

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

***LACTUCA SATIVA* L.'DEN ELDE EDİLEN
POLİFENOLOKSİDAZIN KISMİ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ümran SALMAN

Balıkesir, Temmuz-2006

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

LACTUCA SATIVA L.'DEN ELDE EDİLEN
POLİFENOLOKSİDAZİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ümran SALMAN

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Serap DOĞAN

Sınav Tarihi : 17 /07/ 2006

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ümit ÇAKIR

Yrd.Doç. Dr. Serap DOĞAN (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Balıkesir, Temmuz-2006

ÖZET

***LACTUCA SATIVA* L.'DEN ELDE EDİLEN POLİFENOLOKSİDAZIN KİSMİ KARAKTERİZASYONU**

Ümran SALMAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2006

Bu çalışmada, marul (*Lactuca sativa* L.) polifenol oksidaz (PFO) enziminin kısmi saflaştırılması yapılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. *Lactuca sativa* L.'den ekstrakte edilen polifenol oksidaz (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) çöktürmesi ve diyaliz işlemleri sonucunda kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Lactuca sativa L.'nin toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteau metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu metoda dayanarak *Lactuca sativa* L.'de 100 g taze bitki için 304 mg fenolik madde içeriği tespit edilmiştir. Protein içeriği ise Bradford yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir ve 100 g taze bitki için 494/µg mL olarak bulunmuştur.

Ayrıca PFO'nun substrat spesifikliğı, optimum pH ve sıcaklık değerleri ve ısı inaktivasyonu incelenmiştir. PFO aktivitesi L-tirozin, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substartları kullanılarak incelenmiştir. Polifenol oksidaz aktivitesi 4-metilkatekol ve katekol için 420 nm'de, pirogallol için 320 nm'de ve L-tirozin 484

nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan, *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO, L-tirozine karşı aktivite göstermemiştir. Kinetik parametreler olan K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır. Enzimin katalizleme gücünü gösteren V_{max}/K_M parametresine göre en iyi substrat pirogallol onu takiben katekol ve 4-metilkatekolün olduğu tespit edilmiştir. *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının optimum sıcaklık aktivite değerleri katekol için 40 °C, 4-metilkatekol ve pirogallol için 30 °C'de olduğu bulunmuştur. Marul PFO'nun optimum pH değerleri ise 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol için sırasıyla 6.5, 8.0 ve 7.5 olarak saptanmıştır. *Lactuca sativa* L. PFO'nun 35 °C, 55 °C ve 75 °C'de ısı inaktivasyon çalışmaları 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak yapılmıştır. Özellikle 4-metilkatekol ve katekol substratları kullanıldığında artan inaktivasyon süresine paralel olarak PFO aktivitesinin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Değişik inhibitörlerin maruldan kısmen saflaştırılan PFO aktivitesi üzerine etkisi, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol fenolik substratları kullanılarak spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Bu amaçla, tropolon, glutatyon, askorbik asit, 4-aminobenzoik asit, sodyum azid ve benzoik asit inhibitörleri değişik konsantrasyonlarda kullanılarak *Lactuca sativa* L. PFO aktivitesi inhibe edilmeye çalışılmıştır. Fakat, sodyum azid ve benzoik asitle *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO inhibe edilememiştir. Diğer taraftan daha önce belirtilen substratlar kullanılarak her bir inhibitör için inhibisyon mekanizması belirlenmiştir. Deneysel sonuçlara göre marul PFO'nun inhibisyonu için en güçlü inhibitörün glutatyon olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Marul; *Lactuca sativa* L.; Polifenol oksidaz; substrat spesifikliği; pH; sıcaklık; ısı inaktivasyonu; inhibisyon.

ABSTRACT

PARTIAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLOXIDASE OBTAINED FROM *LACTUCA SATIVA* L.

Ümran SALMAN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

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

Balikesir-Turkey, 2006

In this study, polyphenol oxidase of lettuce (*Lactuca sativa* L.) was partially purified and we investigated its some kinetic parametres. Polyphenol oxidase of lettuce (*Lactuca sativa* L.) was extracted and partially purified through ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and dialysis.

The total phenolic content of *Lactuca sativa* L. was determined according to the Folin-Ciocalteu method. Total phenolic content was found to be 304 mg/ 100 g on a fresh weight basis. Protein content was determined according to Bradford method and it was found to be 494 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for ever 100 g on a fresh weight .

In addition it was investigated the effects of substrate specificity, pH, temperature and heat-inactivation on polyphenol oxidase. PPO activity was determined using 4-methylcatechol, catechol, pyrogallol and L-tyrosine as substrates. Polyphenol oxidase activity was measured spectrophotometrically for 4-methylcatechol and catechol at 420 nm, for pyrogallol at 320 nm and for L-tyrosine at 484 nm. On the other hand, lettuce (*Lactuca sativa* L.) showed no activity toward the L-tyrosine. Kinetic parametres, K_M and V_{max} , were calculated from Lineweaver-Burk graph. According to V_{max}/K_M parametres pyrogallol was the best substrat, followed by catechol and 4-metyl catechol. The optimum temperature values of *Lactuca sativa* L. polyphenol oxidase for catechol found to be 40 $^{\circ}\text{C}$, for 4-methyl catechol and pyrogallol found to be 30 $^{\circ}\text{C}$. The optimum pH values of

lettuce PPO were 6.5, 8.0 and 7.5 for 4-methyl catechol, catechol and pyrogallol, respectively. Polyphenol oxidase of *Lactuca sativa* L. was investigated heat-inactivation at 35 °C, 55 °C and 75 °C using 4-methylcatechol, catechol and pyrogallol as substrates. Especially, the enzyme activity decreased due to heat-denaturation of the enzyme with increasing temperature and inactivation time for catechol and 4-methylcatechol substrates.

The effect of different inhibitors on partially purified lettuce polyphenol oxidase activity was investigated by spectrophotometrically, using 4-methyl catechol, catechol and pyrogallol as phenolic substrates. For this purpose, tropolone, glutathione, ascorbic acid, 4-aminobenzoic acid, sodium azide and benzoic acid were used to inhibit the activity of *Lactuca sativa* L. PPO at different concentrations. However, the presence of sodium azide and benzoic acid didn't have inhibitor effect on the activity of *Lactuca sativa* L. polyphenol oxidase. On the other hand, it was determined mechanism of inhibition for each inhibitor using selected substrates. According the experimental results it can be said that glutathione was found to be the most potent inhibitor for *Lactuca sativa* L. polyphenol oxidase.

KEY WORDS : Lettuce; *Lactuca sativa* L.; polyphenoloxidase; substrate specificity; optimum pH and temperature; inactivation; inhibition.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Marul (<i>Lactuca sativa</i> L.)	2
1.1.1 Marul (<i>Lactuca sativa</i> L.) Bitkisiyle Yapılan Çalışmaların Özeti	3
1.2 Polifenol Oksidaz	4
1.2.1 Polifenol Oksidazın Bulunduğu Organizmalar	5
1.2.2 Bitkilerde Polifenol Oksidazın Biyolojik Önemi	6
1.2.3. Polifenol Oksidazın Substratları	6
1.3 Enzimatik Kararma	7
1.4 Polifenol Oksidaz İle Yapılan Çalışmaların Özeti	9
1.5 Enzim Kinetiği	11
1.6 İnhibisyon	13
1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon	14
1.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon	15
1.6.3 Karışık İnhibisyon	17

2. MATERYAL VE METOT	19
2.1 Materyal	19
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması	19
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	21
2.2 Ham Ekstraktın Hazırlanması	22
2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması	23
2.4 Spektrofotometrik Ölçümler	24
2.5 Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi	24
2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	25
2.7 Isı İnaktivasyonu	25
2.8 İnhibisyon	25
2.9 <i>Lactuca sativa</i> L. Ekstraktının Protein İçeriği	26
2.10 <i>Lactuca sativa</i> L. Ekstraktının Toplam Fenolik Madde İçeriği	26
3. BULGULAR	28
3.1 <i>Lactuca sativa</i> L. Ekstraktının Toplam Protein ve Fenolik Madde İçerikleri	28
3.2 Substrat Spesifikliği	28
3.3 Optimum pH	30
3.4 Optimum Sıcaklık	32
3.5 Termal İnaktivasyon	33
3.6 Polifenol Oksidazın İnhibisyonu	36

3.7 I ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	61
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	71
4.1 Toplam Fenolik Madde İğeriği	71
4.2 Optimum pH	72
4.3 Optimum Sıcaklık	74
4.4 Substrat Spesifikliği	74
4.5 Termal İnaktivasyon	76
4.6 Enzim İnhibisyonu	77
4.6.1 Yarışmalı İnhibisyon	78
4.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon	81
4.6.3 Karışık-Tür İnhibisyon	82
4.7 I ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	83
5. KAYNAKLAR	85

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı	Birimi
PFO	: Polifenol oksidaz 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 substarta doyduğu andaki hızı	EÜ/dak mL
K _M	: Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu	mol/L
[S]	: Substrat kaonsantrasyonu	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

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	<i>Lactuca sativa</i> L.'nin fotoğrafı	2
Şekil 1.2	Enzimatik kararmada polifenoloksidazın rolü	5
Şekil 1.3	Michealis-Menten eğrisi	12
Şekil 1.4	Lineweaver-Burk grafiği	13
Şekil 1.5	Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	15
Şekil 1.6	Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	16
Şekil 1.7	Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri	17
Şekil 3.1	Katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları ile <i>Lactuca sativa</i> L. polifenol oksidazı için çizilmiş $1/[S]-1/V$ eğrileri	30
Şekil 3.2	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilmiş polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimi	31
Şekil 3.3	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilmiş polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi	33
Şekil 3.4	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilmiş polifenol oksidaz aktivitesinin termal denaturasyonuna ait eğriler	35

Şekil 3.5	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	38
Şekil 3.6	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri.	40
Şekil 3.7	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	42
Şekil 3.8	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	44
Şekil 3.9	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	46
Şekil 3.10	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	48
Şekil 3.11	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	50
Şekil 3.12	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	52
Şekil 3.13	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	54
Şekil 3.14	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	56

Şekil 3.15	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	58
Şekil 3.16	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri	60
Şekil 3.17	Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler	63
Şekil 3.18	Bir substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler	66
Şekil 3.19	Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler	69

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 3.1	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler	29
Çizelge 3.2	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler	31
Çizelge 3.3	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz aktivitesinin sıcaklıkla gösterdiği değişime ait deneysel veriler	32
Çizelge 3.4	<i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidaz enziminin termal denatürasyonu için elde edilmiş deneysel veriler	34
Çizelge 3.5	4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörüne ait deneysel veriler	37
Çizelge 3.6	4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	39
Çizelge 3.7	4-metil katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörüne ait deneysel veriler	41
Çizelge 3.8	4-metilkatekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	43

Çizelge 3.9	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörüne ait deneysel veriler.	45
Çizelge 3.10	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın. askorbik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	47
Çizelge 3.11	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın tropolon inhibitörüne ait deneysel veriler	49
Çizelge 3.12	Katekol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın 4-aminobenzoik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	51
Çizelge 3.13	Piragallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörüne ait deneysel veriler	53
Çizelge 3.14	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L. den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	55
Çizelge 3.15	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın askorbik asit inhibitörüne ait deneysel veriler	57
Çizelge 3.16	Pirogallol substratı kullanılarak <i>Lactuca sativa</i> L.'den elde edilen polifenol oksidazın glutatyon inhibitörüne ait deneysel veriler	59
Çizelge 3.17	Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri	62
Çizelge 3.18	Bir substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri	65

Çizelge 3.19	Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri	68
Çizelge 4.1	Maruldan elde edilen polifenoloksidazın substrat spesifikliği	76
Çizelge 4.2	Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında maruldan elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve K_i' değerleri	79
Çizelge 4.3	Substrat olarak katekol kullanıldığında marul elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve K_i' değerleri	80
Çizelge 4.4	Substrat olarak pirogallol kullanıldığında maruldan elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve K_i' değerleri	82
Çizelge 4.5	<i>Lactuca sativa</i> L. PFO'nun I_{50} değerleri	84

ÖNSÖZ

Eğitim hayatımın önemli bir kilometre taşı olan bu Yüksek Lisans çalışmam esnasında bana kılavuzluk eden, her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında en az danışman hocam kadar ilgi ve desteğini gördüğüm hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet DOĞAN'a; deneysel çalışmalarında bana yardımcı olan hocam Arş. Grv. Pınar TURAN'a teşekkürlerimi bildirmek isterim.

Yüksek Lisans Tezimin deneysel aşamaları boyunca laboratuvarlarından yararlandığım Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi (BÜTAM)'a; Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya ve Biyoloji Bölümleri'ne teşekkür ederim.

Ayrıca maddi manevi destek ve ilgilerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Emrah ASA, Hüseyin SEVİM, İlker ÖZLÜ, Mutluay SAMANCI ve Zuhal ÜNSAL'a sonsuz teşekkürler.

Hayatın bana en büyük armağanı olarak gördüğüm, her zaman, her konuda yanımda olan sevgili aileme gönül dolusu minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Balıkesir,2006

Ümran SALMAN

1. GİRİŞ

Canlı sistemler, muazzam çeşitlilikte biyokimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla şekillenirler. Hemen hemen bütün bu reaksiyonlar temelde protein yapılı olan ve enzimler olarak bilinen bir seri olağanüstü biyolojik katalizörler aracılığıyla gerçekleşmektedir[1].

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. Gıdaların korunmasına ilişkin olarak yapılması gereken temel uygulamalardan birisi dokulardaki kimyasal olayların kontrol altına alınmasıdır. Çünkü özellikle sebze ve meyvelerde meydana gelen kimyasal değişimler ürünün renginin bozulmasına ve daha da önemlisi besin değerinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu renk bozunmaları enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır.

Besinlerin saklanması, depolanması veya çeşitli işlemler sırasında, meyve ve sebze dokuları herhangi bir şekilde zedelenirse, kesilirse, kabuğu soyulursa gıdalarda bazı istenmeyen kahverengileşme reaksiyonları meydana gelir. Besinlerde meydana gelen başlıca esmerleşme reaksiyonları, Maillard reaksiyonu, karamelizasyon, askorbik asit oksidasyonu, fenollerin enzimatik kararması, okside lipidler tarafından kararmış polimerlerin şekillenmesi olarak söylenebilir[2]. Sebzelerde ve meyvelerde ortaya çıkan enzimatik kararma istenmeyen renk, koku ve tad oluşumuna neden olmakta, bu da gıdaların besin değerinin önemli ölçüde düşmesine sebep olmaktadır. Enzimatik kararmanın başlıca sorumlusu polifenol oksidazdır (PFO). Polifenol oksidaz (PFO; E.C. 1.14.18.1), bitkiler aleminde yaygın şekilde bulunan monofenollerin *o*-hidroksilasyonunu katalizleyen ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara yükseltgenmesini sağlayan bakır içeren bir monooksijenazdır[3].

Enzimatik kararma işletmeciler ve tüketiciler için önemli bir ekonomik problem teşkil etmektedir. Bu çalışmada *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO kısmen saflaştırılarak substrat spesifikliği, optimum pH, sıcaklık, ısı inaktivasyonu

ve inhibisyon kinetiği gibi bazı kinetik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca marulun hasadından sonraki işlemlerde kararmasını önlemek ya da azaltmak için bazı inhibitörlerin potansiyelleri değerlendirilmiştir.

1.1 *Lactuca Sativa* L.

Lactuca sativa L., “marul” olarak bilinen *Asteraceae* familyasına ait önemli bir bitkidir. 12-15 °C sıcaklığa sahip aylarda ve hafif asitli, verimli, pH’sı 5.8-7.0 olan topraklarda nispeten iyi gelişim gösterir[4]. Bu tür genellikle 30-100 cm yükseklikte, tamamen tüsüz, sarı çiçekli, beyaz sütlü, otsu bir kültür bitkisidir[5].



Şekil 1. 1 *Lactuca sativa* L.’nin fotoğrafı

Salatalarda kullanılan son derece popüler bir ürün olan marul büyük bir ticari öneme sahiptir. Diyet yapan bilinçli tüketiciler için de marul çoğunlukla düşük kaloriye sahip bir besin kaynağıdır. Aynı zamanda bitkinin yapraklarının, baş ağrılarını kesici, süt ve idrar arttırıcı, sedatif hipnotik (uyutucu) etkilerinin yanı sıra hafif müshil etkiye de sahip olduğu bilinmektedir[5,6]. Marulun küçük, kahverengiden sarıya kadar değişen renkte badem şekilli tohumları vardır. Tohumlar, yatıştırıcı, uyutucu, anti konvulsent, süt arttırıcı ve hafif müshil etkiye sahiptir. Yine marul tohumları İran’da iltihap yangısı, mide-bağırsak yangısı ve osteodina tedavisinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılmaktadır[6].

Yapılan çalışmalarda, marulda fenolik bileşikler ve antioksidan aktivitenin yüksek olduğu ve bu bileşiklerin kanser gibi oksidatif stresle ilişkili kronik hastalıkları önlediği rapor edilmektedir[6,7]. Marulun antioksidan ekstraktının oksijen radikallerini absorblama kapasitesinin olduğu, düşük yoğunlukta lipoproteinlerde lipid oksidasyonunu engellediği, oksiradikaller tarafından indüklenerek oluşan etilen üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu, protein oksidasyonunu indükleyen Cu^{2+} 'a karşı inhibitör etkiye ve hidroksil radikali absorblama kapasitesine sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. İçerdiği bu doğal antioksidanlar yönüyle zengin olan marul tarımsal ekonomi açısından da önemli bir bitkidir[7].

1.1.1 Marul (*Lactuca sativa* L.) Bitkisiyle Yapılan Çalışmalar

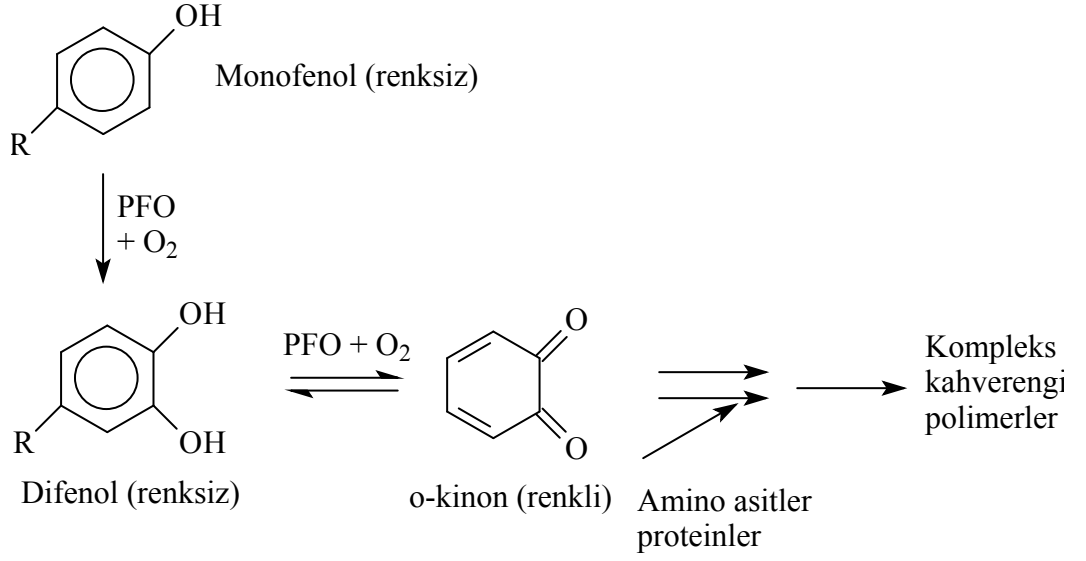
Lactuca sativa L.'den elde edilen PFO aktivitesiyle ilgili olarak az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Fujita ve arkadaşları *Lactuca sativa* L.'den PFO'yu amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon yöntemiyle yaklaşık 69.7 kat saflaştırmışlardır[8]. Chazarra ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'den elde ettikleri latent ve aktif PFO'yu, 4-tert-bütül katekolü ve klorojenik asidi substrat olarak kullanarak bazı kinetik parametreleri belirlemişlerdir[9]. Ayrıca yine Chazarra ve arkadaşları, maruldan elde ettikleri latent polifenol oksidazın *o*-difenollerin *o*-kinonlara okside olmaları süresince dönüşümsüz inaktivasyona uğradığını tespit etmişler, 4-tert-bütül-katekol substratı kullanarak SDS ile aktifleştirdikleri PFO'nun bazı kinetik parametrelerini incelemişlerdir[10]. Chazarra ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'nin kloroplastlarından sonikasyon yöntemiyle elde ettikleri PFO'nun monofenolaz aktivitesi gösterdiğini spektrofotometrik ölçümlerle tespit etmişler ve bazı kinetik sabitleri belirlemişlerdir[11]. Yine Chazarra ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO'yu amonyum sülfat, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve SDS ile tetramerik yapıda, iki ayrı formdan oluştuğunu tespit etmişlerdir[12]. Sayyah ve arkadaşları *Lactuca sativa* L.'nin ekstraktlarının farelerde analjezik ve anti-inflammatory etkilerini araştırmışlardır[6]. Choi ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'nin yapraklarında yaralanma sonucu çözünebilir fenolik maddelerin üretimi ve birikimi sonucu doku kararmasının gerçekleştiğini ve *n*-alkole maruz bırakılan

yaprak dokularındaki kararmanın % 40-60 oranında azaldığını saptamışlardır[13]. Bennet ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'den sentezlenen sesquiterpenlerin biyosentezinin moleküler biyolojisini incelemişlerdir[14]. Caspersen ve arkadaşları, rizosfer mikrobiyal immunitésinin metabolik faaliyeti vasıtasıyla ferulik asidin yüksek konsantrasyonda toksik etkisinin giderilebileceğini belirlemeye çalışmışlardır[15]. Bestwick ve arkadaşları, *Lactuca sativa* L.'de hipersensitif reaksiyonlar süresince antioksidan enzim düzeylerindeki değişimleri incelemişlerdir[16]. Xue ve arkadaşları, Ruiz Lozano ve arkadaşları farklı yıllarda yaptıkları araştırmalarda marulda abiyotik strese ve değişen bitki beslenmesine bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerini belirlemişlerdir[17,18]. Liu ve arkadaşları, kırmızı marul kùltivarlarının aynı büyüme şartları altında yetişen yeşil marullara göre daha fazla antioksidan aktivite gösterdiklerini ve daha fazla fenolik madde içerdiklerini belirlemişlerdir[7]. Tamura ve arkadaşları, kùltüre alınmış *Lactuca sativa* L.'den izole ettikleri 3,4,5-tri kafeoilkünik asit (TCQA)'in insan HIV virüsü üzerindeki inhibitör etkisini incelemişlerdir[19].

1.2 Polifenol Oksidaz

Polifenol oksidazlar olarak isimlendirilen enzimler, bakterilerden memelilere kadar tüm filogenetik skalada geniş yayılım gösteren bakır içeren proteinlerin bir grubudur. Bu grubun ortak özelliği, moleküler oksijen varlığında fenollerin oksidasyonunu katalizleme kapasitelerinin olmasıdır[20].

Birçok meyve ve sebzenin toplanması ve depolanması süresince kararmasının başlıca sebebi polifenol oksidaz denilen enzimdir[21]. Bu enzim, monofenollerin hidroksilasyonu ve polifenollerin oksidasyonunu katalizleyen Cu^{2+} içeren bir monooksigenazdır. PFO, oksijen vasıtasıyla hidrojen yakalayıcısı olduğu için oksidoredüktaz olarak da sınıflandırılmaktadır[22].



Şekil 1.2 Enzimatik kararmada polifenoloksidazın rolü

Meyve ve sebzelerin kararması, PFO'nun katalizlediği fenolik bileşiklerin kinonlara, onların da daha sonra kondense renkli pigmentlere oksidasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.2)[2]. Renkli bakır bileşiklerinin polimerize olmasıyla meydana gelen kinonlar, besin kalitesinin, meyve ve sebzelerin ticari değerlerinin düşmesine sebep olmaktadır[23]. Enzimatik kararmanın derecesi fenolik bileşiklerin miktarına, doğasına, oksijenin varlığına, indirgen maddeye, metalik iyonlara, pH'ya, sıcaklığa ve polifenol oksidaza bağlıdır. Enzimatik kararma işletmeciler için önemli ekonomik bir problemdir[24].

1.2.1 Polifenol Oksidazın Bulunduğu Organizmalar

Polifenol oksidaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalarda, özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir. Bazı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karides, küçük karides) bu enzimin varlığına rastlanmıştır. Polifenol oksidaz bitkisel gıdalarda enzimatik kararmaya neden olurken, hayvansal gıdalarda enzimatik kararma söz konusu değildir[25].

1.2.2 Bitkilerde Polifenol Oksidazın Biyolojik Önemi

Yapılan çalışmalar, hastalık direncinde polifenol oksidazın önemli bir rolü olduğunu ortaya koymuştur[22,26]. Doğada geniş ölçüde yayılım gösteren ve doku yaralanmalarından sonra istenmeyen enzimatik kararmaya sebep olan bu enzim, bitkilerde kloroplast tilekoidlerinin membranlarında lokalize olmuş durumdadır. 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 meyve kurdu, yeşil şeftali aphidi gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı yaralanmalardan sonra ekspire olan PFO böceklere karşı bir savunma oluşturmaktadır. Aynı zamanda PFO'nun auron biyosentezi ve fenil-propanoid yoluyla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunlara ek olarak kloroplast mezofillerinde PFO'nun Mehler reaksiyonunda fonksiyonel olduğu bildirilmektedir[26]. PFO'nun faaliyeti sonucu oluşan kinonların ikinci bir polimerizasyon reaksiyonuyla koyu renkli, suda çözünmeyen polimerler oluşturduğu bilinmektedir. Polimerlerle doldurulan zedelenmiş dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı bir engel oluşturmaktadır[22].

Diğer taraftan bazı tahıllardan elde edilen unlardaki yüksek PFO aktivitesinden dolayı, ekmek, makarna ürünlerinin kararma gösterdiği enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan kinonların proteinlerle birleşerek onların hazmolma yeteneklerini ve bu arada lizin aminoasidinin yararlılığını azalttığı bildirilmiştir[27]. Çay, kahve ve kakaonun üretiminde ise enzimatik kararma istenilen önemli bir prosestir. Siyah çayın üretimi süresince meydana gelen biyokimyasal değişimler çayın lezzetini veren teafavin ve tearubinlerin üretilmesi açısından önemlidir[28].

1.2.3 Polifenoloksidazın Substratları

Meyve ve sebzeler oldukça fazla türde fenolik bileşik ihtiva ederler. Bununla birlikte bunların sadece bir kısmı PFO'nun substratlarıdır. PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en yaygın doğal substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Flavonoidler, bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum

kısımlarında bulunurlar. Genelde flavonoidler bitkilerin belirli bölgelerinde konsantre bir şekilde bulunmazlar. Bitkilerin çeşitli bölümlerinde hemen hemen homojen bir şekilde dağılmışlardır. Değişik konsantrasyonlardaki polifenoller yenilebilir ürünlerin çoğunda, kararma reaksiyonlarının meydana gelmesi için yeterli sebeptir.

Bitkilerde doğal olarak bulunan farklı türdeki flavonoid bileşiklerinden yalnızca katekinler, lökoantosiyanidinler, antosiyaninler, flavonoller, basit fenoller ve sinamik asit türevleri besinlerin önemli bir kısmını teşkil ederler[25].

1.3 Enzimatik Kararma

Enzimatik kararma besinlerin toplanması, depolanması veya onlarla yapılan işlemler sırasında meyve ve sebze dokularının herhangi bir şekilde zedelenmesi, kesilmesi, kabuklarının soyulması sonucu meydana gelmektedir. Bu renk bozunmaları enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır[28,29]. Taze sebze ve meyvelerin enzimatik kararması içerdikleri fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ilişkilidir. Bu bileşikler oksijen varlığında oksidasyon sonucunda kahverengi, kırmızı ve siyah pigmentlere yani yüksek derecede kararlı olmayan kinonlara dönüşmektedir[30]. Zarar gören bitki dokuları oksijenle temas ettikleri zaman hızlıca kararır, sonuçta istenmeyen renk, tad, ve koku oluşumu gözlenir. Bu durum gıdaların besin değerlerinin büyük ölçüde düşmesine sebep olurken gıda endüstrisinde de önemli bir problemi ortaya çıkarmaktadır. Enzimatik olmayan kararma ise Maillard reaksiyonu, askorbik asit mekanizması ve etkin aldehit teorisi, karamelizasyon, okside lipidler tarafından kararan polimerlerin şekillenmesi şeklinde beş farklı mekanizmanın kontrolündedir[2]

Fenolik maddeleri okside etme yeteneğine sahip olan enzimler lakkaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz (tirozinaz) dır. Bu üç grup enzimin benzer substrat tercihleri vardır. Bu nedenle özellikle seçilmiş inhibitörlerin kullanılması bu grup enzimlerin ayırt edilmesinde önemlidir. Peroksidazlar hidrojen peroksit varlığında substratları okside edebilirler yani peroksidazların oksidasyon reaksiyonları hidrojen

peroksidin varlığına bağlıdır. Oksitatif reaksiyonlarda gerek işlemeden önce gerekse işlem sırasında sebze ve meyvelerle ilgili renk bozulmalarından daha çok polifenol oksidaz sorumludur[31].

Bitkilerde bulunan fenolik moleküllerin oksijenli ortamda yükseltgenmesini sağlayan polifenol oksidaz renksiz olan bu bileşikler kullanarak renkli ürünlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu süreçte öncelikle monofenoller difenollere yükseltgenerek kresolaz aktivitesi gösterirler. Kresolaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan ürünler de yine polifenol oksidaz tarafından *o*-kinonlara yükseltgenerek katekolaz aktivitesi gösterirler. Oluşan *o*-kinonlar polimerize olurlar, ortamdaki amino asitler ve proteinlerle kompleks oluşturarak kahverengi pigmentlere dönüşürler. Meydana gelen bu pigmentler yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerlerdir. Enzimatik kararmada ilk adım *o*-kinonların oluşmasıdır. *O*-kinonlar ise, *o*-dihidroksi ünitesi içeren her çeşit fenolik maddeyi içermektedir. Sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan doğal flavonoid maddelerden, katekinler, proantosiyanidinler (lökoantosiyanidinler), antosiyanidinler, flavonoller ile ayrıca hidroksibenzoik, hidroksisinamik ve bunların türevleri olan çeşitli bileşikler; kafeik, ferulik, *p*-kumarik, kuinik, gallik, sinamik ve klorogenik asitler gibi çok çeşitli basit fenolik maddeler; ve polifenollerin enzimatik kararma reaksiyonlarında rol oynadığı görülmektedir. Ancak meyve ve sebze de çok az bulunmasına karşın, onların enzimatik yolla kararmalarında önemli rol oynayan maddelerden diğeri de gerçekte bir basit fenolik madde olan ve aminoasitler arasında yer alan tirozindir[24].

Enzimatik kararma reaksiyonlarında bir çok polifenolik maddelerin substrat olarak rol oynamalarına karşın, bazı fenolik maddeler tam aksine, inhibitör rolü oynamaktadır. Enzimatik kararma reaksiyonlarının olduğu ortamda bulunan bazı maddeler, renk değişimlerinin kilit maddesi olan *o*-kinonları geriye, yani *o*-fenolik formlara indirgeme niteliğine sahiptirler. Böylece enzimatik kararma olayı, *o* noktada durmakta ve renk bozulmamaktadır. Bu indirgen maddelerin başında askorbik asit gelmektedir. Askorbik asit oluşan *o*-kinonları, *o*-fenolik bileşiklere indirgeyerek renk bozunmasını engellemekte ve bu sırada askorbik asit parçalanmaktadır. Ayrıca askorbik asit ortamdaki oksijeni indirgeyerek de kararma reaksiyonlarını ikinci bir yolla inhibe etme özelliğine sahiptir. İşte meyve ve

sebzelerin işlenmesinde, işlenmekte olan ürünün rengini korumak amacı ile askorbik asidin yaygın kullanılma nedeni budur[24].

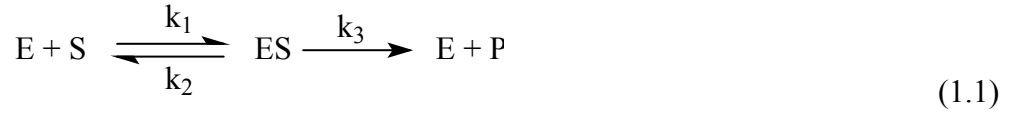
1.4 Polifenol Oksidaz İle Yapılan Çalışmaların Özeti

Polifenol oksidaz gıda endüstrisi açısından son derece önemli bir enzim olduğu için yapılan literatür taraması sırasında polifenol oksidazla yapılmış çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Khan ve arkadaşları, amonyum sülfatla çöktürdükleri patates proteinlerinden bir adsorbant olan celite 545 üzerinde PFO'yu direk immobilize etmişlerdir[32]. Mayende ve arkadaşları, çürümüş yapraklardan izole ettikleri termofilik *Basillus* spp. taksonlarından elde ettikleri PFO ve selüloz aktivitelerini incelemişlerdir[33]. Matsui ve arkadaşları, yeşil hindistan cevizi suyundan elde ettikleri PFO ve peroksidaz enzimlerinin termal inaktivasyonlarını çalışmışlardır[34]. Martinez ve arkadaşları, beyaz fare fungusu olan *Trametes versicolor* ATCC 42530'da elde ettikleri PFO enzimini kullanarak ayçiçeği yağında bulunan ve polifenolik bir madde olan klorojenik asiti enzimatik olarak degrade etmişlerdir[35]. Doğan ve arkadaşları, farklı patlıcan kültürlerinden PFO'yu kısmen saflaştırmışlar ve PFO aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, substrat spesifikliğı ve ısı inaktivasyonu gibi bazı kinetik parametrelerin etkilerini araştırmışlardır[36]. Yine Doğan ve arkadaşları, farklı *Thymus longicaulis* var. *subisophyllus* taksonundaki PFO aktivitesinin bazı kinetik özelliklerini belirlemişlerdir[21]. Gündoğmaz ve arkadaşları, çeşitli *Salvia* türlerinde varolan PFO'nun bazı kinetik özelliklerini araştırmışlardır[37]. Erat ve arkadaşları, *Ferula* sp.'den elde ettikleri PFO'yu saflaştırarak karakteristik özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır[38]. Durigan ve arkadaşları, *Averrhoa carambola* L.'nin yedi genotipinde PFO aktivitesini incelemişlerdir[39]. Doğan ve Doğan yine *Thymus* türünden kısmen saflaştırdıkları PFO aktivitesinin nasıl değiştiğini belirlemeye çalışmışlardır[3]. Thipyapong ve arkadaşları, fotosentez sırasında ortaya çıkan stres durumunda yükselen PFO aktivitesini domatesten inhibe etmeye çalışmışlardır[26]. Lee ve arkadaşları, patatesten elde ettikleri polifenol oksidazın Maillard reaksiyonu ürünleri olan glisin ve glukoz tarafından inhibe olduğunu saptamışlardır[2]. Nunez-Delicado ve arkadaşları, Napoleon üzümünden elde ettikleri latent PFO'yu Triton X-114 ile iki fazlı bölme yaklaşımını kullanarak elde etmişler ve optimal aktivite değerlerini tespit etmişlerdir[40]. Doğan ve arkadaşları, değişik *Origanum* türlerinin

farklı organlarından kısmen saflaştırdıkları PFO aktivitesinin dönemlere ve organlara bağlı olarak nasıl değiştiğini belirlemeye çalışmışlardır[41]. Xu, 4-20 °C'de 6 ay süreyle *Castanea henryi* depolanması sırasında PFO aktivitesi ve total fenolik bileşikleri incelemiştir[42]. Yıldız ve arkadaşları, üç farklı polimer kullanarak PFO'nun immobilizasyonunu çalışmışlar ve bazı Türk kırmızı şaraplarındaki toplam fenolik maddeyi elektrotlarla belirlemişlerdir[43]. Büyükbayram ve arkadaşları, kırmızı şaraptaki kararlı fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan iletken kopolimerlerde PFO'nun immobilizasyonu vasıtasıyla biosensörlerin hazırlanmasına çalışmışlardır[44]. Marukes ve arkadaşları, bitki ve fungus türlerinden elde ettikleri PFO'nun karşılaştırmalı analizini yapmışlardır[45]. Gui ve arkadaşları, karbondioksite maruz bırakılan elma suyundaki PFO'nun inaktivasyonunu incelemişlerdir[46]. Alvarez-Parrila ve arkadaşları, lezzetli kırmızı elmadan elde ettikleri PFO'yu klorojenik asit substratını kullanarak β -siklodekstrin, 4 - heksilresorsinol, metilyasmonat inhibitör maddelerini kullanarak inhibe etmeye çalışmışlardır[47]. Maki ve Morohasi, domateste tohumların köklenmesinden sonra mikropilar endospermdeki PFO aktivitesinin arttığını saptamışlardır[48]. Arslan ve arkadaşları, beyaz duttan (*Morus alba* L.) elde ettikleri PFO'yu sefaroze 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit kullanarak affinite kromatografisiyle saflaştırıp kinetik ve elektroforetik özelliklerini belirlemişlerdir[49]. Ünal, Anamur muzundan elde ettiği PFO'nun optimum sıcaklık, pH, termal inaktivasyon ve inhibisyon çalışmalarını yapmıştır[50]. Mdluli, Afrika'da yetişen *Scalerocarya birrea* subsp. *caffra*'den elde ettiği PFO ve peroksidazı saflaştırarak karakterizasyonunu belirlemeye çalışmıştır[51]. Mozetic ve arkadaşları, Rebula üzümünden elde ettikleri polifenollerin Folin-Ciocalteu metoduna göre analiz etmişlerdir[52]. Doğan ve arkadaşları, *Ocimum basilicum* L. ve mantardan elde ettikleri PFO'nun glutamik asitle inhibe olduğunu saptamışlardır[23]. Ayrıca yine Doğan ve arkadaşları, enginar bitkisinden elde ettikleri PFO'nun karakteristik özellikleri ve bazı kinetik parametrelerini belirlemişlerdir[53]. Gutes ve arkadaşları, polifenolokidaz biyosensörleri vasıtası ile fenolik bileşiklerin belirlenmesini araştırmışlardır[54].

1.5 Enzim Kinetiği

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

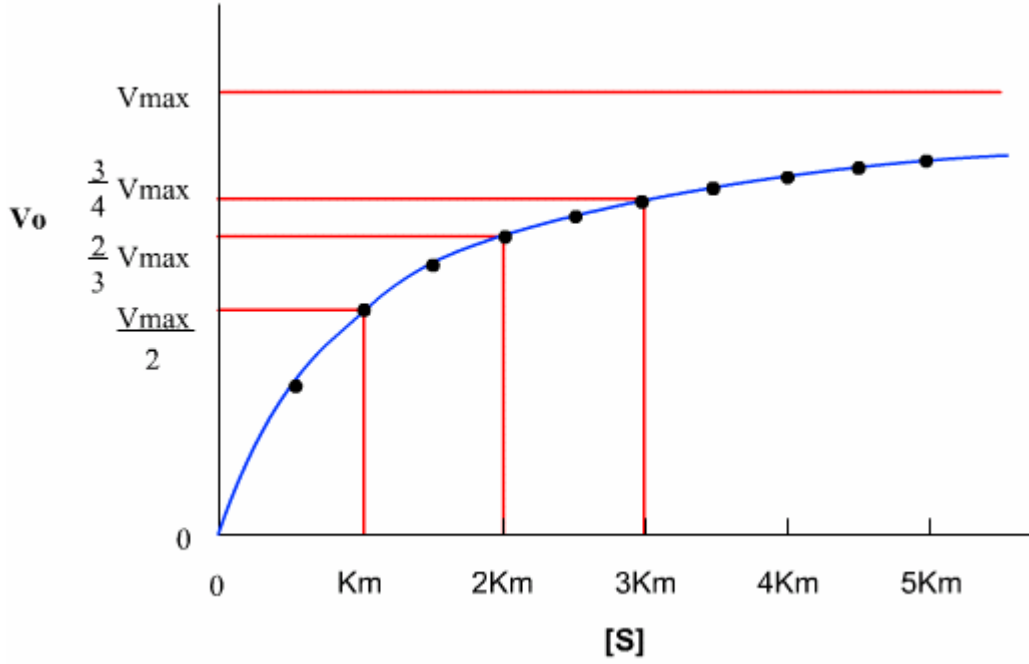


Bu kimyasal reaksiyon için Michaelis-Menten denklemleri aşağıdaki gibi verilebilir:

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

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

şekil 1.3 enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı artar, yani reaksiyon substrata göre birinci derecedendir. Substrat konsantrasyonu arttırıldığı zaman reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfırcı ile birinci dereceler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat konsantrasyonu daha da arttırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonu ile değişmez. Bu kısımda reaksiyon sıfırcı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substrat ile birleşmiş yani doymuş haldedir.

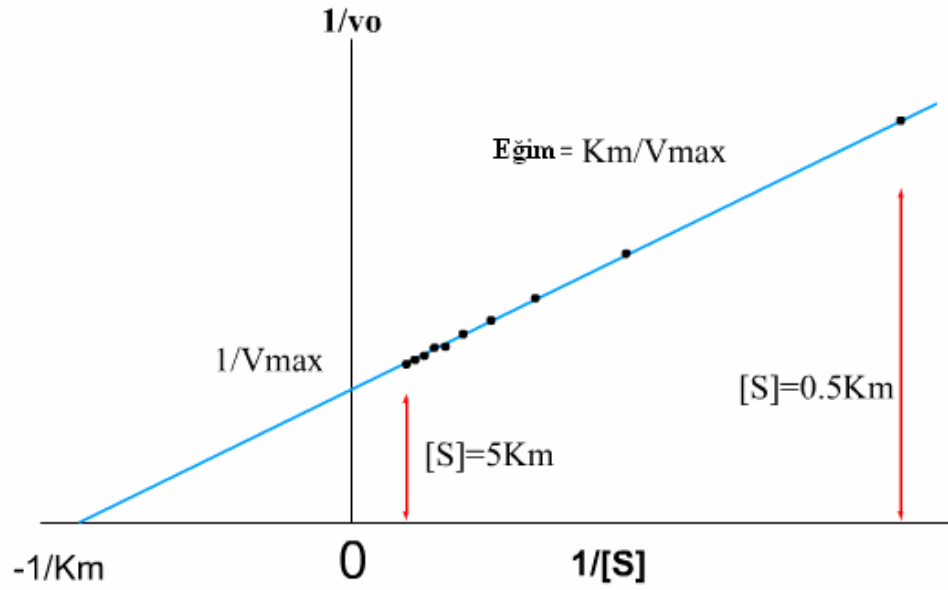


Şekil 1.3 Michealis-Menten eğrisi

Michaelis-Menten eşitliğinin parametrelerini belirlemek için birkaç metot vardır. $[S]$ 'nin çok yüksek değerlerinde başlangıç hızı (V_0) V_{max} 'a yaklaşır. Bununla birlikte pratikte Şekil 1.3'de gösterildiği gibi V_0 'ın $[S]$ 'ye karşı grafiğinden V_{max} 'u doğru bir şekilde belirlemek çok zordur. V_{max} ve K_M 'nin değerlerini belirlemek için daha iyi bir metot Lineweaver-Burk tarafından geliştirilmiş olup bu denklem Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmiş biçimidir.

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

Bu eşitlikte $1/V_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı eğrisi, eğimi K_M/V_{max} ve ekstrapolasyonu $1/V_{max}$ olan düz bir doğru verecektir (Şekil 1.4)[55].



Şekil 1.4 Lineweaver-Burk grafiği

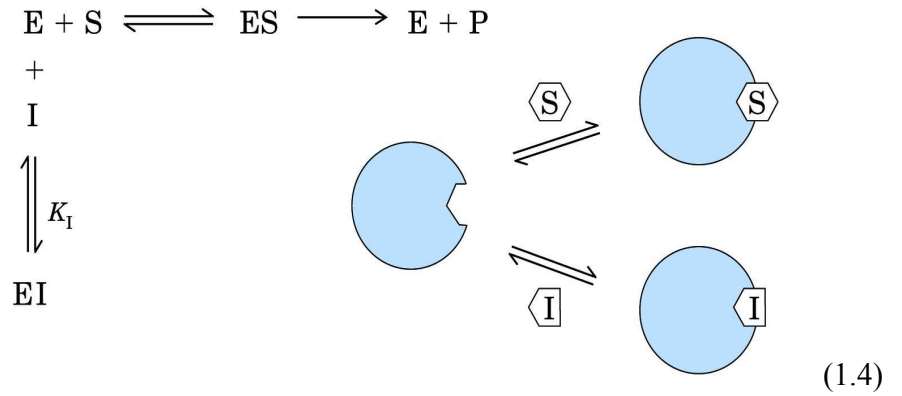
1.6 İnhibisyon

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

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

1.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

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

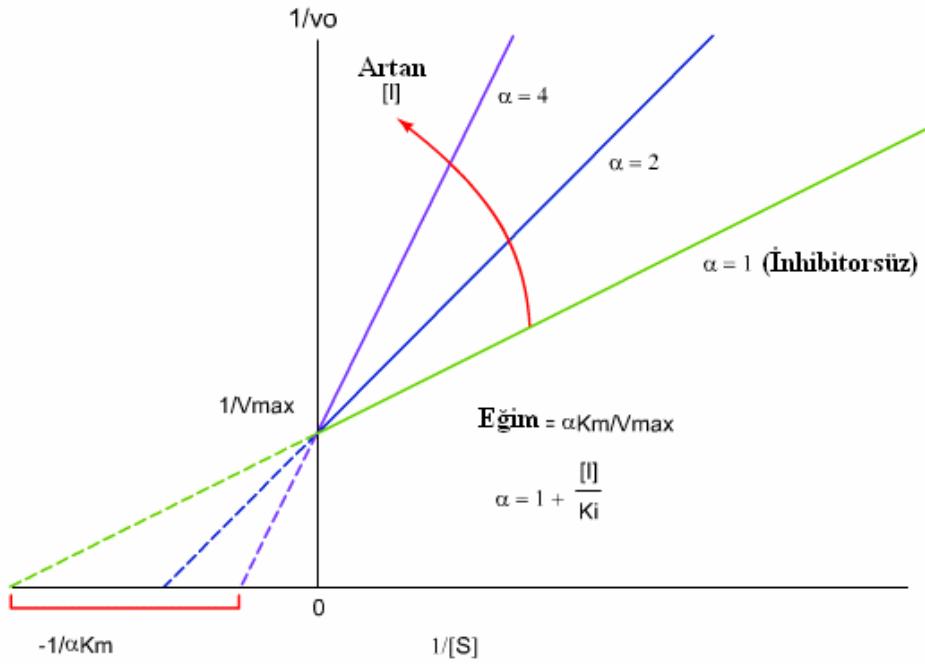


Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi verilebilir:

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

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

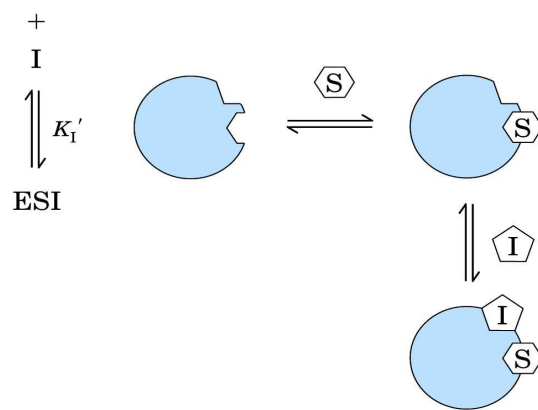
Bu eşitliğin eğrisi düz doğrudur. Bu düz doğrunun eğimi $\alpha K_M / V_{\max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{\max}$ 'dur. Bu durum Şekil 1.5'de görülmektedir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için yukarıdaki denklem $1/V_0$ ekseninde $1/V_{\max}$ kayımına sahiptir. Bu, diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur[22].



Şekil 1.5 Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

1.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

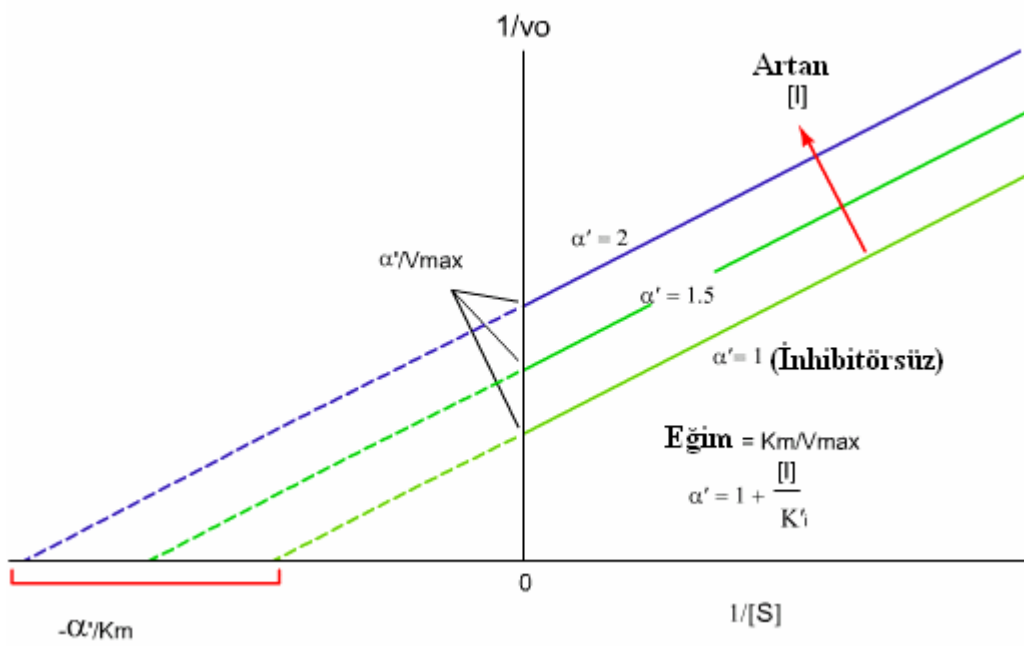
Yarı-yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanır.



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

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

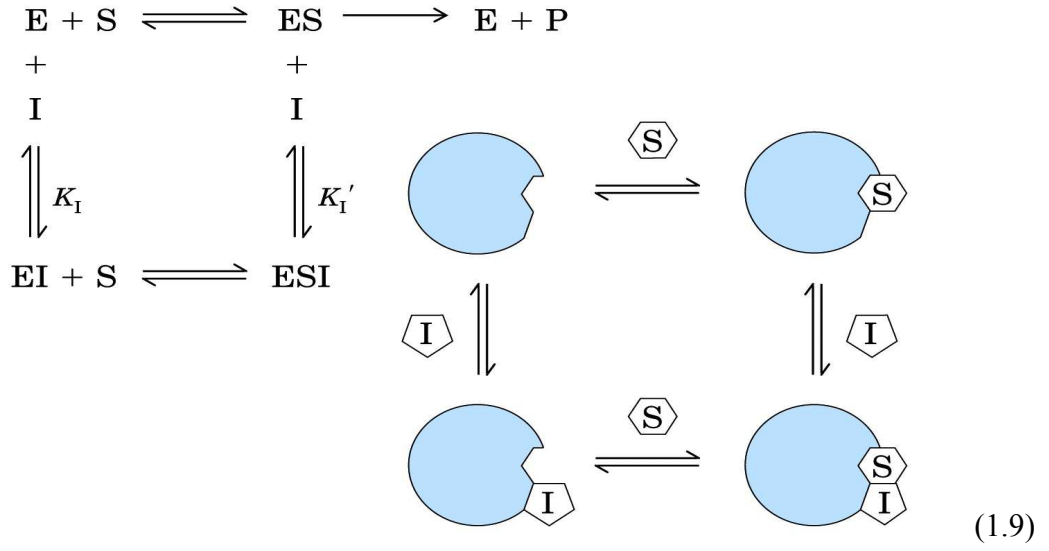
Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi (K_M/V_{\max}) ve ekstrapolasyonu (α'/V_{\max}) olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.6). Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur[22].



Şekil 1.6 Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

1.6.3 Karışık İnhibisyon

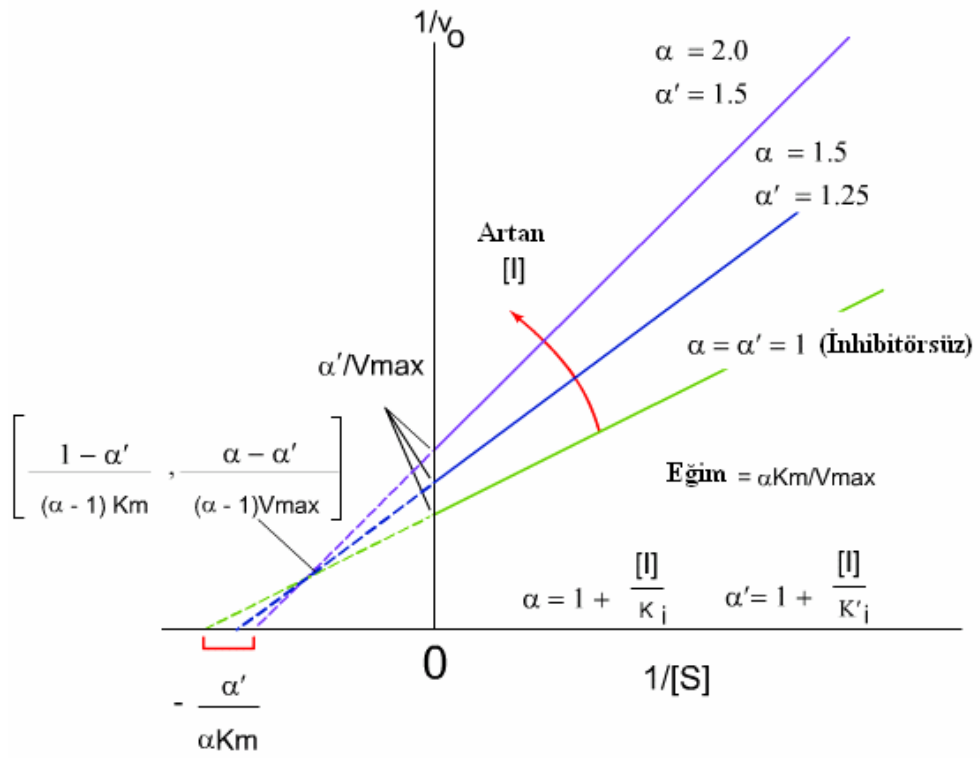
Bu tür inhibisyonda inhibitörler hem enzim hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilirler.



Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki şekilde verilebilir:

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

Bu eşitliğin eğrisi eğimi $(\alpha K_M/V_{\max})$ ve ekstrapolasyonu (α'/V_{\max}) olan doğrulardan meydana gelir (Şekil 1.7). $K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) olduğu özel durum için, kesişim $1/[S]$ eksenini üzerindedir. Bu durumda inhibisyon çeşiti yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır[22].



Şekil 1.7 Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrileri

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Lactuca sativa* L. Balıkesir’de bir marketten taze olarak temin edildi. Taze yapraklar görünür topraklarından arındırılarak çeşme suyuyla yıkandı ve üzerlerindeki su kurutulduktan sonra -80 °C’de saklandı. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck’den ve Sigma Chem. Co’dan satın alındı. Enzim analizleri ise Cary|1 E|g UV–Visible (Varian, Avustralya) spektrofotometresi kullanılarak belirlendi[3].

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıdaki listede verilmiştir:

1. Disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4)
2. Sodyum asetat (NaCH_3COO)
3. Sodyum hidroksit (NaOH)
4. Nitrik asit (HNO_3)
5. Amonyum sülfat (NH_4) $_2\text{SO}_4$
6. Katekol
7. 4-metilkatekol
8. Pirogallol
9. Glutasyon
10. Tropolon
11. 4-aminobenzoik asit
12. Askorbik asit
13. Benzoik asit
14. Sodyum azid
15. Folin- Ciocalteau belirteci
16. Sodyum karbonat
17. Serum albumin

18. Coomassie Brilliant-Blue G- 250
19. Sodyum karbonat (Na_2CO_3)
20. Diyaliz torbası

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır:

1. Cary|1 E|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 : Hettic Zentrifugen EBA 12R
9. Mağnetik karıştırıcı : Heildolph
10. Vorteks : Nüve NM 100

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

1. **0.1 M Na_2HPO_4 pH=6-9 (Eksrakt Hazırlama ve Aktivite Ölçümü İçin)**

17.796 g sodyum fosfat hassas terazide tartılarak balon jofeye konuldu ve katı partiküller tamamen magnetik karıştırıcı üzerinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı pH-metre ile NaOH ve HNO_3 kullanılarak 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden pH'sı 6.5 olan ekstrak hazırlanması ve aktivite ölçümleri esnasında kullanılırken, diğer çözeltilerden optimum pH çalışmaları süresince yararlanıldı.

2. **0.01 M Na_2HPO_4 pH=7.0 (Diyaliz İşlemi için):**

1.7796 g sodyum fosfat hassas terazide tartılarak balon jofeye konuldu ve

katı partiküller tamamen magnetik karıştırıcı üzerinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı pH-metre ile NaOH ve HNO₃ kullanılarak 7.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan bu çözelti enzim örneklerinin diyaliz işlemleri süresince kullanıldı.

3. 0.1 M NaCH₃COO pH =4-6(Aktivite Ölçümü İçin)

13.68 g sodyum asetat tartıldıktan sonra balon jöjeye konuldu ve magnetik karıştırıcı üzerinde iyice çözüldü ve hacmi 1L'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı pH-metre ile NaOH ve HNO₃ çözeltileri kullanılarak 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0'ya ayarlandı. Bu çözeltiler daha sonra optimum pH çalışmaları süresince aktivite ölçümlerinde kullanıldı.

4. 0.1 M Katekol (Substrat Çözeltisi):

0.55 g katekol tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partikülleri iyice çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

5. 0.1 M 4-metilkatekol (Substrat Çözeltisi):

0.620 g 4-metilkatekol tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partikülleri iyice çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

6. 0.1 M Pirogallol (Substrat Çözeltisi):

0.630 g pirogallol tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partikülleri iyice çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

7. 0.01 M 4-aminobenzoik Asit (İnhibitör Çözeltisi):

0.0685 g 4-aminobenzoik asit tartıldıktan sonra 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partikülleri iyice çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

8. 0.001 M Glutasyon (İnhibitör Çözeltisi):

0.0015 g glutasyon tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partikülleri tamamen çözüldükte sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

9. 0.001 M Askorbik Asit (İnhibitör Çözeltisi):

0.0038 g askorbik asit tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partiküller tamamen çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

10. 0.001 M Tropolon (İnhibitör Çözeltisi):

0.0610 g tropolon tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partiküller tamamen çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

11. % 20'lik Sodyum Karbonat (Na₂CO₃) (Fenolik Madde Tayini İçin):

10 g sodyum karbonat tartılıp 50 mL'lik balon jöjeye alındı ve katı partiküller tamamen çözüldükten sonra hacmi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

12. Coomassie Brilliant-Bule G-250 Reaktifi Hazırlama (Protein Tayini İçin):

100 mg (0.1 g) Coomassie Brilliant-Bule G-250 tartıldı ve 50 mL etanol içinde iyice çözüldü. Üzerine 100 mL fosforik asit eklendikten sonra iyice karıştırılarak üzeri saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

13. Bovin Serum Albumin (Protein Tayini İçin):

100 mg (0.1 g) albumin tartılıp 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

2.2 Ham Ekstrakların Hazırlanması

Çalışmalar süresince -80 °C'de saklanan *Lactuca sativa* L. örneklerinden ham enzim ekstraktı hazırlamak için 20 g bitki numunesi tartıldı. Örnekler bidistile suyla birkaç defa iyice yıkandı. Yıkanan numuneler %5'lik polietilenglikol ve 10 mM askorbik asit içeren 0.1 M 100 mL pH'sı 6.5 olan fosfat tamponu içinde paslanmaz çelik bir blendır kullanılarak 2 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenat, sık gözenekleri olan ve birkaç kez katlanarak hazırlanan beyaz bir tülbent yardımıyla filtre edildi. Filtrat satrifüj tüplerine alındı ve tüplerin ağırlıkları hassas bir terazide eşitlenerek 15000 x g'de 10 dakika süreyle + 4°C'de santrifüj

edildi[3,56]. Santrifüj sonrası üst kısımları süzülerek elde edilen süpernatant bir gün süresince 0.01 M'lık pH'ı 7.0 olan fosfat tamponu içerisinde diyalize bırakıldı. Diyaliz süresince tampon dört kez değiştirildi[3]. Diyalizden alınan ekstrakt diğer işlemlerde kullanıldı.

2.3 Polifenol Oksidazın Kısmen Saflaştırılması

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

$$g_{[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]} = \frac{1.77V(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2} \quad (2.1)$$

Burada;

V: Süpernatantın hacmi,

S_1 : l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu,

S_2 : l'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğudur.

Eklenen katı amonyum sülfat en düşük devirde çalışan bir magnetik karıştırıcı üzerindeki ham ekstrakt içerisine yavaş yavaş ilave edildi. Her bölümün eklenmesi süresince katı amonyum sülfat parçacıklarının tamamen çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yaklaşık yarım saat kadar sürdü. Katı amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra % 80 doygunluğa ulaşan süspansiyon tekrar santrifüj tüplerine alınıp ağırlıkları eşitlendikten sonra 60 dakika boyunca + 4 °C'de 15000 x g'de santrifüj edildi[3]. Üstte kalan sıvı kısım atılarak tüpte kalan çökelek, pH'sı 7.0 olan 5 mM'lık fosfat tamponunda çözünebildiği en az miktarda çözüldü. Enzim solüsyonu diyaliz tüpüne boşaltılarak torba içerisinde 5 mM'lık, pH'sı 6.5 olan fosfat

tamponu bulunan bir behere alındı ve 24 saat boyunca diyalize bırakıldı. Düşük devirde çalışan bir magnetik karıştırıcı üzerinde + 4 °C'de gerçekleştirilen diyaliz işlemi süresince tampon dört defa yaklaşık olarak 5-6 saat aralıklarla değiştirildi. Diyaliz işlemi sonucu kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz, deneylerde enzim kaynağı olarak kullanıldı[56].

2.4 Spektrofotometrik Ölçümler

Kinetik analizler Cary | 1 E | g -UV-Visible spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon 1 cm'lik ışık yolu olan 3 mL hacimli kuartz küvet içinde gerçekleştirildi. Her bir ölçümde küvetteki reaksiyon solüsyonun hacmi 3 mL olarak sabit tutuldu. 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 ilave edildi ve tüp hızlıca karıştırılarak absorbans okumasının yapılacağı spektrofotometreye yerleştirildi. Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek üzere 4-metilkatekol, katekol, pirogallol ve L-tirozin substratlar olarak denendi. *Lactuca sativa* L. bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz enziminin, bu substratlardan L- tirozine karşı aktivite göstermediği belirlendi. Enzimin kinetiksel ölçümleri katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları kullanılarak absorbanslarındaki artışın ölçülmesiyle tespit edildi. Ölçümler 4-metilkatekol ve katekol substratları için 420 nm'de, pirogallol substratı için 320 nm'de ve 2 dakika boyunca absorbans ölçümü alınarak gerçekleştirildi. Bir enzim ünitesi, 1 mL enzim çözeltisi için bir dakikada absorbansda meydana gelen 0.001'lik değişim olarak tanımlanmıştır. Ölçümler iki defa tekrarlanarak yapıldı[3].

2.5 Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

Lactuca sativa L. bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için pH 4-6 aralığında 0.1M asetat ve pH 6-9 aralığında 0.1M fosfat tamponu kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH ayarlamaları yapılırken 0.1M NaOH ve 0.1M HNO₃ çözeltileri kullanıldı. Optimum pH değerleri yine 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak

belirlendi. Ölçümlerde reaksiyon karışımı 2.3 mL tampon, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim ekstraktından meydana geldi. Ölçümler ikişer kez tekrarlandı[3].

2.6 Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

PFO enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri belirlenirken 20-60 °C dereceleri arasındaki deneysel çalışmalar gerçekleştirildi. Ölçümlerde kullanılan substratlar ve tampon çözeltilerin sıcaklığı su banyosu yardımıyla ayarlandı. Reaksiyon karışımı 2.3 mL tampon, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim karışımından meydana geldi. Reaksiyon karışımına en son enzim çözeltisi eklendi. Küvetteki enzim, substrat ve tamponun hacimleri tüm ölçümlerde 3 mL olarak sabit tutuldu. Tüm ölçümler iki kez tekrarlandı[3].

2.7 Isı İnaktivasyonu

Lactuca sativa L.'den saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin ısı inaktivasyonunun belirlenmesi için 35, 55 ve 75 °C sıcaklık değerleri seçildi. Bu amaçla 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanıldı. Enzim ekstraktı altı farklı tüpe konuldu ve farklı sürelerde etüvde inkübe edildi. 10 dakika aralıklarla enzim çözeltisi etüvden alınarak buz banyosunda soğutulduktan sonra 2.3 mL tampon çözelti, 0.6 mL substrat ve 0.1 mL enzim çözeltisi kullanılarak aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler iki kez tekrarlandı[21].

2.8 İnhibisyon

Polifenol oksidazın inhibisyonu 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak yapıldı. Askorbik asit, tropolon, glutatyon, 4-aminobenzoik asit, benzoik asit ve sodyum azid inhibitörler olarak kullanıldı. *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO'nun benzoik asit ve sodyum azidle inhibe olmadığı görüldü. 3 mL'lik reaksiyon karışımı 0.1 M fosfat tamponu içinde çeşitli konsantrasyonlardaki substrat ve inhibitörleri ve 0.1 mL enzim çözeltisinden meydana geldi. Her inhibitör için inhibisyon sabitleri (K_i), Lineweaver–Burk

eğrilerinden hesaplandı. I_{50} değerlerini bulmak için farklı inhibitör derişimlerinde aktivitede meydana gelen değişim incelendi[57].

2.9 *Lactuca sativa* L. Ekstraktının Protein İçeriği

Lactuca sativa L.'nin protein içeriği Bradford yöntemi ile belirlenmiştir[58]. Bradford yöntemi, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant-Blue G-250 reaktifiyle kompleks oluşturmaları şeklinde gerçekleşmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır [22].

1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden deney tüplerine sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ L otomatik pipet yardımıyla konuldu. Albumin çözeltisi bulunan tüplerin hacimleri 5 mM pH'sı 6.5 olan fosfat tamponuyla 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant-Bule G-250 reaktifi bütün tüplere eklendikten sonra tüpler bir vorteks yardımıyla 1 dakika süresince karıştırıldı. 30 dakika karanlık ortamda beklemeye bırakılan çözeltinin absorbansı 595 nm'de belirlendi. Kör olarak hazırlanan tüp 0.1 mL fosfat tamponu ve 5 mL Coomassie Brilliant-Bule G-250 reaktifini içerdi. Hazırlanan enzim ekstraktından 3 ayrı tüpe 0.2'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[22].

2.10 *Lactuca sativa* L. Ekstraktının Toplam Fenolik Madde İçeriği

Lactuca sativa L. ekstraktının toplam fenolik madde içeriği, Singleton ve Rossi'nin metoduna göre Folin-Ciocalteau belirteci kullanılarak belirlendi. 2 g bitki örneği oda sıcaklığında % 80'lik 100 mL sulu etanol içerisine eklenerek karışım bir çelik blender içinde homojenize edildi. Homojenat 15 dakika 10000 x g ve + 4 ⁰C'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 μ L'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 bekledikten sonra 295 nm'de spektrometrik olarak ölçüldü. Standart kalibrasyon eğrisi, katekol kullanılarak hazırlandı. Sonuç, 100 g taze bitki ağırlığı başına mg katekol olarak verildi[59].

Satandard kalibrasyon eğrisi çizilirken 0.05 M'lık katekol çözeltisi hazırlandı. 11 farklı tüpe sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ L katekol eklendi. Tüplerin hacmi distile suyla 3 mL'e seyreltildikten sonra 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. 60 dakika sonra tüplerin köre karşılık absorbans değerleri 295 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kör olarak içerisinde Folin–Ciocalteu reaktifi, distile su ve sodyum karbonat karışımı bulunan tüp kullanıldı[59].

3. BULGULAR

Bu bölümde çalışmalar sonucunda elde edilen deneysel veriler sunulmaktadır.

3.1 *Lactuca sativa* L. Ekstraktlarının Protein ve Fenolik Madde İçerikleri

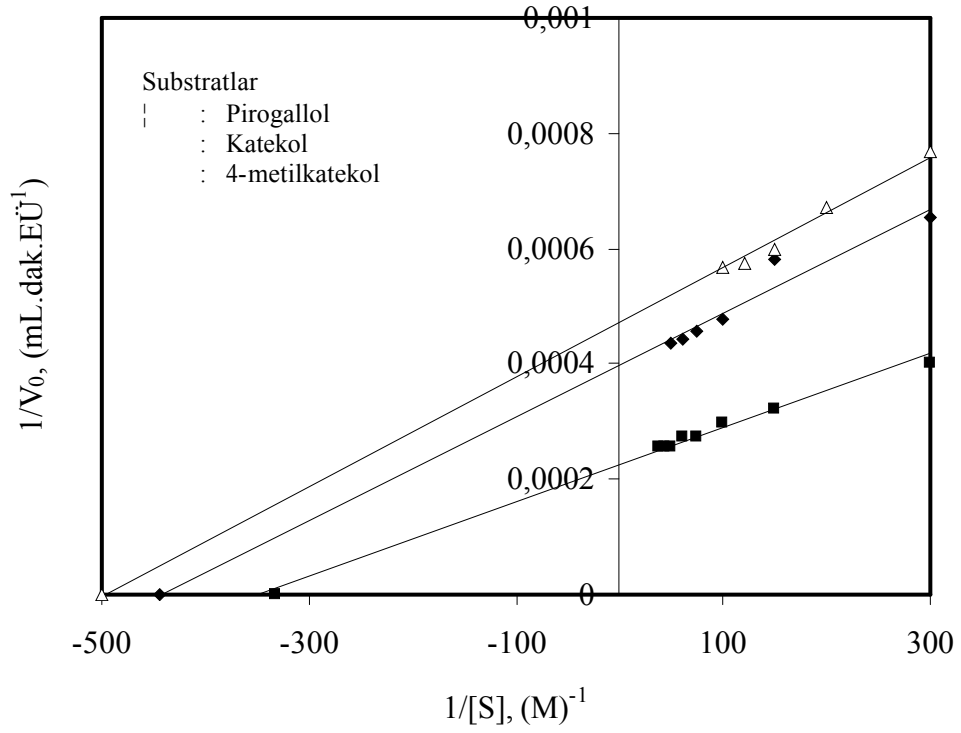
Ham enzim ekstraktlarındaki protein içeriği Bradford yöntemine göre[58] ve toplam fenolik madde içeriği ise Singleton ve Rossi yöntemine göre[59] belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular enzim ekstraktının $494 \mu\text{g mL}^{-1}$ protein ve $304\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğunu göstermiştir.

3.2 Substrat Spesifikliği

Lactuca sativa L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.1'de verilerek Şekil 3.1'de grafik edilmiştir. Şekil 3.1, $1/[S]$ 'nin $1/V_0$ 'a karşı grafiğini göstermektedir.

Çizelge 3.1 *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesi için çeşitli substratlarla elde edilmiş kinetik veriler

Substratlar	[S] (M) x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹) ⁻¹ x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M mM	V _{max} /K _M (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹ mM ⁻¹)	R ²
Katekol	3,33	1529	300	6,54	7457	10,7	697	0,9823
	6,67	1721	150	5,81				
	10,00	2089	100	4,79				
	13,33	2188	75	4,57				
	16,67	2263	60	4,42				
	20,00	2290	50	4,37				
4-metilkatekol	6,67	1299	300	7,70	16158	11,6	1393	0,9966
	10,00	1488	200	6,72				
	13,33	1671	150	5,98				
	16,67	1738	120	5,75				
	20,00	1766	100	5,66				
Pirogallol	3,33	2502	300	4,00	6390	5,2	1220	0,9795
	6,67	3095	150	3,23				
	10,00	3379	100	2,96				
	13,33	3673	75	2,72				
	16,67	3680	60	2,72				
	20,00	3916	50	2,55				
	23,33	3885	43	2,57				
	26,67	3880	38	2,58				



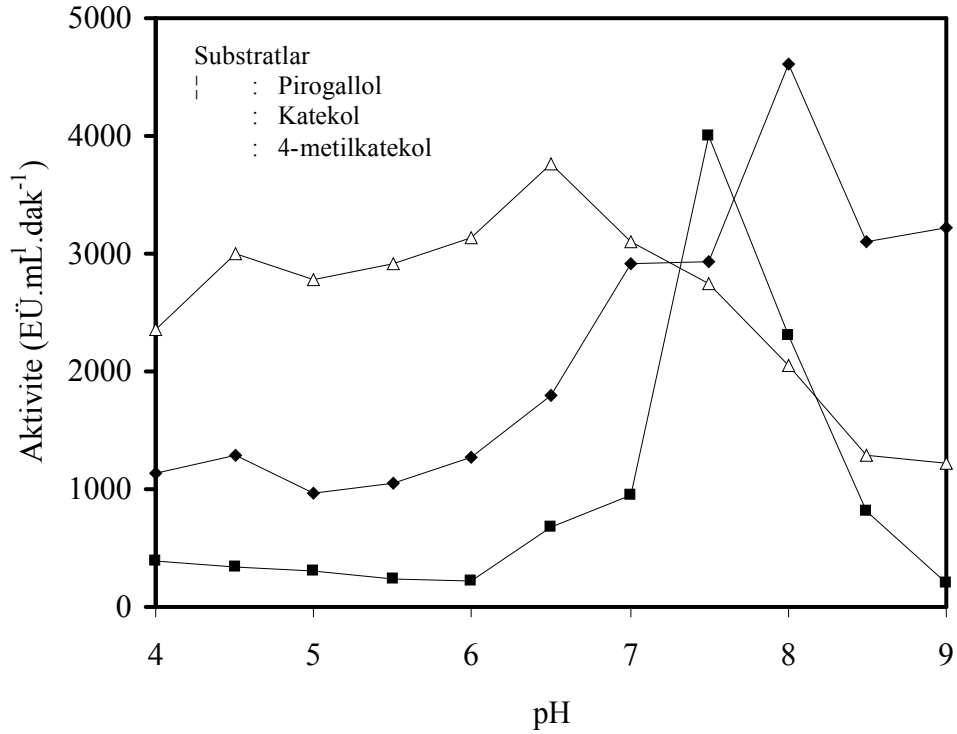
Şekil 3.1 Katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazı için çizilmiş $1/[S]$ - $1/V_0$ eğrileri

3.3 Optimum pH

Lactuca sativa L.'den elde edilen polifenoloksidazın optimum pH değerleri 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol substratları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.2'de verilmektedir. Şekil 3.2 substratlara bağlı olarak pH'nın aktivite ile değişimini göstermektedir.

Çizelge 3.2 *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimine ait veriler

pH	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metilkatekol	Pirogallol
4,0	1144	2364	395
4,5	1292	2999	337
5,0	959	2784	297
5,5	1058	2920	242
6,0	1265	3136	215
6,5	1789	3767	670
7,0	2913	3101	944
7,5	2928	2753	4000
8,0	4617	2044	2304
8,5	3104	1294	813
9,0	3223	1220	200



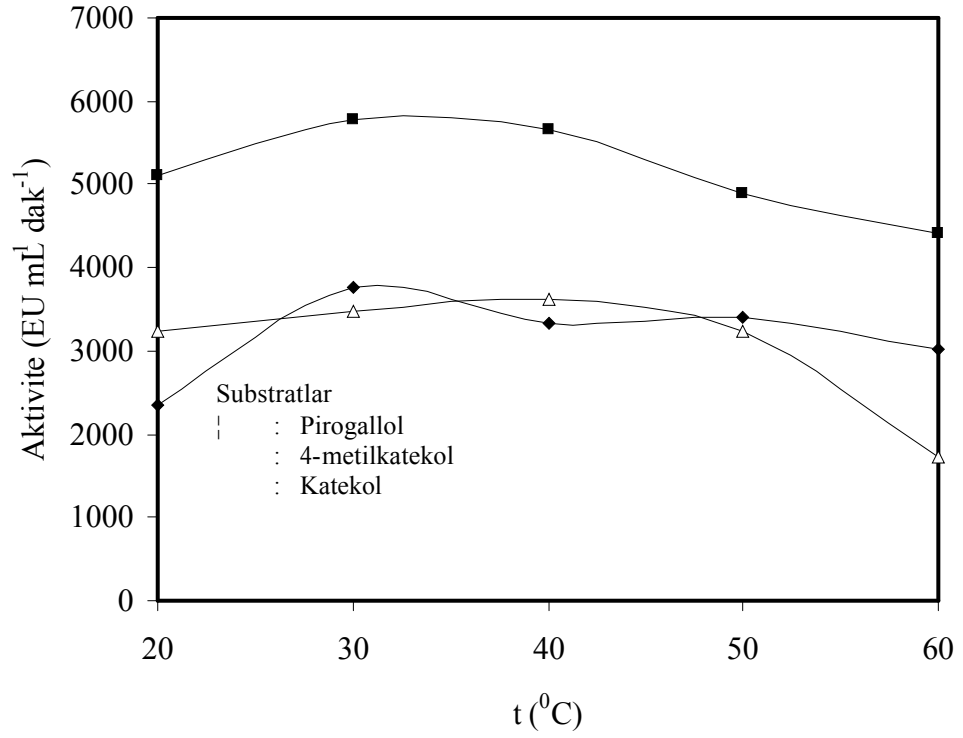
Şekil 3.2 *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin pH ile değişimi

3.4 Optimum Sıcaklık

4-metilkatekol, pirogallol ve katekol substratları kullanılarak *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 20, 30, 40, 50 ve 60 °C'lerde incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.3'de verilerek Şekil 3.3'de grafik edilmiştir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklık 30 °C iken katekol için 40 °C'dir.

Çizelge 3.3 *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimine ait veriler

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)		
	Katekol	4-metilkatekol	Pirogallol
20	3236	2352	5115
30	3487	3766	5788
40	3618	3341	5664
50	3244	3395	4880
60	1717	3009	4415



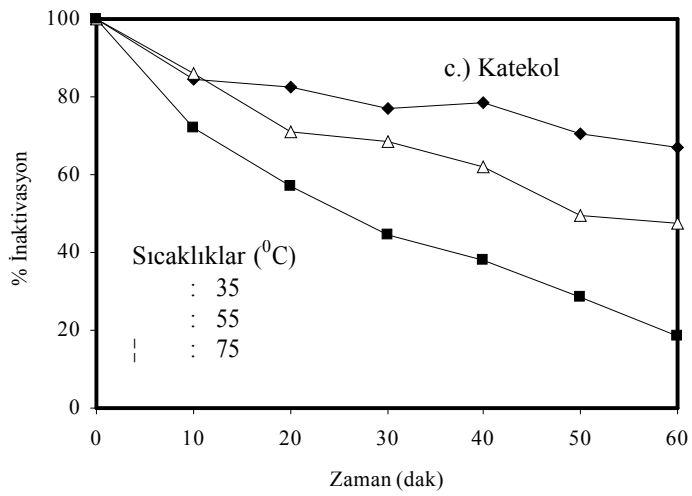
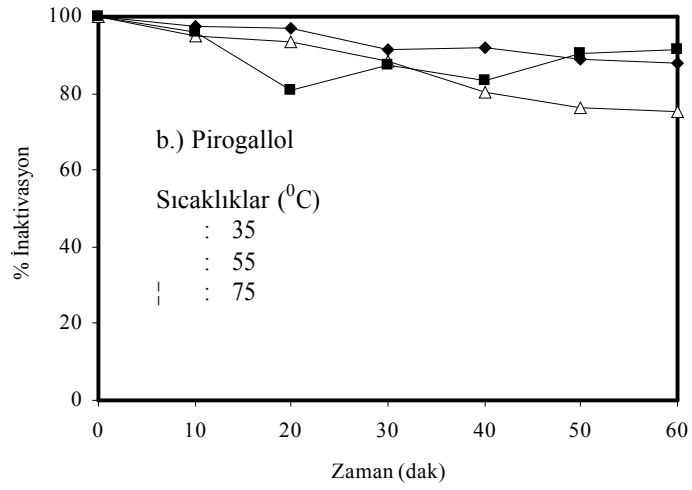
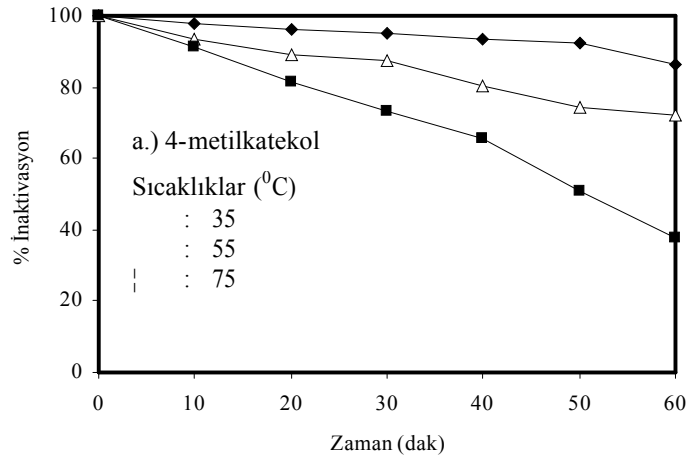
Şekil 3.3 *Lactuca sativa* L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

3.5 Termal İnaktivasyon

Lactuca sativa L.'den elde edilen polifenoloksidaz aktivitesinin termal denaturasyonu artan sıcaklığın ve inaktivasyon süresinin bir fonksiyonu olarak incelendi. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.4'de verilerek Şekil 3.4'de grafik edilmiştir. Deneysel bulgular tüm substratlar için artan sıcaklık ve inaktivasyon süresi ile enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 3.4 *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının termal denaturasyonu için elde edilen deneysel veriler

Substratlar	Zaman (dak.)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)			% İnaktivasyon		
		35 °C	55 °C	75 °C	35 °C	55 °C	75 °C
Katekol	0	6000	6000	6000	100,00	100,00	100,00
	10	5061	5173	4327	84,35	86,22	72,12
	20	4952	4255	3407	82,53	70,92	56,78
	30	4612	4106	2675	76,87	68,43	44,58
	40	4715	3713	2269	78,58	61,88	37,82
	50	4227	2981	1700	70,45	49,68	28,33
	60	4006	2858	1108	66,77	47,63	18,46
4-metilkatekol	0	3900	3900	3900	100,00	100,00	100,00
	10	3810	3641	3560	97,69	93,36	91,28
	20	3758	3479	3167	96,36	89,21	81,21
	30	3706	3418	2857	95,03	87,64	73,26
	40	3642	3124	2552	93,38	80,10	65,44
	50	3595	2892	1978	92,18	74,15	50,72
	60	3376	2807	1472	86,56	71,97	37,74
Pirogallol	0	7800	7800	7800	100,00	100,00	100,00
	10	7614	7398	7481	97,62	94,84	95,91
	20	7583	7294	6322	97,22	93,51	81,05
	30	7146	6902	6806	91,62	88,48	87,26
	40	7165	6280	6512	91,86	80,51	83,48
	50	6931	5948	7068	88,86	76,26	90,61
	60	6862	5872	7119	87,97	75,28	91,27



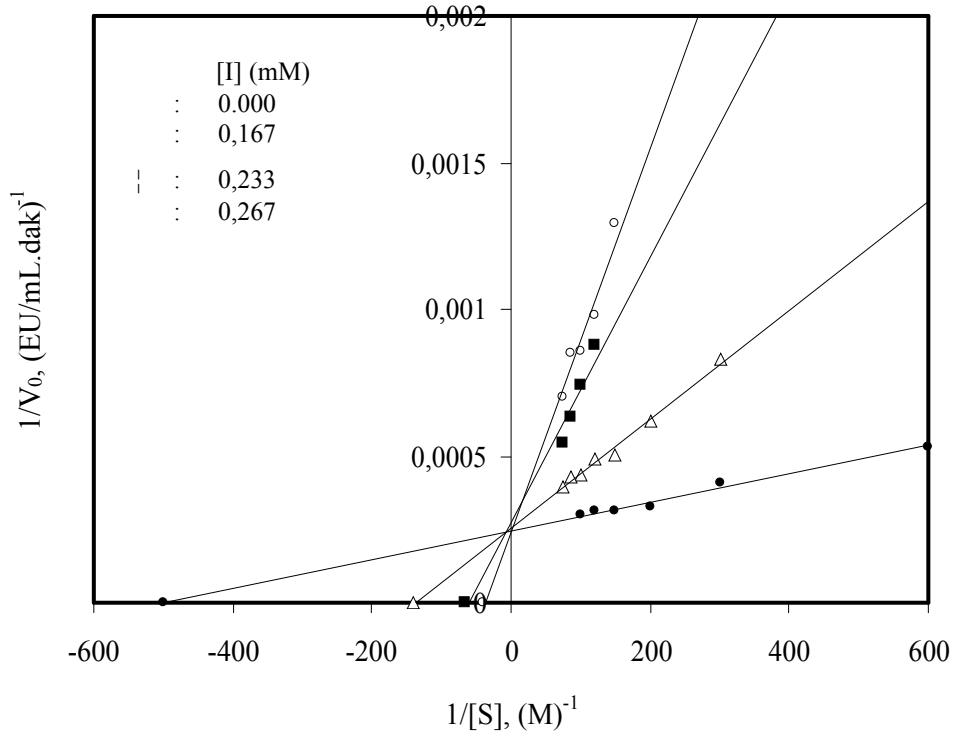
Şekil 3.4 *Lactuca sativa* L. polifenoloksidaz aktivitesinin termal denaturasyonuna ait eğriler

3.6 Polifenoloksidazın İnhibisyonu

Askorbik asit, sodyum azid, tropolon, glutatyon, benzoik asit ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri ile polifenoloksidazın inhibisyonu 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol substratları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler sırasıyla Çizelge 3.5-3.16'da verilmiş olup Şekil 3.5-3.16'da grafik edilmiştir. Deneysel bulgular sodyum azid ve benzoik asitin *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazını inhibe etmediğini göstermiştir.

Çizelge 3.5 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

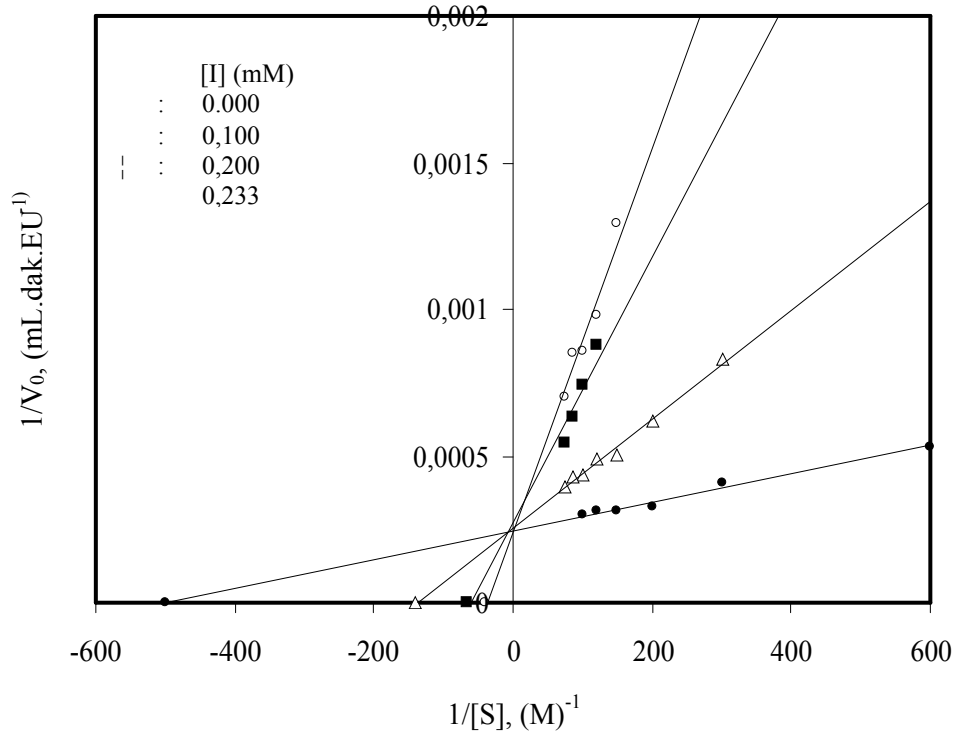
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁻³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	1,67	1894	600	5,27	5000	2,5	—	0,9945
	3,33	2430	300	4,11				
	5,00	3054	200	3,27				
	6,67	3209	150	3,11				
	8,33	3213	120	3,11				
	10,00	3344	100	2,99				
1,67x10 ⁻⁴	3,33	1206	300	8,29	—	—	5,55x10 ⁻⁵	0,9958
	5,00	1612	200	6,20				
	6,67	1989	150	5,02				
	8,33	2051	120	4,87				
	10,00	2294	100	4,35				
2,33x10 ⁻⁴	8,33	1139	120	8,77	—	—	2,59x10 ⁻⁵	0,9785
	10,00	1354	100	7,38				
	11,67	1588	86	6,29				
	13,33	1828	75	5,47				
2,67x10 ⁻⁴	6,67	775	150	12,90	—	—	2,05x10 ⁻⁵	0,9865
	8,33	1024	120	9,76				
	10,00	1169	100	8,55				
	11,67	1177	86	8,49				
	13,33	1432	75	6,98				



Şekil 3.5 4-metilkatekol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.6 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

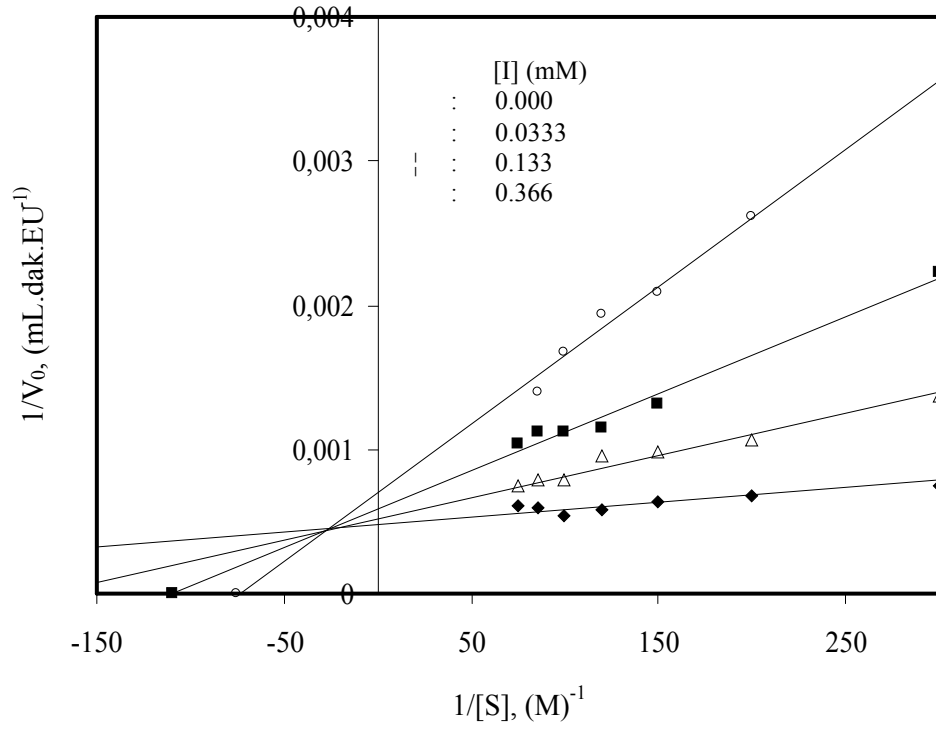
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	1,67	1018	600	9,82	2500	2,25x10 ⁻³	—	0,9955
	3,33	1339	300	7,47				
	5,00	1598	200	6,26				
	6,67	1730	150	5,78				
	8,33	1744	120	5,73				
	10,00	1846	100	5,42				
1,00x10 ⁻⁴	3,33	998	300	10,02	—	—	8,197x10 ⁻⁵	0,9925
	5,00	1202	200	8,31				
	6,67	1316	150	7,59				
	8,33	1559	120	6,41				
	10,00	1638	100	6,10				
	11,67	1762	86	5,67				
13,33	1765	75	5,66					
2,00x10 ⁻⁴	5,00	811	200	12,33	—	—	5,81x10 ⁻⁵	0,9845
	6,67	1115	150	8,96				
	8,33	1128	120	8,86				
	10,00	1255	100	7,96				
	11,67	1302	86	7,68				
	13,33	1366	75	7,32				
2,33x10 ⁻⁴	6,67	933	150	10,71	—	—	6,78x10 ⁻⁵	0,9982
	8,33	1076	120	9,29				
	10,00	1183	100	8,45				
	11,67	1293	86	7,73				
	13,33	1292	75	7,73				



Şekil 3.6 4-metilkatekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.7 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

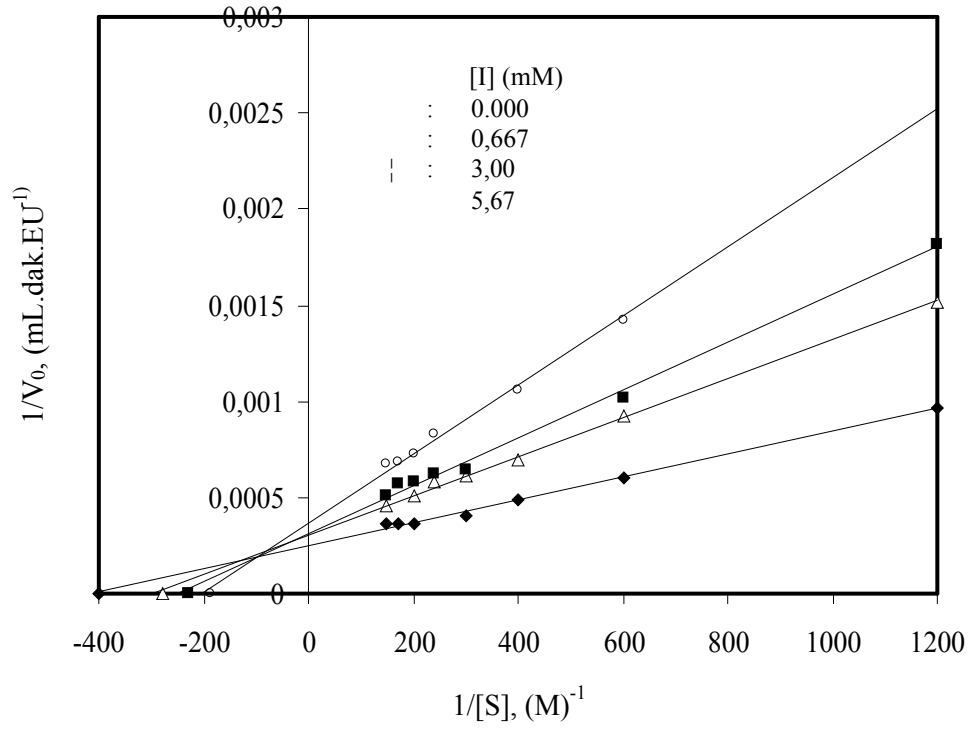
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	3,33	1343	300	7,45	2000	2,00	—	0,9781
	5,00	1464	200	6,83				
	6,67	1570	150	6,37				
	8,33	1710	120	5,85				
	10,00	1838	100	5,44				
	11,67	1673	86	5,98				
	13,33	1626	75	6,15				
3,33x10 ⁻⁵	3,33	730	300	13,70	—	—	1,66x10 ⁻⁵	0,9901
	5,00	933	200	10,72				
	6,67	1019	150	9,81				
	8,33	1048	120	9,54				
	10,00	1260	100	7,94				
	11,67	1277	86	7,83				
	13,33	1332	75	7,51				
1,33x10 ⁻⁴	3,33	1343	300	22,27	—	—	3,33x10 ⁻⁵	0,9919
	5,00	1464	150	13,17				
	6,67	1570	120	11,49				
	8,33	1710	100	11,26				
	10,00	1838	86	11,16				
	11,67	1673	75	10,41				
3,66x10 ⁻⁴	5,00	383	200	26,10	—	—	4,07x10 ⁻⁵	0,9940
	6,67	477	150	20,96				
	8,33	515	120	19,41				
	10,00	597	100	16,75				
	11,67	712	86	14,04				



Şekil 3.7 4-metilkatekol substratı kullanılarak tropolon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.8 4-metilkatekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

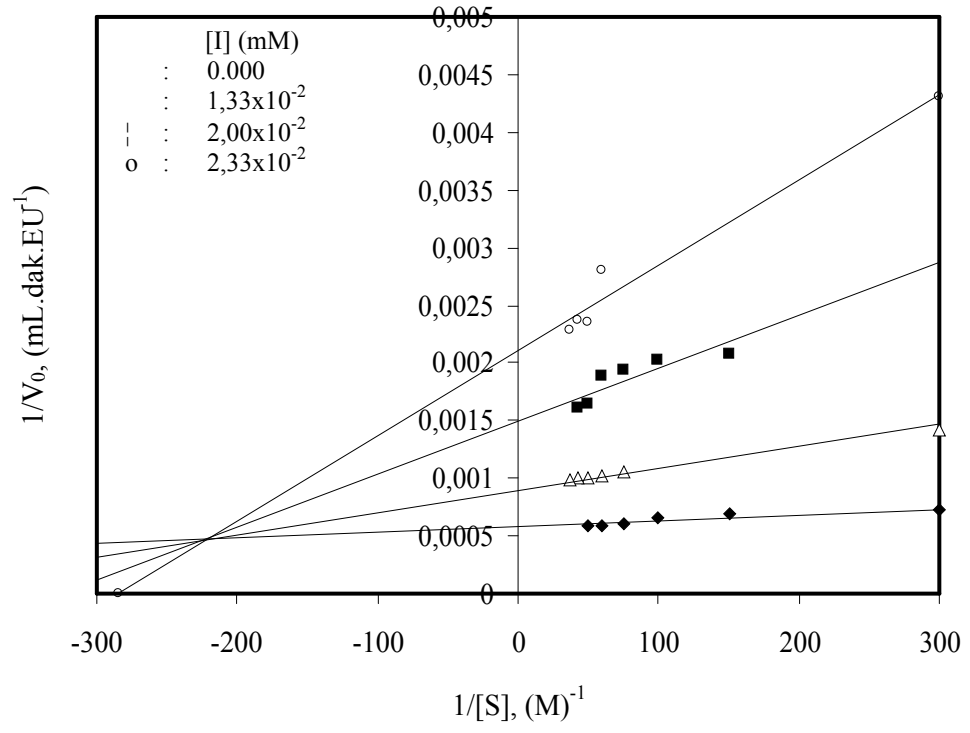
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	0,83	1033	1200	9,68	5000	3,00	-	0,9969
	1,67	1652	600	6,05				
	2,5	2054	400	4,87				
	3,33	2486	300	4,02				
	5,00	2792	200	3,58				
	5,83	2760	171	3,62				
	6,67	2752	150	3,63				
6,67x10 ⁻⁴	0,83	660	1200	15,15	-	-	1x10 ⁻³	0,9986
	1,67	1080	600	9,26				
	2,50	1429	400	7,00				
	3,33	1629	300	6,14				
	4,17	1719	240	5,82				
	5,00	1969	200	5,08				
	6,67	2168	150	4,61				
3x10 ⁻³	0,83	550	1200	18,18	-	-	4,5x10 ⁻³	0,9966
	1,67	981	600	10,19				
	3,33	1558	300	6,42				
	4,17	1614	240	6,20				
	5,00	1722	200	5,81				
	5,83	1767	171	5,66				
	6,67	1959	150					
5,67x10 ⁻³	1,67	703	600	14,22	-	-	2,43x10 ⁻³	0,9958
	2,5	941	400	10,63				
	4,17	1201	240	8,33				
	5,00	1381	200	7,24				
	5,83	1451	171	6,89				
	6,67	1493	150	6,70				



Şekil 3.8 4-metilkatekol substratı kullanılarak 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.9 Katekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının glutasyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

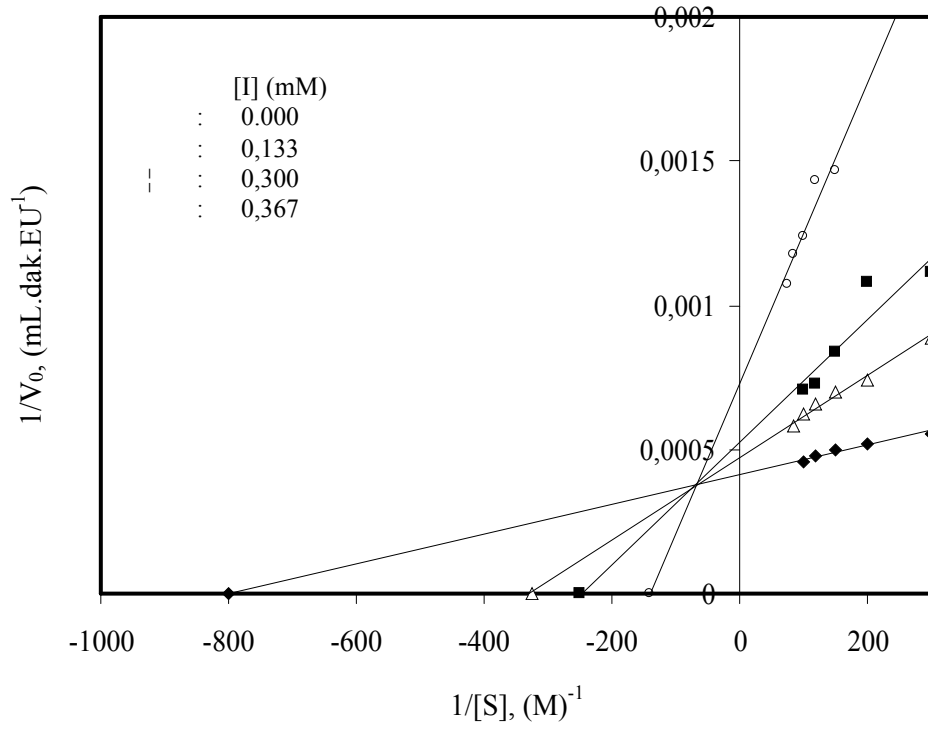
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	3,33	1381	300	7,24	1667	0,83	-	0,9922
	6,67	1445	150	6,92				
	10,00	1504	100	6,65				
	13,33	1633	75	6,12				
	16,67	1681	60	5,95				
	20,00	1690	50	5,92				
1,33x10 ⁻⁵	3,33	707	300	14,14	—	—	4,44x10 ⁻⁶	0,9950
	13,33	950	75	10,52				
	16,67	973	60	10,27				
	20,00	998	50	10,02				
	23,33	1000	43	10,00				
	26,67	1014	38	9,86				
2,00x10 ⁻⁵	6,67	480	150	20,83	—	—	2,22x10 ⁻⁶	0,9827
	10,00	492	100	20,32				
	13,33	516	75	19,37				
	16,67	529	60	18,90				
	20,00	611	50	16,36				
	23,33	622	43	16,07				
2,33x10 ⁻⁵	3,33	232	300	43,10	—	—	1,79x10 ⁻⁶	0,9901
	16,67	356	60	28,08				
	20,00	425	50	23,52				
	23,33	422	43	23,69				
	26,67	438	38	22,83				



Şekil 3.9 Katekol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.10 Katekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

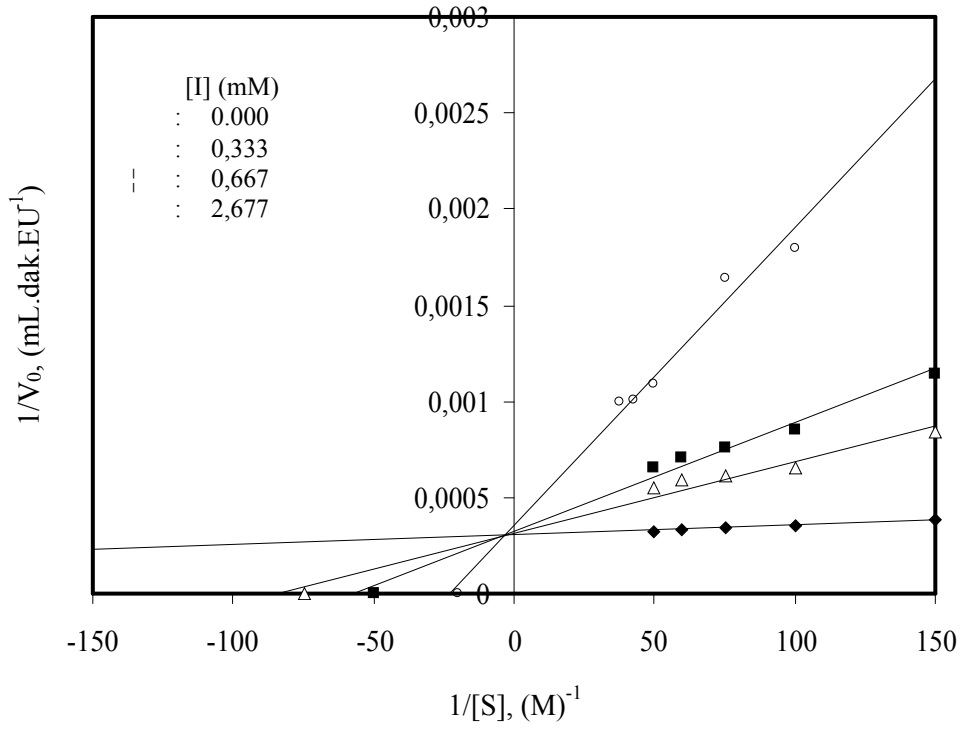
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	3,33	1796	300	5,57	2500	1,25	—	0,9988
	5,00	1936	200	5,17				
	6,67	2006	150	4,99				
	8,33	2098	120	4,77				
	10,00	2199	100	4,55				
1,33x10 ⁻⁴	3,33	1130	300	8,85	—	—	1,33x10 ⁻⁴	0,9972
	5,00	1354	200	7,39				
	6,67	1424	150	7,02				
	8,33	1516	120	6,60				
	10,00	1610	100	6,21				
	11,67	1717	86	5,82				
3,00x10 ⁻⁴	3,33	896	300	11,16	—	—	1,00x10 ⁻⁴	0,9720
	5,00	925	200	10,81				
	6,67	1197	150	8,35				
	8,33	1370	120	7,29				
	10,00	1413	100	7,07				
3,67x10 ⁻⁴	6,67	681	150	14,68	—	—	4,08x10 ⁻⁵	0,9931
	8,33	698	120	14,32				
	10,00	806	100	12,40				
	11,67	850	86	11,76				
	13,33	933	75	10,71				



Şekil 3.10 Katekol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.11 Katekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

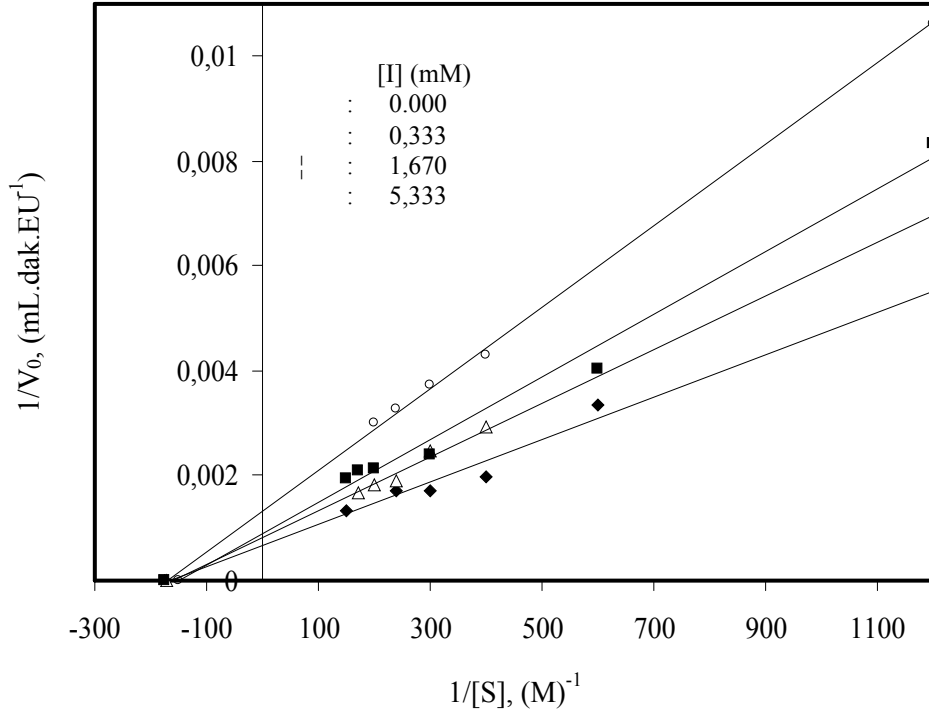
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	6,67	2610	150	3,83	3333	1,67	-	0,9980
	10,00	2800	100	3,57				
	13,33	2876	75	3,47				
	16,67	2966	60	3,37				
	20,00	3155	50	3,16				
3,33x10 ⁻⁴	6,67	1195	150	8,36	-	-	4,77x10 ⁻⁵	0,9773
	10,00	1528	100	6,54				
	13,33	1635	75	6,11				
	16,67	1697	60	5,89				
	20,00	1813	50	5,51				
6,67x10 ⁻⁴	6,67	875	150	11,42	-	-	6,67x10 ⁻⁴	0,9881
	10,00	1176	100	8,50				
	13,33	1313	75	7,61				
	16,67	1414	60	7,07				
	20,00	1527	50	6,54				
2,67x10 ⁻³	10,00	558	100	17,92	-	-	6,86x10 ⁻⁵	0,9816
	13,33	608	75	16,44				
	20,00	919	50	10,88				
	23,33	989	43	10,11				
	26,67	1000	38	10,00				



Şekil 3.11 Katekol substratı kullanılarak tropolon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.12 Katekol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

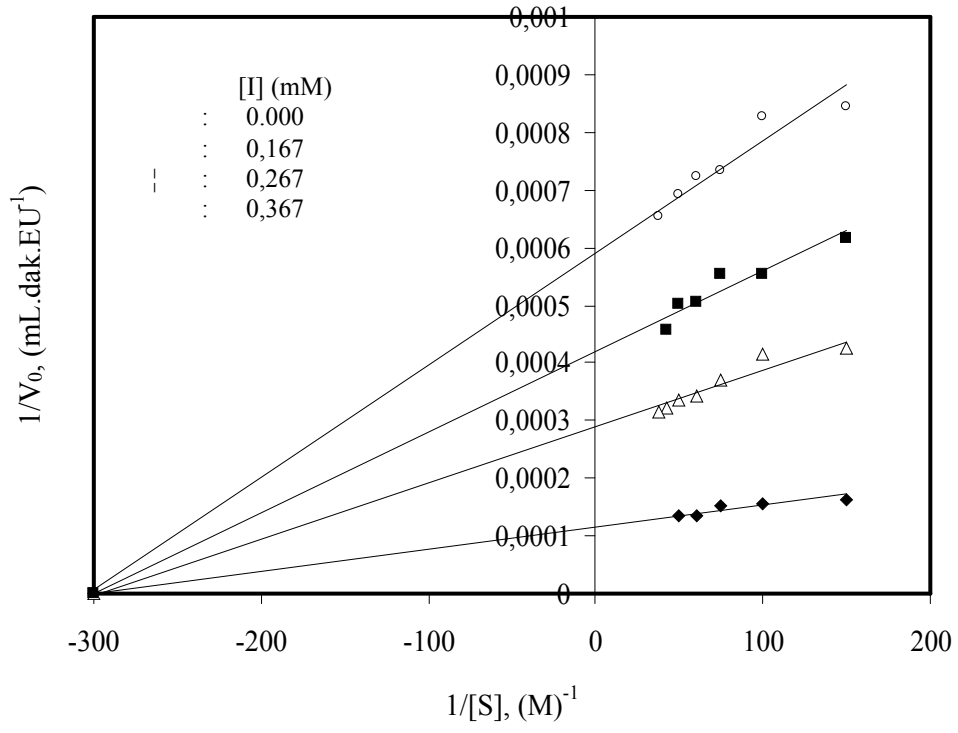
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	1,67	300	600	33,33	1429	5,72	-	0,9695
	2,50	501	400	19,96				
	3,33	581	300	17,21				
	4,17	590	240	16,94				
	6,67	742	150	13,47				
3,33x10 ⁻⁴	2,50	343	400	29,15	-	-	1,33x10 ⁻³	0,9900
	3,33	402	300	24,87				
	4,17	530	240	18,86				
	5,00	551	200	18,14				
	5,83	597	172	16,75				
1,67x10 ⁻³	0,83	120	1200	83,33	-	-	3,34x10 ⁻³	0,9900
	1,67	248	600	40,32				
	3,33	414	300	24,15				
	5,00	470	200	21,27				
	5,83	482	172	20,74				
5,33x10 ⁻³	0,83	94	1200	106,38	-	-	5,33x10 ⁻³	0,9989
	2,50	232	400	43,10				
	3,33	268	300	37,31				
	4,17	305	240	32,78				
	5,00	334	200	29,94				



Şekil 3.12 Katekol substratı kullanılarak 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.13 Pirogallol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının glutatyon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

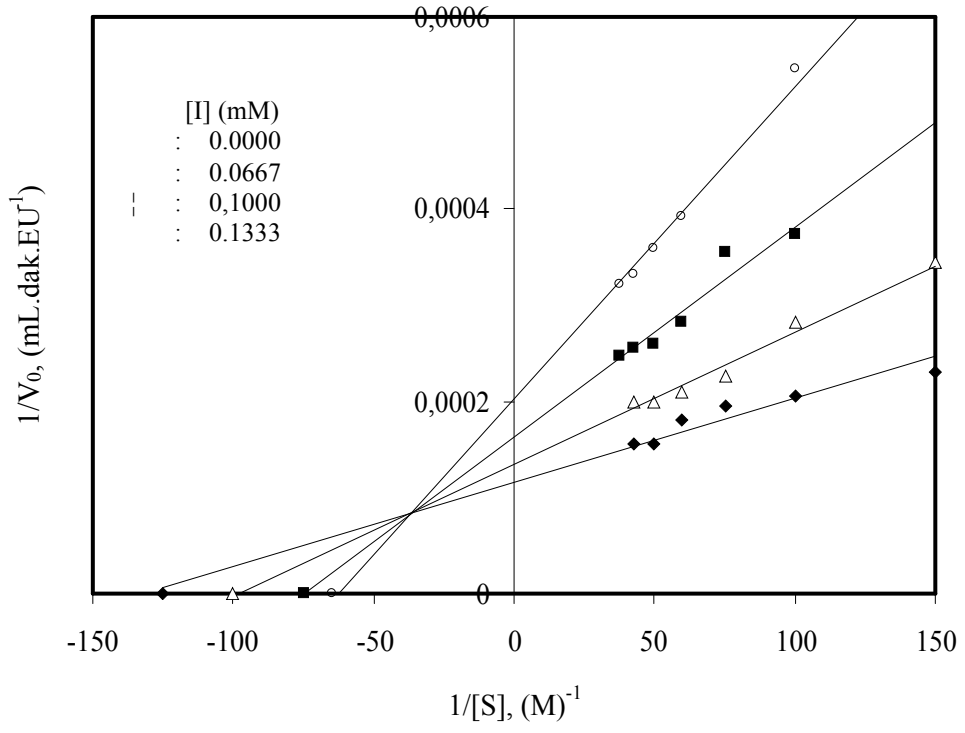
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	6,67	6158	150	1,62	10000	4,00	-	0,9915
	10,00	6412	100	1,55				
	13,33	6618	75	1,51				
	16,67	7333	60	1,36				
	20,00	7435	50	1,34				
1,67x10 ⁻⁴	6,67	2359	150	4,23	-	-	1,11x10 ⁻⁴	0,9900
	10,00	2408	100	4,15				
	13,33	2710	75	3,69				
	16,67	2929	60	3,41				
	20,00	2986	50	3,34				
	23,33	3120	43	3,20				
	26,67	3164	38	3,16				
2,67x10 ⁻⁴	6,67	1621	150	6,16	-	-	1,78x10 ⁻⁴	0,9940
	10,00	1803	100	5,54				
	13,33	1811	75	5,52				
	16,67	1986	60	5,03				
	20,00	1995	50	5,01				
	23,33	2184	43	4,57				
3,67x10 ⁻⁴	6,67	1185	150	8,43	-	-	9,18x10 ⁻⁵	0,9931
	10,00	1211	100	8,25				
	13,33	1361	75	7,34				
	16,67	1386	60	7,21				
	20,00	1443	50	6,93				
	26,67	1527	38	6,54				



Şekil 3.13 Pirogallol substratı kullanılarak glutasyon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.14 Pirogallol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının askorbik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

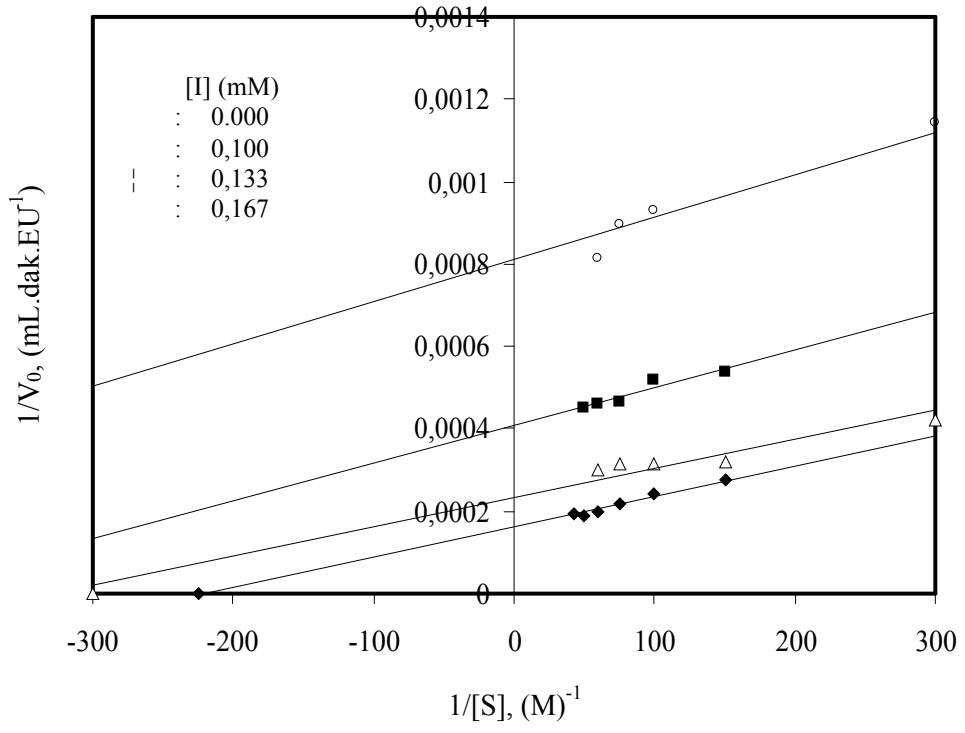
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	6,67	4335	150	2,30	10000	9,00	-	0,9815
	10,00	4875	100	2,05				
	13,33	5149	75	1,94				
	16,67	5563	60	1,79				
	20,00	6428	50	1,55				
	23,33	6392	43	1,56				
6,67x10 ⁻⁵	6,67	2896	150	3,45	-	-	6,06x10 ⁻⁴	0,9952
	10,00	3550	100	2,81				
	13,33	4407	75	2,26				
	16,67	4761	60	2,10				
	20,00	4999	50	2,00				
	23,33	5033	43	1,98				
1,00x10 ⁻⁴	10,00	2682	100	3,72	-	-	8,19x10 ⁻⁵	0,9869
	13,33	2818	75	3,54				
	16,67	3539	60	2,82				
	20,00	3862	50	2,58				
	23,33	3910	43	2,55				
	26,67	4050	38	2,46				
1,33x10 ⁻⁴	10,00	1834	100	5,45	-	-	5,71x10 ⁻⁵	0,9964
	16,67	2547	60	3,92				
	20,00	2783	50	3,59				
	23,33	3019	43	3,31				
	26,67	3115	38	3,21				



Şekil 3.14 Pirogallol substratı kullanılarak askorbik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.15 Pirogallol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının tropolon inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

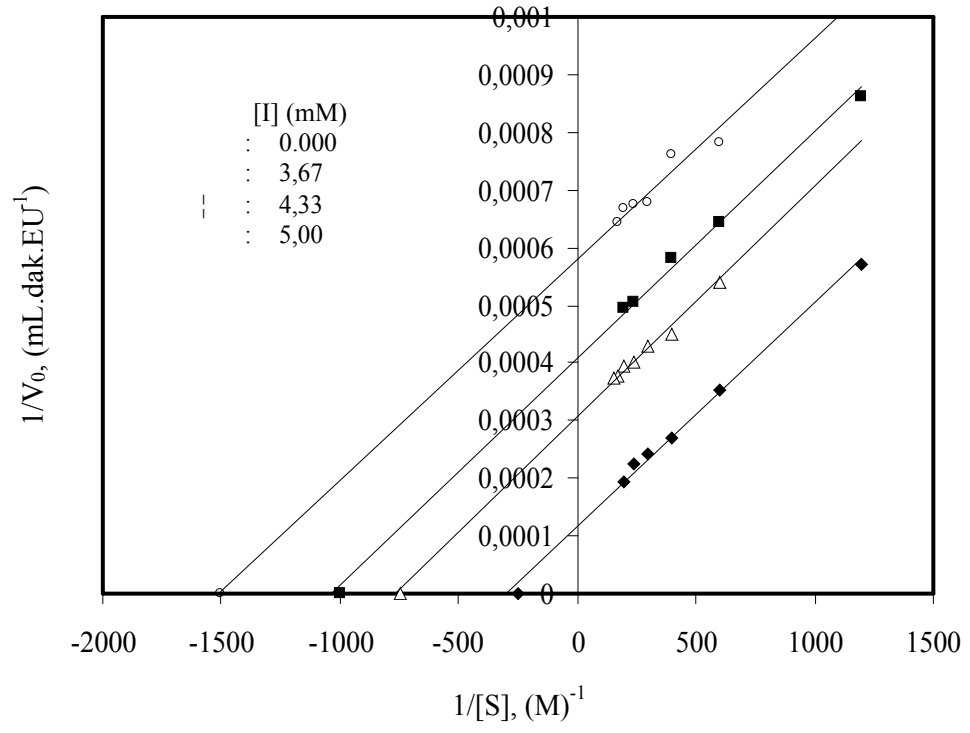
[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	6,67	3610	150	2,77	5000	3,5	-	0,9948
	10,00	4110	100	2,43				
	13,33	4628	75	2,16				
	16,67	5053	60	1,97				
	20,00	5276	50	1,89				
	23,33	5200	43	1,92				
1,00x10 ⁻⁴	3,33	2380	300	4,20	-	-	0,44x10 ⁻⁵	0,9716
	6,67	3108	150	3,21				
	10,00	3153	100	3,17				
	13,33	3192	75	3,13				
	16,67	3326	60	3,01				
1,33x10 ⁻⁴	6,67	1857	150	5,38	-	-	1,96x10 ⁻⁴	0,9974
	10,00	1932	100	5,17				
	13,33	2152	75	4,64				
	16,67	2162	60	4,62				
	20,00	2231	50	4,48				
1,67x10 ⁻⁴	3,33	874	300	11,44	-	-	6,60x10 ⁻⁴	0,9945
	10,00	1076	100	9,29				
	13,33	1117	75	8,95				
	16,67	1226	60	8,15				



Şekil 3.15 Pirogallol substratı kullanılarak tropolon inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

Çizelge 3.16 Pirogallol substratı kullanılarak *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile inhibisyonuna ait deneysel veriler

[I] (M)	[S] (M)x10 ⁺³	V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/V ₀ (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)x10 ⁺⁴	V _{max} (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K _M (mM)	K _i (M)	R ²
0	0,83	1750	1200	5,71	10000	4,00	-	0,9955
	1,67	2821	600	3,54				
	2,50	3693	400	2,70				
	3,33	4151	300	2,40				
	4,17	4452	240	2,24				
	5,00	5122	200	1,95				
3,67x10 ⁻³	1,67	1851	600	5,40	--	-	7,59x10 ⁻³	0,9974
	2,50	2220	400	4,50				
	3,33	2324	300	4,30				
	4,17	2481	240	4,03				
	5,00	2539	200	3,93				
	5,83	2648	171	3,77				
4,33x10 ⁻³	0,83	1162	1200	8,60	-	-	10,90x10 ⁻³	0,9976
	1,67	1557	600	6,42				
	2,50	1718	400	5,82				
	4,17	1981	240	5,04				
	5,00	2017	200	4,95				
5,00x10 ⁻³	1,67	1280	600	7,81	-	-	20,00x10 ⁻³	0,9954
	2,50	1314	400	7,61				
	3,33	1472	300	6,79				
	4,17	1485	240	6,73				
	5,00	1494	200	6,69				
	5,83	1551	171	6,44				



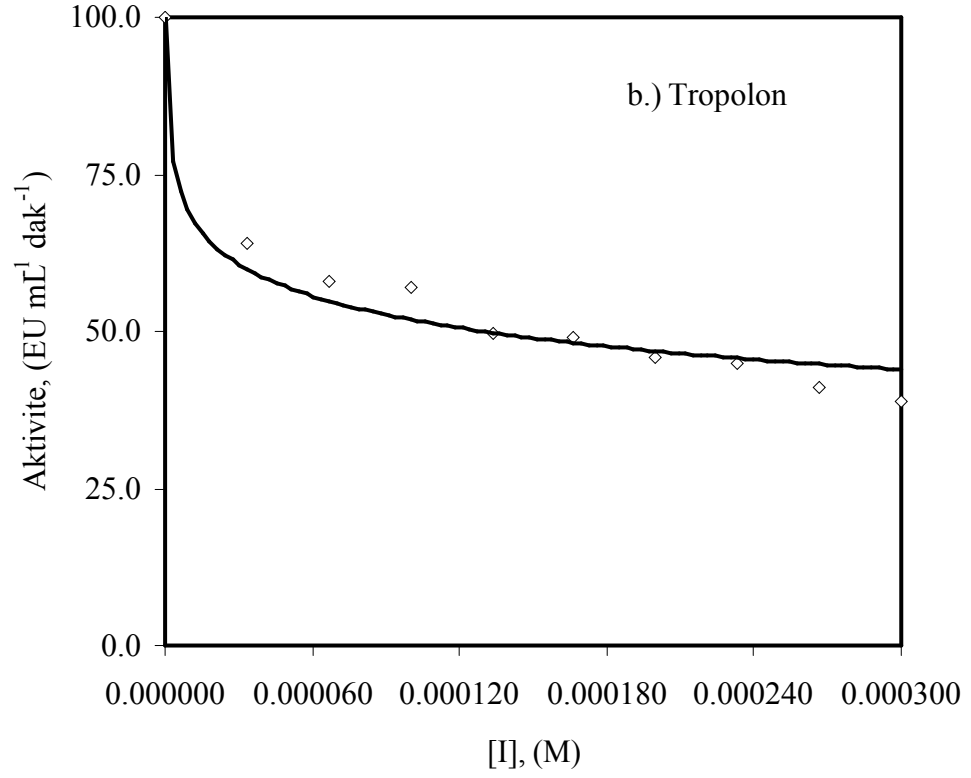
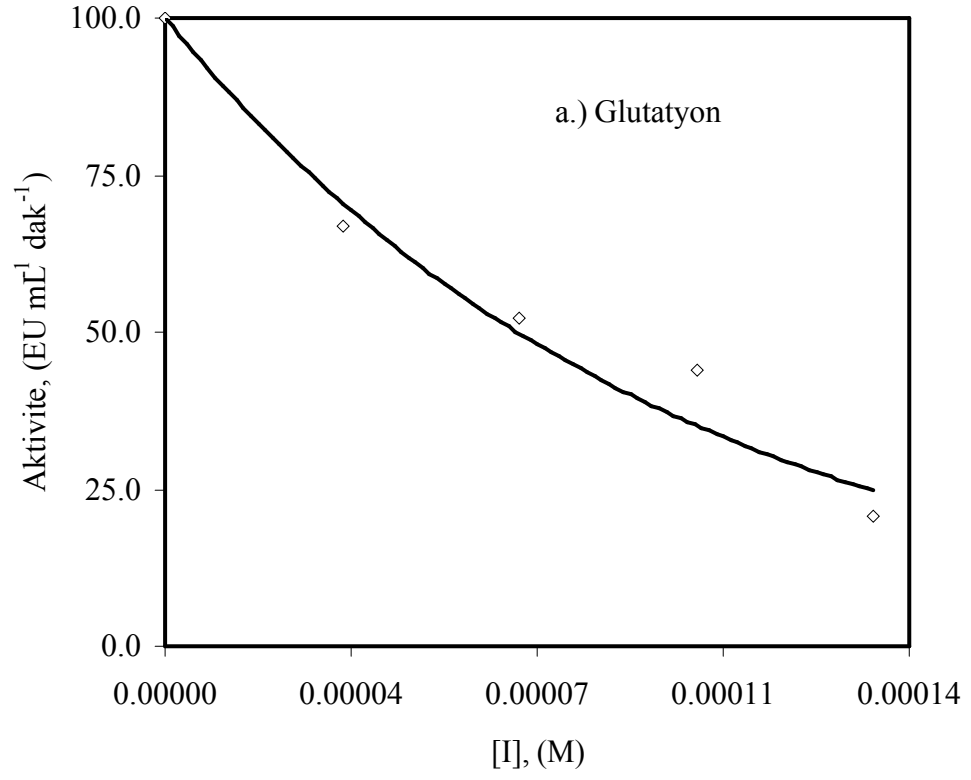
Şekil 3.16 Pirogallol substratı kullanılarak 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile *Lactuca sativa* L. polifenoloksidazının inhibisyonu için $1/V_0-1/[S]$ eğrileri

3.7 I₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

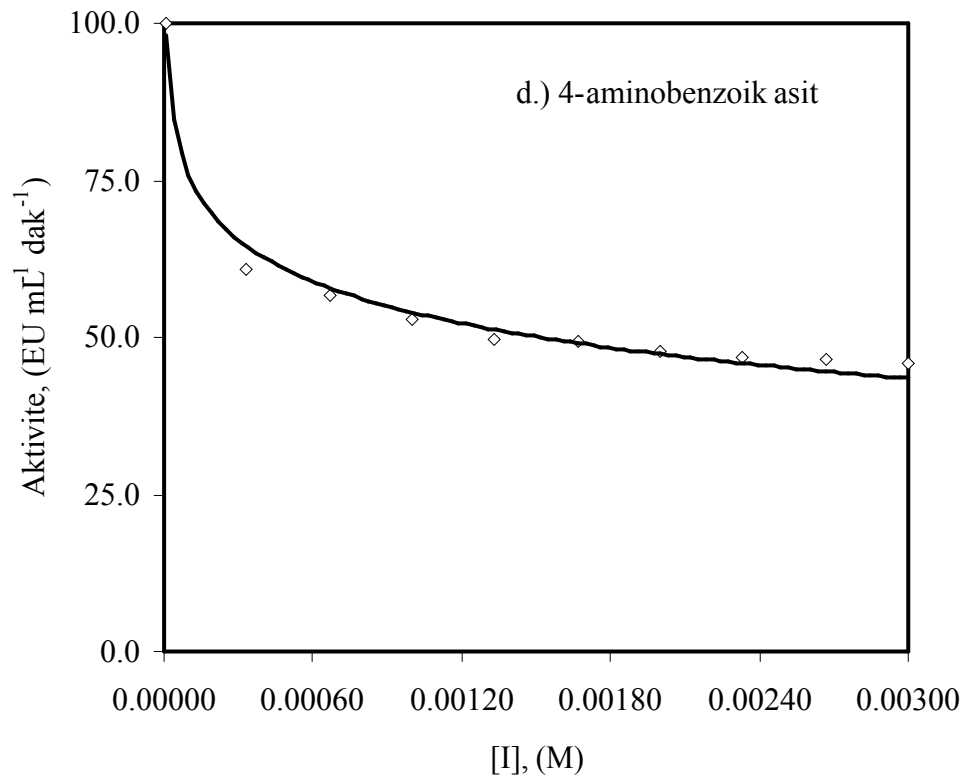
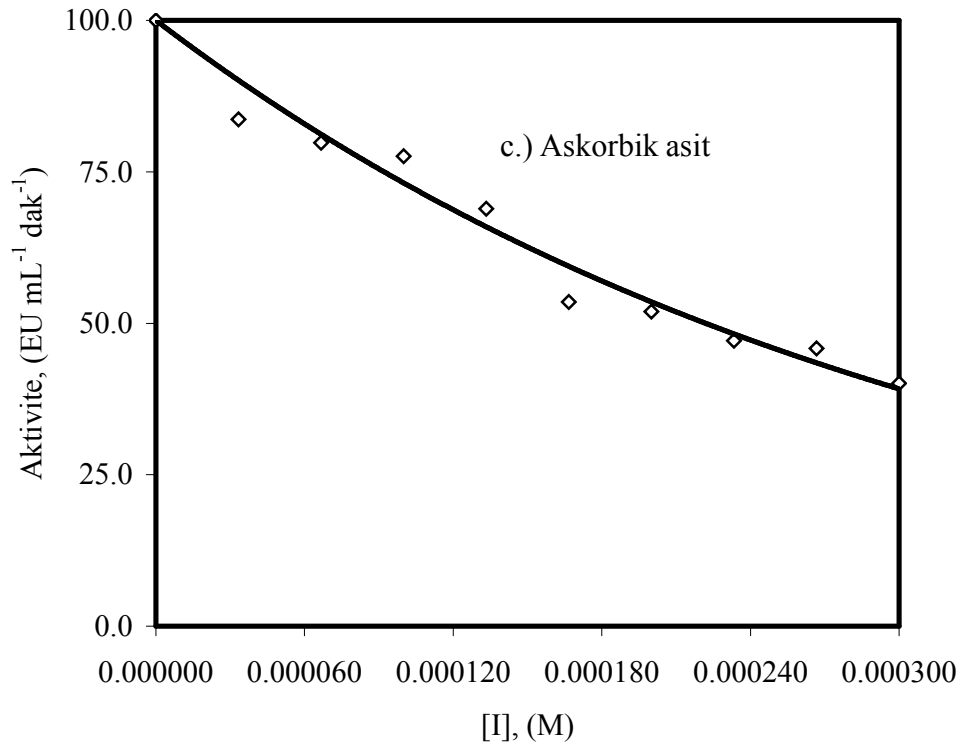
Polifenoloksidazın askorbik asit, tropolon, glutatyon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri ile I₅₀ değerini tayin etmek için 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlar olarak kullanıldı. Elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.17-3.19'da verilmektedir. Şekil 3.17 ve 3.19'dan görüldüğü gibi inhibitör konsantrasyonunun yüzde inhibisyona karşı çizilen grafiklerinin eğrilerinin denklemlerinden I₅₀ değerleri tayin edildi.

Çizelge 3.17 Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% İnhibisyon
Glutasyon	0,000000	1675	100,0
	0,000030	1121	66,9
	0,000070	877	52,4
	0,000100	736	43,9
	0,000130	346	20,7
Tropolon	0,000000	1838	100,0
	0,000033	1174	63,9
	0,000067	1067	58,1
	0,000100	1049	57,1
	0,000133	913	49,7
	0,000167	901	49,0
	0,000200	844	45,9
	0,000233	823	44,8
	0,000267	754	41,0
	0,000300	714	38,8
Askorbik asit	0,000000	3120	100,0
	0,000033	2610	83,7
	0,000067	2490	79,8
	0,000100	2420	77,6
	0,000133	2150	68,9
	0,000167	1670	53,5
	0,000200	1620	51,9
	0,000233	1470	47,1
	0,000267	1430	45,8
	0,000300	1250	40,1
4-aminobenzoik asit	0,000010	2757	100,0
	0,000333	1676	60,8
	0,000667	1564	56,7
	0,001000	1457	52,8
	0,001333	1372	49,8
	0,001667	1357	49,2
	0,002000	1313	47,6
	0,002333	1290	46,8
	0,002667	1280	46,4
	0,003000	1260	45,7



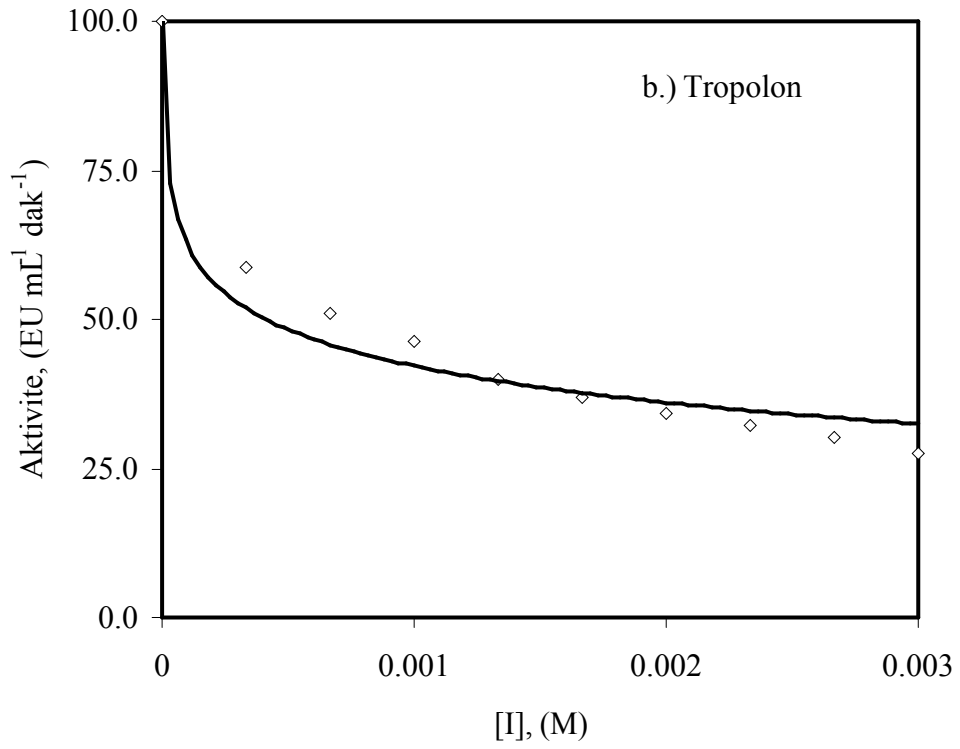
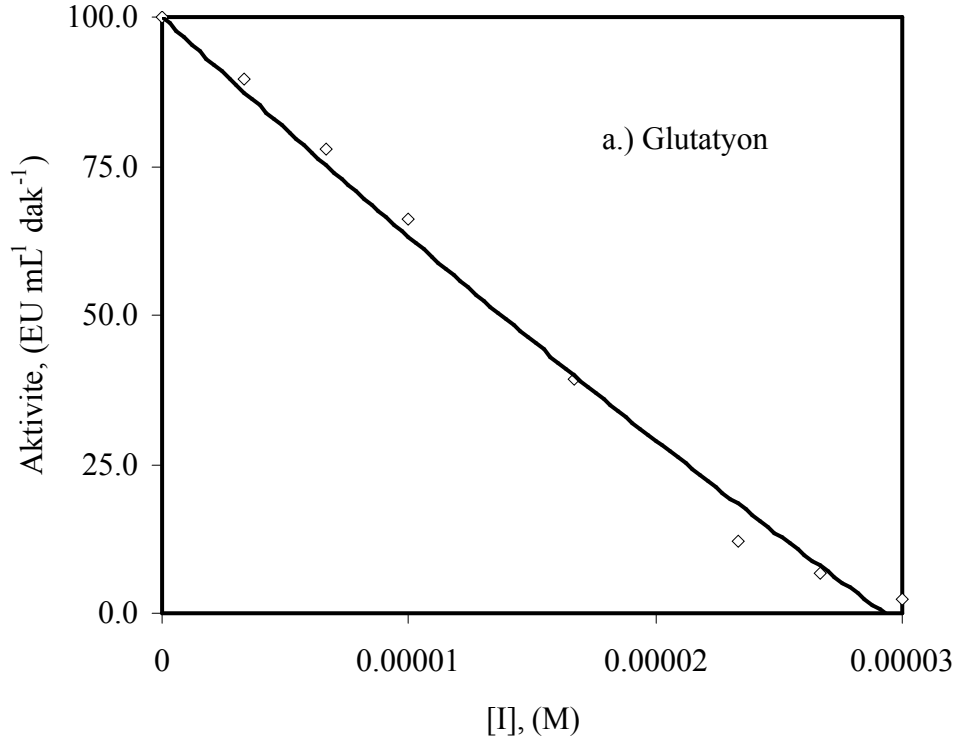
Şekil 3.17 Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler



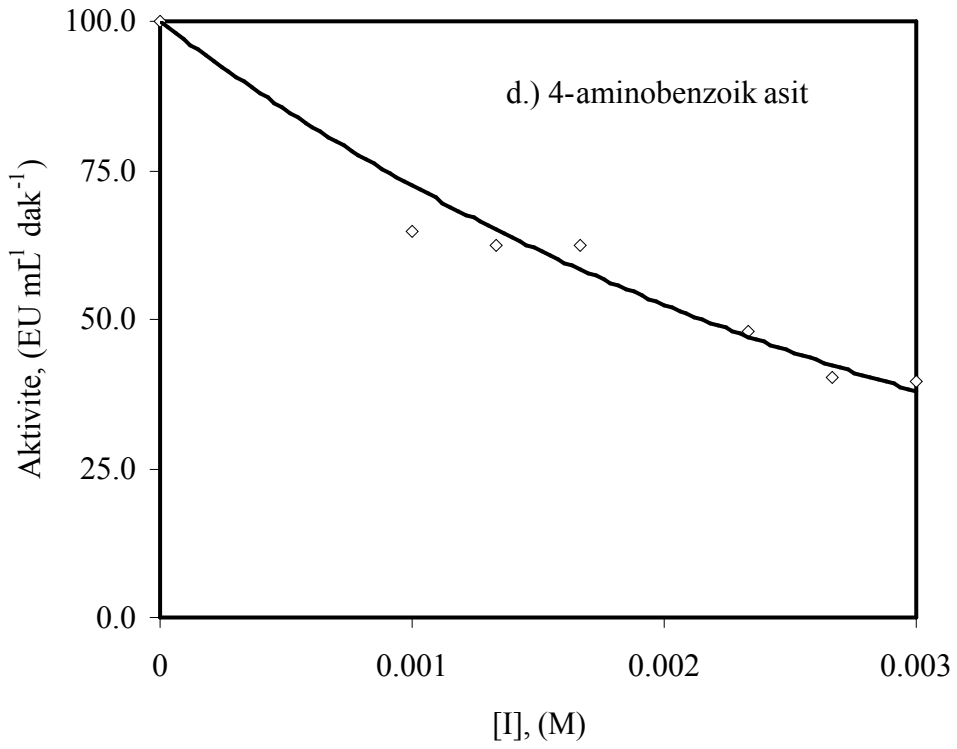
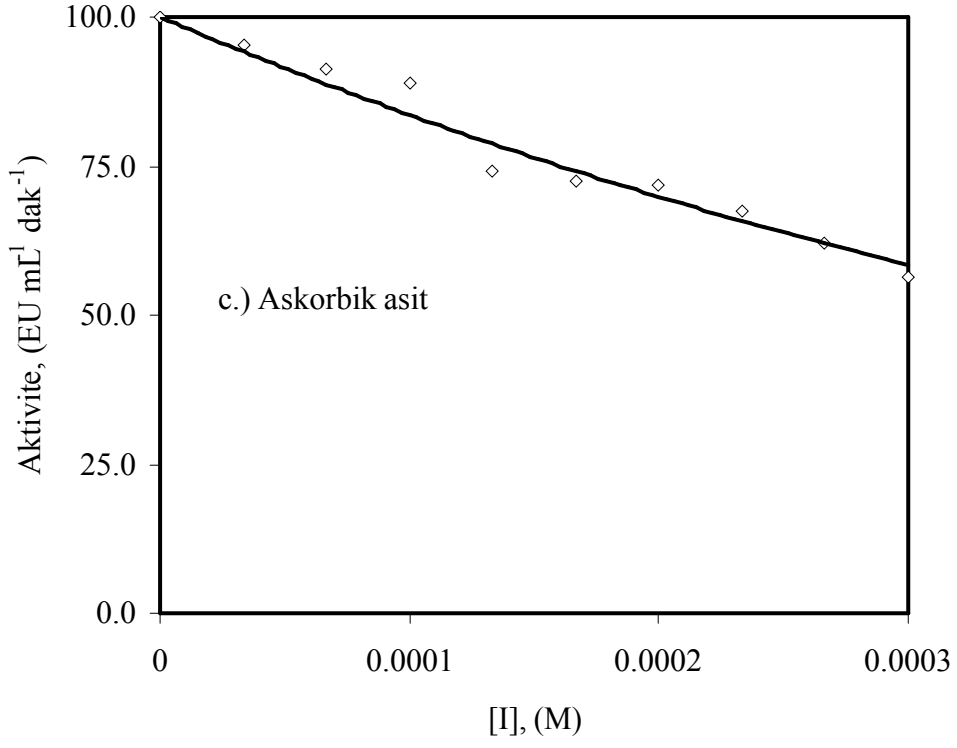
Şekil 3.17'nin devamı

Çizelge 3.18 Bir substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% İnhibisyon
Glutasyon	0,000000	1610	100,0
	0,000003	1445	89,8
	0,000007	1253	77,8
	0,000010	1066	66,2
	0,000017	630	39,1
	0,000023	196	12,2
	0,000027	107	6,6
	0,000030	37	2,3
Tropolon	0,000001	3155	100,0
	0,000333	1851	58,7
	0,000667	1614	51,2
	0,001000	1461	46,3
	0,001333	1261	40,0
	0,001667	1166	37,0
	0,002000	1075	34,1
	0,002333	1019	32,3
	0,002667	952	30,2
	0,003000	870	27,6
Askorbik asit	0,000000	2199	100,0
	0,000033	2099	95,5
	0,000067	2009	91,4
	0,000100	1952	88,8
	0,000133	1634	74,3
	0,000167	1596	72,6
	0,000200	1581	71,9
	0,000233	1483	67,4
	0,000267	1368	62,2
	0,000300	1242	56,5
4-aminobenzoik asit	0,000001	2186	100,0
	0,001000	1415	64,7
	0,001333	1362	62,3
	0,001667	1362	62,3
	0,002333	1052	48,1
	0,002667	882	40,3
	0,003000	869	39,8



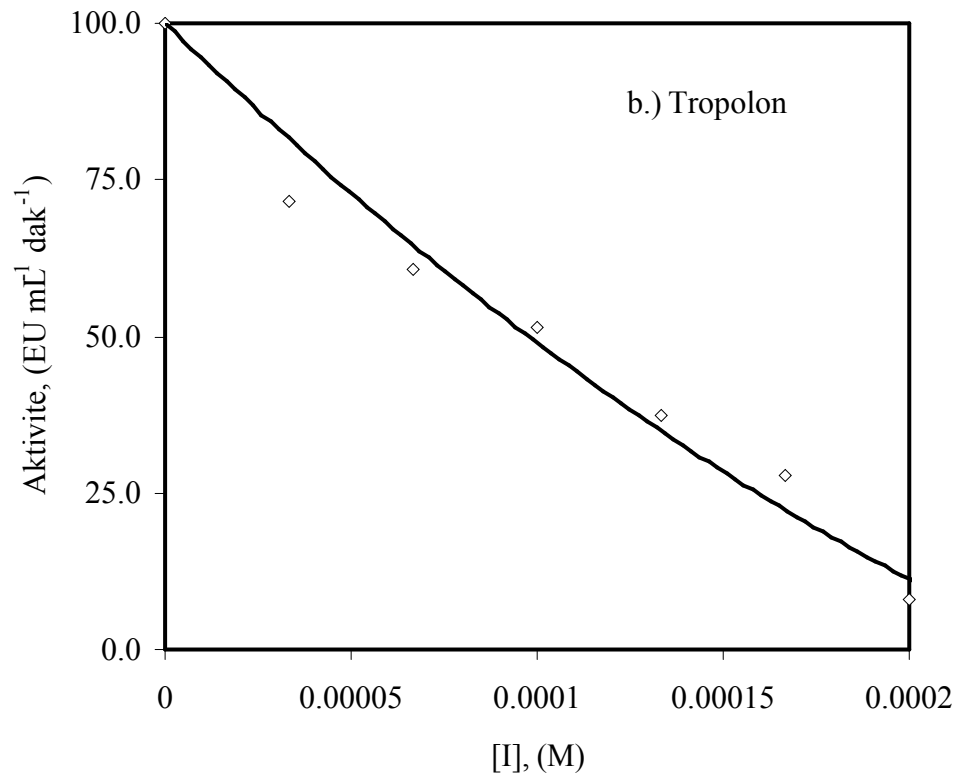
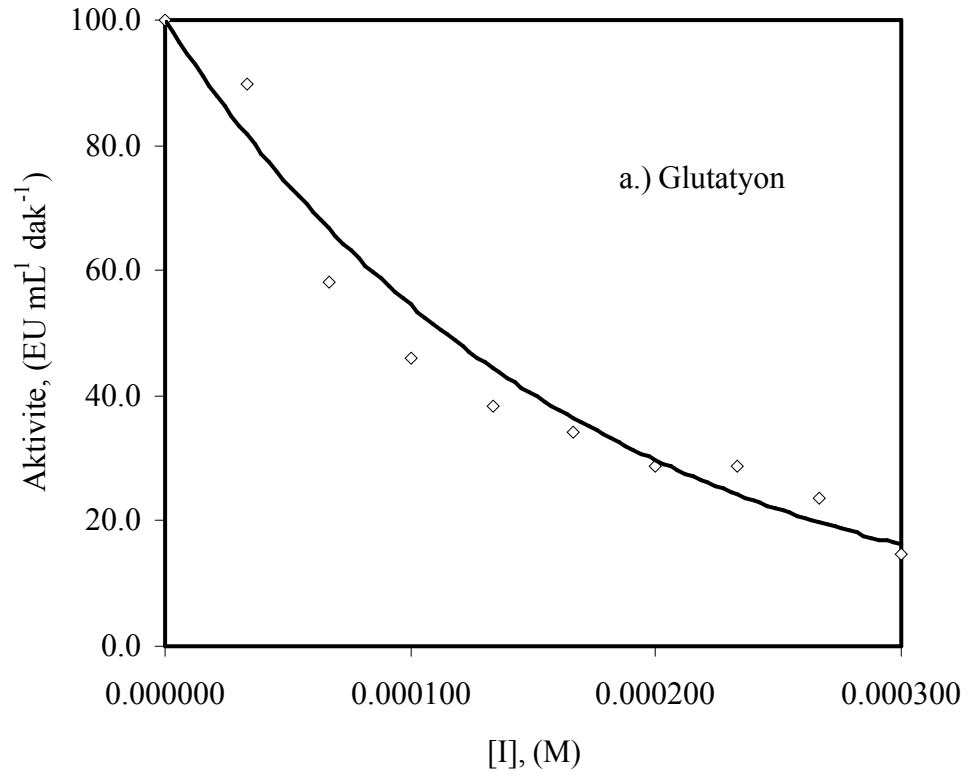
Şekil 3.18 Bir substrat olarak katekol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler



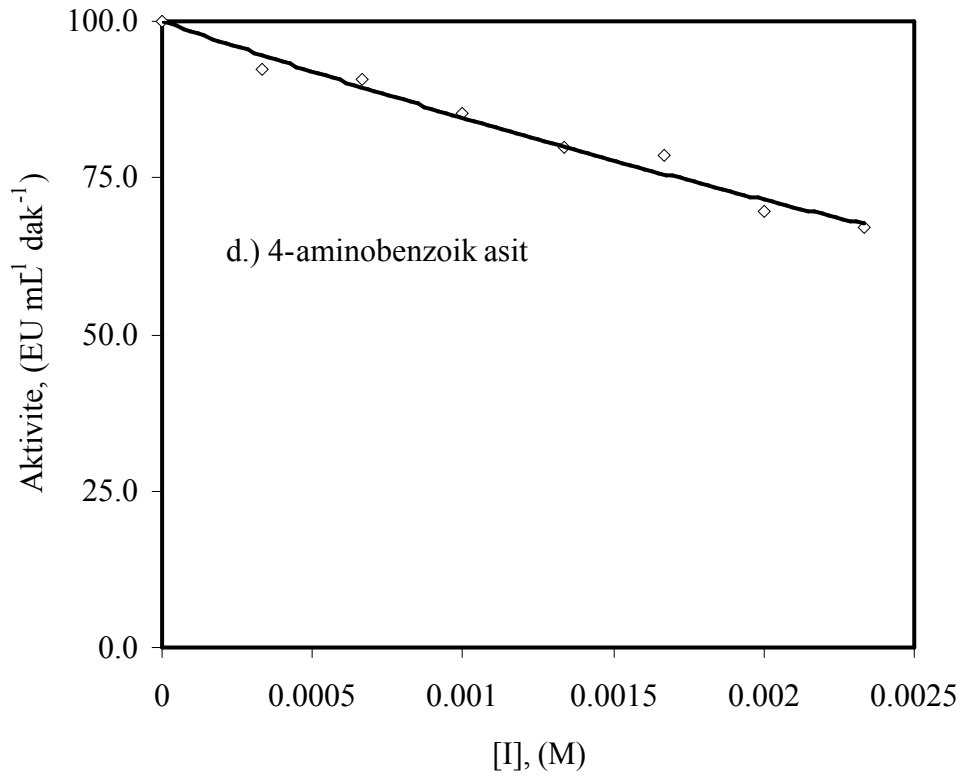
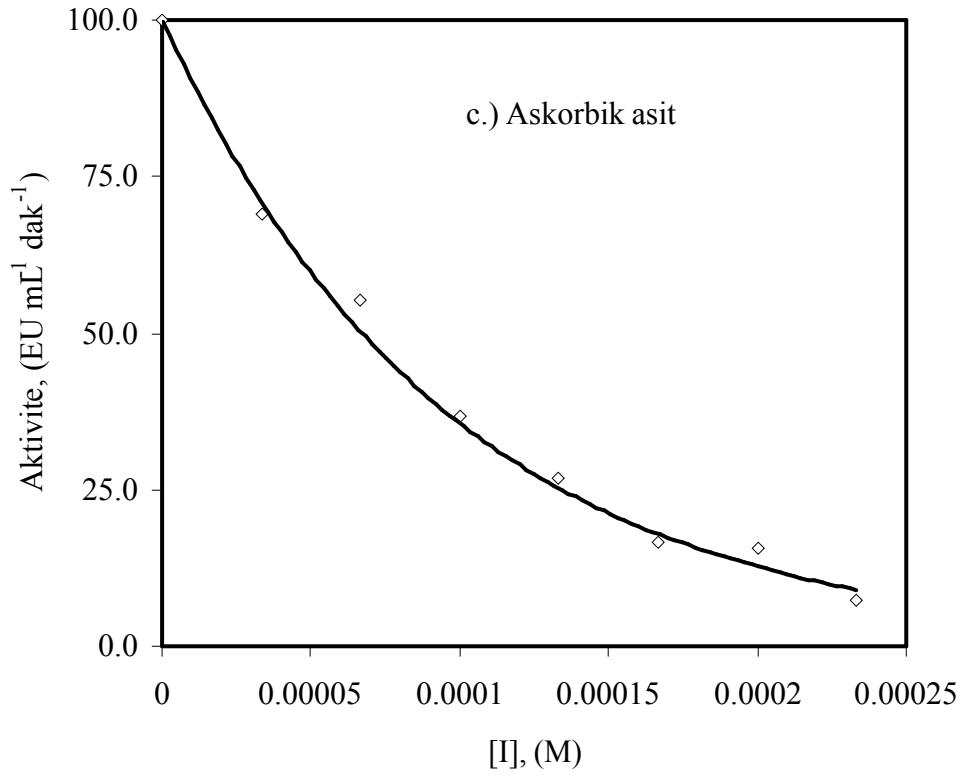
Şekil 3.18'in devamı

Çizelge 3.19 Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında polifenoloksidazın çalışmada kullanılan inhibitörlerle elde edilmiş yüzde inhibisyon değerleri

İnhibitör	[I] (M)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹ dak ⁻¹)	% İnhibisyon
Glutatyon	0,000000	7435	100,0
	0,000033	6665	89,6
	0,000067	4323	58,1
	0,000100	3418	46,0
	0,000133	2859	38,5
	0,000167	2545	34,2
	0,000200	2149	28,9
	0,000233	2148	28,9
	0,000267	1767	23,8
	0,000300	1081	14,5
Tropolon	0,000000	5276	100,0
	0,000033	3784	71,7
	0,000067	3202	60,7
	0,000100	2718	51,5
	0,000133	1980	37,5
	0,000167	1470	27,9
	0,000200	416	7,9
	0,000233	15	0,3
Askorbik asit	0,000000	6428	100,0
	0,000033	4426	68,9
	0,000067	3543	55,1
	0,000100	2368	36,8
	0,000133	1725	26,8
	0,000167	1077	16,8
	0,000200	1009	15,7
	0,000233	472	7,3
4-aminobenzoik asit	0,000000	5122	100,0
	0,000333	4732	92,4
	0,000667	4652	90,8
	0,001000	4377	85,5
	0,001333	4083	79,7
	0,001667	4020	78,5
	0,002000	3573	69,8
	0,002333	3433	67,0



Şekil 3.19 Bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında polifenoloksidazın çeşitli inhibitör konsantrasyonu ile yüzde inhibisyonunu gösteren grafikler



Şekil 3.19'un devamı

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Toplam Fenolik Madde ve Protein İçeriği

Fenolik bileşikler bitkilerde geniş dağılım gösteren, sebze ve meyvelerde renk ve lezzet oluşumuna katkıda bulunan bileşiklerdir[60]. Koyu renkli sebze ve meyvelerde karotenoidler, antosiyaninler ve flavonoidler fenolik madde kaynaklarıdır. Bu bileşikler bitkilerde turuncu, kırmızı ve mavi renklerin oluşumunda görevlidirler[61]. Meyvelerde kabuğun kararmasında ve total fenolik madde içeriği arasında yüksek ilişki olduğu bilinmektedir[62]. Bu bileşikler hücre duvarının yapısallaşmasında rol oynadıkları gibi (örneğin; ligninleşme) biyotik ve abiyotik stres durumlarında, yüksek ışık zararı, UV radyasyon, patojen hücumu, besin eksikliği, düşük sıcaklık, mekaniksel zararlarda bitkilerde savunma görevini de üstlenirler[63].

Fenolik bileşikler, lipid serbest radikallerinin inaktivasyonunu ya da hidroperoksitlerin serbest radikallere dekompozisyonunu önleyerek antioksidan aktivite sergiledikleri için çok önemli bitki bileşenleridir. Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Antioksidanlar, oksidasyon prosesinin farklı devrelerindeki koruyucu özelliklerinden dolayı iki sınıfa ayrılırlar. Primer antioksidanlar, serbest radikalleri daha kararlı olan ürünlere çevirerek oksidasyonu geciktirirler ya da inhibe ederler. Sekonder antioksidanlar metal iyonlarını bağlayarak, oksijeni yakalayarak, hidroperoksitleri non-radikal türlere dönüştürerek, UV radyasyonunu yakalayarak ya da tek elektronlu oksijeni inaktive ederek antioksidan fonksiyonlarını yerine getirirler[60]. Birçok bitkinin fenolik bileşikleri çalışılmıştır [61,66]. Örneğin *Antidesma velutinum* Tulas., *Cleistocalyx operculatus* var. *Paniala* (Roxb. ve Eugenia Craib.) bitkilerinin tohumlarının toplam fenolik madde miktarının oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir (123-180 mg GAE/g). *Hydrolea zeylanica*., *Lasia spinosa* v e *Limnocharis flava*'nın soğanlarında ise toplam fenolik madde miktarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. (5-7mg GAE/g)[60].

Lactuca sativa L.'nin fenolik madde miktarı bize *Lactuca sativa* L.'nin antioksidan kapasitesi hakkında da bilgi vermektedir. *Lactuca sativa* L.'nin de toplam fenolik madde içeriği 100 g taze bitki ağırlığı başına 304 mg olarak bulunmuştur. Toplam fenolik madde içeriği bitki çeşitlerine göre, sert iklimsel koşullara göre değişiklik göstermektedir. Aseteraceae familyasının toplam fenolik madde içeriğinin diğer familyalara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir[62]. Enzimatik kararma ile fenolik madde içeriği arasındaki ilişki çok sayıda bitkilerle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda toplam fenolik madde içeriğinin elma ve üzüm gibi bazı meyvelerin kararmasında önemli bir payı olduğu söylenebilir[22]. 100 g taze bitki ağırlığı başına fenolik madde içeriği dutta 1515.9 mg, doğu eriğinde 668.0 mg, çilekte 363.7 mg, malta eriğinde 199.4 mg, yeşil biberde 206.0 mg, sarı biberde 191.2 mg, kırmızı biberde 180.3 mg, Ceylon ıspanakta 269.0 mg, beyaz soğanda 216 mg, acı kavunda 257.2 mg olarak bulunmuştur[65]. Buna göre *Lactuca sativa* L.'nin fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu söylenebilir.

Lactuca sativa L.'nin toplam protein içeriği asidik bir boya olan Coomassie-Brilliant Blue (CBB) G-250 solüsyonu kullanılarak Bradford metoduna göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır[58]. Toplam protein içeriği aminoasit dizilerine bağlıdır. Serbest amino asit içeriği bitkiden bitkiye göre değişim göstermektedir. Ayrıca protein varlığı ve dağılımı çevresel faktörlere göre de değişim göstermektedir[65]. *Lactuca sativa* L.'nin protein içeriği 494 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bitki hücrelerindeki protein içeriklerinin bitkinin türüne, yaşına, sebze ve meyvelerin olgunluğa bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmektedir[24].

4.2 Optimum pH

pH, enzim aktivitesi için belirleyici bir faktördür ve substratın iyonlaşması ya da amino asit yan zincirlerinin iyonlaşması durumlarında çok önemlidir[66]. Böylece öncelikle her bir substrat için optimum pH belirlenmiştir. PFO'nun pH profili 4.5-9.0 aralığında asetat ve fosfat tamponları kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.2'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılarak marul

PFO'su için optimum pH'ların sırasıyla 6.5, 8.0 ve 7.5 olduğu bulunmuştur. Genellikle, bitkiler nötral pH değerinde optimum pH aktivitesi göstermektedirler[3].

4-metilkatekol substrat olarak kullanıldığında *Ferula* sp. PFO'su için optimum pH'nın 6.0 [38], çilek PFO'su için optimum pH'nın 4.5, patlıcan PFO'su için optimum pH'nın 6.0 olduğu bulunmuştur[24]. 4-metil katekol substrat olarak kullanıldığında optimum pH'nın düşük çıkmasının sebebi asit şoku ile indüklemiş olan daha yüksek enzim aktivitesinin bir sonucu olarak düşünülebilir. Benzer sonuçlar pancar, kiraz ve patates yapraklarının PFO'ları için de elde edilmiştir[66]. Katekol substrat olarak kullanıldığında marula meyvesi PFO'su için optimum pH'nın 7.0 [51], Anamur muz PFO'su için optimum pH'nın 5.5 ve 7.0 [50] *Ferula* sp. bitkisi PFO'sunun optimum pH'sının 7.0 [38], *Allium* sp. PFO'sunun optimum pH'sının 7.5 [67], kivi PFO'sunun optimum pH'sının 7.3 [68], Jerusalem enginar PFO'sunun optimum pH'sının 4.0 [69] olduğu bulunmuştur. *Lactuca sativa* L.'nin optimum pH değeri bu bitkilerden farklılık göstermektedir. Ancak ahududu PFO'sunun optimum pH 8.0 [70] ve *Ocimum basilicum* PFO'sunun optimum pH'sı 8.0 [71] olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar *Lactuca sativa* L. PFO'sunun optimum pH değeri ile benzerlik göstermektedir. Substrat olarak pirogallol kullanıldığında ise Çin lahanası PFO'su için optimum pH'nın 5.0 [72], yabani gül PFO'su için optimum pH'nın 7.0 [73], enginar PFO'su için optimum pH'nın 8.0 [53], *Ocimum basilicum* L. PFO'su için optimum pH'nın 9.0 olduğu belirlenmiştir[71]. Bu PFO'ların optimum pH'ları *Lactuca sativa* L.'nin optimum pH değerlerinden biraz farklılık göstermektedir. Ancak Sago PFO'sunun optimum pH'sı ile aynı optimum pH'yı göstermektedir. Sago PFO'su substrat olarak pirogallol kullanıldığında en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında optimum pH'nın enzimin kaynağına ve kullanılan substratlara bağlı olarak değiştiği söylenebilir[71].

4.3 Optimum Sıcaklık

Şekil 3.3, üç farklı substrat için *Lactuca sativa* L. PFO aktivitesinin sıcaklıkla değişimini göstermektedir. Şekil 3.3'den görüldüğü gibi 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklıkların sırasıyla 30, 40 ve 30⁰C olduğu bulunmuştur. Benzer sonuçlar substratlar olarak 4-metilkatekol ve pirogallol kullanıldığında kahve yaprakları ve endospermi PFO'ları [74] ve *Helianthus tuberosus* PFO'su[69] için; substrat olarak katekol kullanıldığında *Salvia* türleri[37], kekik[3,21], Çin kabağı[72] ve *Cynara scolymus* L.[53] PFO'ları için bulunmuştur. Birçok bitki ve meyve üzerinde yapılan çalışmalarda PFO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 25-30⁰C aralığında olduğu, sıcaklığın 40⁰C'nin üzerine çıkmaya başladığı anda PFO aktivitesinin azalma gösterdiği belirtilmiştir[29,36,75-79]

4.4 Substrat Spesifikliği

Lactuca sativa L.'den elde edilen PFO'nun substratlara bağlı olarak gösterdiği aktiviteyi belirlemek amacı ile L-tirozin gibi monofenolik, katekol ve 4-metilkatekol gibi difenolik ve pirogallol gibi trifenolik substratlar kullanıldı. Maruldan elde edilen PFO'nun bir monofenol olan L-tirozine karşı aktivite göstermezken 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlarına karşı aktivite gösterdiği belirlendi. Bazı bitki polifenoloksidazları hem monofenolaz ve hem de difenolaz aktivitesi göstermektedir. Bununla birlikte pek çok polifenoloksidaz monofenolaz aktivitesi göstermez[80-82]. Domates tohumları[83], *Solanum tuberosum*[83], *Sorghum* taneleri[84], *Averrhoa carambola* L.[39], DeChaunac üzümü[85] polifenoloksidazlarının difenolaz aktivite gösterdiği; çilek[79], Gum arabic[86], elma[87] polifenoloksidazlarının ise trifenolaz aktivitesi gösterdiği yapılan literatür araştırması sonucunda saptanmıştır. Difenolik ve trifenolik substratlar için doygunluk eğrileri *Lactuca sativa* L. PFO'sunun basit Michaelis-Menten eğrileri sergileğini göstermiştir. Michealis-Menten sabitleri olan V_{max} ve K_M değerlerini belirlemek için deneyler, enzimin ilgili substratlarla optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Üç farklı substratın farklı konsantrasyonlarında ölçülmüş olan reaksiyon hızlarından Michealis-Menten sabitlerini (V_{max} ve K_M) belirlemek için Lineweaver-Burk denklemi kullanıldı ve denklemin eğim ve ekstrapolasyonundan V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı. Ayrıca enzimin katalizleme

gücünü gösteren V_{max}/K_M değerleri de hesaplanarak en etkin substratın pirogallol olduğu ve bunu sırasıyla katekol ve 4-metil katekolün izlediği bulundu. Her üç substrat için hesaplanmış Michealis-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 2000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 2,0 mM ve 1000 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; substrat olarak katekol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 2500 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 2,25 mM ve 1111 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında V_{max} , K_M ve V_{max}/K_M değerlerinin sırasıyla 5000 EU mL⁻¹ dak⁻¹, 3,0 mM ve 1667 EU mL⁻¹ dak⁻¹ mM⁻¹ olduğu bulunmuştur. Enzimlerin K_M değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10⁻¹ ile 10⁻⁶ M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir[88]. Bu çalışmada bulunan K_M değerleri 2,00-3,00 mM aralığındadır. Bu çalışmada marul PFO’su için elde edilen K_M değerleri, substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak fesleğen için elde edilmiş 1,62 mM[71], *Annona cherimola* Müll.’den elde edilmiş 1,33 mM[89] değerlerine; substrat olarak katekol kullanılarak çilek için elde edilmiş 2,71 mM[79], değerine; substrat olarak pirogallol kullanılarak Amasya elması için[78] elde edilmiş 3,1mM yali şeftalisi için[90] elde edilmiş 2,6 mM değerlerine oldukça benzerdir. *Lactuca sativa* L. PFO’su için elde edilen K_M değerleri substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak kekik için elde edilen 9,8 mM[21], enginar için elde edilen 11,6 mM[53] değerlerinden; substrat olarak katekol kullanılarak Amasya elması için elde edilen 34 mM[78] elma için elde edilen 180 mM, kekik için elde edilen 18mM[3] kabak için elde edilen 682,5 mM [72] *Annona cherimola* Müll.’den elde edilen 6,25 mM[89], Stanley eriği için elde edilen 20 mM[91] ve Yali şeftalisinden elde edilmiş 5,5 mM[90] değerlerinden ve substrat olarak pirogallol kullanılarak çay yaprağı için elde edilen 17,8 mM[72] Amasya elması için elde edilmiş 27 mM[78] ve ıspanak için elde edilmiş 15,7 mM[92] değerlerinden düşüktür. Katalitik güç olarak isimlendirilen V_{max}/K_M oranı, pirogallolün *Lactuca sativa* L. için en uygun substrat olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1 Maruldan elde edilen polifenoloksidazın substrat spesifikliği

Substratlar	V_{max} (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max}/K_M (EU mL ⁻¹ dak ⁻¹ mM ⁻¹)
4-metilkatekol	2000	2,00	1000
Katekol	2500	2,25	1111
Pirogallol	5000	3,00	1667

4.5 Termal İnaktivasyon

Lactuca sativa L.'den elde edilen polifenoloksidaz için termal inaktivasyon grafikleri Şekil 3.4'de verilmiştir. İnaktivasyon deneylerinde *Lactuca sativa* L. 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 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratları kullanılmıştır ve benzer grafikler elde edilmiştir. Özellikle 4-metilkatekol ve katekol substratları kullanıldığında artan inkübasyon süresine paralel olarak PFO aktivitesinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. *Lactuca sativa* L.'den elde edilen PFO'nun sıcaklığa dayanıklılığının diğer kaynaklardan [85,93] elde edilen PFO'lara göre nispeten daha kararlı olduğu söylenebilir. Isı inaktivasyon çalışması marul PFO'sunun yüksek derecede ısıya dayanıklı enzimler grubuna ait olduğunu göstermiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilmiş PFO'nun ısı denaturasyon çalışmaları 70-90 °C sıcaklıklarına kısa süreli maruz bırakılan PFO aktivitesinin kısmen ya da tamamen inaktivasyona uğradığını göstermiştir. Enzimin ısıya dayanıklılığı meyvenin olgunluğu ile ilişkili olabilir ve bazı durumlarda pH'ya bağlıdır. Buna ek olarak aynı kaynağın farklı moleküler formlarının da farklı termostabiliteye sahip olabilecekleri söylenebilir[93].

4.6 Enzim İnhibisyonu

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler arasında pH, ısı, ışık ve bazı fiziksel faktörler, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, reaksiyon ürünleri, çeşitli iyonların varlığı, hormonlar ve bazı biyokimyasal faktörler ve inhibitörler ya da inhibitör etkisi gösteren bileşikler yer almaktadır. Birçok madde enzimin aktivitesini, substratın enzime bağlanmasını ve/veya enzimin turnover sayısını etkileyerek değiştirir. Bu maddeler modülatör olarak bilinirler. Modülatör bileşikler iki gruba ayrılırlar. Aktivatör adı verilen grup enzimlerin aktivitesini artırırken inhibitörler ise enzimatik tepkimeleri yavaşlatarak veya durdurarak katalizleyen moleküler ajanlardır. Enzimler hemen hemen bütün hücrel süreçleri katalizlerler böylece hücrel sistem kontrol altına alınabilir[94]. Birçok inhibitör yapısal olarak enzimin substratına benzer. İnhibitörler yaygın olarak bir substrat bağ noktasının kimyasal ve konformasyonel doğasını incelemek için de kullanılır[55].

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 [93]. 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[95]. Polifenoloksidaz prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloprotein olduğundan dolayı EDTA ve tropolon gibi metal şelatlayıcı ajanlar ve askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar tarafından inhibe edilebilir. Bu inhibitörlerden bazıları basit olmayan bir etkiyle *o*-kinonları *o*-difenollere indirgerken aynı zamanda enzim üzerinde direk olarak inhibitör etkisiyle ya da renkli bileşik ürünleri veren kinonlarla reaksiyona girerek kimyasal etki gösterirler. Bir çok durumda bir inhibitör için tek bir spesifik mekanizmadan bahsetmek doğru değildir[96].

Çalışmanın bu kısmında inhibitör olarak glutatyon, tropolon, askorbik asit, 4-aminobenzoik asit, benzoik asit ve sodyum azid kullanıldı. PFO'nun bu inhibitörlerle inhibisyonunu incelemek üzere 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol substratlar olarak seçildi. Elde edilen deneysel sonuçlar sodyum azid ve benzoik asitin marul PFO'sunu inhibe etmediğini göstermiştir. Spesifik bir inhibitörle enzimatik kararmanın önlenmesi ya tek bir mekanizmanın ya da iki ve daha fazla inhibitör etki mekanizmasının karşılıklı etkileşiminin bir sonucu olabilir. Enzimlerin etki mekanizmalarını gösteren çeşitli inhibisyon türleri vardır.

4.6.1 Yarışmalı İnhibisyon

Yarışmalı inhibisyon için genel reaksiyon şeması eşitlik (1.4)'de ve Linewaver-Burk denklemi ise eşitlik (1.5)'de verilmişti. (1.5) eşitliğinin eğrisi, eğimi $\alpha K_m / V_{max}$ ve ekstrapolasyonu $1/V_{max}$ olan düz bir doğru verecektir. Çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında yarışmalı bir inhibitör için Linewaver-Burk eğrileri $1/V_0$ eksenindeki $1/V_{max}$ noktasında kesişirler. Diğer inhibisyon türleri ile karşılaştırıldığında çeşitli inhibitör konsantrasyonlarındaki Linewaver-Burk eğrilerinin $1/V_{max}$ 'da kesişmesi yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur[55].

Çizelge 4.2 ve 4.3 sırasıyla 4-metilkatekol ve katekol substratları kullanılarak çeşitli inhibitörler için hesaplanmış K_i değerlerini ve inhibisyon türlerini göstermektedir. Çizelgelerden de görüldüğü gibi substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında glutatyon ve askorbik asit inhibitörleri için; ve substrat olarak katekol kullanıldığında tropolon inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı olduğu bulunmuştur. Bir enzimin bağ noktası için normal bir substrat ile doğrudan yarışan bir madde yarışmalı bir inhibitör olarak bilinir. Böyle bir inhibitör çoğu zaman enzimin substratına benzer. Bu tür inhibisyonda inhibitör enzimin turnover sayısını etkilemez. Spesifik bir inhibitörle enzimatik kararmanın önlenmesi ya tek bir mekanizmanın ya da iki ve daha fazla inhibitör etki mekanizmasının karşılıklı etkileşiminin bir sonucu olabilir. Askorbik asit, enzimatik kararmanın inhibitörü olarak en çok kullanılanlardan biridir. Çünkü gıda ürünlerinin biyolojik değerini artırmaktadır. Oksidatif parçalanmadan gelen antosiyaninlere karşı koruyucu görev yapar ve aynı zamanda

kırmızı meyvelerin renklerinin korunmasında yardımcı olur. Askorbik asidin PFO-polifenol sistemi üzerine etkisi kompleksdir ve kinonların indirgeyicisidir. Kinetik çalışmalar askorbik asidin etkili bir inhibitör olduğunu göstermektedir. Bazı fenollerde olduğu (rezorsinol) gibi PFO'nun yarışmalı inhibisyonu askorbik asitle artırılabilir. Askorbik asit aynı zamanda düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip bileşiklerin yanında pro-oksidant olarak hareket eder. Askorbik asidin yüksek konsantrasyonlarının kararmaya karşı devamlı bir koruyuculuk sağladığı gözlenmiştir kararlı renksiz ürünlere ya da metabisüfit gibi polifenoloksidazın aktif merkezine bağlanmasına atfedilebilir [97,98]. Glutasyon doğrudan enzimi etkilemez ve oksijen ile oksitlenmiş olan fenole bağlı olarak ya uyarılır ya da inhibe edilir[31].

Çizelge 4.2 Substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında maruldan elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve K_i' değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	K_i' (M)	İnhibisyon türleri
Glutasyon	$1,67 \times 10^{-4}$	$5,55 \times 10^{-5}$		Yarışmalı
	$2,33 \times 10^{-4}$	$2,59 \times 10^{-5}$		
	$2,67 \times 10^{-4}$	$2,05 \times 10^{-5}$		
Tropolon	$3,33 \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-5}$	$3,59 \times 10^{-4}$	Karışık
	$1,33 \times 10^{-4}$	$3,14 \times 10^{-5}$	$5,60 \times 10^{-4}$	
	$3,66 \times 10^{-4}$	$4,39 \times 10^{-5}$	$7,87 \times 10^{-4}$	
Askorbik asit	$1,00 \times 10^{-4}$	$8,20 \times 10^{-5}$		Yarışmalı
	$2,00 \times 10^{-4}$	$5,81 \times 10^{-5}$		
	$2,33 \times 10^{-4}$	$6,78 \times 10^{-5}$		
4-aminobenzoik asit	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$	Karışık
	$1,33 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$	$2,66 \times 10^{-4}$	
	$5,67 \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-4}$	

Çizelge 4.3 Substrat olarak katekol kullanıldığında marul elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve K_i' değerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	K_i' (M)	İnhibisyon türleri
Glutatyon	$1,33 \times 10^{-5}$	$4,44 \times 10^{-6}$	$2,66 \times 10^{-5}$	Karışık
	$2,00 \times 10^{-5}$	$2,22 \times 10^{-6}$	$1,33 \times 10^{-5}$	
	$2,33 \times 10^{-5}$	$1,79 \times 10^{-6}$	$0,93 \times 10^{-5}$	
Tropolon	$3,33 \times 10^{-4}$	$4,77 \times 10^{-5}$		Yarışmalı
	$6,67 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-5}$		
	$2,67 \times 10^{-3}$	$6,86 \times 10^{-5}$		
Askorbik asit	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$5,32 \times 10^{-4}$	Karışık
	$3,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$12,00 \times 10^{-4}$	
	$3,67 \times 10^{-4}$	$4,08 \times 10^{-5}$	$4,89 \times 10^{-4}$	
4-aminobenzoik asit	$3,33 \times 10^{-4}$		$2,33 \times 10^{-3}$	Yarışmasız
	$1,67 \times 10^{-3}$		$5,85 \times 10^{-3}$	
	$5,33 \times 10^{-3}$		$6,22 \times 10^{-3}$	

Bazı yazarlar polifenoloksidaz enzimi için bir substrat olarak 4-metilkatekolü kullandıklarında çeşitli inhibitörler için inhibisyon türünün yarışmalı olduğunu bulmuş olmalarına rağmen literatürde çeşitli kaynaklardan elde edilmiş polifenoloksidazın inhibisyon tür ve derecesinde farklılıklar olduğu da rapor edilmektedir [99-103]. Gunata ve arkadaşları, üzüm polifenoloksidazı için bir substrat olarak 4-metilkatekolü kullanarak sinnamik ve benzoik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı [100]; Doğan ve Doğan, *Thymus* polifenoloksidazı için substratlar olarak 4-metilkatekol, pirogallol ve katekol kullanarak glutatyon inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı; Paul ve Gowda tarla baklası polifenoloksidazı için bir substrat olarak katekol kullanarak tropolon, askorbik asit ve L-sistein inhibitörleri için inhibisyon türünün yarışmalı [104]; ve Robert ve arkadaşları, Palmito polifenoloksidazı için substrat olarak 4-metilkatekolü kullanarak benzoik asit inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmalı olduğunu bulmuşlardır [105]. Yukarıda görüldüğü gibi inhibisyon türü sadece incelenmiş polifenoloksidazın kaynağına değil, aynı zamanda kullanılmış substrata da bağlıdır.

4.6.2 Yarı-yarışmalı İnhibisyon

Yarı-yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil doğrudan enzim substrat kompleksine bağlanır. Böyle bir mekanizma, inhibitör için bağ noktası sadece substratla etkileştiğinde anlaşılabilir. Ayrıca bu kompleks çok kararlı olduğu için ürüne dönüşmez. Yarı-yarışmalı inhibisyon için inaktif kompleksin oluşumu eşitlik (1.7) ve Lineweaver-Burk denklemi ise daha önce (1.8) eşitliği ile verilmişti. Yarı-yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisi eğimi K_M/V_{max} ve ekstrapolasyonu α'/V_{max} olan düz bir doğru verir. Çeşitli yarı-yarışmalı inhibitör konsantrasyonlarında bir seri Lineweaver-Burk eğrileri birbirine paralel doğrulardan meydana gelir. Bu yarı-yarışmalı inhibisyon için özel bir durumdur. Yarı-yarışmalı inhibisyonda, inhibitör enzimin katalitik fonksiyonunu etkiler ancak substrata bağlanmasını etkilemez[55].

Çizelge 4.4 ve Şekil 3.15 ve 16'dan görüldüğü gibi substrat olarak pirogallol kullanıldığında tropolon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörü ile polifenol oksidazın inhibisyonunun yarı-yarışmalı olduğunu bulduk. Arslan ve arkadaşları substrat olarak katekol kullanarak p-aminobenzen sulfonamid ve sulfosalisalik asit inhibitörleri için inhibisyon türünün yarı-yarışmalı olduğunu buldular[49]. Ayrıca mantar polifenol oksidazı için substrat olarak L-tirozin ve L-DOPA kullanıldığında agartinin yarı-yarışmalı inhibisyon sergilediği bulunmuştur. Yine mantar polifenol oksidazı için substrat olarak katekol ve pirogallol kullanıldığında 2,3-diaminopropionik asidin yarı-yarışmalı bir inhibisyon sergilediği Arslan ve Doğan tarafından bulunmuştur[57].

Çizelge 4.4 Substrat olarak pirogallol kullanıldığında maruldan elde edilen polifenoloksidazın inhibisyon tipi, K_i ve de K_i' gerleri

İnhibitörler	[I] (M)	K_i (M)	K_i' (M)	İnhibisyon türleri
Glutasyon	$1,67 \times 10^{-4}$		$8,35 \times 10^{-5}$	Yarışmasız
	$2,67 \times 10^{-4}$		$8,90 \times 10^{-5}$	
	$3,67 \times 10^{-4}$		$7,34 \times 10^{-5}$	
Tropolon	$1,00 \times 10^{-4}$		$0,44 \times 10^{-5}$	Yarı-yarışmalı
	$1,33 \times 10^{-4}$		$1,96 \times 10^{-4}$	
	$1,67 \times 10^{-4}$		$6,60 \times 10^{-4}$	
Askorbik asit	$6,67 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-4}$	Karışık
	$1,00 \times 10^{-4}$	$0,82 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-4}$	
	$1,33 \times 10^{-4}$	$5,70 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-4}$	
4-aminobenzoik asit	$3,67 \times 10^{-3}$		$7,59 \times 10^{-3}$	Yarı-yarışmalı
	$4,33 \times 10^{-3}$		$10,90 \times 10^{-3}$	
	$5,00 \times 10^{-3}$		$20,00 \times 10^{-3}$	

4.6.3 Karışık 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.

Şekil 3.7, 3.8 ve Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında tropolon ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri için; substrat olarak katekol kullanıldığında glutasyon ve askorbik asit inhibitörleri için; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında askorbik asit inhibitörü için inhibisyon türünün karışık tip inhibisyon olduğu belirlendi. Bu tür inhibisyonda V_{max} değeri azalırken K_M değeri artar[55]. Literatürde incelenmiş polifenoloksidazın kaynağına bağlı olarak inhibisyon

türünün değiştiği belirtilmektedir. Patates PFO'su için sinamik asit inhibitörü ile ve ayrıca patates ve mantar polifenoloksidazları için tropolon inhibitörü ile inhibisyon tipinin karışık tip inhibisyon olduğu bulunmuştur[106,107].

$K_i=K_i'$ ($\alpha=\alpha'$) özel durumu için Lineweaver-Burk eğrileri $1/[S]$ ekseninde kesişirler. Bu durumda inhibisyon türü yarışmasız inhibisyon olarak adlandırılır. (1.10) eşitliği ile elde edilmiş deneysel verilerden K_i ve K_i' değerleri birbirine eşit ise bu tür inhibisyon yarışmasız bir inhibisyon olarak ifade edilir [108]. Çizelge 4.3 ve 4.4'den görüldüğü gibi substrat olarak katekol kullanıldığında 4-aminobenzoik asit inhibitörü için; ve substrat olarak pirogallol kullanıldığında glutatyon inhibitörü için inhibisyon türünün yarışmasız olduğu bulunmuştur. K_i ve K_i' değerlerinin (çizelgelerde K 'nın her iki değeri değil sadece bir değeri gösterilmiştir) birbirine eşit olması inhibisyon türünün yarışmasız bir inhibisyon olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'deki K_i ve K_i' değerlerinden görüldüğü gibi substratlar olarak 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol kullanıldığında marul polifenoloksidazının inhibisyonu için en etkin inhibitörün glutatyon olduğu ve bunu surasıyla tropolon, askorbik asit ve 4-aminobenzoikasidin izlediği bulunmuştur.

4.7 I_{50} Değerleri

Çizelge 4.5, 4-metilkatekol, katekol ve pirogallol substratlar olarak kullanıldığında glutatyon, tropolon, askorbik asit ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I_{50} değerlerini de göstermektedir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi polifenoloksidazın inhibitörlere duyarlılığı substrattan substrata değişmektedir. Bir substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldığında glutatyon, tropolon, askorbik asit ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I_{50} değerleri sırasıyla $1,67 \times 10^{-5}$, $4,13 \times 10^{-4}$, $3,90 \times 10^{-4}$ ve $2,15 \times 10^{-5}$ M; bir substrat olarak katekol kullanıldığında glutatyon, tropolon, askorbik asit ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I_{50} değerleri sırasıyla $6,62 \times 10^{-5}$, $1,30 \times 10^{-5}$, $2,20 \times 10^{-4}$ ve $1,52 \times 10^{-3}$ M; ve bir substrat olarak pirogallol kullanıldığında glutatyon, tropolon, askorbik asit ve 4-aminobenzoik asit inhibitörleri için elde edilmiş I_{50} değerleri sırasıyla $1,14 \times 10^{-5}$, $1,10 \times 10^{-5}$, $6,72 \times 10^{-5}$ ve $4,13 \times 10^{-3}$ M'dir.

Çizelge 4.5 *Lactuca sativa* L. PFO'nun I₅₀ değerleri

İnhibitörler	Substratlar	[I ₅₀] (M)x10 ⁺⁴	İnhibitörler	Substratlar	[I ₅₀] (M)x10 ⁺⁴
Glutasyon	4-metilkatekol	0,167	Askorbik asit	4-metilkatekol	3,900
	Katekol	0,662		Katekol	2,200
	Pirogallol	1,140		Pirogallol	0,672
Tropolon	4-metilkatekol	4,13	4-aminobenzoik asit	4-metilkatekol	21,500
	Katekol	1,30		Katekol	15,200
	Pirogallol	1,10		Pirogallol	41,300

KAYNAKLAR

- [1] Voet, Donald., Voet, Judith G., Pratt, Charlotte W. Biochemistry, JohnWiley & Sons, Inc., (1999), USA.
- [2] Lee, M-K., Park, I., "Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction product" *Food Chemistry*. **91** (2005), 57-61.
- [3] Dogan, S., and Dogan, M., "Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*)" *Food Chemistry*. **88** (2004), 69-77.
- [4] Soundy, P., Botha, C. C., Crispheat Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Cultivar Evaluation and Response of Transplants to Nitrogen Nutrition, Master Thesis, University of Pretoria etd-Madzivhandila, L L-R (2005).
- [5] Baytop, T. Türkiye’de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. (1999), 289.
- [6] Sayyah, M., Hadidi, N., Kamelinejad, M., "Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats" *Journal of Ethnopharmacology*. **92** (2004), 325-329.
- [7] Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushunoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P., "Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado" *LWT*.(2005).(in press)
- [8] Fujita, S., Tono, T., Kawahara, H., "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce (*Lactuca sativa*)" *J.Sci. Agric.* **55** (1991), 643-651.
- [9] Chazarra, S., Cabanes, J., Escribona, J., García-Carmona, F., "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.)" *J.Agric. Food Chem.* **44** (1996), 984-988.
- [10] Chazarra, S., Cabanes, J., Escribona, J., García-Carmona F., "Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenol oxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) induced by 4- tert- butylcatecol in the presence of SDS" *Biochemicaet Biophysia Acta.* **1339** (1997), 297-303.
- [11] Chazarra, S., Cabanes, J., Escribona, J., Garcia- Carmona, F., "Characterization of Monophoenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Iceberg Lettuce" *J.Agric. Food Chem.* **47** (1999), 1422-1426.
- [12] Chazarra, S., Garsia-Carmona, F., Cabasanés, J., "Evidence for a Tetrameric Form of Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Polyphenol

Oxidase: Purification and Characterization” *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001), 4870-4875

- [13] Choi, Y.-J., Tomás-Barberán, F. A., Saltveit, M. E., “Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to *n*-alcohols” *Postharvest Biology and Technology*. **37** (2005), 47-55.
- [14] Bennet, M. H., Mansfield, J. W., Lewis, M. J., Beale, M. H., “Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.)” *Phytochemistry*. **60** (2002), 255- 261.
- [15] Caspersen, S., Alsanius, B.W., Sundin, P., Jensen, P., “Bacterial amelioration of ferulic acid toxicity to hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.)” *Soil Biology & Biochemistry*. **32** (2000), 1063-1070.
- [16] Bestwick, C. S., Adam, A. L., Puri, N., Mansfield, J.W., “Characterization of and changes to pro- and-anti-oxidant enzyme activities during the hypersensitive reaction in lettuce (*Lactuca sativa* L.)” *Plant Science*. **161** (2001), 497 -506.
- [17] Xue, T. L., Hartikainen, H., “Association of antioxidative enzyme with synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth” *Agr. Food Sci. Finland*, **9** (2002), 177-186.
- [18] Ruiz Lozano, J. M., Azcon, R., Palma, J. M., “Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress” *New Phytol.* **134** (1996), 327-333.
- [19] Tamura, H., Akioka, T., Ueno, K., Chujo, T., Okazaki, K., King, P. J., Robinson, E. W., “Anti-human immunodeficiency virus activity of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves” *Molecular Nutrition & Food Research*. **50(4-5)** (2006), 396-400
- [20] Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X., “The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco” *Acta Biochimica Polonica*. **49(4)** (2002), 1029-1035.
- [21] Doğan, S., Doğan M., Arslan, O., “Characterization of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* var. *subisophyllus*)” *Advances in Food Science*. **25(2)** (2003), 56-64.
- [22] 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.
- [23] Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Alkan, M., “Inhibition of Polyphenol

Oxidase by Glutamic Acid” *Process Biochemistry* .(2006) (in press)

- [24] Ertürk, H., *Cynara scolymus* L. Bitkisinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Temmuz, (2004).
- [25] 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), 35.
- [26] Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J. C., “Suppression of polyphenol oxidase increases stress tolerance in tomato” *Plant Science*. **167** (2004), 693-703.
- [27] Oynan, M., Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Ve Yenedünya (*Eriobotrya japonica*) Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Aralık, (2000), 27.
- [28] Keskin, H., Erkmen, G. Besin Kimyası. T.C..İstanbul Üniversitesi Sıra no:3450, Mühendislik Fakültesi No:72. Güryay Matbaacılık Tic. Lmt. Şti., İstanbul, (1987), 270-274.
- [29] Keleş, F., “Amasya ve Golden Elmalarının Polifenol Oksidazları Üzerine Araştırmalar I Genel Özellikler” *Doğa D2*, **10(2)** (1986), 224-234.
- [30] Carbonara, M., Mattera, M., “Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Williams)” *Food Chem.* **72** (2001), 419-424.
- [31] Lee, C.Y., Withaker, J. R., “Enzymatic Browning and Its Prevention” *American Chemical Society*, Washington, DC, (1995).
- [32] Khan, A. A., Akhtar, S., Husain, Q., “Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*)” *Journal of Molecular Catalysis*. **40** (2006), 58-63.
- [33] Mayende, L., Wilhelmi, B. S., Pletschke, B. I., “Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Basillus* spp. isolated from compost” *Soil Biology & Biochemistry* . (2006).(in press)
- [34] Matsui, K. N., Granado, L. M., Oliveria de, P.V., Tadini, C. C., “Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions” *LWT*. (2006). (in press)

- [35] Martinez, E., Duvnjak, Z., “Enzymatic degradation of chologenic acid using a polyphenol oxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* ATCC 42530” *Process Biochemistry*. **41** (2006),1835-1841.
- [36] Dogan, M., Arslan,O., Dogan, S., “Substrat specificity , heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars.” *International Journal of Food Science and Technology*. **37** (2002), 415-423.
- [37] Gündoğmaz, G., Doğan,S., Arslan, O., “Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from *Varius Salvia* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller” *Food Sci. Tech. Int.* **9(4)** (2003), 309-315.
- [38] Erat, M., Sakıroglu, H., Kuhrevioglu,I. O., “Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp.” *Food Chemistry*. **95** (2006), 503-508.
- [39] 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.
- [40] Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M., “ Charecterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape” *Food Chemistry*. (2006). (in press)
- [41] Doğan, S., Arslan, O., Özen, F., “ Polyphenol oxidase activity of *oregano* of different stages” *Food Chemistry*. **91** (2005), 341-345.
- [42] Xu, J., “The effect of low-tempereture storage on the activity of polyphenol oxidase in *Castenea henryi chesnuts*” *Postharvest Biology and Technology*. **38** (2005), 91-98.
- [43] Yildiz, H., B., Toppare, L., Gursel, Y. H., Yagci, Y., “Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines electrodes” *Enzyme and Microbial Technology*. (2006). (in press).
- [44] Büyükbayram, A. E., Kıralp, S., Toppare, L., Yagci, Y., “Preparation of biosensors by immobilition of polyphenol oxidase in cunducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine” *Biochemistry*. **69** (2006), 164-171.
- [45] Marusek , C. M., Trobaugh , N. M., Flurkey, W. H., Inlow, J. K., “Comparative analysis of polypheol oxidase from plant and fungal species” *Journal of Inorganic Biochemistry*. **100** (2006), 108-123.
- [46] Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z., “Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to

- supercritical carbon dioxide” *Food Chemistry*. (2006). (in press)
- [47] Alvarez-Parrilla , E., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vázquez-Folares, A., Gonzáles-Arguilar, G. A., “Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ)” *Food Chemistry*. (2006). (in press)
- [48] Maki, H., Morohashi, Y., “Development of polyphenol oxidase activity in the microplular endosperm of tomato seeds” *Journal of Plant Physiology*. **163** (2006), 1-10.
- [49] Arslan, O., Erzenigin, M., Sinan, S., Ozensoy, O., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties” *Food Chemistry*. **88** (2004), 479-484.
- [50] Ünal, M. Ü., “Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*)” *Food Chemistry*. (2005). (in press)
- [51] Mdluli, K.M., “Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra)” *Food Chemistry*. **92** (2005), 311-323.
- [52] Mazetić , B., Tomaž ič, I., Škvarč, A., Trebše, P., “Determination of Polyphenols in White Grape Berries cv.Rebula” *Acta Chím.Slov.* **53** , (2006), 58-64
- [53] Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O., “Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase From Artichoke (*Cynara scolymus* L.)” *J.Agric. Food Chem.* **5** (2005), 776-785.
- [54] Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S., del Valle, M., “Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis” *Biosensors and Bioelectronics*. **20** (2005), 1668-1673.
- [55] Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., US, (2003).
- [56] Panskul, N., Leelasert, B., Rakariyatham , N., “Effect of L- Cysteine Potassium metabisulfite, Ascorbic Acid and Citric Acid on Inhibition of Enzymatic Browning in Longon” *Chiang Mai J. Sci.* **33(1)** (2006), 137-141.
- [57] Arslan, O., and Doğan S., “Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid” *Journal of the Science of Food and Agricultural*. **85** (2005), 1499-1504.

- [58] Bradford, M. A., “Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” *Anal. Biochem.* **72** (1976), 248-254.
- [59] Singleton, V. L., and Rossi, J. A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.” *American Journal of Enology.* **16** (1965), 144- 145.
- [60] Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R., “Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants”, *Food Chemistry*.(2006). (in press)
- [61] Pokorny, J., Antioxidants in Food: Practical Applications, Yanishlieva, N., & Gordon (Eds) M. H., Intraduction Cambridge : Woodhead publishing Limited.(2001) (pp. 1-3).
- [62] Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., Tawata, S., “Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt.& R. M Sm. leaves exposed to copper sulphate” *Environmental and Experimental Botany.* (2006). (in press)
- [63] 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.* **97** (2006), 654-660.
- [64] Vasantha Rupasinghe, H. P., Jayasankar, S., Lay, W., “Variation in total phenolic and antioxidant capacity among European plum genotypes” *Scientia Horticulturae.* **108** (2006), 243-246.
- [65] 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). (in press)
- [66] Onsa, G. H., bin Sari, N., Selamat, J., Bakar, J., “Latent Polyphenol Oxidases from Sago log (*Metroxylon sagu*) : Partial Purification, Activation and Some Properties” *J.Agric. Food Chem.* **48 (10)** (2000), 5041-5045.
- [67] Arslan, O., Temur, A.& Tozlu, I., “Polyphenol oxidase from *Allium* sp.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** (1997), 2861-2863.
- [68] Park, E.Y.,& Luh, B. S., “Polyphenol oxidase of kiwi fruit” *Journal of Food Science.* **50** (1985), 678.
- [69] Ziyen, E., Pekyardımcı, Ş., “Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*)” *Turk. J. Chem.* **27** (2003), 217-225.

- [70] Gonzales, E. M., Ancos, B. & Cano, M. P., "Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47** (1999), 4068.
- [71] Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M., "Characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase" *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005), 10224-10230.
- [72] Hadler, J., Tamuli, P., & Bhaduri, A. N., "Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf" *Journal of Nutritional Biochemistry*. **9** (1998), 75.
- [73] Sakiroglu, H., Küfrevioğlu, I. Ö., Kocacaliskan, I., Oktay, M., Onganer, Y., "Purification and characterization of Dog-rose (*Rose dumalis* Rechts.) polyphenol oxidase." *J. Agric. Food Chem.* **44** (2002), 2982-2986.
- [74] Mazzafera, P., Robinson S., P., "Characterization of polyphenoloxidase in coffee" *Phytochemistry*. **55** (2000), 285-296.
- [75] Şakiroğlu, H., Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenoloksidaz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, Nisan (1994).
- [76] Arslan, O., and Tozlu, İ., "Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from *Anethum graveolens* L." *Ital. J. Food Sci.* **9** (1997), 249-253.
- [77] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., "Polyphenol oxidase from Malatya apricot." *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998), 1239-1241.
- [78] Oktay, M., Küfrevioğlu, İ., Kocaçalışkan, İ., & Şakiroğlu, H., "Polyphenol oxidase from Amasya apple." *Journal of Food Science*. **60** (1995), 1.
- [79] Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M. W. "Strawberry Polyphenoloxidase : Extraction and Partial Characterization" *Journal of Food Science*. **55** (1990), 1320.
- [80] Benjamin, N. D., Montgomery, M. W., *J. Food Sci.* **38** (1973), 799.
- [81] Anosike, E. O., Ayacbene, A. O., *Phytochemistry* **20** (1981), 2625.
- [82] Rivas, N. J., Whitaker, J. R., *Plant Physiol* **52** (1973), 501.
- [83] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., and Tumer, N., "Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenol oxidase" *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001), 652-657.

- [84] 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.* **50(13)** (2002), 3780-3788.
- [85] Lee, C. Y., Smith, N. L., and Pennesi, A. P., "Polyphenoloxidase from DeChanunac Grapes" *J. Sci. Food Agric.* **34** (1983), 987-991.
- [86] Billaud, C., Lecornu, D., Nicolas, J., "Substrates and Carboxylic Acid Inhibitors of Partially Purified Polyphenol Oxidase from Gum Arabic" *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996), 1668-1675.
- [87] Javovitz-Klapp, A., Richard, F., and Nicolas, J., "Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties" *Phytochemistry.* **28** (1989), 2903-2907.
- [88] Keha, E., ve Küfrevioğlu, İ., "Biyokimya" pp.97-147, Şafak Yayınevi, Erzurum, 1997.
- [89] Martinez-Cayuela, M., De Medina, L. S., Faus, M. J., and Gil A., "Cherimoya (*Anno cherimola* Mill.) Polyphenoloxidase : Monophenolase and Diphydroxyphenolase Activities" *Journal of Food Science* **53 (4)** (1988), 1191.
- [90] Zhou, H., Feng, X., "Polyphenol oxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*)" *J. Sci. Food Agric.* **57** (1991), 307-313.
- [91] Siddiq, M., Sinha, N. K., Cash, J. N., "Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums" *Journal of Food Science.* **57** (1992), 1177-1179.
- [92] Goldbeck, J. H., Cammarata, K. V., "Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme" *Plant Physiol.* **67** (1981), 887-884.
- [93] Augustin, M. A., Ghazali, H. M., Hashim, H., "Polyphenoloxidase from Guava (*Psidium guajava* L.)" *J. Sci. Food Agric.* **36** (1985), 159-1265.
- [94] Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, David L. Nelson-Michael M. Cox / Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç. Palme Yayıncılık, 2005, Ankara.
- [95] Roudsari, M. H., Signoset, A., Crovzet, J., "Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties." *Food Chemistry.* **7** (1981), 227- 235.
- [96] da Cruz Viera, I., Fatibello-Filho, O., "L-cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure" *Analytica Chimica Acta.* **399** (1999), 287-293.

- [97] Ikediobi, C. O., Obasuyi, H. N., "Purification and some properties *o*-diphenolase from white yam tubers" *Phytochemistry*. **21** (1982), 2815-2820.
- [98] Valero, E., Garcia-Carlmona, F., "Hysteresis and cooperative behaviors of a latent plant polyphenol oxidase" *Plant Physiology*. **98** (1992), 772-776.
- [99] Janovitz- Klapp, A. H., Richard, F. C., Nicolas, J. J., "Polyphenol oxidase from apple, partial purification and some properties" *Phytochemistry*. **28(11)** (1989), 2903-2907.
- [100] Guanata, Y. Z., Sapis, J. C., Moutonet, M., "Substrates and aromatic carboxylic and inhibitors of grape polyphenoloxidases" *Phytochemistry*. **26(6)** (1987), 1573-1575.
- [101] 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*. **26**(1975), 1825-1831.
- [102] Pifferi, P. G., Baldassari, L., Cultrera, R., "Inhibition by carboxylic acids of an *o*-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits" *J. Sci. Food Agric*. **25** (1974), 263-270.
- [103] Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., " Studies on inhibition of mushroom polyphenol oxidase using chlorogenic acid as substrate" *J. Agric. Food Chem*. **41** (1993), 526-531.
- [104] Poul, B., Gowda, L. R. " Purification and characterization of polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dalichos lablab*)", *J. Agric. Food Chem*. **48** (2000), 3839-3846.
- [105] Robert, C., Rouch, C., Cadet, F., "Inhibition of palmito (*Acanthoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids" *Food Chemistry*. **59(3)** (1997), 355-360.
- [106] Macrae, A. R., Duggleby, R. G., "Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase" *Phytochemistry*. **7** (1968), 855-861.
- [107] Kahn, V., Andrawis, A., "Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone" *Phytochemistry*. **24** (1985), 905-908.
- [108] Martiono, V., Caffini, N., Phillipson, J. D., Lapa, A., Tchernitchin, A., Ferraro, G., Debenedelti, S., Schilcher, H., Aceveda, C., "Identification and characterization of antimicrobial components in leaf extracts of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) *Acta Hortic*. **501** (1999), 111-114.

