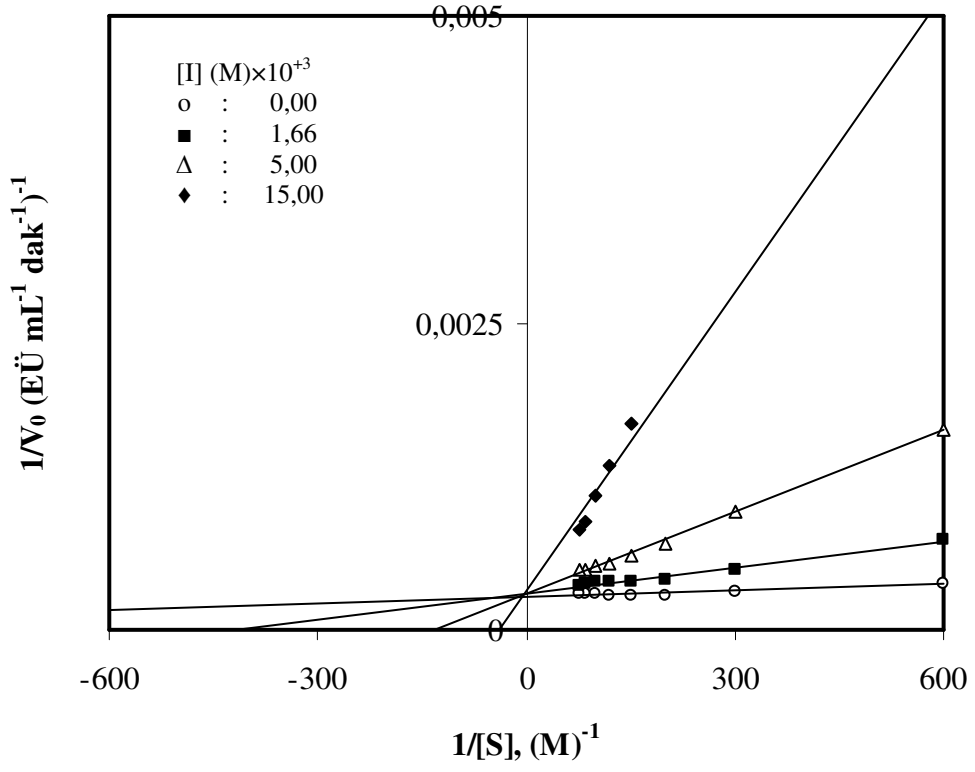
Şekil 3.10 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.11 4-metilkatekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	1,66	2666	600	3,75	3333	0,7	-	0,9882
	3,33	3260	300	3,07				
	5,00	3519	200	2,84				
	6,66	3568	150	2,80				
	8,33	3583	120	2,79				
	10,00	3371	100	2,97				
	11,66	3404	85,7	2,97				
	13,33	3485	75	2,87				
$1,66 \times 10^{-3}$	1,66	1355	600	7,38	-	-	$0,6 \times 10^{-3}$	0,9755
	3,33	2029	300	4,93				
	5,00	2479	200	4,03				
	6,66	2538	150	3,94				
	8,33	2559	120	3,91				
	10,00	2596	100	3,85				
	11,66	2634	85,7	3,80				
	13,33	2829	75	3,53				
$5,00 \times 10^{-3}$	1,66	613	600	16,31	-	-	$0,5 \times 10^{-3}$	0,9965
	3,33	1032	300	9,96				
	5,00	1426	200	7,01				
	6,66	1672	150	5,98				
	8,33	1857	120	5,39				
	10,00	1904	100	5,25				
	11,66	2066	85,7	4,84				
	13,33	2027	75	4,93				

Çizelge 3.11'in devamı

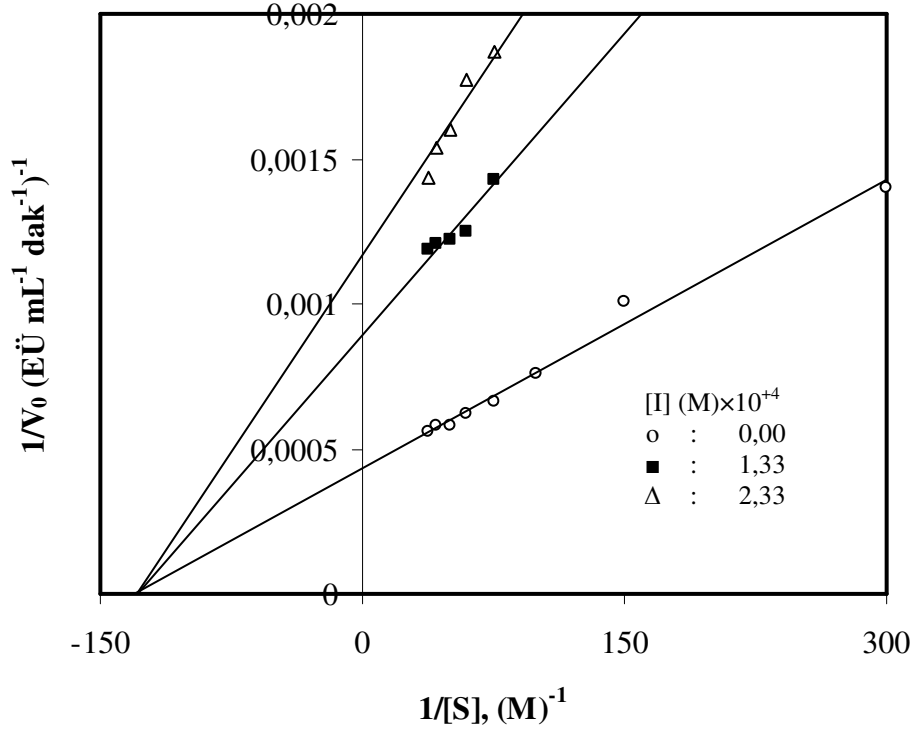
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
15,0×10 ⁻³	1,66	32	600	312,5	-	-	0,3×10 ⁻³	0,9601
	3,33	352	300	28,41				
	5,00	363	200	27,55				
	6,66	595	150	16,81				
	8,33	745	120	13,42				
	10,00	918	100	10,89				
	11,66	1145	85,7	8,73				
	13,33	1227	75	8,15				



Şekil 3.11 4-metilkatekol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.12 4-metilkatekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

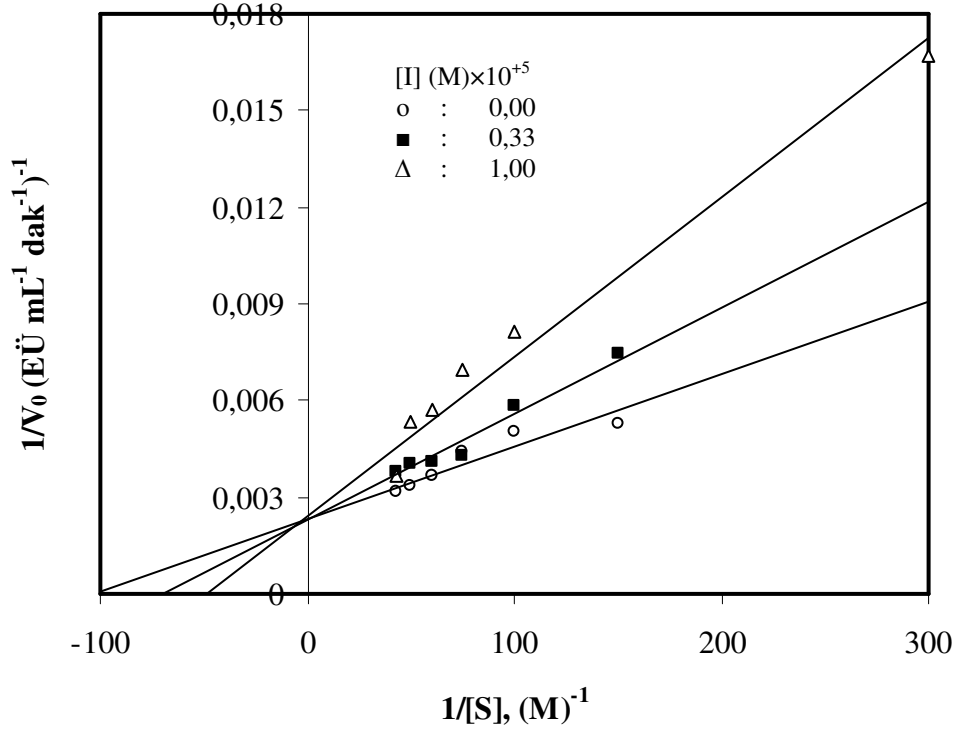
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	1,66	715	300	13,99	2500	7,5	-	0,9932
	3,33	995	150	10,05				
	5,00	1314	100	7,61				
	6,66	1517	75	6,59				
	8,33	1617	60	6,18				
	10,00	1735	50	5,76				
	11,66	1718	42,8	5,82				
	13,33	1793	37,5	5,58				
1,33×10 ⁻⁴	1,66	287	300	34,84	-	-	0,9×10 ⁻⁴	0,9959
	3,33	381	150	26,25				
	5,00	407	100	24,57				
	6,66	701	75	14,27				
	8,33	801	60	12,48				
	10,00	819	50	12,21				
	11,66	830	42,8	12,05				
	13,33	843	37,5	11,86				
2,33×10 ⁻⁴	1,66	278	300	35,97	-	-	1,1 ×10 ⁻⁴	0,9958
	3,33	307	150	32,57				
	5,00	422	100	23,70				
	6,66	455	75	21,98				
	8,33	565	60	17,70				
	10,00	624	50	16,03				
	11,66	650	42,8	15,38				
	13,33	697	37,5	14,35				



Şekil 3.12 4-metilkatekol substratı kullanılarak benzoik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.13 Piragallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

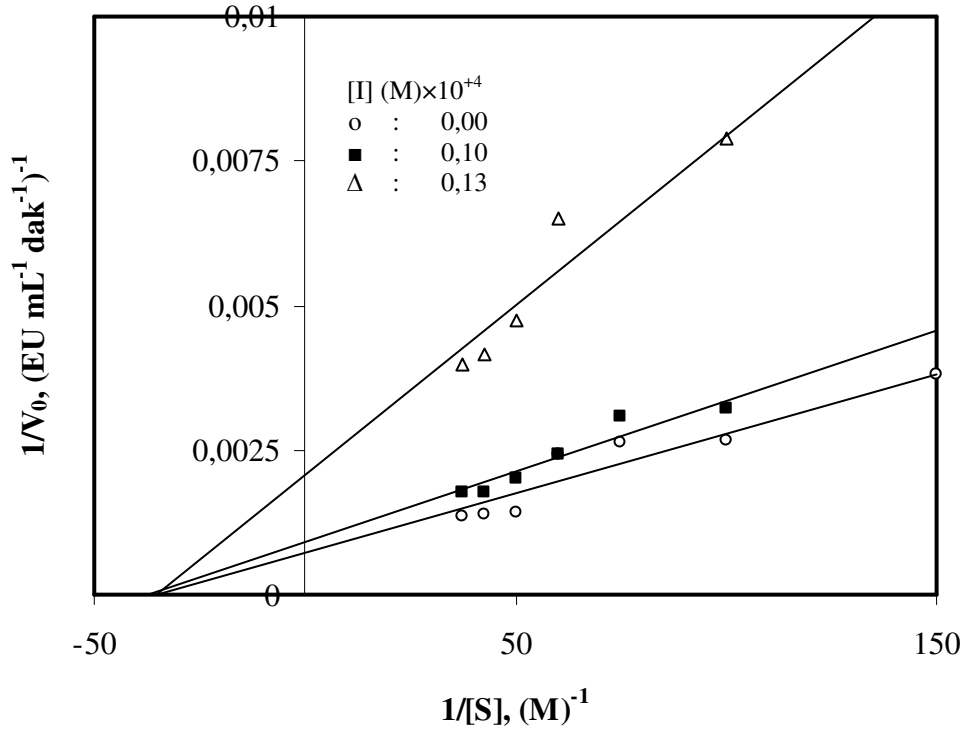
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	160	300	62,5	434,7	8,6	-	0,9694
	6,66	190	150	52,63				
	10,0	200	100	50,00				
	13,33	226	75	44,25				
	16,66	306	60	32,68				
	20,0	343	50	29,15				
	23,33	366	42,8	27,32				
	26,66	486	37,5	20,58				
0,33×10 ⁻⁵	3,33	120	300	83,33	-	-	6,6×10 ⁻⁶	0,9875
	6,66	134	150	74,63				
	10,0	172	100	58,14				
	13,33	233	75	42,92				
	16,66	243	60	41,15				
	20,0	248	50	40,32				
	23,33	266	42,8	37,59				
	26,66	303	37,5	33,00				
1,00×10 ⁻⁵	3,33	63	300	166,6	-	-	6,6×10 ⁻⁶	9774
	6,66	123	150	81,30				
	10,0	123	100	81,30				
	13,33	144	75	69,44				
	16,66	175	60	57,14				
	20,0	188	50	53,19				
	23,33	275	42,8	36,36				
	26,66	436	37,5	22,94				



Şekil 3.13 Piragallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.14 Piragallol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

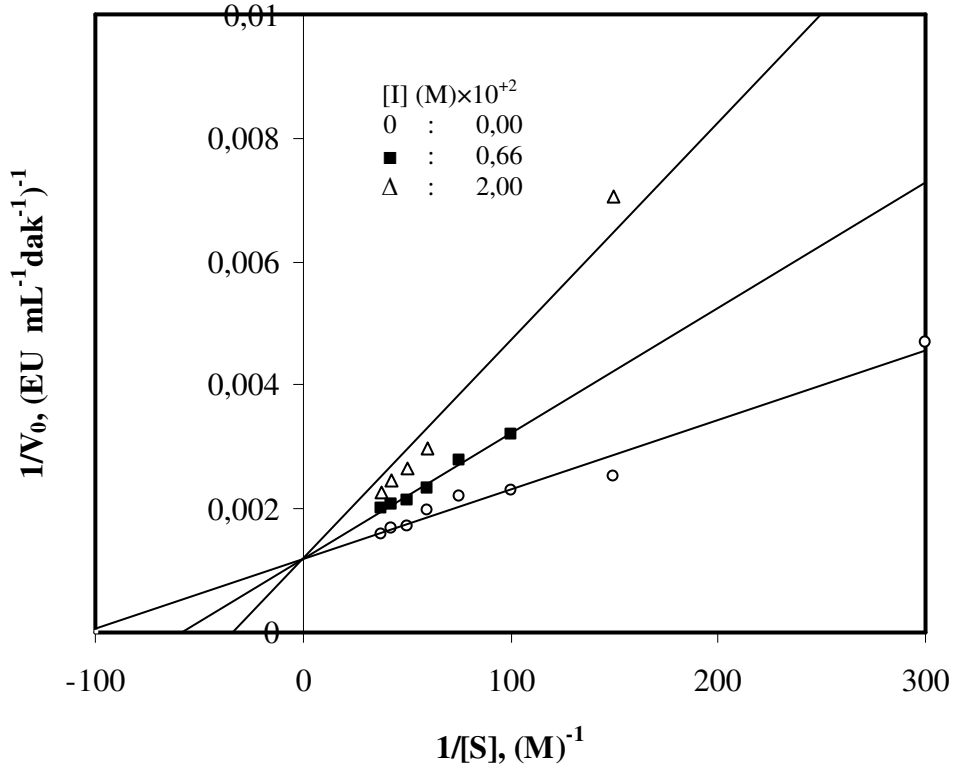
[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	56	300	178,6	1429	28	-	0,9419
	6,66	263	150	38,02				
	10,0	367	100	26,6				
	13,33	381	75	26,2				
	16,66	413	60	24,2				
	20,0	703	50	14,2				
	23,33	721	42,8	13,8				
	26,66	741	37,5	13,5				
1,00×10 ⁻⁵	3,33	27	300	370,3	-	-	2,8×10 ⁻²	0,9714
	6,66	233	150	42,92				
	10,0	310	100	32,26				
	13,33	324	75	30,86				
	16,66	413	60	24,21				
	20,0	496	50	20,16				
	23,33	569	42,8	17,57				
	26,66	572	37,5	17,48				
1,33×10 ⁻⁵	3,33	67	300	149,2	-	-	6,6×10 ⁻⁶	0,9671
	6,66	68	150	147,0				
	10,0	147	100	78,74				
	13,33	154	75	64,94				
	16,66	175	60	57,14				
	20,0	211	50	47,39				
	23,33	241	42,8	41,49				
	26,66	251	37,5	39,84				



Şekil 3.14 Piragallol substratı kullanılarak glutatyon inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.15 Piragallol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M) $\times 10^{+3}$	V_0 (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M)	$1/V_0 \times 10^{+4}$ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹	V_{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	K_i (M)	R^2
-	3,33	213	300	46,95	833	8,3	-	0,9741
	6,66	397	150	25,19				
	10,00	437	100	22,88				
	13,33	455	75	21,98				
	16,67	508	60	19,69				
	20,00	578	50	17,30				
	23,33	599	42,8	16,69				
	26,66	631	37,5	15,85				
0,66 $\times 10^{-2}$	3,33	156	300	64,10	-	-	1,84	0,9847
	6,66	170	150	58,82				
	10,00	312	100	32,05				
	13,33	358	75	27,93				
	16,67	427	60	23,42				
	20,00	466	50	21,46				
	23,33	484	42,8	20,66				
	26,66	499	37,5	20,04				
2,00 $\times 10^{-2}$	3,33	38	300	263,2	-	-	1,98 $\times 10^{-2}$	0,9627
	6,66	142	150	70,42				
	10,00	146	100	68,49				
	13,33	194	75	51,55				
	16,67	336	60	29,76				
	20,00	379	50	26,39				
	23,33	408	42,8	24,51				
	26,66	442	37,5	22,62				



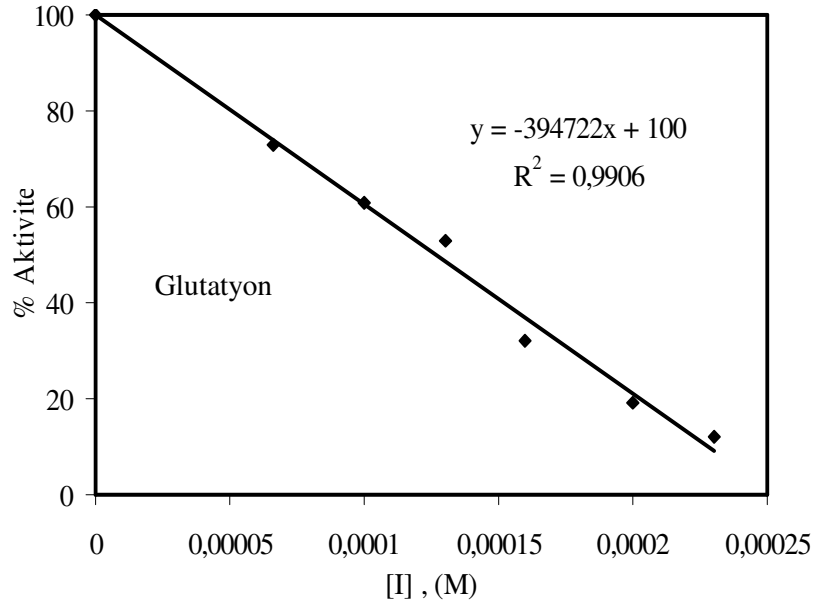
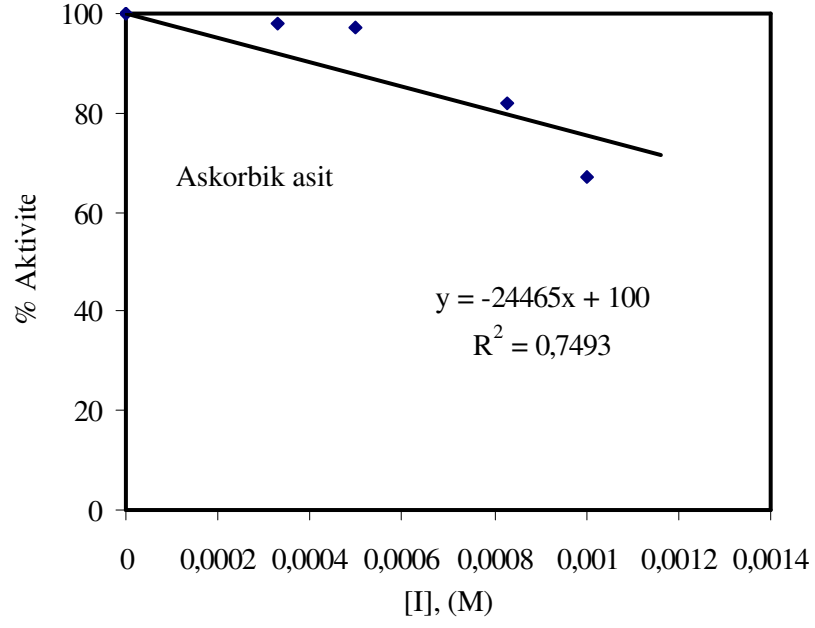
Şekil 3.15 Piragallol substratı kullanılarak sodyum azid inhibitörü ile polifenoloksidazın inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

3.7 I₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

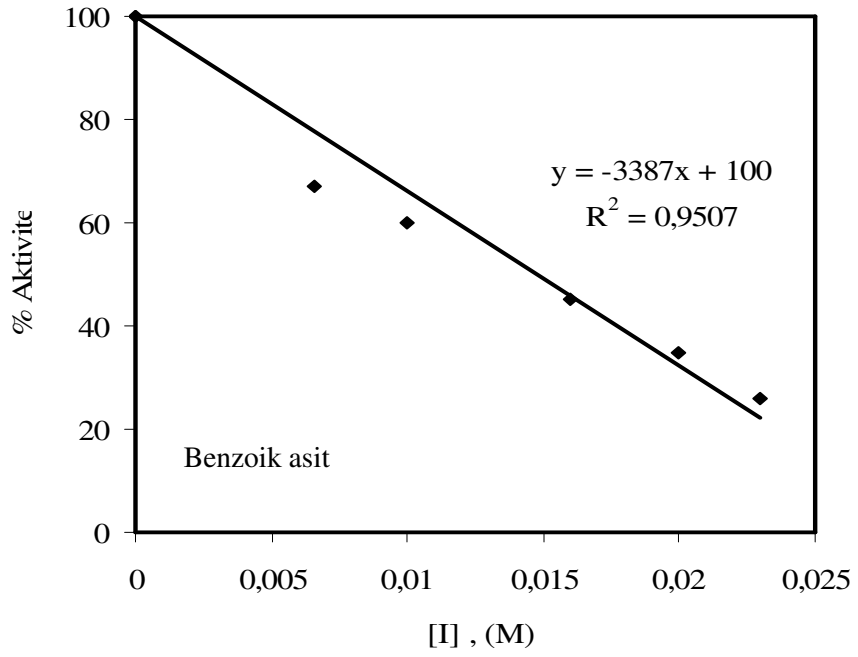
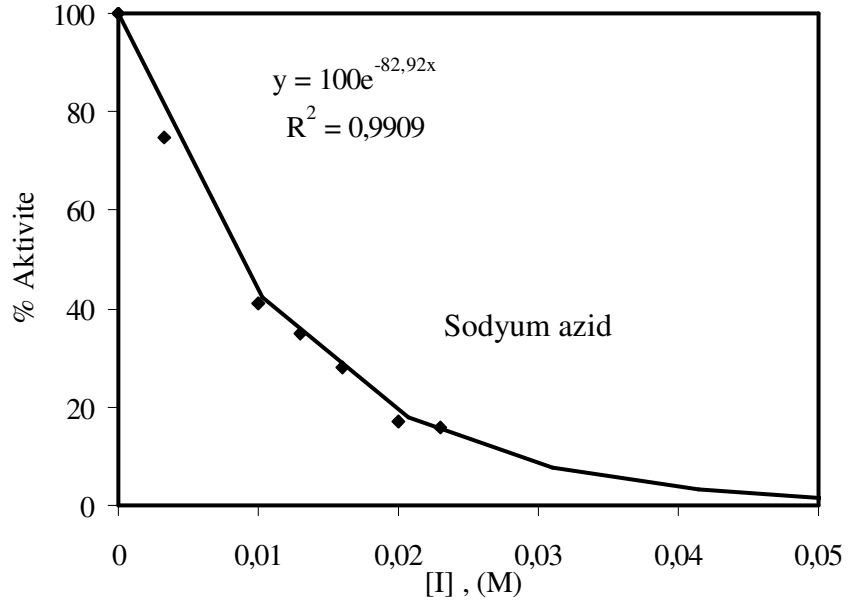
Polifenoloksidazın askorbik asit, benzoik asit, glutatyon ve sodyum azid inhibitörleri ile katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanılarak I₅₀ değerleri tayin edildi. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.16-3.18’de verildi. Şekil 3.16-3.21’deki grafiklerde inhibitör konsantrasyonunun yüzde inhibisyona karşı çizilen grafiklerinin denklemlerden I₅₀ değerleri hesaplandı.

Çizelge 3.16 Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde aktivasyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)×10 ⁵	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% Aktivasyon
Askorbik asit	0	6159	100
	33	6093	98
	50	6018	97
	66	5970	96
	83	5056	82
	100	4169	67
	110	2871	46
	116	1407	22
	Benzoik asit	0	6159
330		4092	65
660		4147	55
1000		3728	49
1300		3474	46
1600		2774	37
2000		2211	29
2300		1654	22
Glutatyon	0	4588	100
	3,3	3409	74
	6,6	3381	73
	10,0	2836	61
	13,0	2433	53
	16,0	1512	32
	20,0	886	19
	23,0	575	12
Sodyum azid	0	6159	100
	330	4628	75
	660	3096	50
	1000	2530	41
	1300	2183	35
	1600	1779	28
	2000	1075	17
	2300	1031	16
2600	730	11	



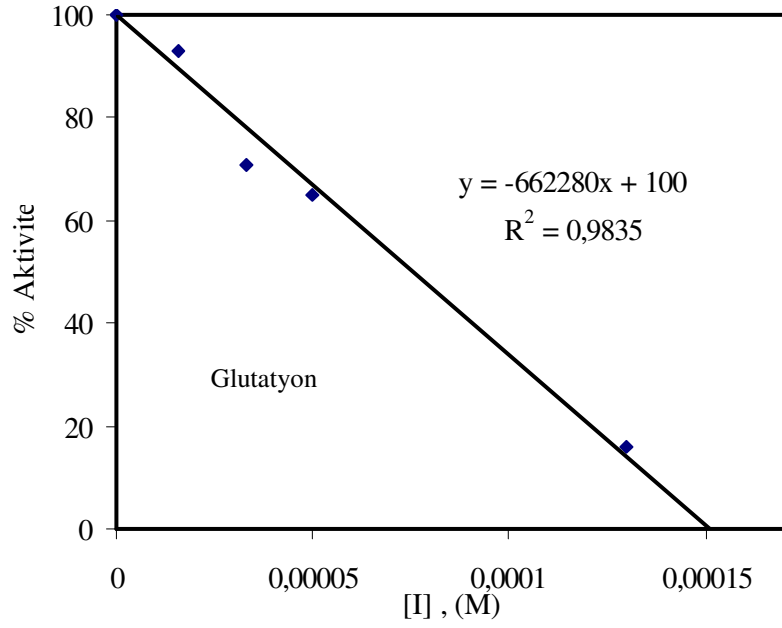
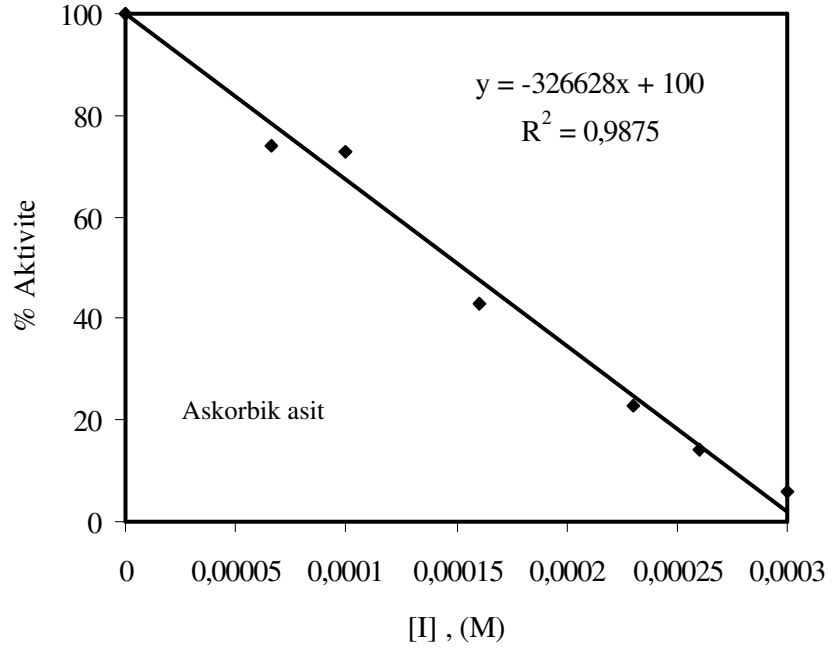
Şekil 3.16 Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutasyon inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler



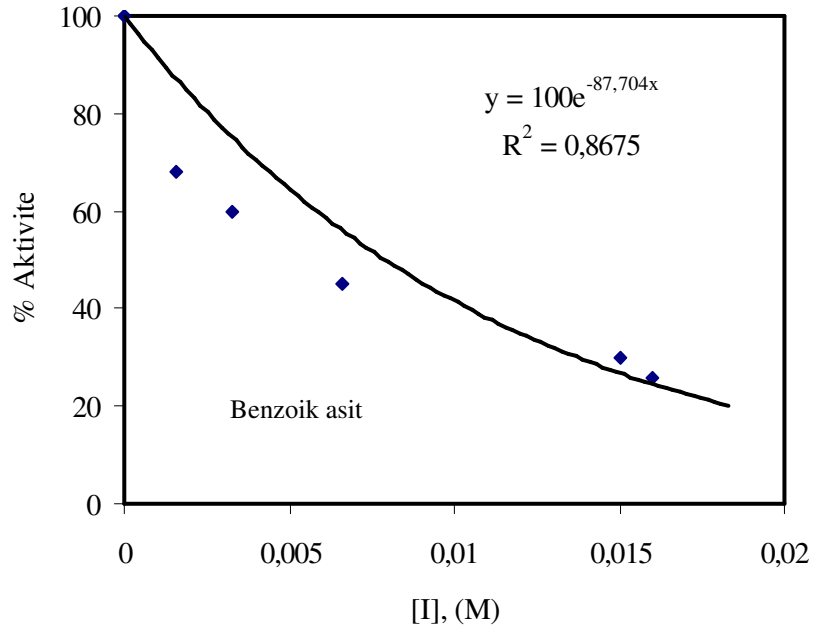
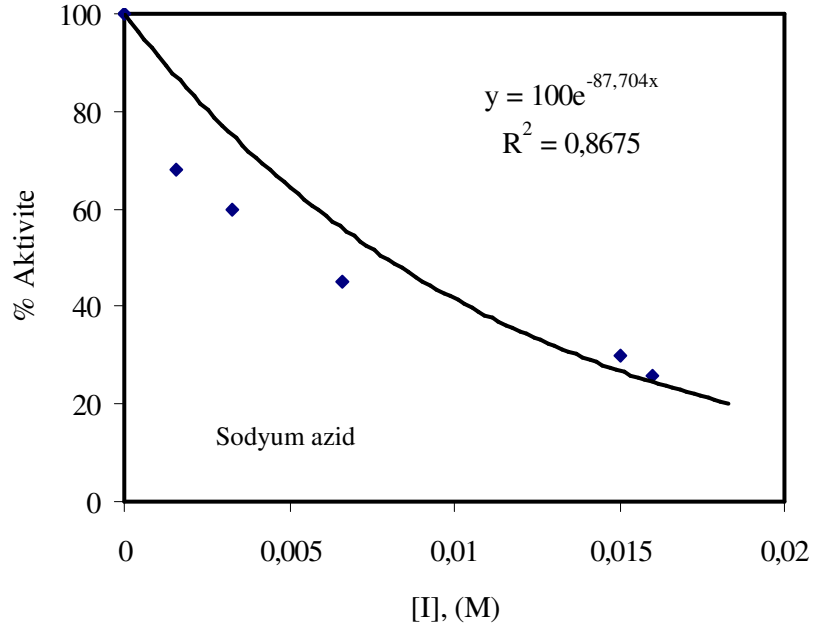
Şekil 3.17 Substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler

Çizelge 3.17 Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde aktivasyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)×10 ⁵	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% Aktivasyon
Askorbik asit	0	1735	100
	3,3	1389	80
	6,6	1298	74
	10,0	1282	73
	13,0	1106	63
	16,0	708	43
	20,0	765	44
	23,0	410	23
	26,0	259	14
	30,0	117	6
Benzoik asit	0	1735	100
	3,3	693	39
	6,6	644	37
	10,0	657	37
	13,0	601	34
	16,0	548	31
	20,0	542	31
	30,0	470	27
Glutatyon	0	690	100
	1,6	643	93
	3,3	494	71
	5,0	455	65
	6,0	251	36
	83,0	217	31
	10,0	135	19
	13,0	113	16
Sodyum azid	0	3371	100
	160	2582	68
	330	2246	60
	500	1875	49
	660	1716	45
	830	1711	44
	1000	1676	60
	1160	1493	45
	1330	1422	37
	1500	1147	30
	1600	1003	26
	1830	960	25



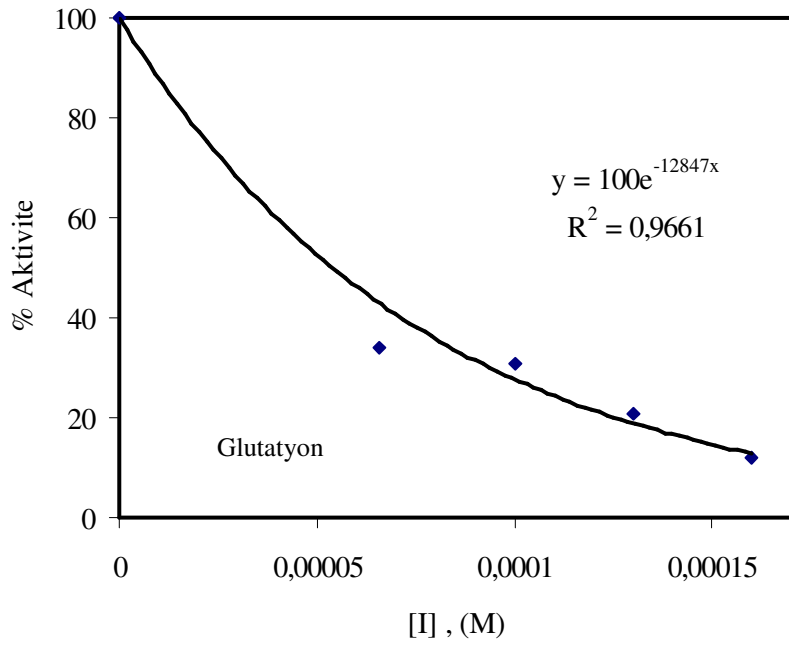
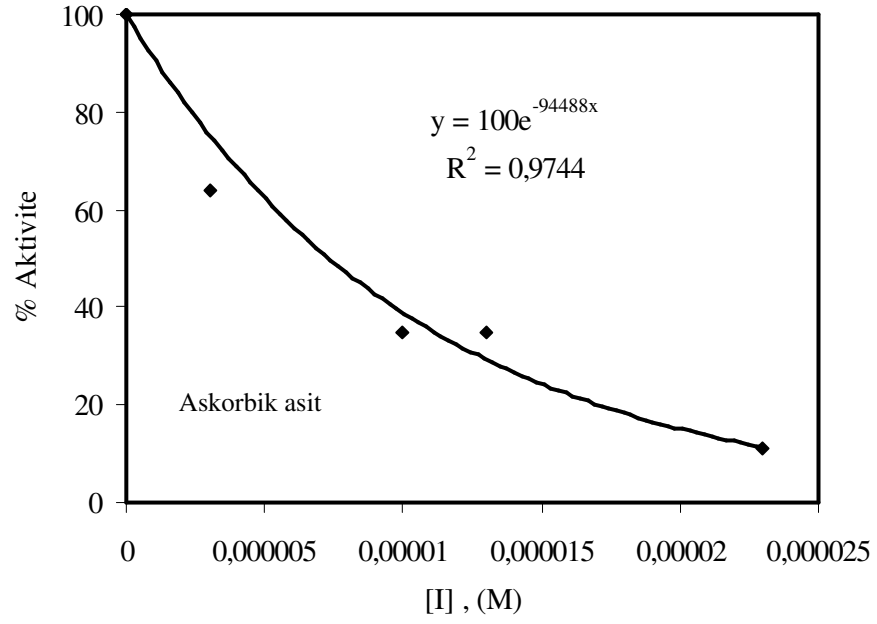
Şekil 3.18 Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutasyon inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler



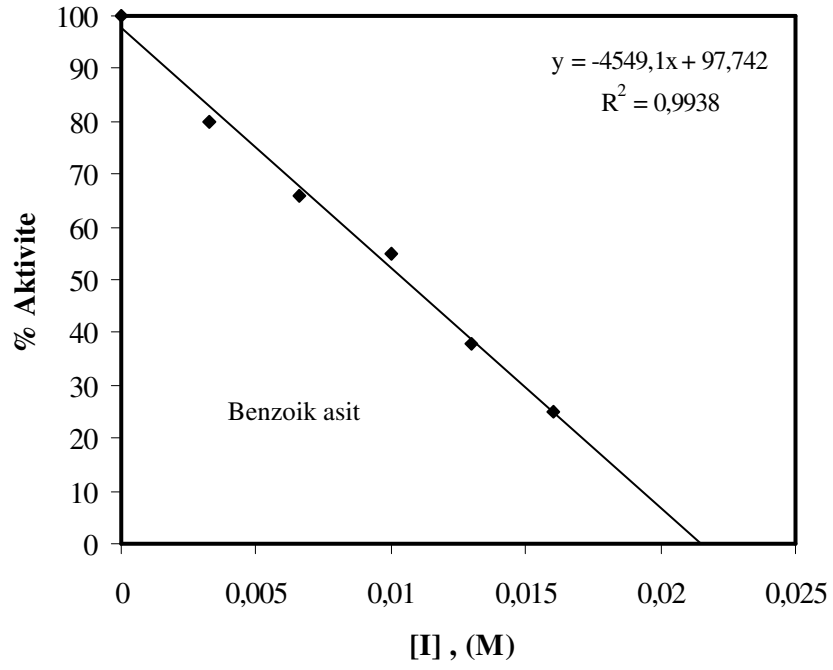
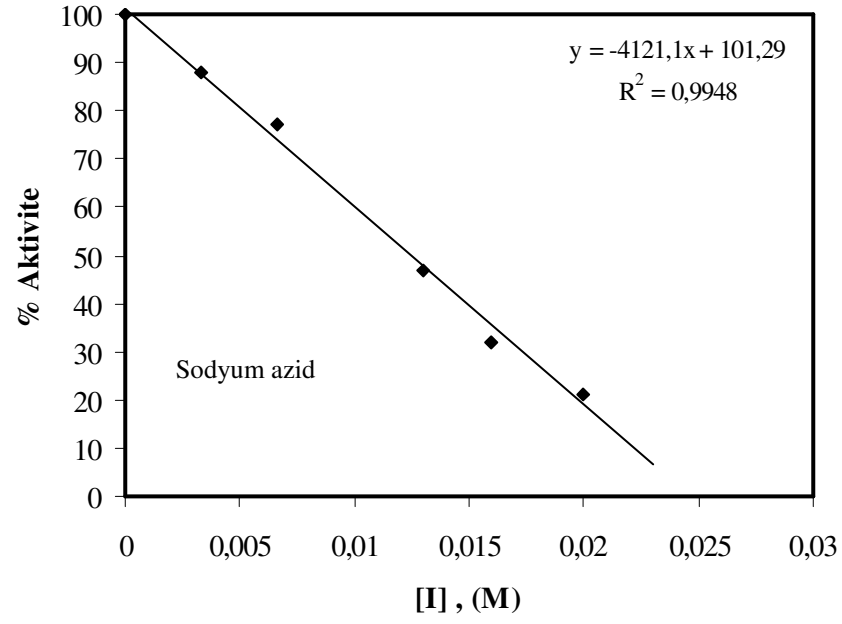
Şekil 3.19 Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyonunu gösteren grafikler

Çizelge 3.18 Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleriyle elde edilmiş yüzde aktivasyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)×10 ⁵	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% Aktivasyon
Askorbik asit	0	343	100
	0,3	222	64
	0,6	142	41
	1,0	121	35
	1,3	123	35
	1,6	109	31
	2,0	83	24
	Benzoik asit	0	5780
330		4634	80
660		3091	66
1000		2616	55
1300		1793	38
1600		1358	25
2000		1030	22
2300		809	17
Glutatyon	0	703	100
	3,3	264	65
	6,6	241	40
	10,0	225	31
	13,0	158	21
	16,0	89	12
Sodyum azid	0	578	100
	330	510	88
	660	447	77
	1000	322	53
	1300	309	47
	1600	276	32
	2000	190	21
	2300	99	17



Şekil 3.20 Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın askorbik asit ve glutasyon inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler



Şekil 3.21 Substrat olarak piragallol kullanıldığında polifenoloksidazın sodyum azid ve benzoik asit inhibitörlerinin konsantrasyonu ile yüzde aktivasyon değişimini gösteren grafikler

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Toplam Fenolik Madde ve Protein Miktarı

Fenolik maddeler bitki, sebze ve meyvelerde renk ve lezzet oluşumunda etkili olan en önemli bileşenlerdendir [50]. Koyu renkli sebze ve meyvelerde karotenoidler, antosiyaninler ve flavonoidler fenolik madde kaynaklarıdır. Bu bileşikler bitkilerde turuncu, kırmızı ve mavi renklerin oluşumunda görevlidirler [51]. Fenolik bileşikler bitkide meydana gelen fiziksel etkilere karşı (yüksek ışık, patojen hücumu, düşük sıcaklık, UV radyasyon vb.) savunma görevini üstlenirler [52]. Bu bileşikler hidroliz ya da oksidasyonla kolaylıkla bozunabilirler ve aynı zamanda çeşitli moleküllerle kovalent bağlı ürünler ve kovalent bağlı olmayan kompleksler oluşturabilirler [53]. Fenolik bileşikler, lipit serbest radikallerinin inaktivasyonunu ya da hidroperoksitlerin serbest radikallere dekompozisyonunu önleyerek antioksidan aktivite sergiledikleri için çok önemli bitki bileşenleridir. Primer antioksidantlar, serbest radikalleri daha kararlı olan ürünlere çevirerek oksidasyonu geciktirirler ya da inhibe ederler.

Enzimatik kararma ve fenolik madde içeriği arasındaki ilişki yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. *Cynara scolymus* L'nin (enginar) fenolik madde içeriği 100 g taze bitkide 425 mg [54], pancar kökünde 323 mg [55], siyah havuçta 350 mg [51], marulda 304 mg [52], *Ocimum basilicum* L' de 280 mg, soğanda 349 mg, nanede 400 mg olarak bulunmuştur [53]. Bu çalışmada *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* ekstraktındaki toplam fenolik madde içeriği 100 g başına 280 mg olarak bulundu. Bu sonuca göre Oğul otu olarak da bilinen bitkinin fenolik madde içeriğinin literatürde bilinen zerdeçal (176 mg), brokoli (88 mg), domates (68 mg), tatlı patates (92 mg) [54], Malta eriği (199.4 mg), yeşil biber (206.0 mg), sarı biber (191.2 mg), kırmızı biber (180.3 mg), ıspanak (269.0 mg), beyaz soğan (216 mg), acı kavun (257.2 mg) [55]'un kinden daha büyük değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'in protein içeriği 230 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Protein içeriği Bradford metoduna göre asidik bir boya olan Coomassie-Brillant Blue (CBB) G-250 solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [50]. Literatürde muzun protein içeriği 1,5 -2,1 mg mL⁻¹ [56], elmanın 0,19 mg mL⁻¹ [56], sakız ağacının 0,0526 mg mL⁻¹ [56], *O. onites* ve *O. vulgare* ssp *hirtum* türlerinin vejetatif ve generatif dönemlerde yapraklarındaki protein içeriğinin sırasıyla 5,89–4,34 ve 7,96–55,59 mg g⁻¹ aralığında olduğu bulunmuştur [6].

4.2 Optimum pH

Ortamın pH değeri enzim aktivitesini önemli bir şekilde etkilemektedir. Artan pH değeri ile enzim aktivitesi ilk önce bir maksimum değere erişir ve daha sonra bazik bölgede sıfır değerine doğru azalır. Substratın enzime bağlanması, enzimin katalitik aktivitesi, substratın iyonlaşması, protein yapısında meydana gelen etkiler gibi nedenlerle pH aralığı daralır [57]. Genelde enzimlerin aktivitesi yükselen pH değerisiyle artar, düşük pH'lar da azalarak sıfıra gider. pH, ayrıca substratın ya da amino grup yan zincirlerinin iyonlaşması durumlarında çok önemlidir [29]. Bu yüzden her substrata ait pH değeri belirlenmektedir.

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* PFO'sunun optimum pH'sı 4,5-9,0 aralığında fosfat ve asetat tamponları kullanılarak belirlendi. Oğul otu PFO'sunun optimum pH'sı belirlenirken katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre optimum pH katekol için 6,5; 4-metilkatekol için 4,0; ve piragallol için 8,5 olarak bulundu.

Katekol substrat olarak kullanıldığında marula meyvesi için optimum pH 7,0 [58], Anamur muzunu için optimum pH'lar 5,5 ve 7,0 [59], *Ferula* sp. bitkisi için optimum pH 7,0 [60], *Allium* sp. için optimum pH 7,5 [61], kivi için optimum pH 7,3 [62], Jerusalem enginarı için optimum pH 4,0 [63], patlıcan [20] için optimum

pH 7,0 olarak; 4-metilkatekol substrat olarak kullanıldığında çilek için optimum pH 4,5 [45], patlıcan için optimum pH 6,0 [20], kuşburnu için optimum pH 8,5 [64], enginar için optimum pH 5,0 [65] olarak; ve piragallol substrat olarak kullanıldığında kuşburnu için optimum pH 7,0 [64], enginar için optimum pH 8,0 [65], marul için optimum pH 9,0 [66] olarak bulunmuştur. Oğul otunda katekol substratının optimum pH'sının literatürdeki değerlere göre daha düşük ama enginarın optimum pH'sından daha büyük olduğu bulunmuştur. 4-metilkatekol substratına ait optimum pH değeri ise literatür değerlerinden daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Piragallol substratının ise literatürdeki değerlere benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında optimum pH'nın enzimin kaynağına ve kullanılan substratlara bağlı olarak değiştiği söylenebilir [67].

4.3 Optimum Sıcaklık

Farklı substratlar için *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun aktivitesinin sıcaklıkla değişimi Şekil 3.3'te verilmiştir. Oğul otu PFO'su kullanılan üç substratla da 10 ile 70 °C arasında aktivite göstermektedir. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları için optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 40, 50 ve 60 °C olduğu bulundu.

Literatürde aynı sonuçlar katekol substratı için kekik [3,46], *Salvia* türleri [68], *Cynara scolymus* L. [65] PFO'ları için gözlemlenmiştir. Ayrıca substrat olarak 4-metilkatekol ve piragallol kullanıldığında kahve yaprakları ve endospermi PFO'ları [69] ve *Helianthus tuberosus* PFO'su için optimum sıcaklık 30 °C [63] olarak bulunmuştur. Deneysel sonuçlar *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun optimum sıcaklık değerlerinin kullanılan substrata bağlı olduğunu göstermektedir.

4.4 Enzim Kinetiği ve Substrat Spesifikliğı

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* PFO'sunun substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla mono, di ve trifenolik substratlar kullanılmıştır. Bir monofenol olan L-tirozin; difenol olan katekol ve 4-metilkatekol ve trifenol olan piragallol

substrat olarak seçildi. Bir monofenol olan L-tirozine karşı Oğul otu PFO'sunun aktivite göstermediği bulundu. Bazı bitki polifenoloksidazları hem monofenolaz ve hem de difenolaz aktivitesi göstermektedir. Bununla birlikte pek çok polifenoloksidaz monofenolaz aktivitesi göstermez [70,71]. Domates tohumları ve *Solonum tuberosum* [21], *Sorghum* taneleri [72], *Averrhoa carambola* L. [73], DeChaunac üzümü [74], enginar ve *O. basilicum* L. [65,67] polifenoloksidazlarının difenolaz aktivite gösterdiği; çilek [45], Gum arabic [75], elma [76] polifenoloksidazlarının ise trifenolaz aktivitesi gösterdiği yapılan literatür araştırması sonucunda saptanmıştır.

Difenolik ve trifenolik substratlar için substrat doygunluk eğrileri *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun basit Michaelis–Menten eğrileri sergilediğini göstermektedir. Her bir substratın çeşitli konsantrasyonlarda ölçülmüş reaksiyon hızlarının kinetik analizleri için Lineweaver-Burk denklemi kullanıldı. Bu denklemden V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı. Substrat spesifikliğı katalizleme gücü olarak bilinen V_{max}/K_M oranına göre belirlendi [33]. Buna göre en etkin substratın katekol olduğu ve bunu sırasıyla 4-metilkatekol ve piragallolün izlediği bulundu. Her üç substrat için hesaplanmış Michaelis-Menten sabitleri ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 4.1'de verilmektedir. Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 1111,1 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 11,1 mM ve 100 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; substrat olarak katekol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 10000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 20 mM ve 500 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; ve substrat olarak piragallol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 2500 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 50 mM ve 50 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu bulunmuştur.

4.5 Termal İnaktivasyon

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidaz için termal inaktivasyon grafikleri Şekil 3.4'de verildi. İnaktivasyon deneylerinde *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun aktivitesi 35, 55 ve 75 °C sıcaklıklarda 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika süreyle inkübe edildikten sonra buz banyosunda soğutulularak belirlenmiştir. Deneylerde PFO aktivitesinin termal

inaktivasyonunu belirlemek için katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanılmıştır ve benzer grafikler elde edilmiştir. Katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanıldığında artan inkübasyon süresine paralel olarak PFO aktivitesinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Literatürde çeşitli kaynaklardan elde edilen polifenoloksidazların ısıya duyarlılığı bitkinin olgunluğuna ve enzimin farklı moleküller formlarına bağlı olabileceği rapor edilmektedir [62].

Çizelge 4.1 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidazın substrat spesifikliğı

Substratlar	V_{max} (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max}/K_M (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹ mM ⁻¹)
Katekol	10000	20	500
4-metilkatekol	1111,1	11,1	100
Piragallol	2500	50	50

4.6 Enzim İnhibisyonu

Birçok madde enzimin aktivitesini, substratın enzime bağlanmasını ve/veya enzimin turnover sayısını etkileyerek değiştirir. Bu şekilde bir enzimin aktivitesini azaltan maddeler inhibitörler olarak bilinirler. Birçok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzer [42]. Çoğu inhibitörler enzime ve enzim-substrat kompleksine tersinir bağlandıkları için tekrar ayrılabilirler. Bazıları ise kovalent bağlarla bağlanıp, enzimden ayrılamazlar. İnhibitörler yaygın olarak bir substrat bağ noktasının kimyasal ve konformasyonel doğasını incelemek için de kullanılır [10].

Sebzelerin enzimatik kararması oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktantları ortamdaki gidererek veya PFO inhibitörlerini kullanarak geciktirilebilir ya da tamamen önlenir. Sebzelerin işlenmeleri sırasında ortamdaki oksijenin tamamen giderilmesi oksijenin atmosferdeki mevcudiyetinden dolayı oldukça zordur [77]. Çalışmamızda inhibitör olarak askorbik asit, sodyum azid, glutatyon, benzoik asit, gallik asit ve L-glutamik asit kullanılmıştır. PFO'nun bu inhibitörlerle inhibisyonunu incelemek için katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratları kullanıldı. Elde

edilen deneysel verilere göre gallik asit ve L-glutamik asitin oğul otu PFO'sunu inhibe etmediği gözlemlendi. Sebzelerdeki enzimatik kararmanın inhibisyonu i.) polifenoloksidazın inaktivasyonu, ii.) reaksiyon için oksijen ve polifenoller gibi substratlardan birisinin giderilmesi ve iii.) ikincil reaksiyondaki renkli ürünlerin oluşumunu inhibe etmek için enzimin reaksiyon ürünleri üzerinde inhibitörlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir [78]. Enzimlerin etki mekanizmasını gösteren çeşitli inhibisyon türleri vardır.

4.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'ten görüldüğü gibi substrat olarak katekol kullanıldığında benzoik asit, sodyum azid ve glutatyon; 4-metilkatekol kullanıldığında glutatyon ve sodyum azid; ve piragallol kullanıldığında sodyum azid ve askorbik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı olduğu bulunmuştur. Literatürde Gunata ve arkadaşları, üzüm polifenoloksidazı için bir substrat olarak 4-metilkatekolü kullanarak sinamik ve benzoik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı [79]; Doğan ve Doğan, *Thymus* polifenoloksidazı için substratlar olarak katekol, 4-metilkatekol ve piragallol kullanılarak glutatyon inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı [46]; Paul ve Gowda tarla baklası polifenoloksidazı için bir substrat olarak katekol kullanıldığında tropolon, askorbik asit, ve L-sistein inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı [80]; Robert ve arkadaşları, Palmito polifenoloksidazı için bir substrat olan 4-metilkatekolü kullanarak benzoik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı [81]; Janovitz-Klapp substrat olarak 4-metilkatekol kullandığında karboksilik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı [76] olduğunu buldular. Literatürden de görüldüğü gibi inhibisyon türü sadece incelenmiş polifenoloksidazın kaynağına değil, aynı zamanda kullanılmış substrata da bağlıdır.

Çizelge 4.2 Substrat olarak katekol kullanıldığında *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* 'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon türleri
Askorbik asit	$0,6 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-3}$	Yarışmasız
	$0,8 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^{-3}$	
	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,8 \times 10^{-3}$	
	$1,1 \times 10^{-3}$	$0,9 \times 10^{-3}$	
Glutasyon	$1,3 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-5}$	Yarışmalı
	$1,6 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-5}$	
Sodyum azid	$0,6 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-3}$	Yarışmalı
	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-3}$	
	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-3}$	
Benzoik asit	$0,3 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-3}$	Yarışmalı
	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$	
	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-3}$	

4.6.2 Karışık Tür İnhibisyon

Bu tür inhibisyonda büyük bir olasılıkla inhibitör hem enzim-substrat kompleksine ve hem de katalize iştirak eden enzimin aktif noktalarına bağlanır. Bu tür inhibisyon da hem enzim hem de enzim-substrat kompleksinin reaksiyonu eşitlik (1.9)'da ve Lineweaver-Burk denklemi ise eşitlik (1.10)'da daha önce verilmişti. (1.10) eşitliğinin eğrisi, eğimi $\alpha K_M/V_{max}$ ve ekstrapolasyonu α/V_{max} olan düz bir doğru verecektir. İnhibitörün farklı konsantrasyonları için bu eşitliğin eğrileri $1/V_0$ ekseninin solunda kesişen birbirine benzer doğrulardan meydana gelir.

Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'ten görüldüğü gibi substrat olarak katekol kullanıldığında askorbik asit inhibitörü; 4-metilkatekol kullanıldığında benzoik asit inhibitörü; ve piragallol kullanıldığında glutasyon inhibitörü ile inhibisyon türünün yarışmasız olduğu belirlendi. Ayrıca 4-metilkatekol substratı kullanıldığında da askorbik asit inhibitörü ile PFO'nun karışık inhibisyon gösterdiği belirlendi.

Çizelge 4.3 Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon türleri
Askorbik asit	$0,6 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-4}$	Karışık
	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	
Glutasyon	$0,6 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-5}$	Yarışmalı
	$1,3 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-6}$	
Sodyum Azid	$1,6 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	Yarışmalı
	$5,0 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	
	$15,0 \times 10^{-3}$	$0,3 \times 10^{-3}$	
Benzoik asit	$1,3 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$	Yarışmasız
	$2,3 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	

Çizelge 4.4 Substrat olarak piragallol kullanıldığında *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*'ten elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon türleri ve K_i değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	İnhibisyon türleri
Askorbik asit	$0,3 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-6}$	Yarışmalı
	$1,0 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-6}$	
Glutasyon	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-2}$	Yarışmasız
	$1,3 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-6}$	
Sodyum azid	$0,6 \times 10^{-2}$	1,8	Yarışmalı
	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$	

Literatürde Doğan ve arkadaşları, marul PFO'sunda 4-metilkatekol substratını kullanarak tropolon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleriyle yapılan inhibisyonunda; katekol substratı kullanarak glutasyon ve askorbik asit inhibitörleriyle yapılan inhibisyonunda ve piragallol substratını kullanarak askorbik asit inhibitörüyle yapılan çalışmalarda karışık tür inhibisyon elde etmişlerdir [66].

4.7 I₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.5 katekol, 4-metilkatekol ve piragallol substratlar olarak kullanıldığında askorbik asit, benzoik asit, sodyum azid ve glutatyon inhibitörleri için elde edilmiş I₅₀ değerlerini göstermektedir. Bu çizelgeden görüldüğü gibi polifenoloksidazın inhibitörlere duyarlılığı substrattan substrata değişmektedir.

Çizelge 4.5 *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* PFO'sunun inhibitörlere bağlı olarak I₅₀ değeri

İnhibitörler	Substratlar	[I ₅₀] (M)	İnhibitörler	Substratlar	[I ₅₀] (M)
Glutatyon	Katekol	1,2×10 ⁻⁴	Benzoik asit	Katekol	1,4×10 ⁻²
	4-metilkatekol	7,5×10 ⁻⁵		4-metilkatekol	9,6×10 ⁻⁵
	Piragallol	5,3×10 ⁻⁵		Piragallol	1,0×10 ⁻²
Sodyum azid	Katekol	8,3×10 ⁻⁵	Askorbik asit	Katekol	2×10 ⁻³
	4-metilkatekol	7,9×10 ⁻⁶		4-metilkatekol	1,5×10 ⁻⁴
	Piragallol	1,2×10 ⁻²		Piragallol	7,3×10 ⁻⁶

Melissa officinalis L. subsp. *officinalis* PFO'su için substrat olarak katekol kullanıldığında askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I₅₀ değerleri sırasıyla 2 x10⁻³, 1,2 x10⁻⁴, 8,3 x10⁻⁵ ve 1,4 x10⁻² M; substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I₅₀ değerleri sırasıyla 1,5 x10⁻⁴, 7,5x10⁻⁵, 7,9x10⁻⁶ ve 9,6x10⁻⁵ M; ve substrat olarak piragallol kullanıldığında askorbik asit, glutatyon, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I₅₀ değerleri sırasıyla 7,3 x10⁻⁶, 5,3 x10⁻⁵, 1,2 x10⁻² ve 1,0x10⁻² M olarak bulundu.

KAYNAKLAR

- [1] Nelson, D., Cox, M., “Lehninger Biyokimyanın İlkeleri”, Kılınç, N.,975-8982-18-4, Palme Yayıncılık, Ankara, (2005), 244-269
- [2] Öztan, D., “Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı”. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Ankara, Temmuz (2007)
- [3] Doğan, S., Doğan, M., Arslan, O., “Characterization of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* var. *subisophyllus*)”. *Advances in Food Science* (2003) **25(2)**, 56-64.
- [4] Turan, P., “*Ocimum basilicum* L. Polifenol Oksidazının Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi”,Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [5] 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.
- [6] 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).
- [7] Sherman,T.,O., Vaughn, K., C., Duke, S., O., “A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase”, *Phytochemistry*, (1991) **30**, 2499-2506.
- [8] Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J. C., “Supression of polyphenol oxidase increases stress tolarence in tomato” *Plant Science*, (2004) **167**, 693-703.
- [9] Şakiroğlu, H., “Kuşburnu meyvesinde izole edilen polifenoloksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, Nisan (1994).
- [10] Lee, M.K., “Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products”, *Food Chem.*, (2007) **102**, 146-149.
- [11] Fu, Y., Zhang, K., Wang, N., Du, J., “Effect of aqueous chlorine dioxide

- treatment on polyphenol oxidases from Golden Delicious apple”, *LWT*, (2007) **40**, 1362-1368.
- [12] Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Varon, L., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., “Kinetic Characterization of the Esculetin by Polyphenol Oxidase and Peroxidase”, *Biosci Biotechnol. Biochem.*, (2007) **71**(2), 390-396.
- [13] Matsui, K.N., Granado, L.M., de Oliveira, P.V., Tadini, C.C., “Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solution”, *LWT*, (2007) **40**, 852-859.
- [14] Muñoz, J., Garcia-Molina, F., Varon, R., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Cánovas, F., Tudela, J. “Kinetic Characterization of the Oxidation of Chlorogenic Acid by Polyphenol Oxidase and Peroxidase. Characteristics of the *o*-Quinone” *J. Agric. Food Chem.*, (2007) **55**, 920-928.
- [15] Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., “Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets”, *Food Chem.*, (2007) **105**, 1047-1053.
- [16] Orenes-Piñero, E., Garcia- Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A., “Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2007) **47**, 143-148.
- [17] Pozo-Insfran, D., Balaban, M.O., Talcott, S.T., “Inactivation of polyphenol oxidase in muscadine grape juice by dense phase-CO₂ processing” *Food Research International*, (2007), **40**, 894-899.
- [18] Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. “Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape”, *Food Chem.*, (2007) **100**, 108-114.
- [19] González, E.M., Ancos, B., Cano, M.P., “Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activities in Blackberry Fruits”, *J. Agric. Food Chem.*, (2007) **48**, 5459-5464.
- [20] 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*, (2002) **37**, 415-423.
- [21] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., Tumer, N., “Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem.*, (2001) **49**, 652-657.
- [22] Chang-Peng, Y., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M.D., Hayashi, N., “Partial Purification and Characterization of Polyphenol

- Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel”, *J. Agric. Food Chem.*,(2001) **49**, 1446-1449.
- [23] Nagai, T., Suzuki, N., “Partial Purification of Polyphenol oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L.”, *J. Agric. Food Chem.* (2000) **49**, 3922-3926.
- [24] Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F., “Partial Purification, Characterization and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia clavaryi* Chatin) Polyphenol Oxidase”, *J. Agric. Food Chem.*, (2001) **49**, 1922-1927.
- [25] Carvajal-Millan, E., Carvallo, T., Orozco, A., Martinez, A., Tapia, I., Guerrero, V.M., Rascon, Chu, A., Llamas, J., Gardea, A.A., “Polyphenol Oxidase Activity, Color Changes and Dehydration in Table Grape Rachis during Development and storage as Affected by N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea” *J.Agric.Food Chem.*, (2001) **49**, 946-951.
- [26] Sojo, M.M., Nunuz-Delicado, E., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F., “Oxidation of Salsolinol by Banana Pulp Polyphenol Oxidase and Its Kinetics Synergisms with Dopamine”, *J. Agric. Food Chem.* (2000) **48**, 5543-5547.
- [27] Chang, S., Tan, C., Frankel, E.L., Barrett, D.M., “Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars”, *J. Agric. Food Chem.* (2000) **48**, 147-151.
- [28] 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.*, (2000) **48(12)**, 5924-5928.
- [29] Onsa, G. H., bin Sari, N., Selamat, J., Bakar, J., “Latent Polyphenol Oxidases from Sago log (*Metroxyllo sagu*) : Partial Purification, Activation and Some Properties” *J.Agric. Food Chem.* **48 (10)** (2000), 5041-5045
- [30] Gonzales, E.M., Ancos, B., Cano, M.P., “Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1999) **47**, 4068.
- [31] 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.*, (1999) **79**, 950-954.
- [32] Rodriguez-Lopez, J.N., Fenol, L.G., Tudela, J., Devec, C., Sanchez-Hernandez, D., de los Reyes, E., Garcia-Carmona, F., “Thermal Inactivation of Mushroom Polyphenoloxidase Employing 2450 MHz Microwave Radiation”, *J. Agric Food Chem.*, (1999) **47**, 3028-3035.

- [33] Baytop, T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1999), 289.
- [34] Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O., “Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase From Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *J. Agric. Food Chem.* (2005) **53**, 776-785.
- [35] Salman, U., “*Lactuca sativa* L.’den Elde Edilen Polifenoloksidazın Kısmi Karakterizasyonu ”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [36] Medina, A., Etheriche, C., Howkes, G., “Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*.)”, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, (2007) 10(4).
- [37] Szöllösi, R., Varga, I.S., “Total Antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method)”, *Acta. Biologica Szegedensis*, (2002) **46**(3-4), 125-127.
- [38] Silva, S., Sato, A., Lage, C.L.S., Gil, R.A.S.S., Azevedo, D.A., ESquibel, M.A., “Essential Oil Composition *Melissa officinalis* L. subsp *officinalis* in vitro Produced Under the Influence of Growth Regulators”, *J.Braz. Chem. Soc.*, (2005) 16(6B), 1387-1390.
- [39] Kennedy, D.O., Little, W., Andrew, B., “Attenuation of Laboratory-Induced Stress in Humans After Acute Administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm)” *American Psychosomatic Society*, (2004) **66**, 607-613.
- [40] Adzet, T., Ponz, R., Wolf, E., Schulte, E., “Genetic variability of the essential oil content of *Melisa officinalis*”, *Planta Med.* (1992) **58**, 558-561.
- [41] Doğan, S., Doğan, M., Arslan, O., “Enzymatic Browning in Foods and Its Prevention” *Food Processing: Methods, Techniques and Trends*, Nova Publications (in pres).
- [42] Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc. US, (2003).
- [43] Angleton, E. L., Flurkey W.H., “Activation and alteration of plant and fungal polyphenol oxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis” *Phytochemistry*, (1984) **23**, 2723-2725.
- [44] 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.* (2006) **33**(1), 137-141.
- [45] Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M. W., “Strawberry polyphenol oxidase: extraction and partial characterization”, *Journal of Food Science*, (1990) **55**, 1320-1325.

- [46] Dogan, S., Dogan, M., “Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*)”, *Food Chemistry*, (2004) **88**, 69-77.
- [47] Arslan, O., Doğan S., “Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid”, *Journal of the Science of Food and Agricultural*, (2005) **85**,1499-1504.
- [48] Büyükbayram, 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*, (2006) **69**, 164-171.
- [49] Singleton, V.L., Rossi, J.A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology*, (1965) **16**, 144- 145.
- [50] Bradford, M., “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” *Anal. Biochem*, (1976) **72**, 248-254.
- [51] Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R., “Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants”, *Food Chemistry*, (2007) **100**,1409-1418..
- [52] Pokorny, J., Antioxidants in Food: Practical Applications, Yanishlieva, N., & Gordon (Eds) M. H., Intraduction Cambridge: Woodhead publishing Limited.(2001) (pp. 1-3).
- [53] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., “Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds”, *Food Chemistry*, (2006) **97**, 654-660.
- [54] Kaur, C., Kapoor, H.C., “Anti- oxidant activity and phenolic content of some Asian vegetables” *Int. J. Food Sci. Technol*, (2002) **37(2)**, 153-161.
- [55] 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)
- [56] 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).
- [57] 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.
- [58] Mdluli, K.M., “Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase

- and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra)” *Food Chemistry*, (2005), **92**, 311-323.
- [59] Ünal, M.Ü., “Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*)”, *Food Chemistry*, (2007), **100**:3, 909-913
- [60] Erat, M., Sakıroglu, H., Kuhreviöglu, I.O., “Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp.”, *Food Chemistry*, (2006) **95**, 503-508.
- [61] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I., “Polyphenol oxidase from *Allium* sp.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1997) **45**, 2861-2863.
- [62] Park, E.Y., Luh, B.S., “Polyphenol oxidase of kiwi fruit”, *Journal of Food Science*, (1985) **50**, 678.
- [63] Ziyar, E., Pekyardımcı, Ş., “Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*)”, *Turk. J. Chem.* (2003) **27**, 217-225.
- [64] Sakiroglu, H., Küfreviöglu, I.Ö., Kocacaliskan, I., Oktay, M., Onganer, Y., “Purification and characterization of Dog-rose (*Rose dumalis* Rechts.) polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem.* (2002) **44**, 2982-2986.
- [65] 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, (2004).
- [66] Doğan, S., Salman, Ü., “Partial Characterization of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Polyphenol Oxidase”, *Eur. Food Res. Technol.*, (2007) 226, 93-103.
- [67] Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M., “Characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase”, *J. Agric. Food Chem.* (2005) **53**, 10224-10230.
- [68] Gündoğmaz, G., Doğan, S., Arslan, O., “Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from *Variis Salvia* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller”, *Food Sci. Tech. Int.* (2003) **9**(4), 309-315.
- [69] Mazzafera, P., Robinson S., “Characterization of polyphenoloxidase in coffee”, *Phytochemistry*, (2000) **55**, 285-296.
- [70] Benjamin, N. D., Montgomery, M. W., *J. Food Sci.* (1973) **38**, 799.
- [71] Rivas, N.J., Whitaker, J.R., *Plant Physiol.*, (1973) **52**, 501.
- [72] Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Traore, A.S., Laane, C., van Berkel, W.J.H., Voragen, A.G.J., “Comparison of Content in Phenolic Compounds, Polyphenol Oxidase, and Peroxidase in Grains of Fifty

Sorghum Varieties from Burkina Faso", *J. Agric. Food Chem.*, (2002) **50(13)**, 3780-3788.

- [73] Durigan, F., Mattiuz B. H., James , T., "Cultivar affects browning susceptibilty of fresh cut star fruit slices" *Sci. Agric*, (Piracicorba, Braz) **63(1)** (2006),1-4.
- [74] Lee, C.Y., Smith, N.L., Penesi, A.P., "Polyphenol oxidase from DeChaunac grapes", *J. Sci. Food Agric.*, (1983) **34**, 987-991.
- [75] Billaud, C., Lecornu, D., Nicolas, J., "Substrates and Carboxylic Acid Inhibitors of Partially Prified Polyphenol Oxidase from Gum Arabic", *J. Agric. Food Chem.*, (1996) **44**, 1668-1675.
- [76] Javovitz-Klapp, A., Richard, F., Nicolas, J., "Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some prorerties", *Phytochemistry*, (1989) **28**, 2903-2907.
- [77] Roudsari, M.H., Signoset, A., Crovzet, J., "Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties", *Food Chemistry*, (1981) **7**, 227-235.
- [78] Augustin, M.A., Ghazali, H.M., Hashim, H., "Polyphenoloxidase from Guava (*Psidium guajava* L.)", *J. Sci. Food. Agric.* (1985) **36**, 159-1265.
- [79] Walker, J.R.L., Wilson, E.L., "Studies of the enzymatic browning of apples. Inhibition of *o*-diphenol oxidase by phenolic acids", *J. Sci. Food Agric.*, (1975) **26**, 1825-1831.
- [80] Poul, B., Gowda, L.R. "Purification and characterization of polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dalichos lablab*)", *J. Agric. Food Chem.*, (2000) **48**, 3839-3846.
- [81] Robert, C., Rouch, C., Cadet, F., "Inhibition of palmito (*Acanthoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids", *Food Chemistry*, **59(3)**, 355-360.