

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAULOWNIA TOMENTOSA'DAN POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
ÇEŞİTLİ BİTKİ ÖZÜTLERİ İLE İNHİBİSYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Cengiz ÇESKO**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**  
**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**  
**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülnur ARABACI**

**Temmuz 2018**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAULOWNIA TOMENTOSA'DAN POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
ÇEŞİTLİ BİTKİ ÖZÜTLERİ İLE İNHİBİSYONU**

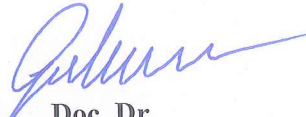
**DOKTORA TEZİ**


**Cengiz ÇESKO**


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

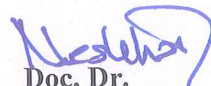
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

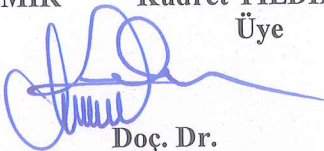
Bu tez 05/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr.  
Gülnur ARABACI  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr.  
Serap COŞANSU AKDEMİR  
Üye

  
Doç. Dr.  
Kudret YILDIRIM  
Üye

  
Doç. Dr.  
Neslihan ŞAKI  
Üye

  
Doç. Dr.  
Volkan EYÜPOĞLU  
Üye

## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Cengiz ÇESKO

05.07.2018

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca danışman Hocam Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya tez boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan, verilerin yorumlanmasındaki katkılarından dolayı ve yaptığı bütün katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora laboratuvar teknikleri ve uygulamasında Esmâ Hande ALICI'ya ve Rûveyda BAŐTAN'a ayrıyeten teşekkür ederim. Hayatımın her anında bana güvenen, desteğini ve sevgisini her zaman derinden hissettiğim canım aileme Őükranlarımı sunarak başta Annem olmak üzere, eőim Dua ÇESKO ve çocuklarıma, kardeőlerim Deniz ÇESKO ve Eren ÇESKO'ya desteklerinden dolayı bir kez daha teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	xiv
ÖZET.....	xv
SUMMARY .....	xvi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler .....	4
2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması .....	5
2.1.2. Enzim kinetiği .....	6
2.1.3. Enzim aktivite birimleri .....	10
2.1.4. Enzim inhibisyonu.....	10
2.1.5. Enzimatik reaksiyonlara etki eden faktörler.....	16
2.1.5.1. pH etkisi.....	16
2.1.5.2. Isı etkisi.....	16
2.1.5.3. Enzim konsantrasyonunun etkisi .....	17
2.1.5.4. Substrat konsantrasyonunun etkisi .....	17
2.1.5.5. Kofaktör ve koenzimlerin konsantrasyonu.....	17
2.2. Polifenol Oksidazlar .....	18
2.2.1. Tirozinaz enzimi.....	19

2.2.1.1. Polifenol oksidaz enzimi için optimum sıcaklık ve pH.....	21
2.2.1.2. Tirozinaz, lakkaz ve katekol oksidaz enzimlerinin biyokimyasal farklılıkları .....	21
2.2.1.3. PPO enzimin inhibitörleri ve aktivatörleri.....	25
2.2.2. Bakır bölgeleri ve reaksiyon mekanizması .....	26
2.2.3. PPO ve tirozinaz enzimi ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar ve uygulama alanları.....	28
2.3. Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri .....	30
2.3.1. <i>Paulownia tomentosa</i> ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar .....	32
2.3.2. <i>Verbascum thapsus</i> .....	34
2.3.3. <i>Datura stramonium</i> .....	36
2.3.4. <i>Solanum nigra</i> .....	38
2.3.5. <i>Tanacetum vulgare</i> .....	41
2.3.6. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	43
2.3.7. <i>Cydonia oblonga</i> .....	44
2.3.8. <i>Momordica charantia l.</i> .....	46
2.3.9. <i>Punica granatum</i> .....	47

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar .....	50
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	50
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....	50
3.2. PPO Enziminin İzolasyonu .....	51
3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması .....	51
3.2.2. Üçlü faz saflaştırma metodu.....	51
3.2.3. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini .....	52
3.2.4. SDS jel elektroforezi .....	52
3.2.5. Native-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının tespiti.....	55
3.3. PPO Enziminin Karakterizasyonu.....	56

3.3.1. PPO aktivite tayini .....	56
3.3.2. Substrat spesifikliği .....	56
3.3.3. pH etkisi .....	57
3.3.4. Sıcaklığın etkisi .....	57
3.3.5. Enzim kinetiği .....	57
3.3.6. Enzim aktivitesi üzerine madde etkisi.....	58
3.3.6.1. Bilinen inhibitörlerin etkisi.....	58
3.3.6.2. Metallerin etkisi .....	59
3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı .....	59
3.4. PPO enzimi üzerinde etkilerin incelenmesi için kullanılan bitkiler....	59

#### BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI .....	63
4.1. Üçlü Faz Safılaştırma Yöntemin Sonuçları .....	63
4.2. Bradford Yöntemiyle Toplam Protein Tayini .....	66
4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Molekül Ağırlılığının Tespiti ve Saflılığı.....	66
4.4. Native-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflılığın Tespiti.....	67
4.5. SDS-PAGE ve Native-PAGE Sonuçların Karşılaştırılması.....	684
4.6. Enzim Kinetiği .....	68
4.7. Enzim Depolanma Kararlılığı .....	784
4.8. İnhibitörlerin Etkisi .....	80
4.9. Metallerin Etkisi .....	89
4.10. Kullanılan Bitki Ekstratların $IC_{50}$ Değerleri Ve Enzim Üzerindeki Etkileri.....	91

#### BÖLÜM 5.

SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR .....	102
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ .....	117

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Brovine Serum Albumin
dk	: Dakika
DOPA	: Dihidroksi fenilalanin
E	: Enzim
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ES	: Enzim-Substrat kompleksi
ESI	: Enzim-Substrat-İnhibitor kompleksi
EU	: Enzim Ünitesi
FDA	: Food and Drug Administration
I	: İnhibitör
kDa	: Kilodalton
$K_i$	: İnhibisyon Sabiti
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Molar
mg	: miligram
mM	: Milimolar
P	: Ürün
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PPO	: Polifenol Oksidaz
PVP	: Polivinil Prolidin
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: Tetra etil metilen diamin
TPP	: Three-Phase Partitioning
TRIS	: Tris(hidroksimetil) amino metan



U	: Ünite aktivite
UV	: Ultra Viyole
ÜFS	: Üç Fazlı Saflaştırma
$V_{maks}$	: Enzimatik reaksiyonun ulaştığı maksimum hız

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Enzimatik reaksiyon .....	6
Şekil 2.2. Herhangi bir enzimin katalitik etkisi.....	7
Şekil 2.3. Michaelis - Menten grafiği .....	8
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği.....	9
Şekil 2.5. Eadie-Hofstee grafiği .....	9
Şekil 2.6. Yarışmalı inhibisyon şeması .....	11
Şekil 2.7. Yarışmalı inhibisyon Lineweaver - Burk grafiği .....	12
Şekil 2.8. Yarı yarışmalı inhibisyon şeması .....	12
Şekil 2.9. Yarı yarışmalı inhibisyon Lineweaver - Burk grafiği .....	13
Şekil 2.10. Yarışmasız inhibisyon şeması .....	14
Şekil 2.11. Yarışmasız inhibisyon Lineweaver - Burk grafiği .....	14
Şekil 2.12. Karışık inhibisyon şeması .....	15
Şekil 2.13. Karışık inhibisyon Lineweaver - Burk grafiği .....	15
Şekil 2.14. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu, tirozinaz enzimi (A ve B), katekol oksidaz enzimi (b) ve lakkaz enzimi (C).....	18
Şekil 2.15. Tirozinden melanin oluşumu .....	19
Şekil 2.16. Tirozin - dopa ve melanin ilişkisini anlatan reaksiyon şeması .....	20
Şekil 2.17. PPO enzimin substratları.....	25
Şekil 2.18. Tirozinaz enzimin en çok bilinen inhibitörleri.....	26
Şekil 2.19. T3 tipi bakır iyonlarının tirozinaz enzimin aktif bölgesinde ki üç boyutlu yapısı .....	26
Şekil 2.20. Tirozinaz enzimin difenolaz ve monofenolaz katalitik döngünün moleküler mekanizması.....	27
Şekil 2.21. Flavonoid molekülü. ....	30
Şekil 2.22. <i>Paulownia tomentosa</i> ağacı (Solda: meyve, sağda meyve vermeden önceki hali).....	31

Şekil 2.23. Bir yıllık <i>Verbascum thapsus</i> .....	34
Şekil 2.24. <i>Verbascum thapsus</i> ikinci yılında.....	35
Şekil 2.25. <i>Verbascum thapsus</i> çiçekleri .....	35
Şekil 2.26. <i>Verbascum thapsus</i> kapsülleri .....	36
Şekil 2.27. <i>Datura stramonium</i> bitki yapısı .....	37
Şekil 2.28. Tropan mokolülü .....	37
Şekil 2.29. <i>Datura stramonium</i> bitkisinde bulunan önemli alkaloidler .....	38
Şekil 2.30. <i>Solanum nigrum</i> bitkisi .....	39
Şekil 2.31. <i>Solanum nigrum</i> çiçekleri .....	39
Şekil 2.32. <i>Solanum nigrum</i> bitkisinin yapısında bulunan solanin molekülü .....	40
Şekil 2.33. <i>Solanum nigrum</i> meyveleri, solda olgunlaşmadan ki hali sağda ise olgunlaşmış solanum meyveleri .....	40
Şekil 2.34. <i>Tanacetum vulgare</i> çiçekleri .....	41
Şekil 2.35. Tansy böceği .....	41
Şekil 2.36. Tannik asit .....	42
Şekil 2.37. <i>Tanacetum vulgare</i> bitkisinde bulunan önemli uçucu yağların molekülleri .....	42
Şekil 2.38. <i>Tanacetum vulgare</i> bitkisinin yapısında bulunan antiviral moleküllerin yapısı .....	43
Şekil 2.39. <i>Rosmarinus officinalis</i> bitkisi .....	43
Şekil 2.40. Rosmarinik asit molekülü .....	44
Şekil 2.41. <i>Cydonia oblonga</i> meyvesi.....	44
Şekil 2.42. <i>Cydonia oblonga</i> çiçeği .....	45
Şekil 2.43. <i>Cydonia oblonga</i> 'da bulunan önemli bazı moleküller.....	45
Şekil 2.44. Olgunlaşmamış bir <i>Momordica charantia l.</i> .....	46
Şekil 2.45. Olgun <i>Momordica charantia l.</i> .....	47
Şekil 2.46. <i>Punica granatum</i> çiçeği ve gelişmekte olan meyvesi.....	48
Şekil 2.47. <i>Punica granatum</i> taneleri.....	48
Şekil 2.48. Olgun <i>Punica granatum</i> meyvesi .....	49
Şekil 3.1. Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği.....	52
Şekil 3.2. Soxhlet ekstraktör cihazı.....	60
Şekil 4.1. ÜFS alt faz enzim özütün optimum pH grafiği.....	64

Şekil 4.2. ÜFS alt faz enzim özütün ham enzim özütü ile karşılaştırmalı optimum pH grafiği. ....	64
Şekil 4.3. ÜFS ara faz enzim özütün optimum pH grafiği.....	65
Şekil 4.4. ÜFS ara faz enzim özütün ham enzim özütü ile karşılaştırmalı optimum pH grafiği .....	65
Şekil 4.5. ÜFS alt faz'ın <i>ter</i> -butanol oran sonuçları.....	66
Şekil 4.6. ÜFS ara faz'ın <i>ter</i> -butanol oran sonuçları.....	66
Şekil 4.7. PPO enzimin SDS-PAGE sonucu .....	67
Şekil 4.8. PPO enzimin SDS-PAGE ve Native-PAGE sonuçlarının karşılaştırılması. ....	68
Şekil 4.9. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol varlığında optimum pH grafiği.....	69
Şekil 4.10. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol varlığında optimum pH grafiği.....	70
Şekil 4.11. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol varlığında optimum pH grafiği .....	70
Şekil 4.12. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa varlığında optimum pH grafiği .....	71
Şekil 4.13. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol varlığında optimum sıcaklık grafiği .....	72
Şekil 4.14. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol varlığında optimum sıcaklık grafiği .....	72
Şekil 4.15. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol varlığında optimum sıcaklık grafiği .....	73
Şekil 4.16. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa varlığında optimum sıcaklık grafiği.....	74
Şekil 4.17. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol substratın doygunluk eğrisi .....	74
Şekil 4.18. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	75
Şekil 4.19. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol substratın doygunluk eğrisi .....	75

Şekil 4.20. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	76
Şekil 4.21. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol substratın doygunluk eğrisi.....	76
Şekil 4.22. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği .....	77
Şekil 4.23. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa substratın doygunluk eğrisi .....	77
Şekil 4.24. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa substratı için Lineweaver-Burk grafiği .....	78
Şekil 4.25. PPO enziminin oda sıcaklığındaki (25 <sup>0</sup> C) aktivitesinin zamanla değişimi .....	79
Şekil 4.26. PPO enziminin 4 <sup>0</sup> C'deki aktivitesinin zamanla değişimi.....	79
Şekil 4.27. PPO enziminin -20 <sup>0</sup> C'deki aktivitesinin zamanla değişimi .....	80
Şekil 4.28. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit etkisi.....	81
Şekil 4.29. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum azid etkisi .....	81
Şekil 4.30. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında tiyoüre etkisi .....	82
Şekil 4.31. <i>Paulownia tomentosa</i> bitkisinden elde edilen PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında L-sistein etkisi .....	82
Şekil 4.32. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında askorbik asit etkisi .....	83
Şekil 4.33. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum azid etkisi .....	83
Şekil 4.34. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında tiyoüre etkisi .....	84
Şekil 4.35. <i>Paulownia tomentosa</i> 'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında L-sistein etkisi .....	84
Şekil 4.36. PPO enziminin 4-metil katekol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	85

Şekil 4.37. PPO enziminin 4-metil katekol ile $\text{NaN}_3$ varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	86
Şekil 4.38. PPO enziminin 4-metil katekol ile tiyoüre varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	86
Şekil 4.39. PPO enziminin 4-metil katekol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	87
Şekil 4.40. PPO enziminin pirogallol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	87
Şekil 4.41. PPO enziminin pirogallol ile $\text{NaN}_3$ varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	88
Şekil 4.42. PPO enziminin pirogallol ile tiyoüre varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	89
Şekil 4.43. PPO enziminin pirogallol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	89
Şekil 4.44. PPO enzimi üzerinde metallerin etkisi.....	90
Şekil 4.45. <i>Cydonia oblogna</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	92
Şekil 4.46. <i>Cydonia oblogna</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	92
Şekil 4.47. <i>Punica granatum</i> kabuğunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	93
Şekil 4.48. <i>Punica granatum</i> kabuğunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metilkatekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	93
Şekil 4.49. <i>Datura stramonium</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	94

Şekil 4.50. <i>Datura stramonium</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	94
Şekil 4.51. <i>Datura stramonium</i> tohumun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	95
Şekil 4.52. <i>Datura stramonium</i> tohumunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.53. <i>Rosmarinus officinalis</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	96
Şekil 4.54. <i>Rosmarinus officinalis</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği .....	96
Şekil 4.55. <i>Solanum nigrum</i> meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	97
Şekil 4.56. <i>Solanum nigrum</i> meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	97
Şekil 4.57. <i>Solanum nigrum</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	98
Şekil 4.58. <i>Solanum nigrum</i> yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk Grafiği.....	98
Şekil 4.59. <i>Verbascum thapsus</i> çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	99

Şekil 4.60. <i>Verbascum thapsus</i> çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	99
Şekil 4.61. <i>Tanacetum vulgare</i> çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi .....	100
Şekil 4.62. <i>Tanacetum vulgare</i> çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	100
Şekil 4.63. <i>Momordica charantia l.</i> meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi.....	101
Şekil 4.64. <i>Momordica charantia l.</i> meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği.....	101



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin biyokimyasal ve yapısal özellikleri.....	21
Tablo 2.2. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin monofenoller ile olan etkileşimi .....	22
Tablo 2.3. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin difenoller ile olan etkileşimi .....	23
Tablo 2.4. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin substratlar ile olan etkileşimi .....	24
Tablo 3.1. <i>Paulownia tomentosa</i> PPO enzimi ile yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar.....	50
Tablo 3.2. Ayırma Jeli için kullanılan miktarlar .....	53
Tablo 3.3. Yürütme Jeli için kullanılan miktarlar .....	53
Tablo 3.4. Yükleme tamponu için kullanılan miktarlar .....	54
Tablo 3.5. Yürütme tamponu için kullanılan miktarlar .....	54
Tablo 3.6. Native PAGE için kullanılan miktarlar .....	55
Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan bitkilerin kısımları.....	61
Tablo 4.1. PPO enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan optimum sıcaklık, optimum pH, $K_m$ ve $V_{maks}$ değerleri .....	69
Tablo 4.2. <i>Paulownia tomentosa</i> meyvesinden saflaştırılan PPO enzim aktivitesi üzerine etki eden inhibitörlerin 4-metil katekol ve pirogallol substratların varlığında $I_{C50}$ değerleri .....	80
Tablo 4.3. PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve $K_i$ (mM) değerleri .....	85
Tablo 4.4. PPO enzimi üzerine etki eden metallerin etkisi .....	90
Tablo 4.5. Kullanılan bitkilerin $I_{C50}$ değerleri ve bitki özütlerin enzim üzerindeki inhibitor çeşitleri .....	91

## ÖZET

Anahtar kelimeler: *Paulownia tomentosa*, Polifenol Oksidaz enzimi, Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS), karakterizasyon, inhibisyon.

Bu çalışmada, *Paulownia tomentosa* bitkisinden ekstrakte edilen polifenol oksidaz (PPO) enzimi Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS) yöntemine göre saflaştırılmış olup, PPO için uygun substratlar ve inhibitörlerle karakterize edilerek çeşitli bitki özütlerinin PPO enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. Enzimin substrat spesifikliğini belirlemek için monofenolik, difenolik ve trifenolik yapıdaki substratlardan başlıca pirokatekol, 4-metilkatekol, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa), L-tirozin, guaikol, pirogallol ve o-dianisidin, pirokatekol, 4-metil katekol, pirogallol ve L-dopa substratları kullanılmıştır. PPO enziminin bu substratlar arasında 4-metil katekol substratına karşı etkinliği  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değeri 2,17 mM ve 0,002 mM/dk olup optimum pH ve sıcaklık değerleri 7,0 ve 25°C ile en fazladır. Buna karşı enzim monofenollere herhangi bir aktivite göstermemiştir. İnhibitör olarak L-sistein, sodyum azide, L-askorbik asit ve tioüre kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda inhibitörler içerisinde en etkili inhibitör 0,567 mM'lık  $K_i$  değeriyle yarışmasız etkili inhibitör olarak L-sisteindir. İnhibitör çalışmalarına ilave olarak Kosova'dan temin edilen *Cydonia oblogna*, *Punica granatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Tanacetum vulgare*, *Momordica charantia*, *Solanum nigrum* ve *Datura stramonium* bitkileri soxhlet cihazında metanol ile ekstrakte edilerek, bunların PPO enzimi üzerine etkileri 4-metil katekol substratı ile incelenmiştir. Bu bitkiler arasında *Tanacetum vulgare* ekstraktının 0,2 mg/ml'lık  $K_i$  değeriyle karışık inhibisyon şeklinde en etkili inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

# PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM *PAULOWNIA TOMENTOSA* AND INHIBITION BY VARIOUS PLANT EXTRACTS

## SUMMARY

Keywords: *Paulownia tomentosa*, PPO enzyme, Three-Phase Partitioning-TPP, characterization, inhibition.

In this study, the polyphenol oxidase (PPO) enzyme extracted from *Paulownia tomentosa* plant was purified by the Three-Phase Partitioning (TPP) method and the inhibitory effects on PPO enzyme activity of various plant extracts were investigated by characterizing the enzyme with suitable substrates and inhibitors of PPO. Substrates of monophenolic, difenolic and triphenolic substrates that are specific for the enzyme and substrates such as pyrocatechol, 4-methylcatechol, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), L-tyrosine, guaiacol, pyrogallol and o-dianisidine have been used to determine the specificity of the enzyme. For each of these seven substrates, optimum conditions such as pH and temperature were determined and 4-methylcatechol was found to be one of the most suitable substrates with optimum pH 7,0 and temperature 25<sup>0</sup>C respectively and  $K_m$  and  $V_{max}$  values for 4-methylcatechol were 2,17mM and 0,002mM/min. In contrast, the enzyme did not show any activity against monophenols. L-cysteine, sodium azide, L-ascorbic acid and thiourea were used as the inhibitors. The most effective was found to be L-cysteine which acted as a Non-competitive inhibitor with a  $K_i$  value of 0,567mM. In addition to the studies on inhibitors, the medical plants *Verbascum thapsus*, *Tanacetum vulgare*, *Momordica charantia*, *Solanum nigrum* and *Datura stramonium* harvested from Kosovo were extracted with methanol in a soxhlet apparatus and the effects of these extracts on the PPO enzyme were examined by 4-methyl catechol as a substrat. Among the plant extracts, the *Tanacetum vulgare* was found to be the most effective inhibitor in the form of mixed inhibition with  $K_i$  of 0.2 mg /ml.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Dünya’da nüfusun artması her geçen gün insanların talebinin artmasına neden olmaktadır. Bugün tüketicinin talebi en çok gıda sektörüdür. Gıda sektörünün en önemli alanlarından biri meyve ve sebze alanıdır. Riski yüksek olan bir alandır. Sebebi sebze ve meyveyi topladıktan sonra, taze tutmak ve onları pazarda tüketiciye taze sunmaktır. Sebze ve meyve sektörün en önemli sorunlarından biri ürünlerini taze tutmaktır. Bu sorunu çözmek için yeni teknolojilerin geliştirilmesine rağmen bu sorunların devam ettiği görülmektedir. Her geçen gün büyüyen metropollerin hızlı hayat şartları insanların evde değilde daha fazla dışarda besin ihtiyaçlarını karşılamalarına neden olmaktadır. Bunların artması ile insanların hayatta kalabilmesi için en önemli enerji kaynaklarından biri beslenmedir. Sağlıklı beslenme ister istemez gıda sektöründe yeni yapılanmalara ve her geçen gün teknolojinin yenilenmesi sonucunda gıda sektörüne de yenilik getirmektedir. Teknolojinin sürekli gelişmesi yüksek talebin karşılanmasına çok fazla katkı sunmamaktadır. Ne var ki bunların hepsi sebze ve meyve sektörün en önemli sorunlarından biri olan esmerleşme reaksiyonunun önüne geçmeye yetmemiştir. Bu sektörün riskli olmasının nedeni zararın yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Dünya’da meyve ve sebze sektörü en çok zarar gören sektördür. Sebebi sebze ve meyve stokunun %50'sinden fazlasının esmerleşme sonucunda kayıp olmasıdır. Esmerleşmenin ana kaynağı meyve, sebze ve bitkilerin hepsinde bulunan polifenol oksidaz (PPO) enzimidir. Bu enzimatik esmerleşme bu kayıpların ana kaynağıdır [1]. Meyve ve sebzelerde oluşan enzimatik kararın, bitkilerin organizmasında var olan fenolik yapıdaki bileşiklerin kinon yapılarına dönüşmesi ile bu kinonların kendi içinde polimerleşmesi sonucunda kahverengi, kırmızı, siyah gibi koyu renkli pigmentlerin oluşumu ile gerçekleşmektedir. Bu esmerleşme işlemlerine neden olan enzimler Polifenol oksidaz enzimleridir [EC 1.14.18.1]. Bu enzimler oksidoredüktaz,

polifenol oksidaz (PPO) adları ile bilinmelerinin yanında katekolazlar, tirozinazlar, fenolazlar ve krezolazlar olarak da adlandırılırlar. Enzimatik esmerleşme reaksiyonu, PPO enzimi, fenolik yapıda substratlar ve oksijen ile uygun pH, sıcaklık ve su varlığında bunların bir araya gelmesiyle birlikte reaksiyon gerçekleşmektedir. Pek çok meyve ve sebzenin kesilmesi sırasında bu reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir [2,3].

Meyve ve sebzelerin uzun süre bekletilmesi sonucunda olgunlaşmaları ve bazı hastalıklara karşı maruz kalmaları enzimatik esmerleşmeye neden olabilir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonu sonucunda meyve yada sebze hem doğal rengini hemde tadını kaybetmektedir. Böylece yapılarındaki C vitaminin de azalmasına ve ekonomik açıdan ciddi zararlara uğramasına sebep olan olaylardan biridir. Aslında gıda sektörünün temel sorunlarından biri enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Bu kayıpların azaltılması için bir çok çalışma yapılmakta olup özellikle enzimatik esmerleşme reaksiyonunu kontrol altına alınması konusunda çalışmalar yapılmaktadır [2].

Gıda sanayisinde PPO enziminin inhibisyonunu sağlamak için çeşitli metodlar denenmiştir. İlk olarak oksijenin uzaklaştırılması, enzimatik reaksiyonu engelleyen bazı maddelerin kullanımı ve bazı kimyasalların eklenmesi gibi yöntemler kullanılmıştır. Termal metodlarda kullanarak bu reaksiyon kontrol altına alınmaya denensede diğer zararları (tat değişimi, renk değişimi, besin ve vitamin değeri kayıpları gibi) engellemek neredeyse imkansız hale geldiği için bu metod çok tercih edilmemiştir. Diğer şekillerde ise meyve ve sebzelerin su, tuzlu su ya da şuruba daldırılması veya vakumlanmaları ile esmerleşme reaksiyonunun engellendiği belirlenmiştir. Bu tür uygulamalar vakumlanan paketlerin açılması ile oksijen tekrar içeri girmesi nedeniyle enzimatik esmerleşme reaksiyonu yeniden başladığından kesin sonuç vermez. Enzimatik esmerleşmenin engellenmesinde diğer bir yaklaşım, enzim üzerinde esasen etki gösteren veya enzimatik katalizdeki substrat ve/veya ürünlere reaksiyon veren ve bu şekilde pigment oluşumunu inhibe eden esmerleşme karşıtı ajanların ya da maddelerin kullanılmasıdır. Oysa bu tür kimyasalların kullanımı bazı zehirlenmelere yol açtığı için yasaklanmaktadır. Bu alanda kullanılan

en yaygın kimyasal katkı maddeleri askorbik asit, bisülfid ve türevleri ile indirgeyici olarak sisteindir. Bisülfidlerden, yaygın olarak sodyum/potasyum metabisülfid, kükürtdioksit, sodyum/potasyum bisülfid gibi bileşikler kullanılmaktadır. Bunlar enzimatik esmerleşme reaksiyonunu engeller ancak sağlık açısından zararlı etkilere neden oldukları için kullanımı FDA tarafından yasaklanmıştır. Malik asit, sitrik asit ve fosforik asit asitlendirici olarak kullanılsa da bunun dışında EDTA şelatlayıcı olarak kullanılmaktadır. Askorbik asit ve kombinasyonları da enzimatik esmerleşme reaksiyonu azaltmak için kullanılmaktadır. İnsanların bu konuda daha fazla bilinçlenmesi sonucunda aldıkları gıdalara dikkat ettikleri için, daha güvenli ve toksik etki yaratmayan daha az kimyasal eklenmiş işlenmiş gıdalara talebi arttırmaktadır [2,3].

Bilindiği üzere dünyada her geçen gün enzimlerin kullanımı artmaktadır. Son yıllarda izole edilmiş enzimlerin kullanımı daha fazladır. Sebebi spesifik olmaları ve saklanmaları açısından daha ekonomik olduğundan dolayı kullanımı artmıştır. Endüstride kullanımı artan enzimler özellikle son yıllarda deterjan sanayisinde de kullanımı artmıştır. Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin *Paulownia tomentosa* ağacı meyvesinden PPO enziminin izolasyonu, Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS) metoduyla saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Bu amaçla PPO enzimi, *Paulownia tomentosa*'dan izole edilmiş; daha sonra ÜFS yöntemiyle PPO enzimi tek adımda saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri, optimum pH ve optimum sıcaklığı, depolanma kararlılığı, inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. İnhibitör çalışmalarına ilave olarak Kosova'dan temin edilen bazı bitki özülerinin PPO enzimi üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir.

## **BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Enzimler**

Enzimler, biyolojik reaksiyonları katalize eden protein yapılı moleküllerdir. Aktifleştirme enerjisini düşürerek, reaksiyon hızını arttıırırlar ve substrat olarak adlandırılan tepkenlere çok spesifiktirler. Enzimlerin katalitik etkinliği çok yüksektir, katalizör olmayan reaksiyonlara kıyasla  $10^3$  ile  $10^7$  kat reaksiyonları hızlandırırılar [4].

Canlı organizmalar metabolik aktiviteyle birlikte yaşarlar. Organizmada binlerce kimyasal reaksiyon, tüm canlı hücreler içinde aynı anda gerçekleşmektedir. Organizmada gerçekleşen bu metabolik reaksiyonların hemen hepsini enzimler ve proteinler (bazen RNA) kataliz etmektedirler. Hücre dışında tepkime eğilimi düşük olan organik moleküller enzimler tarafından dönüşüme uğratılır. Örneğin vücuda alınan glikoz vücudumuzda çeşitli metabolik reaksiyonlar ile hiç bozulmayacak şekilde organizmada depo edilip saklanır. Çoğu hücre metabolik fonksiyonların devamı için glikozu oksitleyerek karbondioksit ve su üreterek çok miktarda enerji açığa çıkmaktadır. Glikoz, normalde bitkiler tarafından sentezlenmektedir. Ancak glikoz sentezlendiği zaman oksijen gazı açığa çıkmaktadır ve oksijen normal koşullarda oluşmaz. Bu olay "fotosentez" olarak bilinmektedir. Fotosentez olayı tamamen enzimler vasıtasıyla gerçekleşen bir olaydır. Enzimler, termodinamik açıdan olumlu reaksiyonları kataliz etmektedirler. Dolayısıyla reaksiyonlar çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Hayati önem arz eden fonksiyonların devamı için biyokimyasal reaksiyonların hızlı ve kontrollü bir şekilde gerçekleşmesi tamamen enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir [5].

Enzimler canlı sistemlerde hücre içinde gerçekleşir. Hücre içinde sentezlendiği için genellikle hücre içinde katalitik etki gösterirler. Ancak bazı enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salıverilir. Bunlara örnek vermek gerekiyorsa sindirim sisteminde görevli olan enzimlerden pepsin ve tripsin gibi enzimler, hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salıverilir [4].

### **2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması**

Enzimler, kataliz ettikleri reaksiyon çeşitlerine göre, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı grupta sınıflandırılırlar [4].

Oksidoredüktazlar; yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Bunlara örnek olarak Polifenol oksidaz, Glukoz oksidaz, Laktat dehidrojenaz ve katalaz enzimlerini verilebilir.

Transferazlar; koenzimlerin varlığında belirli grupların iki substrat arasındaki transferini katalize ederler. Bunlara örnek olarak, ALT-alanin amino transferaz, GOT-glutamat oksaloasetat transferaz, heksokinaz gibi enzimler verilebilir.

Hidrolazlar; hidroliz reaksiyonlarını, fonksiyonel grupları suya aktararak katalize eder. Pirofosfataz, lipoprotein lipaz, alkalen fosfataz gibi enzimler örnek olarak verilebilir.

Liyazlar; tepkimelerin hidrolitik ve oksidatif olmayan eliminasyonundan ve çift bağ oluşturmak için grupların eklenmesinden veya uzaklaştırılmasından sorumludur. Piruvat dekarboksilaz, sitrat sentaz ve adenilat siklaz enzimleri örnek olarak verilebilir.

İzomerazlar; izomerizasyon reaksiyonlarını bir molekül içindeki yapısal değişiklikleri katalize ederler. Bu reaksiyonlar, en basit enzimatik reaksiyonlardır,

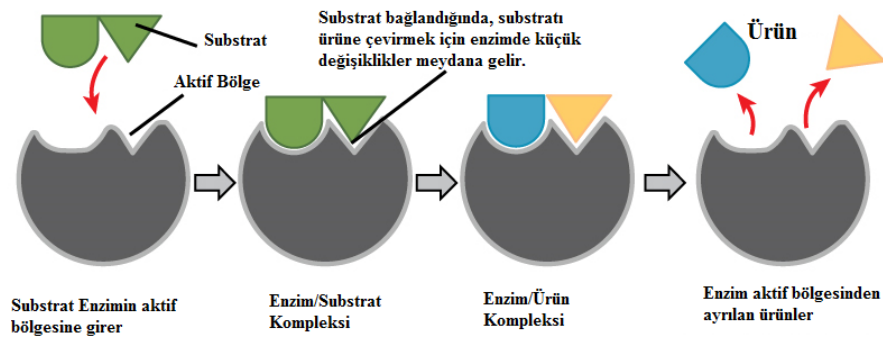


çünkü sadece bir substrat ve bir ürüne sahiptirler. DNA topoizomeraz ve fosfoglukomutaz gibi enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir.

Ligazlar; iki substratın bağlanmasını katalize eder ve reaksiyonu gerçekleştirmek için ATP gibi kimyasal potansiyel enerji kullanırlar. Piruvat karboksilaz ve DNA ligaz enzimleri örnek olarak verilebilir [4,5].

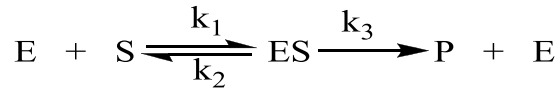
### 2.1.2. Enzim kinetiği

Enzim reaksiyon hızlarını ve mekanizmalarını enzim kinetiğine dayanılarak incelemektedir. Enzimatik kimyasal reaksiyonun nasıl ve ne gibi bir hızla oluştuğunu tespit etmek enzim kinetiğinin esas amacıdır. Substratların ürüne dönüşümü sırasında gidişatın ve hızın bilinmesi bu alan açısından önemlidir. 1894 yılında Emil Fischer en basit enzim substrat ilişkisini tanımlayan, anahtar-kilit (Şekil 2.1.) modelini öne sürmüştür. Enzimlerin kinetik özelliklerini açıklayabilmek için 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten basit bir teori öne sürmüşlerdir. Böylece geliştirmiş oldukları teori ile bir çok enzimin en basit bir şekilde kinetik özelliklerini açıklamayı başarmışlardır. Bugün bu teori hala geçerlidir.



Şekil 2.1. Enzimatik reaksiyon

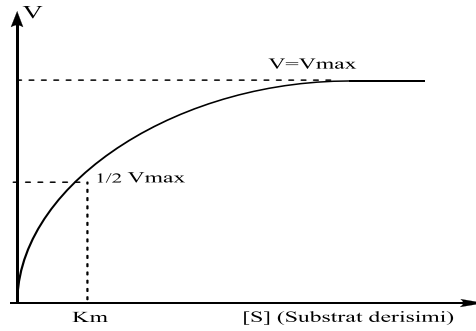
Enzim (E), substrat (S) ile bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturur. Bu ES kompleksi ürün (P) ve enzime (E) dönüşür. Michaelis - Menten modeli aşağıdaki reaksiyon ile gösterilmektedir [4,5].



Şekil 2.2. Herhangi bir enzimin katalitik etkisi [5].

Burada ES kompleksi, E ve S'dan  $k_1$  hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise  $k_2$  hızındaki geri reaksiyonla ve  $k_3$  hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı, enzimin etkisi ile zaman birimi başına (ki bu 1 dakikaya ya da 1 saniyeye göre belirlenebilir) ürüne dönüşen substratın veya oluşan ürünün miktarına göre belirlenir. Biyolojik bir sıvı veya dokudan alınan bir numunedeki enzim miktarı belirlemek için numunedeki enzimin kataliz hızı belirlenir. Ölçülebilen hız, enzimde bulunan aktif enzimin miktarı ile doğru orantılıdır. Buna rağmen birçok enzimin saf numuneleri bulunmadığından veya miktarını belirlemek zor olduğundan bu enzimlerin miktarları ifadesi yerine enzim aktivite ünitesi olarak kullanılır. Binlerce farklı enzim reaksiyon hızlarının farklı olması, ilgili enzimlerin aktivitelerinin veya etkinliklerinin farklı olmasıyla açıklanır [4,5].

Enzimatik reaksiyonun yavaş olmasına neden olan en önemli etkenlerden biri substrat konsantrasyonunun düşük olmasıdır. Böyle enzimatik reaksiyonlarda ES kompleksi çok az oluşur. Bunun sonucunda ortamda bir sürü enzim molekülü serbest halde kalır. Böylece ürüne dönüşen miktar çok azdır, bu da reaksiyon hızının az olmasına neden olur. Substrat konsantrasyonunun belirli oranlarda artışları ile enzim moleküllerinin yarısı serbest kalırken diğer yarısı ES kompleksini oluşturur. Bu noktada oluşan ES kompleksi maksimum hızın yarısına ( $1/2 V_{maks}$ ) ulaşmış olur. Substrat konsantrasyonun kontrollü bir şekilde konsantrasyonunun artırılması ile enzim moleküllerinin tümünün ES kompleksi oluşturduğu bir noktada reaksiyon hızı artık maksimum düzeydedir ( $V_{maks}$ ). Bundan sonra substrat konsantrasyonu artırılrsa da reaksiyon hızı artmaz, çünkü enzim doygunluk noktasına ulaşmış olur.  $K_m$  Michaelis-Menten sabitidir.  $1/2 V_{maks}$ 'daki substrat konsantrasyonunu ifade eder [6].



Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği [5, 7].

Her enzime ait bir  $K_m$  değeri vardır. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar diğer pek çok kimyasal reaksiyonda olduğu gibi, hız denklemleri ile tanımlanabilir. En çok kullanılan yöntem, başlangıç reaksiyon ilk hızını substrat konsantrasyonuyla ilişkilendiren Michaelis-Menten denklemidir (Denklem 2.1) [7].

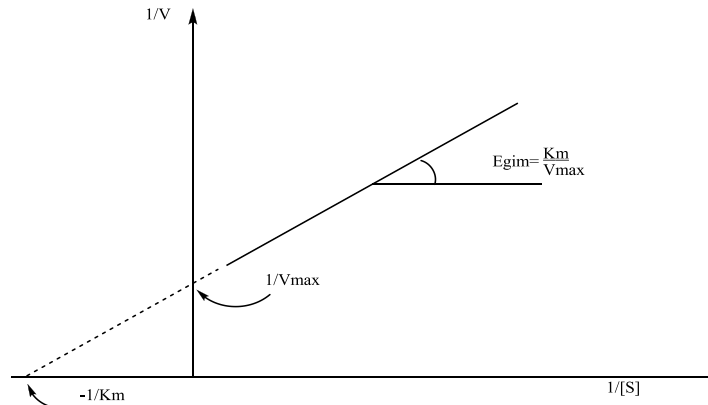
$$v_0 = V_{maks} [S]/K_m + [S] \quad 2.1$$

Buradan  $K_m$  ise,

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1 \quad 2.2$$

denklemleri ile (Denklem 2.2) hesaplanabilir.

$K_m$  değeri Michaelis-Menten sabiti olarak bilinen, substrat için enzimin ilgisinin bir ölçüsüdür. Dolayısıyla  $K_m$  ne kadar düşükse, substrat enzime o kadar sıkı bağlanır  $K_m$  ne kadar büyükse substrat enzime o kadar zayıf bağlanır.  $K_m$  değerleri aynı fonksiyona sahip enzimleri ayırt etmek için de kullanılır [6]. Michaelis-Menten denkleminin kullanıldığı hiperbolik eğride, ilgili enzime ait  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerini hesaplayabilmek için, grafiği doğrusal olan Lineweaver-Burk grafiği kullanılmaktadır.



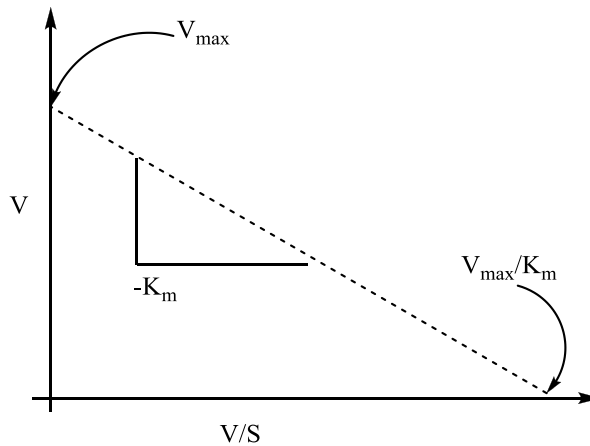
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği [5, 8].

Şekil 2.4.'de görüldüğü gibi Lineweaver-Burk grafiğine göre daha kesin sonuçlar elde edilebilir. Bunun sonucunda bu grafiğe uygun denklem geliştirildiğinde, aşağıdaki denklem ile istenilen sabitler (Denklem 2.3) bulunur.

$$1/v_0 = \{K_m/(v_{maks}[S])\} + (1/v_{max}) \quad 2.3$$

Bundan dolayı bazı çalışmalarda çok düşük ya da çok yüksek substrat konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla daha kesin sonuçlar elde edebilmek için Eadie-Hofstee grafiği ile line-fitting veya linear regresyon gelişmiş analiz yöntemide kullanılabilir (Şekil 2.8.). Bu grafikteki sabitler (Denklem 2.4) ile hesaplanabilir [8].

$$v_0 = -K_m v_0/[S] + v_{maks} \quad 2.4$$



Şekil 2.5. Eadie-Hofstee grafiği [5, 8].

Bazı özel spesifik çalışmalarda farklı ve daha kesin sonuçlar veren grafik şekilleride kullanılmaktadır. Buna rağmen yukarıda bahsedilen grafikler temel enzimatik reaksiyonların özelliklerini ve karakteristik durumlarını açıklayabilmek için kullanılır [8].

### **2.1.3. Enzim aktivite birimleri**

Uluslararası birimlere göre, 1 birim enzim aktivitesi uygun koşullarda ölçülen 25°C'de 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Aktivite, çözelti içindeki toplam enzim birimidir. Özgül (spesifik) aktivite ise total proteinin miligramı başına enzim biriminin sayısıdır. Özgül aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür; enzim saflaştırıldıkça artar ve enzim tamamen saf olduğunda sabit ve maksimumdur. Bir enzim molekülünün birim zamanda ürüne çevirdiği substrat molekül sayısına molar aktivite denir. 1 mol substratı 1 saniyede reaksiyona sokabilen enzim miktarına ise Katal denir [9].

### **2.1.4. Enzim inhibisyonu**

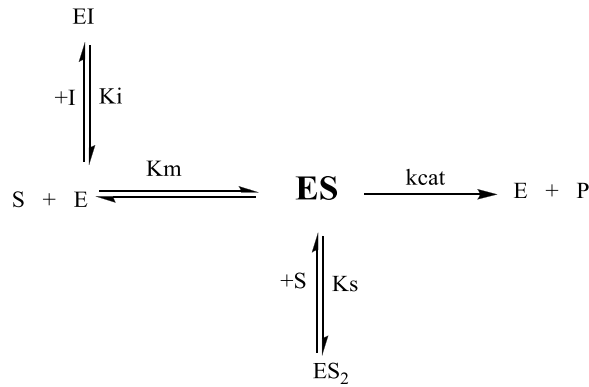
Enzimatik reaksiyon yavaşlaması veya durdurulması, inhibitör olarak adlandırılan belirli moleküllerin ve iyonların bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Bu olaya da enzim inhibisyonu denir. Doğal inhibitörler metabolizmayı düzenler ve birçok ilaç ve toksik ajanlar enzimleri inhibe ederek etki ederler. İnhibitörler enzim uygulamalarında kullanılması, enzim mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır ve enzim mekanizmasının tanımlanmasına yardımcı olmaktadır [4]. Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Geri dönüşümsüz inhibitörler, enzim-inhibitör kompleksi (EI) oluşturmak için enzimlere kovalent bağlarla sıkıca bağlanırlar. Enzim aktif bölgesinde bulunan herhangi bir amino asit kalıntısının yan zincirine etki ederek aktif bölgenin pasif olmasına neden olur. Bu tip inhibisyonda enzimin aktif bölgesine kovalent bir

şekilde bağlanarak enzimi inhibe eder. Mesela penisilin ve aspirin gibi ilaçlar geri dönüşümsüz inhibitörlerdir [4,5].

Geri dönüşümlü inhibitörler, enzimlere kovalent olmayan bağlarla bağlanır ve enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluştururlar ve kolaylıkla enzimden ayrılırlar. Dönüşümlü inhibisyonun yarışmalı, yarı yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere üç türü mevcuttur.

**Yarışmalı inhibisyon:** Bu tip inhibisyona neden olan inhibitörlerin kimyasal yapısı substrata çok benzer. Enzimatik reaksiyonda enzim-substrat (ES) kompleksi yerine Enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşur. Bağlanma zayıf geri dönüşümlüdür. Enzimatik reaksiyonda hem substrat hem de inhibitör olduğu zaman ikisi de enzimin aktif bölgesine bağlanmak için birbiri ile yarışır. Bu özelliklerinden dolayı bu tip inhibitörlere yarışmalı yada rekabetçi inhibitörler denir. İnhibitörsüz enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat kompleksi oluştuğunda ürün elde edilirken, inhibitörlü reaksiyonlarda enzim-inhibitör kompleksi oluşacağından herhangi bir ürün meydana gelmez [10].

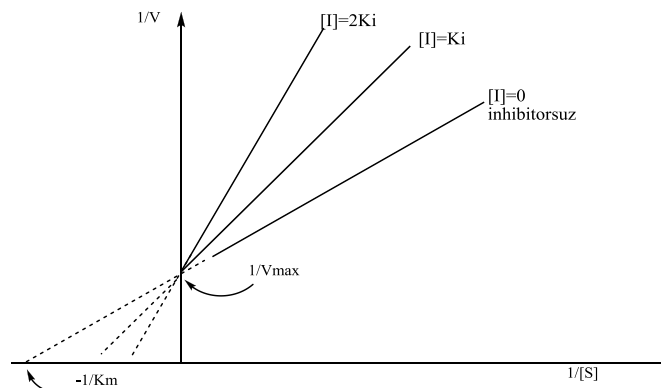


Şekil 2.6. Yarışmalı inhibisyon şeması [11].

Şekil 2.6.'ya baktığımızda, inhibitörün ES kompleksine bağlanmadığını görülmektedir. İnhibitör yapısı bakımından substrata benzediği için enzimin aktif merkezine bağlanıp EI kompleksini oluşturmaktadır. Bu tip inhibisyonda  $V_{\text{maks}}$  değeri değişmez.  $V_{\text{maks}}$  değerinin değişmemesi inhibisyonun ortadan kalktığını göstermektedir. Bundan dolayı inhibitorsüz reaksiyonda ve inhibitör varlığında  $V_{\text{maks}}$

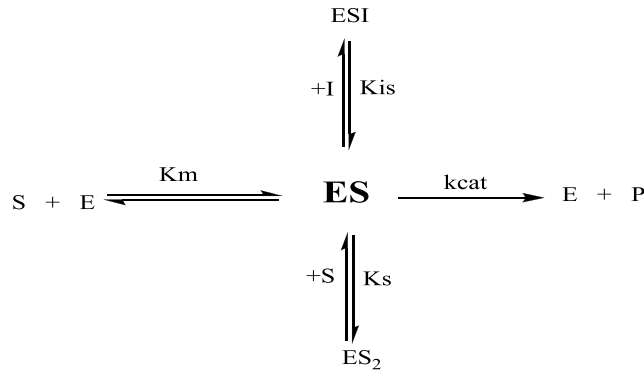
değeri aynıdır. Yarışmalı inhibitörler substratın enzime bağlanmasını olumsuz etkilediği için  $K_m$  değeri büyüktür.  $K_i$ 'nin büyük olması EI kompleksin substrata karşı ilgisiz olduğundan değil, aslında serbest enzimin ve enzim-inhibitör kompleksinin substrata karşı olan tavrından dolayı  $K_i$  değerini etkilemektedir. Kinetik sabitler ( $V_{maks}$  ve  $K_i$ ) Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 2.7.) yararlanılarak kinetik sabitler aşağıdaki eşitlik (Denklem 2.5) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$1/V = K_m/V_{maks}(1+[I]/K_i)1/[S] + 1/V_{maks} \quad 2.5$$



Şekil 2.7. Yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği [8].

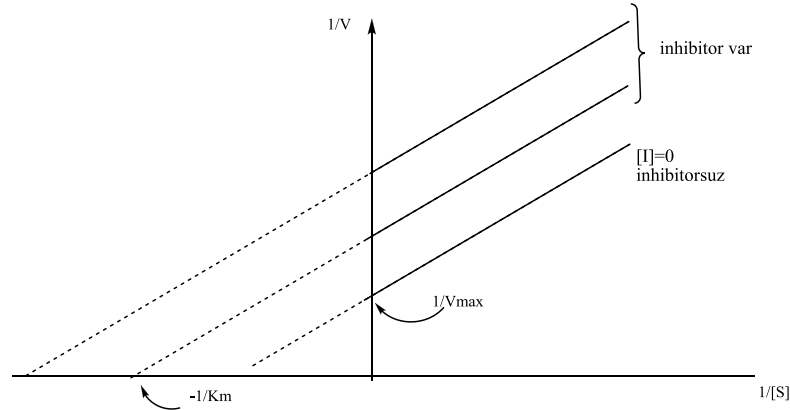
Yarı yarışmalı inhibisyon: Enzimatik reaksiyon esnasında yarı yarışmalı inhibisyona neden olan inhibitörler serbest enzime bağlanmazlar. Şekil 2.8.'deki reaksiyona göre inhibitör enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanarak inhibisyona neden olur. Bu inhibisyona yarı yarışmalı inhibisyon denir. Bu tip inhibisyon çeşitleri genelde iki substratlı reaksiyonlarda görülür [10].



Şekil 2.8. Yarı yarışmalı inhibisyon şeması [11].

Bu inhibisyon türünde  $V_{maks}$  azalırken  $K_i$  değeri inhibitörsüz reaksiyonun  $K_i$  sabitinden daha küçüktür. Kinetik sabitler ( $V_{maks}$  ve  $K_i$ ) Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 2.9.) yararlanılarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak (Denklem 2.6) hesaplanabilir.

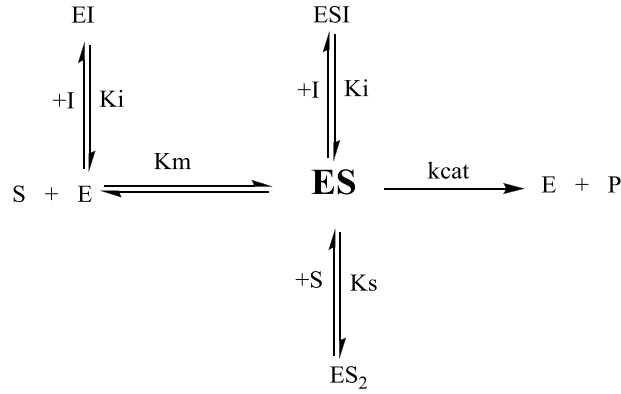
$$1/V = K_m/V_{maks} 1/[S] + 1/V_{maks}(1+[I]/K_i) \quad 2.6$$



Şekil 2.9. Yarı yarışmalı inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği [12].

**Yarışmasız inhibisyon:** Bu tür inhibisyona allosterik enzimlerde rastlanır. Yarışmasız inhibisyon klasik ve karışık olmak üzere iki tiptir. Klasik yarışmasız inhibisyonda inhibitör allosterik bir bölgeye bağlanır. Bu bağlanma substratın bağlanmasını etkilemez. Şekil 2.10.'daki gibi reaksiyon mekanizmasına göre inhibitör, E ve ES kompleksine bağlanarak EI ve ESI kompleksini oluşturabilir. Bağlanmalar dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. İnhibitör ESI kompleksinden dönüşümlü olarak ayrıldığından ürün oluşur. İnhibitör ES'ye bağlandığından  $V_{maks}$  azalırken enzimin substrata bağlanmasını etkilemediğinden  $K_m$  değişmez. Şekil 2.10.'a bakıldığında, substrat değeri artırılırsa da enzim-inhibitör (EI) kompleksi ve enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşumunun engellenemez.  $V_{maks}$ 'ın azalması bu faktöre bağlıdır ve reaksiyonda maksimum hıza ulaşamaz [13, 14, 15].

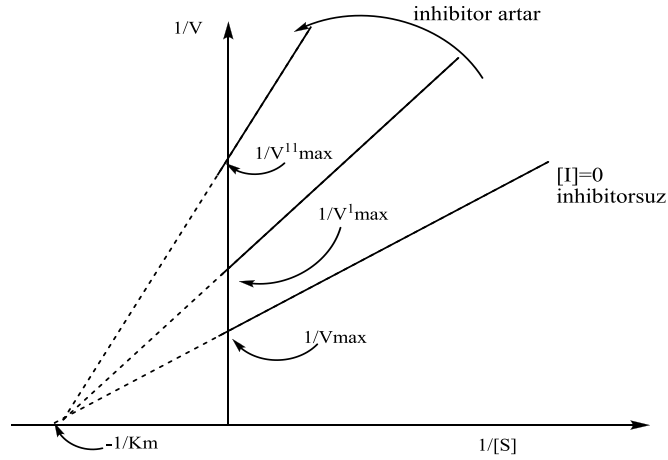




Şekil 2.10. Yarışmasız inhibisyon şeması [11].

Kinetik sabitler ( $V_{maks}$  ve  $K_i$ ) Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak (Şekil 2.11.) aşağıdaki (Denklemler 2.7) eşitlikten hesaplanabilir.

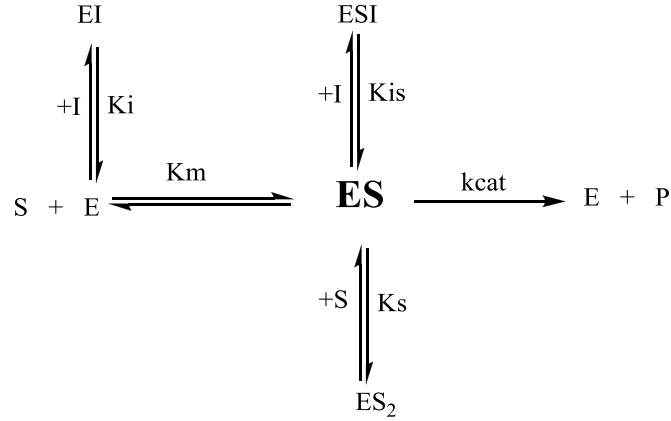
$$1/V = K_m/V_{maks}(1 + [I]/K_i)1/[S] + 1/V_{maks}(1 + [I]/K_i) \quad 2.7$$



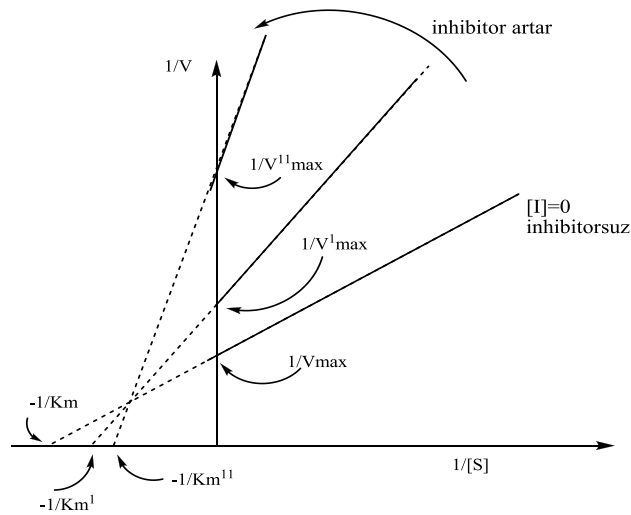
Şekil 2.11. Yarışmasız inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği [16].

Karışık yarışmasız inhibisyon; enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma sabitlerinin farklı olduğu bir reaksiyon türüdür [10]. İnhibitörün bağlanması enzimde konformasyon değişikliğine yol açar. Konformasyon değişikliği substratın enzime bağlanmasını zorlaştırır. Dolayısıyla inhibitörün enzime bağlanması enzimin substrata ilgisini azaltır. Substrat enzime bağlanırsa da reaksiyon çok daha yavaş gerçekleşmektedir. Şekil 2.11.'de olduğu gibi inhibitör ya ES kompleksine ya da

direkt olarak enzime bağlanarak inhibisyon etkisi gösterir. Her iki durumda da enzim inaktif olmaktadır.



Şekil 2.12. Karışık inhibisyon şeması [11].



Şekil 2.13. Karışık inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği [17].

Karışık inhibisyonda  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri etkilenmektedir. Kinetik sabitler ( $V_{maks}$  ve  $K_i$ ) Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 2.13.) yararlanılarak aşağıdaki (Denklem 2.8) eşitlikten hesaplanabilir.

$$1/V = K_s/V_{maks} 1/[S] (1 + [I]/K_i) + 1/V_{maks} (1 + [I]/\alpha K_i) \quad 2.8$$

### **2.1.5. Enzimatik reaksiyonlara etki eden faktörler**

Bilindiği üzere enzimlerin görevi ortamda bulunan substratları değişikliğe uğratarak ürüne dönüştürmektir. Enzimin aktivitesi substrat konsantrasyonunun azalması ya da ürün konsantrasyonunun artmasına bağlıdır. Enzim aktivitesi miktarı, enzim ünitesi (EÜ) ile tanımlanır. Enzimatik reaksiyonları etkileyen faktörler pH, ısı, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, çeşitli kofaktör ve koenzimlerin konsantrasyonu, hormon ve diğer biyolojik maddelerin etkisi olarak sıralanabilir [13, 15].

#### **2.1.5.1. pH etkisi**

Sulu ortamda gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda ortamın pH'sı çok önemlidir. Enzimatik reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiği için pH etkisi önemli derecede etkilidir. Her enzimin çalıştığı en uygun pH değerine optimum pH denir. Reaksiyon ortamının pH'sı optimum pH'ın altında ya da üstünde olursa enzim aktivitesi yavaşlar. Enzimatik aktivite tayininde pH mümkün olduğu kadar belirli bir değerde sabit tutmalıdır. Bunun için bu tip reaksiyonlarda tampon sistemler kullanılmaktadır. Tampon sistemlerin asıl özelliği pH'nın değişimine karşı bir direnç göstermektir. Canlı sistemlerde gerçekleşen enzimatik reaksiyonların ortamı genelde tampon sistemlerdir. Tampon sistemlerin enzimatik reaksiyonlarda rolü büyüktür. Enzim aktivite çalışmalarında optimum pH'nın sabit tutulması gerekir [13, 15, 18].

#### **2.1.5.2. Sıcaklık etkisi**

Enzimatik reaksiyonlarda diğer önemli bir etken de sıcaklıktır. Ortamın sıcaklığı artınca reaksiyona giren moleküller arasındaki çarpışma hızı artacaktır. Sıcaklığın artması aynı zamanda aktivasyon enerji seviyesini aşabilecek moleküllerin arasındaki çarpışmaların sayısını da arttıracaktır. Sıcaklığın artması ile enzimatik reaksiyon hızı maksimum seviyeye ulaşır, ancak belli bir süre sonra düşmeye başlar. Enzimlerin çalıştığı en uygun sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Her enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Canlı organizmalarda enzimatik

reaksiyonlar 37-40°C sıcaklık aralığında gereleşmektedir. Son yapılan çalışmalara göre bazı termofilik bakterilerde enzimatik reaksiyonların 60-70°C'a kadar çıktığı tespit edilmiştir [13, 15, 18].

#### **2.1.5.3. Enzim konsatrasyonunun etkisi**

Ortamda yeterli seviyede substrat varsa enzimatik reaksiyonun hızı, reaksiyonu katalizleyen enzim derişimi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon ortamında ne kadar fazla substrat mevcutsa o oranda enzim-substrat kompleksi oluşur. Böylece o kadar çok üründe oluşur. Dolayısıyla enzim ne kadar fazla olursa birim zamanda oluşacak olan üründe o kadar fazla olacaktır. Enzim sonsuz sayıda substratı ürüne çevirebilir, ancak denatürasyon sonucunda enzim yıkılır. Her enzim belli bir zaman sonra substrat konsatrasyonu arttırılrsa da denatürasyona uğrar ve aktivitesini kaybeder [13, 15, 18].

#### **2.1.5.4. Substrat konsatrasyonunun etkisi**

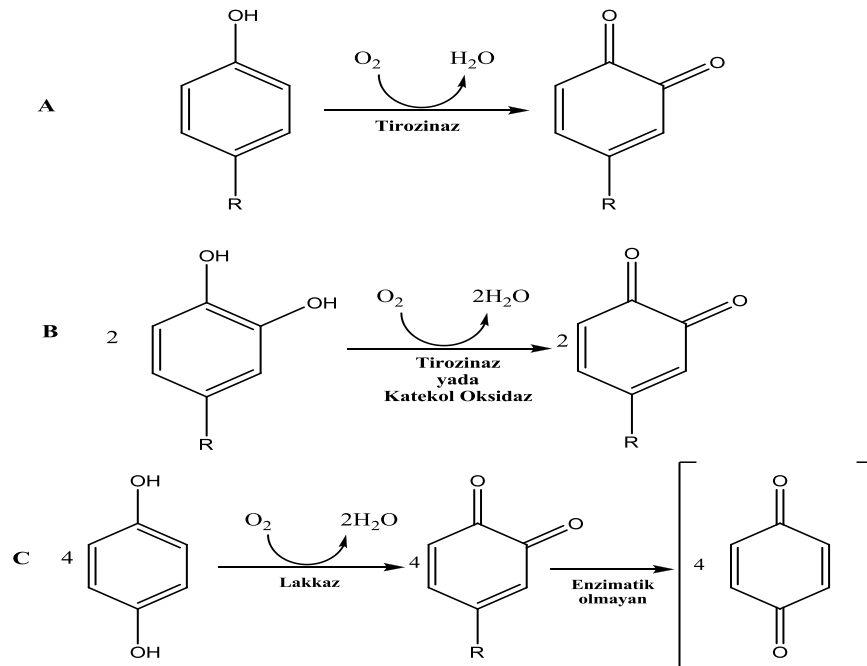
Reaksiyon ortamında enzim konsantrasyonu sabit bir değerde tutulduğu zaman, substrat konsantrasyonu arttırıldıkça enzimatik reaksiyon hızı da artmaktadır. Böylece oluşan ürün miktarı da artacaktır. Bu olay belli bir süre devam etse de enzim doygunluk noktasına ulaştığında, substrat konsantrasyonu arttırılrsa da reaksiyon hızı artık yavaşlayıp parabol eğri hiperbolik eğrisine dönüşmektedir [13, 15, 18].

#### **2.1.5.5. Kofaktör ve koenzimlerin konsantrasyonlarının etkisi**

Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için bazı organik moleküllere bazen de metal iyonlarına gereksinim duymaktadırlar. Metal iyonlarına kofaktör denirken organik moleküllere koenzimler denilmektedir. Bazı enzimler ise hem kofaktör hemde koenzim olduğunda aktivite gösterebilirler. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için koenzim ve kofaktörlerin reaksiyon ortamında yeterli derecede bulunması gerekmektedir [15, 18].

## 2.2. Polifenol Oksidazlar

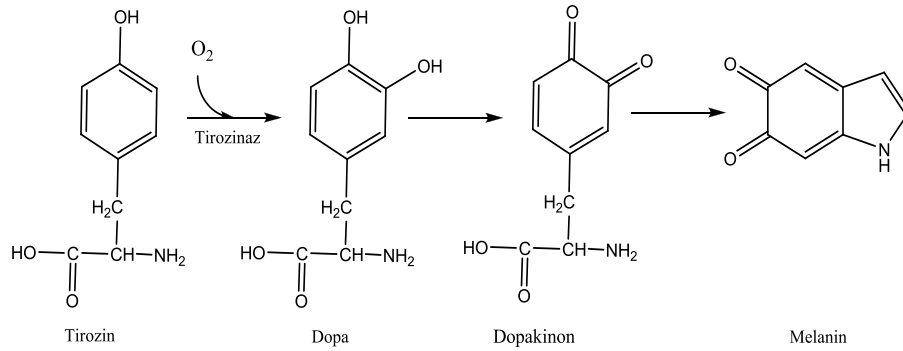
Polifenol oksidaz (PPO) enzimleri aktif merkezlerinde bakır içeren metalloenzimler grubundandır. Bu enzimler oksidoredüktaz sınıfına girmektedir. Substratları fenolik bileşikler olup, oksijen varlığında kararma reaksiyonu ile substratlarını oksitlemektedirler. Bu olay gıda sanayisinde "enzimatik esmerleşme" olarak bilinmektedir. Reaksiyon esnasında kullanılan moleküler oksijen suya indirgenir. Polifenol oksidazlar tirozinazlar (EC1.14.18.1; monofenol monooksijenaz), lakkazlar (EC 1.10.3.2; benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) ve katekol oksidazlardır (EC 1.10.3.1; 1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Tirozinazlar, monohidroksi fenollerin  $O_2$  varlığında *o*-kinonlara dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir. Lakkazlar, *p*-dihidroksi fenolleri  $O_2$  varlığında *p*-kinonlara dönüştüren enzimlerdir. Bunlarda *p*-difenol oksidaz ve lakkaz olarak bilinmektedir. Katekol oksidazlar ise *o*-dihidroksi fenollerin  $O_2$  varlığında *o*-kinonlara yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir [19].



Şekil 2.14. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu [20].

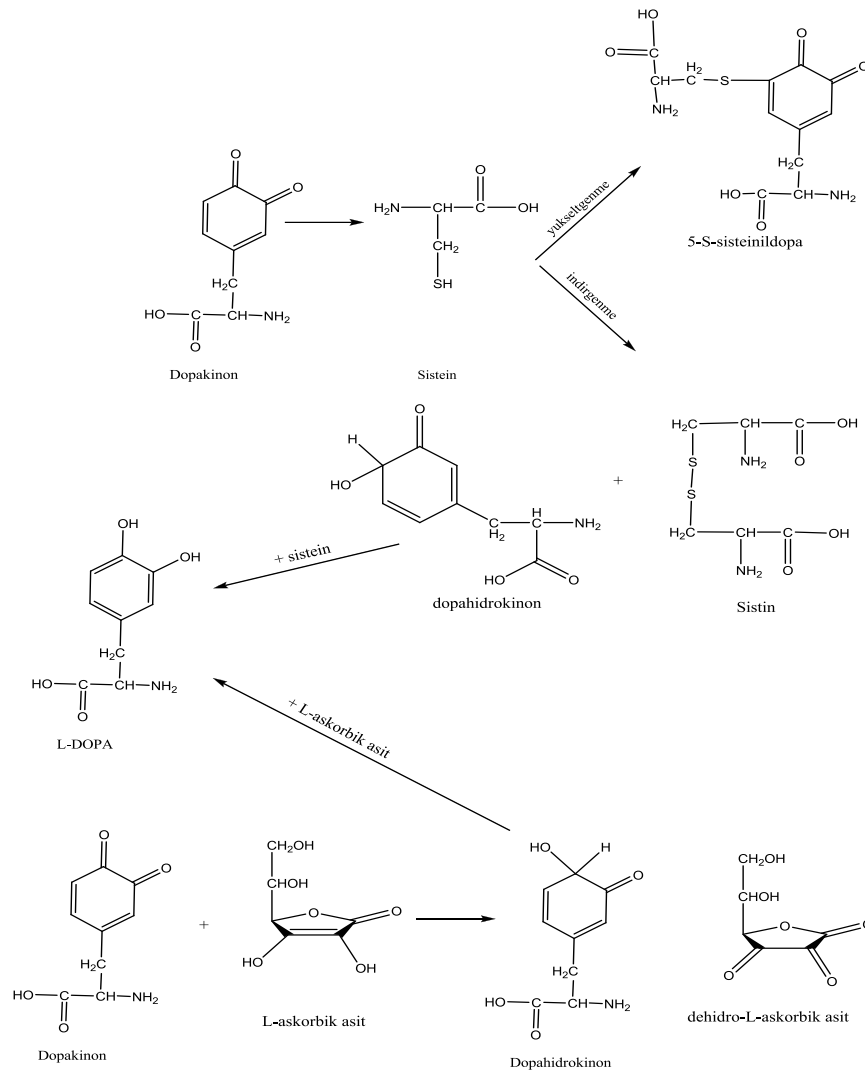
### 2.2.1. Tirozinaz enzimi

Tirozinazlar hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda, omurgasız hayvanlarda, prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalarda bulunmaktadır [20]. Tirozinazlar, insanlarda da bulunmaktadır [21]. Tirozinazlar melanogenezin ilk reaksiyonlarında ve melanin oluşumunda görev alan temel enzimdir. Melaninler, pigmentasyon ve sklerotizasyon gibi birçok biyolojik açıdan önemli fonksiyonlara katılırlar.



Şekil 2.15. Tirozinden melanin oluşumu [22].

Tirozinaz enzimi, fenolik bileşikleri oksitleyerek melaninlere dönüştürmesi üç farklı reaksiyon ile katalizlemektedir. Şekil 2.15.'deki reaksiyona göre ilk adımda L-tirozin amino asidi tirozinaz enzimi katalizörlüğünde hidroksillenerek L-dopa'ya dönüşmektedir. İkinci adımda L-dopa'nın dopakinon'a yükseltgenmesi ya da oksidasyonu ile sonuçlanır. Üçüncü adımda ise daha karmaşık bir yol olup insanlarda dopakinonun siklizasyon ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melaninine dönüşmesidir. Bu kompleks reaksiyon şekil 2.16.'da gösterilmiştir [22].



Şekil 2.16. Tirozin-dopa ve melanin ilişkisini anlatan reaksiyon şeması [22].

Memelilerde melanogenez saç, deri ve göz pigmentasyonu ile ilgilidir. Tirozinaz aktivitesindeki aksaklıklar albinizm ve hiperpigmentasyon ile sonuçlanır. Biyosentetik melanin sentezinde herhangi bir anormallik söz konusu olduğunda insanlarda ciddi estetik sorunlarına yol açmaktadır. Genellikle insanlar çeşitli etkilere maruz kalarak, bu estetik sorunların ortaya çıkmasına neden olur. Örneğin derinin UV ışınlarına maruz kalması hiperpigmentasyon ile sonuçlanmaktadır. Bu reaksiyon insan vücudunda kontrollü bir şekilde gerçekleşmektedir [23, 24, 25].

Doğada çok yaygın olan tirozinaz enzimi, mantar, patates, ayva, elma, şeftali, muz, kahve tohumları, çay yaprakları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklara göre yapılan araştırmalar sonucunda daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiş olup

kayısı, enginar, yabani gül, yabani pirinç, ıspanak gibi bitkilerde de tirozinaz enzimine rastlanmıştır [26]. Kısaca dünyadaki çoğu bitkilerde tirozinaz enzimin varlığından bahsedilebilir.

### 2.2.1.1. Polifenol oksidaz enzimi için optimum sıcaklık ve pH

Yapılan araştırmalar sonucunda PPO enziminin optimum pH'sı enzimin kaynağına ve substrata göre çok geniş aralıkta olduğu görülmüştür. PPO enzimin optimum pH aralığı pH 4,0-7,0 arasındadır. Birkaç kaynaktan elde edilen PPO enziminin pH 4,0'ün altında enzimin inaktif olduğu deneysel olarak ispatlanmıştır. Örneğin patatesten elde edilen PPO enzimi pirogallol ve klorojenik asit varlığında pH 5,0'te inaktif olduğu görülmüştür. Oysa mandalınadan elde edilen PPO enzimi pH 6,0'nın altındaki değerlerde pirogallol substratını oksitleyemediği deneysel olarak tespit edilmiştir [26]. Optimum sıcaklık özelliği de genellikle enzim kaynağı etkili olduğu deneysel olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla PPO enziminin optimum sıcaklık aralığının 25-35°C aralığında deneysel olarak tespit edilmiştir [27].

### 2.2.1.2. Tirozinaz, lakkaz ve katekol oksidaz enzimlerinin biyokimyasal farklılıkları

Polifenol oksidaz enzim grubuna giren, tirozinaz, lakkaz ve katekol oksidaz enzimlerin biyokimyasal açıdan farklılıkları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir. Bu grup enzimlerin bulunduğu yerler, fizyolojik rolleri, hücre yapısındaki muhteviyatları ve molekül ağırlıkları verilmiştir. Enzimlerin substratlara karşı olan ilgileri ve onların inhibitörleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin biyokimyasal ve yapısal özellikleri [20].

	<b>Tirozinaz</b>	<b>Katekol Oksidaz</b>	<b>Lakkaz</b>
Enzim sınıflandırılması	EC 1.14.18.1.	EC 1.10.3.1.	EC 1.10.3.2.
Bulunduğu Yerler	Memeliler, bitkiler, böcekler, mantarlar, bakteriler	Bitkiler, böcekler, mantarlar, bakteriler	Bitkiler, böcekler, mantarlar, bakteriler

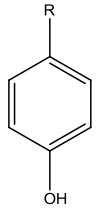


Tablo 2.1. (Devamı)

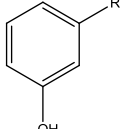
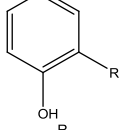
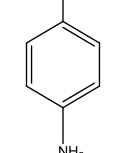
Fizyolojik Rolü	Pigment oluşumu, yara iyileşmesi, Sklerozasyon	Pigment oluşumu, yara iyileşmesi, Sklerozasyon	Lignin bozulması, Pigment ve meyve Vücut oluşumu, Detoksifikasyon, bitki Patogenezi
Hücre'de bulunduğu yer	Hücre içi (İntraceluller)	Hücre içi (İntraceluller)	Hücre dışı (Extraceluller)
Moleküler Ağırlığı	30-50 kDa	30-60 kDa	60-80 kDa (Üç aktif merkeze sahip) 30-40 kDa (İki aktif merkeze sahip)
Substratlar	<i>p</i> -Monofenoller, <i>o</i> -difenoller	<i>o</i> -difenoller	Monofenoller, difenoller, aril aminler, amino fenoller
Birincil Yükseltgenme - Oksidasyon Ürünü	<i>o</i> -Kinin	<i>o</i> -Kinin	Fenoksi Radikaller
Stokiyometrik O <sub>2</sub>	1 mol Monofenol: 1 mol O <sub>2</sub>	2 mol Difenol: 1 mol O <sub>2</sub>	4 mol Phe-OH: 1 mol O <sub>2</sub>
Spesifik inhibitörleri	Tropolon, Salisil Hidroksamik Asidi, 4-Heksil resorsinol, Fenil hidrazin.	Feniltiourea, N,N-dietiltiyo-karbamat	Küçük anyonlar, N-hidroksil glisin, Setiltrimetil amonium bromid, azid

Tablo 2.2.'de tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin monofenoller ile olan etkileşimi gösterilmiştir. Tablo 2.2.'de gösüldüğü gibi lakkaz enzimi bütün monofenollerin türevlerini oksitlemektedir. Tirozinaz enzimi ise sadece monofenollerin *para* formundaki türevlerini ve aromatik mono aminleri oksitlemektedir. Katekol oksidaz enzimi monofenollerin sadece *orto* formundaki türevlerini oksitlemektedir.

Tablo 2.2. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin monofenoller ile olan etkileşimi [20].

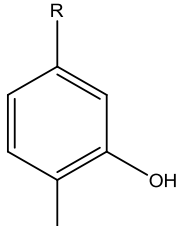
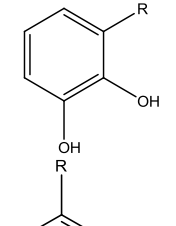
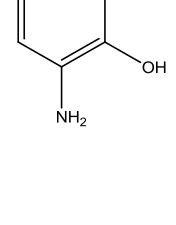
Substrat	Monofenoller		Aktivite		
	Molekül yapısı	Tirozinaz	Katekol Oksidaz	Lakkaz	
<i>p</i> -süstitüe fenoller		+	-	+	

Tablo 2.2. (Devamı)

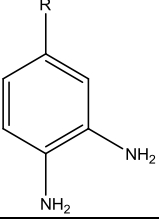
<i>m</i> -süstitüe fenoller		-	-	+
<i>o</i> -süstitüe fenoller		-	+	+
Aromatik mono aminler		+	-	+

Tablo 2.3.'de tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin difenoller ile olan etkileşimi gösterilmiştir. Tablo 2.3.'de görüldüğü gibi lakkaz enzimi bütün difenollerin türevlerini ve aromatik para süstitüe aminleri oksitlemektedir. Tirozinaz enzimi ise difenollerin sadece *meta* formundaki türevlerini oksitlemektedir. Katekol oksidaz enzimi sadece *para* süstitüe difenollerini oksitlemektedir.

Tablo 2.3. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin difenoller ile olan etkileşimi [20].

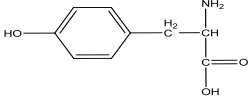
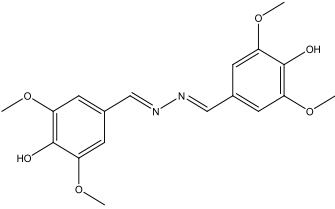

Difenoller		Aktivite		
Substrat	Molekül yapısı	Tirozinaz	Katekol Oksidaz	Lakkaz
<i>p</i> -süstitüe <i>o</i> -fenoller		+	+	+
<i>m</i> -süstitüe <i>o</i> -fenoller		-	-	+
<i>p</i> -süstitüe <i>o</i> -aminofenoller		+	Etkileşim yok	+

Tablo 2.3. (Devamı)

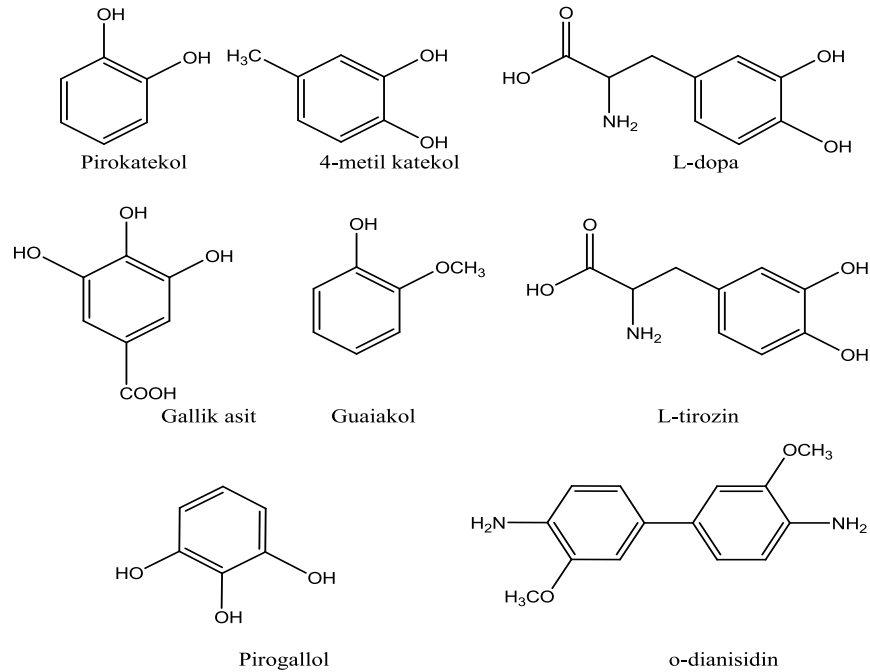
<i>p</i> -süstitüe <i>o</i> -diaminler		+	Etkileşim yok	+
---	---	---	---------------	---

Tablo 2.4.'de tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin seçilmiş ya da özel substratlar ile olan etkileşimi gösterilmiştir. Tablo 2.4.'de görüldüğü gibi lakkaz enzimi seçilmiş substratların çoğunu oksitlemektedir. Tirozinaz ve katekol oksidaz enzimlerinin ise daha seçici davrandığını görülmektedir.

Tablo 2.4. Tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz enzimlerinin substratlar ile olan etkileşimi [20].

Adı	Molekül yapısı	Aktivite		
		Tirozinaz	Katekol Oksidaz	Lakkaz
L-Tirozin		+	-	-
Syringaldazin		-	-	+
<i>p</i> -Fenilen diamin		-	-	+

Polifenol oksidaz enzim grubun en çok etkileşim içinde olduğu substratlar, Şekil 2.17.'de verilmiştir.

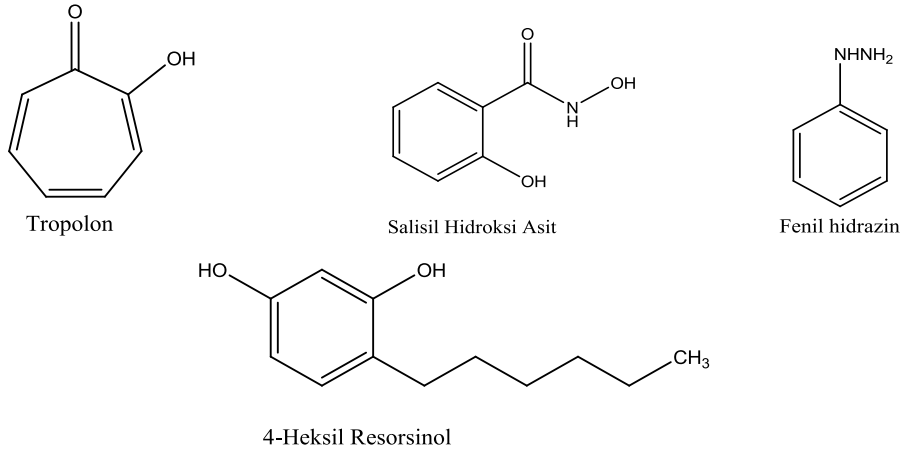


Şekil 2.17. PPO grubu enziminin substratları

### 2.2.1.3. PPO enzimin inhibitörleri ve aktivatörleri

Meyve ve sebzelerde meydana gelen esmerleşme reaksiyonları ana kaynağı yapılarında bulunan PPO enzimidir. Esmerleşme reaksiyonunu inhibe etmek için çeşitli inhibitörler denenmiştir. PPO enziminin esmerleşme ya da kararım reaksiyonunu engellemek için çeşitli inhibitörler geliştirilse de bunun yanında bu esmerleşme reaksiyonuna neden olan en önemli etkenlerden biri oksijendir. Dolayısıyla PPO enzimin katalizlediği reaksiyon, meyve ve sebzelere zarar verdiği için, geliştirilen inhibitörlerin yanında ortamdan oksijenin uzaklaştırılmasıyla istenmeyen esmerleşme reaksiyonuna son verilebilir [28].

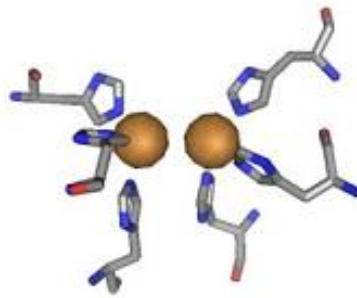
Tablo 2.1.'de polifenol oksidaz grubuna ait her üç enzim içinde en önemli inhibitörleri gösterilirken Şekil 2.18.'de tirozinaz enzimi için en önemli inhibitörler gösterilmektedir. Gıda sanayisinin en çok istediği tip inhibitörler, sebze ve meyvelerin besinsel değerlerini etkilemeyen ayrıca meyve ve sebzelerin bozulmasını engelleyen inhibitörlerdir. Malesef günümüz dünyasında sebze ve meyveler için kullanılan inhibitörlerin hem sağlık açısından tehlikeli olduğu hemde besin değerlerin negatif yönde etki ettiği ispatlanmıştır [28].



Şekil 2.18. Tirozinaz enzimin en çok bilinen inhibitörleri [28].

### 2.2.2. Bakır bölgeleri ve reaksiyon mekanizması

Polifenol oksidaz grubuna ait enzimlerin hepsi aktif merkezlerinde bakır atomları içeren metalloenzimlerdir. Katalizledikleri reaksiyonlarda bakır atomları önemli rol oynamaktadır. Tirozinaz enzimindeki bakır atomların genel özelliği "tip 3 bakır mekrezi" (T3) denen bir antiferromagnetik olarak bağlanmış bakır iyonları CuA ve CuB şeklindedir. Aktif bölgedeki bu CuA ve CuB atomlarının her ikisinde dörtlü  $\alpha$ -heliks sarmalı içerisinde yerleşmiştir. Bir bakır atomu üç histidin molekülü tarafından koordine edilmektedir [29].

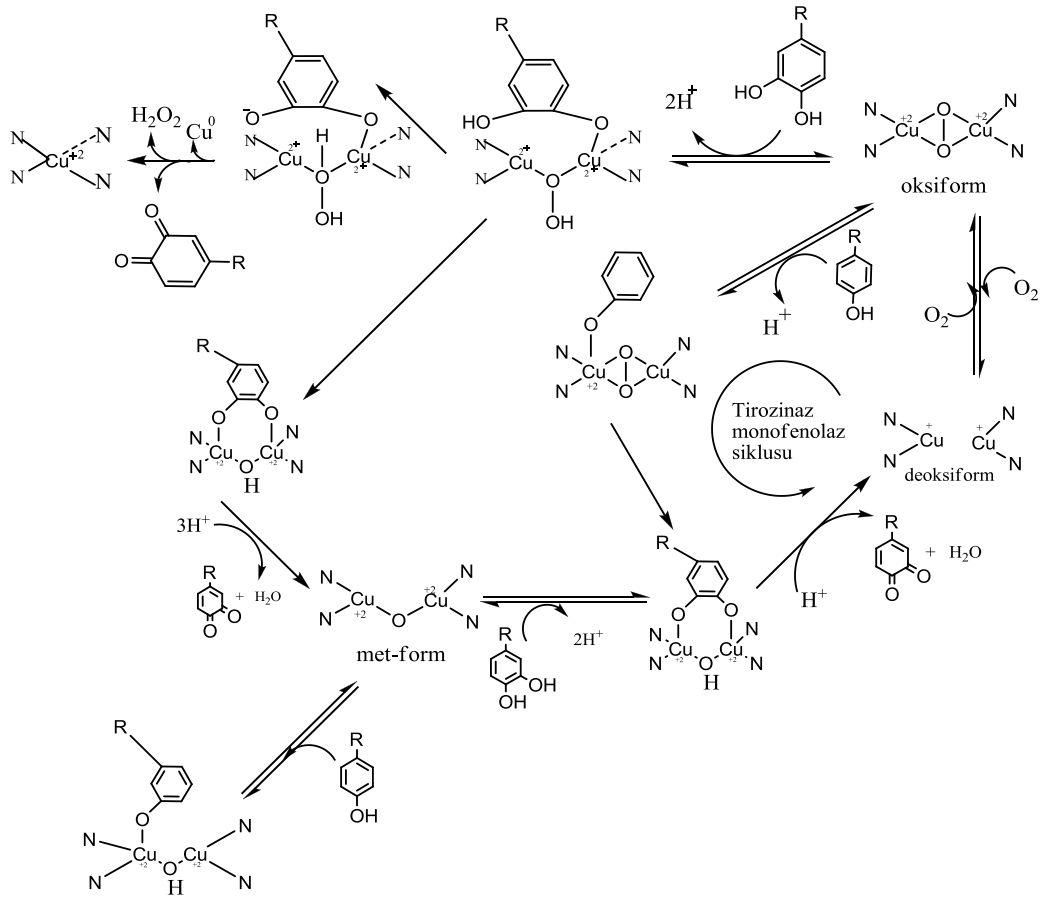


Şekil 2.19. T3 tipi bakır iyonlarının tirozinaz enzimin aktif bölgesindeki üç boyutlu yapısı [29]

Şekil 2.19'da altın rengindeki toplar bakır atomlarını temsil etmektedir. Bakır atomların etrafını saran halka yapıları ise histidin molekülleridir. Bakır

atomları tirozinaz enzimin aktif merkezinde olup, substrat ile etkileşim esnasında aktif rol oynamaktadırlar.

Tirozinaz enziminin monofenoller ve difenoller ile olan reaksiyon mekanizması Şekil 2.20.'de gösterilmiştir. Reaksiyon mekanizması iki farklı yol üzerinden gösterilmeye çalışılmıştır. Reaksiyon mekanizmasına dikkat edildiğinde, enzimin aktif merkezinde bulunan bakır atomlarının oksijen ile etkileşim içinde olduğunu görebiliriz. Bu oksijenin monofenolleri ve difenolleri kinonlara yükseltgemesi reaksiyon mekanizması üzerinden Şekil 2.20.'de görülmektedir [30].



Şekil 2.20. Tirozinaz enzimin difenolaz ve monofenolaz katalitik döngünün moleküler mekanizması [31].

Reaksiyon mekanizması sadece tirozinaz enzimine ait olmayıp aynı zamanda katekol oksidaz enzimine de ait bir mekanizmadır.

### 2.2.3. PPO enzimi ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar ve uygulama alanları

PPO enzimi sağlık, gıda, kozmetik, ilaç ve kimyasal maddelerin arıtılmasında geniş uygulama alanı bulunabilen bir enzimdir. Sebze ve meyvelerde meydana gelen esmerleşme reaksiyonları sadece PPO enzimine bağlı değildir. Yapısında katekol oksidaz, lakkaz gibi enzimleride içeren sebze ve meyvelerde kararma reaksiyonları gerçekleşmektedir. PPO enzimin aktivitesi esmerleşme reaksiyonunun şiddetini de belirler. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi sonucunda gıdalarda kararma meydana gelir. Sonuç olarak istenmeyen gıdaların tadında ve görünüşündeki değişiklikler gıda sektörünü inanılmaz derecede zarara uğratar. Polifenol oksidaz enzimin gerçekleştirdiği kararma reaksiyonu her ne kadar gıda sektöründe istenmesede ne var ki kahve, çay, kuru üzüm, kakao, kuru incir, kuru erik ve benzeri gıdaların görünüş ve tatlarının tercih edilen seviyeye ulaşabilmesi için PPO enziminin aktif olarak bulunması istenir [33].

Bu çalışmada ısırgan otun (*Urtica dioica* L.)'dan ekstrakte edilen polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. PPO enzimi, amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve CM-Sephadex yöntemi iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılıp, karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır. PPO enzimi, katekol, 4-metil katekol, L-dopa aktivitesi göstermiştir. Enzim L-tirozin, p-krezol, pirogallol, trans-sinamik asit ve L-dopa substratları ile optimum pH ve sıcaklık koşulları tespit edilmiş. L-tirozin'in en uygun enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri 4,5 ile 30°C'dir.  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri ise  $7,9 \times 10^{-4}$  M ile 11290 EU/mL olarak saptanmıştır. Yapılan çalışma kapsamında L-askorbik asit, benzoik asit, glutatyon, siyanür, salisilik asit, sodyum dietil ditiyokarbamat tiyoüre, sodyum metabisülfid ve  $\beta$ -merkaptotanol gibi bileşiklerin inhibitör etkisi incelenmiştir. Sonuçlar en etkili inhibitörün yarışmalı inhibitör etkisi gösteren ve  $K_i$  değeri  $1,79 \times 10^{-9}$  M olan sodyum dietil ditiyokarbamat olarak belirlenmiştir [34].

Dere otundan (*Anethum graveolens*) PPO enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılsa da diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile bir adım daha saflaştırılmıştır. PPO aktivitesinin kinetik çalışmaları 420 nm'de zamana karşı olarak

katekol, dopamin ve klorojenik asit gibi substratlarla yapılmıştır. Substratlar arasında PPO enzimin en iyi aktivite gösterdiği substratın klorojenik asit olduğu tespit edildi. Enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri ve iyonlara karşı olan dayanıklılığı incelenmiştir. Saflaştırılan PPO enzimi üzerinde yapılan inhibitör çalışmalarında L-sistein yarışmasız inhibisyon etkili olduğu tespit edilmiştir. Enzimin her üç substrat ile olan reaksiyonlarında 10°C ile 75°C sıcaklığında aktivasyon enerjileri Arrhenius denklemi ile hesaplanmıştır. Ayrıca enzimin entalpi ( $\Delta H$ ) değeri ve  $Q_{10}$  değerleri de hesaplanarak, dere otunun peynir üretiminde rahatça kullanılacağı saptanmıştır [35].

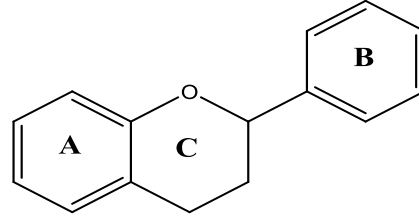
Bir diğer çalışmada elmanın kararmasını engellemek için, Enoki mantarının (*Flammulina velutipes*) üç farklı çözücü kullanılarak ekstraktları hazırlanmıştır. Çözücü olarak aseton, etanol ve sıcak su kullanılmıştır. Enoki mantarından elde edilen özütlerin elmadaki kararma reaksiyonunu durdurmak için PPO aktivitesini inhibe etmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Hazırlanan özütler ile elmanın PPO'ya bağlı gelişen esmerleşme reaksiyonunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [36].

Diğer çalışmada, mango meyvesinden (*Mangifera indicacv. Manila*) PPO enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin biyokimyasal özellikleri incelenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. PPO enzimi hidrofobik etkileşim ve iyon değişimi kromatografisi ile 216 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE'de enzimin molekül ağırlığının 31,5 kDa olduğu saptanmıştır. PPO enzimi en yüksek aktiviteyi  $K_m$  değeri 2,77 mM ile pirogallol substratı ile göstermiştir. Bunun yanında optimum pH ve sıcaklık değerlerinin de 6,0 ile 20-70°C olduğu saptanmıştır. Enzim aktivitesini inhibe eden en etkili inhibitörün 0,1mM ile kojik asit PPO'yu tamamen inhibe ettiği saptanmıştır [37].

Başka bir çalışmada ise, mantardan saflaştırılan tirozinaz enzimin üzerinde bazı flavonoidlerin (Şekil 2.21.) etkileri incelenmiştir. Bu flavonoid bileşikleri L-3,4-di hidroksifenilalanin (L-dopa) substratı varlığında enzim üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada etkileri incelenen flavonoid bileşiklerin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin tersinir olduğu tespit edilmiştir. Flavonoid bileşiklerin çoğu yarışmalı inhibisyon etkili olduğu halde aralarında Luteolin adlı flavonoid bileşiği yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu tespit edilmiştir. Krizin



(Chrysin) ve Quercetin-3-rutinosid adlı flavonoid bileşikleri ise tirozinaz enzimi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir [38].



Şekil 2.21. Flavonoid molekülü [38].

Mantardan (Sigma Chemical Co.) izole edilen tirozinaz enzimi üzerinde sentezlenen alkilbenzaldehyitlerin etkileri incelenmiştir. Tirozinaz enzimi bilindiği üzere difenolik ve mono fenolik bileşikleri üzerinde etkilidir. Çalışmada özellikle tirozinaz enzimin difenolaz etkisi incelenmiştir. Difenoiaz üzerinde L-dopa substratı varlığında alkil benzaldehyitlerin etkisi dönüşümlü inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. *o*-Tolualdehyit ve *m*-tolualdehyit karışık tipli inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. *p*-alkilbenzaldehyitler ise yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu tespit edilmiştir. *p*-Alkil benzaldehyitler olarak kullanılan bileşikler, *p*-tolualdehyit, *p*-etil benzaldehyit, *p*-propil benzaldehyit, *p*-izopropil benzaldehyit, *p*-ter-butil benzaldehyit, *p*-butil benzaldehyit, *p*-pentil benzaldehyit, *p*-heksil benzaldehyit, *p*-heptil benzaldehyit ve *p*-oktil benzaldehyittir. *p*-Heksil benzaldehyitin inhibisyon etkisi en yüksek olduğu tespit edilmiştir. *p*-Alkilbenzaldehyitlerin alkil gruplarının hidrofobik etkilerinin de etkili olduğu tartışmalarda yer almıştır [39].

### 2.3. Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

Bu çalışmada kaynak bitki olarak kullanılan bitki Türkiye'de tüylü pavlonya olarak bilinmekte ve Latince adı *Paulownia tomentosa*'dır. Bitkinin yapısal özelliklerine bakıldığında kapalı tohumlu ve çift çenekli olup scrophulariaceae ailesine aittir. Bitkinin ortalama boyu 7-15 m olup yaprakları 15-30 cm boyunda ve 10-20 cm genişliği ile kalp şekilli yaprakların sapları ise 10-15 cm'dir. Sivri uçlu olan yaprakların üst yüzeyi yeşil, alt yüzeyi ise gri-yeşil renkli ve ayrıca tüylüdür. Genellikle ilkbahar mevsiminde yaprakları açmadan önce çiçekler açar (Şekil 2.22).

Çiçekleri açmadan 5-6 cm boyun tüylü yuvarlak kapsül biçiminde olup sivri uçlu ve yeşil renklidirler [41].

Bu ağaç daha fazla sanayi ağacı olarak da bilinmektedir. Çok çabuk büyüyen bir ağaç olarak bilinmekte ve bir sene içinde 8 metreye kadar büyümektedir. Ağaç çabuk büyüdüğü için sanayi de en çok tercih edilen ağaçlardan biridir. Özellikle kerestecilik alanında kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda birçok ülkede yetiştirilmeye başlanan bitki ilk olarak Çin'de daha sonra Amerike Birleşik Devletleri'nde yetiştirilmeye başlandı.



Şekil 2.22. *Paulownia tomentosa* ağacı [40] (Solda: meyve, sağda meyve vermeden önceki hali)

Ağacın çok fazla tercih edilmesinin nedenleri, kerestecilik alanı, soluk sarı renginde olup kokusuz, pürüzsüz ve budaksızdır. Birçok fiziki ağır şartlara dayanıklı yüksek ısı direncine sahip gibi özellikleri vardır. Ağacın yapısında selüloz oranı %45-50 aralığında olması kağıt sanayisinde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bal üretimi, ilkbahar aylarında *Paulownia tomentosa* çok miktarda çiçek üretir. Ağaçtan elde edilen bal daha çok ticari karışımlar için kullanılır. Hayvan yemi, *Paulownia tomentosa* ağacında çok geniş ve yüksek hacimde yapraklar üretilir. Bunun sonucunda yaprakların kurutulması sırasında besin değeri açısından zengin olup, ağırlıkları oranında tahıl ile aynı besin değerine sahiptirler. Gübre üretimi, ağacın kökleri toprağın derinliklerine indiği için genelde hiçbir ağacın alamadığı rutubeti ve besin maddelerini almaktadır. Böylece sonbahar aylarında dökülen yaprakların toprak ile karışması sonucunda, toprağın verimliliğini artırır. Hava kirliliği, ağacın

yaprakları havada oluşan çeşitli zehirli gazları, toz ve duman gibi hava kirliliğine neden olanları emerek temizlemektedir. Genelde son yıllarda kentlerde *Paulownia* ağaçların dikimi her geçen gün artmaktadır. Derin köklerin oluşumu erozyonu büyük oranda azaltır. Ağacın yapraklarının büyük olması rüzgara karşı bir kalkan olarak kullanılmaktadır. Artık birçok ülke ısınmak için odun kullanımından, enerji sektörü *Paulownia* ağaç yetiştirme işine ciddi anlamda yatırımlar yapmaktadır [41, 42, 43].

### **2.3.1. *Paulownia tomentosa* ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar**

Son yıllarda *Paulownia tomentosa* ile ilgili bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır. *Paulownia tomentosa* ağacı daha fazla Çin'de ve Kuzey Amerika kıtasında sık rastlanan ve geleneksel olarak önem arz eden ağaçlardan biridir. Dünya genelinde *Paulownia tomentosa*'ya artan ilginin genelde ticari amaçlı olduğu görülmektedir. Bitkinin bir sene içinde 5 metreye kadar büyümesi, kağıt sanayisine sağladığı katkıyı büyük ölçüde arttırmıştır. Bugün Kosova ve diğer Balkan ülkelerinde *Paulownia tomentosa* ağacının kullanımı her geçen gün artmaktadır. *Paulownia tomentosa* ağacı ile yapılan bilimsel makaleler aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Kristyna Sch. ve arkadaşları tarafından *Paulownia tomentosa* ağacının fitokimyasal profilin aydınlatılması için ağacın çeşitli bölgelerinden ekstraktların incelemiştir. *Paulownia tomentosa* Çin tıbbında geleneksel olarak kullanılan yaygın bitkilerden biri olarak bilinmektedir. *Paulownia tomentosa* bitki özütünden flavonoidler, lignanlar, fenolik glikozitler, kinonlar, terpenoidler, gliseridler, fenolik asitler ve çeşitli diğer bileşikler izole edilmiştir. Bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ve bunun yanında güçlü antioksidan, antibakteriyel ve antiflojistik aktivite özelliği gösteren bileşikler olduğu bilinmektedir. Özellikle prenilsayonlu flavonodilerin izole edilmesi ve tanımlanması üzerine odaklanılmıştır. Bu ekstraktların, insandaki kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği ve insanda bulunan kolinesteraz, butirilkolinesteraz ve bakteriyel nöraminidazların etkilerini inhibe ettiği deneysel olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, *Paulownia tomentosa*'dan çok yönlü sekonder metabolitlerin ve özellikle de prenil yapılı flavonoidlerin zengin bir

kaynağı olduğu belirlenmiştir. Günümüzde flavonodiler, lignanlar, fenolik glikozitler, kinonlar, terpenoidler, gliseridler, fenolik asitler ve diğer çeşitli bileşikler bu bitkiden izole edilmektedir. *Paulownia tomentosa*'dan izole edilen prenil yapılı flavonodilerin farmakolojik etkileri araştırılıp incelendiğinde bunların özelliklerinden dolayı ilaç sanayisinde her geçen gün *Paulownia tomentosa*'ya karşı her geçen gün ilgi artmaktadır. Yapılan çalışmalar, *Paulownia tomentosa*'nın çeşitli antibakteriyel, antioksidan, antiflojistik ve sitotoksik aktiviteleri önleyici etkilerinin insanda bulunan bazı enzimlere de etkili olduğunu göstermiştir. Flavonoid iskeletinin yan zincirinin altıncı karbonuna bağlanmış modifiye prenil veya geranil yapılı bileşikler 40'tan fazla olduğu keşfedilmiştir. Bu bileşikler *Paulownia tomentosa* ağacının çiçek, meyve ve yapraklarından izole edilmiştir. Bu bitkiden izole edilen bileşiklerin farmakolojik olarak etkilerin ileriye yönelik daha fazla *in vivo* çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir [44].

Šmejkal Karel ve arkadaşları tarafından, *Paulownia tomentosa* ağacı meyvesinden C-geranil flavonoidlerin antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada C-Geranil flavonoidlerin antibakteriyel etkili olduğu deneysel olarak tespit edilmiştir [45].

Meng Z. ve arkadaşları tarafından, *Paulownia tomentosa* çiçeği özütünden izole edilen bileşiklerin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bu ekstartın etanol ile (Ekstrakt/etanol-v/v) %20, %40, %60 ve %80 oranında karışımları hazırlanmış ve karışımlara yönelik DPPH, süper oksit anyonlar ve hidroksil radikal yöntemleri ile anti oksidan özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak en fazla antioksidan özelliğinin %60 oranındaki karışımda olduğu bulunmuştur. Bu karışımdaki ana bileşikler UPLC (Ultra Performans Sıvı Kromatografisi)-TOF (Time of Flight-zaman fonksiyonu olarak kütle spektrometrisi)-MS/MS (Mass-Kütle spektrometrisi) ve UV (Ultra viyole-kızıl ötesi spektrometrisi) spektral analiz yöntemleri ile tespit edilmiştir. %20'lik karışım içinde absisik asit ve *t*-absisik asit bulunduğu tespit edilmiştir. %40'lık karışım içinde ise beş bileşik bulunmuş ve bu bileşiklerin *t*-absisik asit, luteolin, apigenin, triksin ve 4,5,7-trihidroksi-3-metoksiflavon olduğu tespit edilmiştir. %60'lık karışımda ise üç bileşik olduğu tespit edilmiş ve bu bileşiklerin *t*-absisik asit, apigenin ve 4,5,7-trihidroksi-3-metoksiflavon oldukları tespit edilmiştir.

%80'lik karışımda ise 6 bileşik olduğu tespit edilmiş ve bu bileşiklerin luteolin, apigenin, 4,5,7-trihidroksi-3-metoksiflavon, palinownin, 3-metildioplakol ve dioplakon olduğu tespit edilmiştir [46].

Cho Jung Keun ve arkadaşları *Paulownia tomentosa* ağacı meyvesinin metanol ile özütlerinden izole ettikleri geranillenmiş flavonoidlerin proteaz enzimini inhibe ettiğini deneysel olarak tespit etmişlerdir. Bu geranillenmiş flavonoidler hepsi 3,4-dihidro-2H-piran grubunu ihtiva etmektedir. *Paulownia tomentosa* meyvesinin metanol özütünde bulunan flavonoidlerin proteaz enzimini 5,0 ila 14,4  $\mu$ M aralığında inhibe ettiğini göstermişlerdir [47].

Yukarıda bahsedilen çalışmalar aslında son yıllarda yapılan çalışmalardır. Genellikle yapısında içerdiği kimyasal moleküllerin tanımlanması nitel ve nicel analizlerin kısmende olsa yapıldığı görülmektedir. Yapısındaki enzimler ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır.

### 2.3.2. *Verbascum thapsus*

Türkiye'de sığır kuyruğu olarak bilinen otsu bir bitkidir. Kosova'nın birçok yerinde bulunduğu gibi dünyada özellikle Avrupa, Kuzey Afrika, Asya, Amerika ve Avustralya gibi kıtalarda çok sık rastlanan bitkidir. *Verbascum thapsus* Scrophulariaceae familyasına ait olup iki yıllık bir otsu bitkidir. Genelde bu familyaya ait olan bitkiler iki yıllıktır. Morfolojik açıdan incelendiğinde, Haziran ile Ağustos aylarında sarı renkli çiçekler açmaktadır [48].



Şekil 2.23. Bir yıllık *Verbascum Thapsus* [51].

Bitkinin boyu 20 cm ile 150 cm arasında değişmektedir. Bitki iki yıllık olduğundan, ilk yıl filizlendiğinde sadece yaprakları açmaktadır (Şekil 2.23.). Yaprakları genelde büyük olup tüylüdür. Kış uykusuna girildiğinde, ikinci yılın bahar ve yaz aylarında çiçekleri açıp boyu yaklaşık 2 metreye kadar çıkmaktadır. Gövdeleri dik çiçek yaprakları yünümsü tüylerle kaplanmaktadır [49]. Bitkinin yaprakları gövdenin dibinde olup rozet şeklindedir (Şekil 2.24.).



Şekil 2.24. *Verbascum thapsus* ikinci yılında [51].

Bitkinin gövde kısmında yapraklar vardır ancak küçük ve sapsızdırlar. Çiçekler bitkinin gövdesinde ve uca doğru gittikçe sıklaşarak neredeyse salkım şeklinde toplanmışlardır. Çiçekleri çanak ve ta yaprakları beşer parçalıdır (Şekil 2.25.).



Şekil 2.25. *Verbascum thapsus* çiçekleri [51].

Meyveler yuvarlakça olup, çok tohumludur. Çiçekler genelde sabah erkenden açıp öğlene doğru kapanır. Çiçekten sonra elde edilen kapsüller çiçeğin meyvesidir. Bir kapsül 700 kadar tohum içerebilmektedir (Şekil 2.26.). Tohumlar toprağa düştüğünde

uzun süre toprakta kalabilir ve dış etkenlere dayanıklıdır. Şartlar elverişli olduğunda tohumlar tekrar filizlenip yeniden canlanırlar [48].



Şekil 2.26. *Verbascum thapsus* kapsülleri [51].

Bitki yapısında çeşitli böcekleride ihtiva eder. Bitkinin yaprakları tüylü olmasından dolayı dış zararlı etkenlere karşı dayanıklıdır. Yapısında saponinler, kumarin bileşiğin türevleri ve glikozidleri içerdiği için tıbbi bitki kullanımı oldukça yaygındır. Bugün ilaç sektörünün önemli bitkisel kaynaklarından biri olarak bilinmektedir. Akciğer hastalıkların tedavisinde ilaç yapımında kullanımı oldukça yaygındır [48, 49]. Bitkinin özellikle yetiştirilmesine gerek duyulmaz doğada çok fazla bulunduğundan gereken ihtiyacı karşılamaktadır. Çiçek yapısında çeşitli esansiyal yağlar ve glikozitler içermektedir. Antioksidan özelliği yüksek olan *Verbascum thapsus*, genelde ilaç yapımında, muhsil hazırlamada kullanılır. Bazı türlerinin çiçek yapısında saponin içerdiği görülmüştür [50].

### 2.3.3. *Datura stramonium*

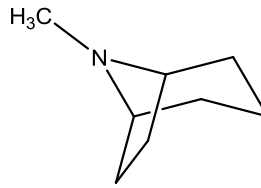
*Datura stramonium* Türkiye ve Balkanlarda yetişen yabani cinsten bir bitkidir. Halk arasında genellikle boru çiçeği, şeytan elması, abu zambak, tatula, domuz pıtırı ve tatala gibi isimlerle bilinmekle birlikte bazı yörelerde süs bitkisi şeklinde bahçelerde yetiştirilebilmektedir. Bitki, patlıcangiller-Solanaceae familyasına ait olan boyu 1 m'ye kadar çıkan otsu bir bitkidir. Yapraklar 8 ile 20 cm uzunluğunda, pürüzsüz, dişli, yumuşak ve düzensiz dalgalıdır. Yaprakların üst yüzeyi koyu yeşil, alttaki açık yeşil olup, acı ve mide bulandırıcı bir tada sahiptir ve bu bitki özlerine verilir ve yapraklar kurutulduktan sonra bile kalır. *Datura stramonium* genellikle yaz boyunca çiçek açar. Çiçekleri beyazdır. Parfümlü çiçekler trompet şeklindedir, beyaz ile

kremsi veya menekşe, 6-9 cm'dir. Çiçekleri, hoş koku yayıp geceleri açılır. Yumurta şeklindeki kapsülün içi dörde ayrılmıştır [52]. Kapsül 3 ile 8 cm kadardır. İçinde bir sürü siyah tohum vardır (Şekil 2.27.).



Şekil 2.27. *Datura stramonium* bitkisi'nin yapısı [54].

Önceleri tıbbi amaçlı özellikle anestezide kullanımı yaygınken kontrolsüz kullanımı nedeniyle ölümlere neden olduğu için kullanımı yasaklanmıştır. Aynı zamanda yerel olarak halk tarafından bronşit, astım, hemoroid ve egzema gibi bazı hastalıkların tedavilerinde alternatif ilaç olarakda uygulanmaktadır. *Datura* bitkisi ve bunun türevleri, genelde yapılarında antiklorojenik olarak sınıflandırılan atropin, hiosimamin ve skopalamın gibi tropan alkaloidleri içerir [52].

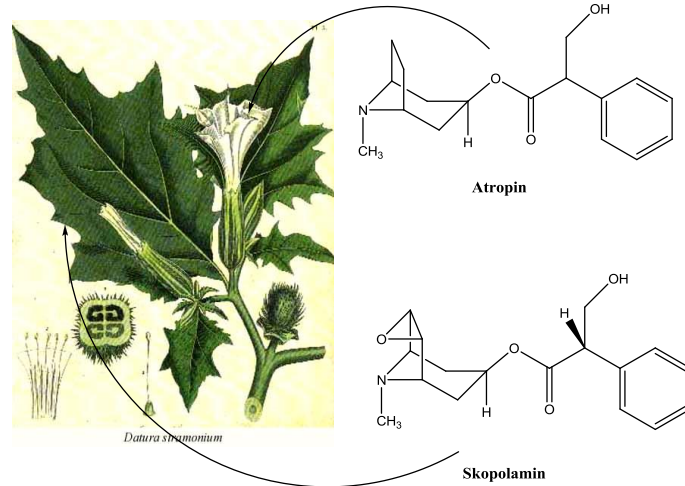


**Tropan**

Şekil 2.28. Tropan mokolülü [52].

*Datura stramonium* yapısında bazı alkaloidler ihtiva etmektedir. Tropan alkaloidin (Şekil 2.28.) türevlerini içerdiği için analjezik olarak kullanılmaktadır [53].





Şekil 2.29. *Datura stramonium* bitkisinde bulunan önemli alkaloidler [53].

Bitki yetiştirmeye başladığında yapraklarında skopalamin (Şekil 2.29.) molekülünü içermektedir. Bitkinin gelişim aşamasında skopalamin yüksek dozda bulunmaktadır. Çiçekler açmaya başladığında bu doz düşer. *Datura* yaprağında skopalamin bulunmaktadır. Çiçeğinde ise atropin molekülü (Şekil 2.29.) bulunmaktadır. Tek bir *Datura* tohumunda 0,1 mg Atropin içermektedir. İnsan için ölümcül doz atropin 10 mg olup, skopalamin ise 2-4 mg'dır. Bitki öforik ve hallüsinojenik sahip olduğundan dikkatsizce ve yüksek miktarda kullanıldığında zehirlenmelere neden olabilmektedir [52, 53].

#### 2.3.4. *Solanum nigrum*

*Solanum nigrum*, it üzümü ya da köpek üzümü olarak bilinir. Tropikal bölgelerde yetişen bitki (Şekil 2.30.), Türkiye'de olduğu gibi Kosova'nın dağlık ve ovalık bölgelerinde bulunmaktadır. Özellikle yol kenarlarında sıkça rastlanmaktadır. *Solanum nigrum*, patlıcangiller (Solanaceae) familyasına ait olan otsu bir bitkidir. Bitkinin boyu 30-120 cm uzunluğuna kadar ulaşabilir [56].



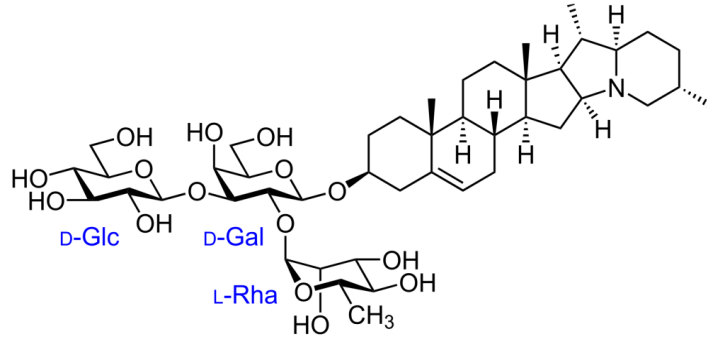
Şekil 2.30. *Solanum nigrum* bitkisi [56].

Çiçekleri beyaz ve anterleri açık sarı renktedir (Şekil 2.31.). Meyvesi çıktığı zaman önce yeşil daha sonra siyah renge dönüşmektedir. Meyvesi 6-8 mm'dir. Çiçekleri yazın sıcak aylarında (Temmuz-Eylül) açar. Meyve ise Ekim ayına doğru oluşur. *Solanum nigrum*'un çeşitleri vardır. Bitki yapısında çeşitli esansiyal yağlar içerdiğinden ilaç sektöründe kullanılan bitkilerden birisidir [56, 57].



Şekil 2.31. *Solanum nigrum* çiçekleri [56].

*Solanum nigrum*'un bir çok çeşidi vardır. Bunlar *S. americanum*, *S. opacum*, *S. douglasii*, *S. ptychanthum*, *S. sarrachoides*, *S. villosum*, *S. scabrum* ve *S. retroflexum* en çok bilinenleridir. Birbirine benzer türleri de olmasına rağmen *Solanum nigrum*'un yaprakları yıldızimsı şeklinde olup karakteristik özelliğe ve farklılığa sahiptir.



Şekil 2.32. *Solanum nigrum* bitkisinin yapısında bulunan Solanin molekülü [58].

Bitkinin meyveleri tüketildiğinde, insanda ciddi sorunlara neden olur. Bitki yapısında solanin adında zehirli bir molekül ihtiva etmektedir. Bu molekül domates, patates ve patlıcan gibi ürünlerin yapısında da bulunmaktadır. Bitki yapısında ihtiva ettiği solanin moleküllerini böceklere karşı bir çeşit savunma mekanizması olarak kullanılmaktadır. *Solanum nigrum* bitkisinde Solanin (Şekil 2.32.) özellikle bitkinin meyvelerinde daha olgun olmadığı zamanlarda (yeşil renkte) çok fazla miktarda bulunmaktadır (Şekil 2.33.). Yanlışlıkla tüketilen meyve, insanda ateş, terleme, karın ağrısı, kusma, ishal ve uyuşma gibi semptomlara neden olabilir [56, 58].



Şekil 2.33. *Solanum nigrum* meyveleri, solda olgunlaşmadan ki hali sağda ise olgunlaşmış solanum meyveleri [56].

Bu bitki Yunan antik çağı ve Çin'de eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitki'nin meyve kısmı zehirlidir. Çin'de bitki zehirli olmasına rağmen yemeklerde acı baharat olarak kullanılmaktadır [57]. Bitkinin yapısında bulunan solanin molekülü uyuşukluğa neden olduğu için önceden sakinleştirici olarak kullanılmıştır. Bugün ilaç sektöründe *Solanum nigrum* önemli bir yere sahiptir [56, 58].

### 2.3.5. *Tanacetum vulgare*

*Tanacetum vulgare*, Tansy olarak bilinmektedir. Türkçe'de solucan otu olarak bilinir. *Tanacetum vulgare*, Asteraceae familyasındandır. Kökü dik ve yapraklı, bitkinin boyu 50-150 cm'dir. Yaprakları 10-15 cm uzunluğunda, 8 cm genişliğinde olup kenarları testere dişli kesiklidir. Çiçekler Ağustos ve Eylül ayında olgunlaşır. Çiçekleri soluk sarı renginde olup düğme şeklindedir (Şekil 2.34.). Çiçekler genelde kümeler şeklinde büyürler. Bitki kokulu olup, hafif biberiye gibi ve kafura benzer [59].



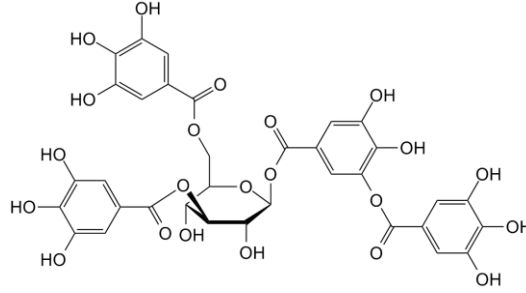
Şekil 2.34. *Tanacetum vulgare* çiçekleri [59].

Bitki yapısında toksik maddeler olduğundan tüketildiğinde ciddi zehirlenmelere neden olur. Bitki üzerinde bazı böcekler yaşamaktadır. Bunlardan toksinlere karşı dirençli olan *Chrysolina graminis* adında bir böcektir, ki buda Tansy böceği (Şekil 2.35.) olarak bilinir. *Tanacetum Vulgare* yapısında çeşitli toksik maddeler içerdiğinden dolayı, böceklere karşı kullanılmıştır [61].



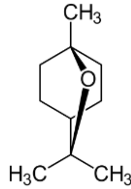
Şekil 2.35. Tansy böceği [61].

Bitki çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve özellikle çayının sindirim sistemindeki bazı solucan ve parazitleri temizlediği bilinmektedir. Yapısında çeşitli uçucu yağlar, tannik asit (Şekil 2.36.), karbonhidratlar, renklendirici maddeler, çeşitli mumsu ve reçineli protein yapılı maddeler içermektedir [60].

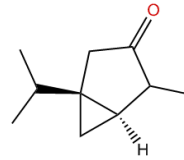


Şekil 2.36. Tannik asit [60].

*Tanacetum vulgare* bitkisinden elde edilen uçucu yağların sara hastalığında kullanımında etkili olduğu görülmüştür. Cildin bazı patlak veren yerlerinde bitkinin yaprakları kullanıldığında onarıcı özelliğe sahip olduğu görülmüştür. *Tanacetum vulgare* yapısında bulunan uçucu yağlardan, 1,8-sineol ve trans-tuyon (Şekil 2.37.) gibi endemik yağları yapısında içerir [59, 60].



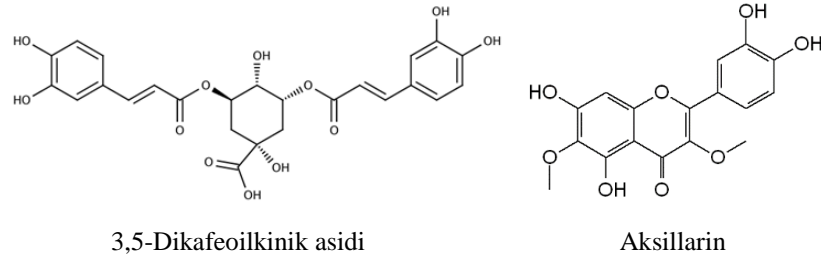
1,8-Sineol



trans-thuyone

Şekil 2.37. *Tanacetum vulgare* bitkisinde bulunan önemli uçucu yağların molekülleri [60].

Son yıllarda yapılan araştırmalarda *Tanacetum vulgare* bitkisinin yapısında virüslere karşı etkili olan aksillarin ve 3,5-dikafeoilkinik asidi (Şekil 2.38.) antiviral bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir [60].



Şekil 2.38. *Tanacetum vulgare* bitkisinin yapısında bulunan antiviral moleküllerin yapısı [60].

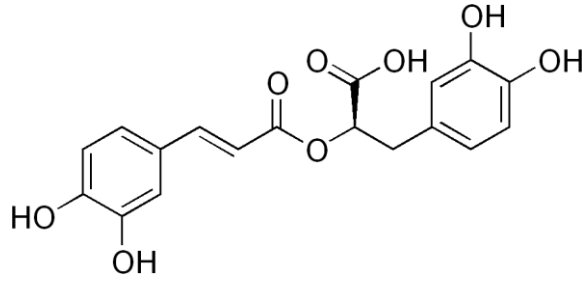
### 2.3.6. *Rosmarinus officinalis*

Biberiye, Lamiaceae ailesine ait olup bilimsel adı *Rosmarinus officinalis*'dir ve genelde Rosemary olarak bilinmektedir. Bitki çok yıllık bir bitkidir. Kosova'nın Dragaş bölgesinde yetişen bir bitkidir. Genelde sıcak bölgelerde yetişmektedir. Kuraklığa dayanıklıdır. Tropikal bölgelerde de nadiren olsa yetişmektedir. Bitki 1.5 metreye kadar büyümektedir. Bitkinin yaprakları iğneli olup, 2-4 cm uzunluğunda ve 2-5 mm genişliğindedir. Yıl boyunca yapraklarını dökmeyen bir bitkidir. Güzel kokulu bir bitkidir. Çiçekleri beyaz, pembe ve mavi renkte olabilir (Şekil 2.39.). Çiçekleri bahar ve yaz aylarında açmaktadır [63, 64].



Şekil 2.39. *Rosmarinus officinalis* [65].

Biberiye, rosmarinik asit (Şekil 2.40.), kafeik asit, ursolik asit, kafur, betulinik asit, karnozik asit ve karnozol gibi fitokimyasal molekülleri içerir. Antioksidan özelliğinden dolayı tıbbi amaçlı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılır [62].



Şekil 2.40. Rosmarinik asit molekülü [62].

Genelde biberiye'den, elde edilen ekstratlar ve uçucu yağlar ile çeşitli ilaçlar yapılmaktadır. Biberiye yapısında % 10-20 arasında değişen oranlarda esansiyel yağ içermektedir [62].

### 2.3.7. *Cydonia oblonga*

*Cydonia oblonga*, Rosaceae familyasına ait ayva adıyla bilinen bir bitki çeşididir. Ayva ağacı, 5-7 metre yüksekliğinde ve 4-5 metre kadar genişleyen bir ağaçtır. Meyve 7-12 santimetre uzunluğunda olup, 6-9 cm arasında genişliğe sahiptir (Şekil 2.41.). Meyve olgunlaşmadan yeşil renktedir, üzeri yoğun bir tüy tabakasıyla kaplıdır. Sonbahar mevsimine doğru olgunlaştığında sarı renge dönüşür. Yaprakları 6-11 cm uzunluğundadır. Yapraklarda ince beyaz tüylü tabaka ile kaplıdır [66].



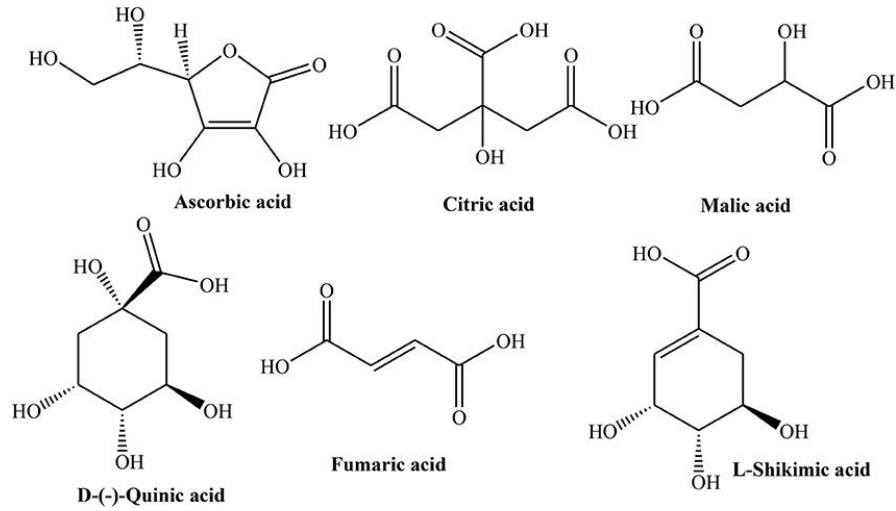
Şekil 2.41. *Cydonia oblonga* meyvesi [66].

Ayva ağacın çiçekleri ilkbahar ayında pembe ile beyaz renkte açmaktadır. Şekil 2.42.'de görüldüğü gibi çiçeğin yaprakları 5-6 tanedir.



Şekil 2.42. *Cydonia oblonga* çiçeği [66].

Ayva, tropikal bölgelerde yetişmektedir. Tarihi kaynaklara göre Orta Asya, İran ve Türkiye gibi yerlerde ilk olarak yetiştirilmiştir. Bugün dünyanın birçok yerinde yayılmıştır. Ayva ağacı, asidik topraklarda yetişebilen ve kuraklığa dayanıklı bir ağaç tipidir. Hem gölgede hem de güneşte yetişir. Meyvelerin daha olgun olabilmesi için ağacın güneşe ihtiyacı vardır. Yapısında çok fazla oranda organik asitleri içermesinden dolayı mayhoş ya da ekşi bir tada sahiptir. Genellikle C vitamini (L-askorbik asit) açısından zengin olup bunun yanında malik asit, fumarik asit, L-şikimik asit ve kunk asit gibi organik asitleride içermektedir (Şekil 2.43.) [67].



Şekil 2.43. *Cydonia oblonga*'da bulunan önemli bazı moleküller [67].

Ayva tohumları, yapısında yaygın olarak nitril türevlerini içerir. Nitriller hidroliz olduklarında özellikle asidik ortamda hidrojen siyanür asidin açığa çıkmasından dolayı tohumların tüketilmesi ciddi zehirlenmelere neden olur. Ayva yaprağı, meyvesi ve tohumunda önemli fitokimyasal bileşikleri, organik asitleri içeren bir



bitki kaynağı olduğundan çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların başında gelen antibakteriyel, antifungal, hipolipidemik, antioksidan, antihemolitik, antidierhal (ishala karşı), antialerjik, antiinflamatuvar ve antidiabetik özellikleri olduğu deneysel olarak gösterilmiştir [66, 67].

### 2.3.8. *Momordica charantia* L.

Kudret Narı, cucurbitaceae familyasına ait ve Latince adı *Momordica charantia* L. olarak bilinmektedir. Bitki boyu yaklaşık 6 metreye kadar uzanabilen gövdesi ile bitki bir yıllıktır. Yaprakları 4-12 cm saplı olup, el gibi parçalıdır. Meyveleri 8 ile 12 cm' ye kadar büyür. Çiçekler Haziran ve Temmuz ayında başlar. Meyve ise Eylül ile Ekim ayında olgunlaşır. Bitki meyvesi ilk aşamada yeşil olup (Şekil 2.44.) olgunlaşmaya başladığında sarı renge daha sonraları portakal rengine dönüşür (Şekil 2.45.) [68].



Şekil 2.44. Olgunlaşmamış bir *Momordica charantia* L.[69].

Ancak üzerinde belirgin özellikte kırmızı marjinal noktalara sahiptir. Bitki meyvesi olgunlaştığında artık meyve ayrılmaya başlar. Meyve içinde fasulye büyüklüğünde kırmızı pulpa ile örtülü sarkık tohumları vardır. Tohumların sayıları genelde yirmi ile otuz arasında değişir [68].



Şekil 2.45. Olgun *Momordica charantia* L.[69].

Dünyanın birçok yerinde yetişmektedir. Özellikle tropikal iklimin hakim olduğu bölgelerde daha fazla yetiştirilmektedir. Halk arasında kudret narı ile çeşitli ilaçlar hazırlanıp çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bugün bilim dünyası kudret narı ile ilgili birçok çalışma yapmış ve bunun insan sağlığı açısından önemli bir bitki olduğu ve özellikle çeşitli hastalıklara iyi geldiğini bilimsel olarak ispatlamıştır [68]. Kudret narı'nın çeşitli biyokimyasal süreçleri etkilediğini adenil siklaz inhibisyonu, antihelmintik akitive özelliği, antikarsinogenik etkisi, antikalstogenik aktivitesi, antikonvulsant aktivitesi, DNA sentez inhibisyonu, fruktoz difosfataz inhibisyonu gibi etkilerin olduğu görülmüştür. Kudret narının ülser hastalığında, egzama ve sedef hastalığında, yara ve iltihaplar üzerinde etkili olup kabızlığa iyi gelir, hücrelerin yenilenmesini sağlar, yanık ve yara tedavisinde kullanılarak, karaciğeri önemli ölçüde desteklediği belirlenmiştir [69].

Kudret narı suda çözünen (C ve B vitaminleri) ve yağda çözünen vitaminlerin (A, E ve K) çoğunu içermektedir. Onun dışında kalsiyum, demir, magnezyum, mangan, fosfor, potasyum, çinko gibi mineralleri içermektedir. Yağ, protein ve karbonhidrat bakımından da zengin bir bitki türüdür [69].

### **2.3.9. *Punica granatum***

*Punica granatum*, Punicaceae ailesine ait, 3 metre yüksekliğe kadar büyüyen çok uzun yıllar yaşayan ağaçtır. Bazı kaynaklara göre 150 yıl kadar yaşadığı bilinmektedir. Ağacın gövdesi kalın ve sağlamdır. Dikenli dallara sahiptir.

Yaprakları parlak renkli olup, karşılıklıdır. Nar ağacının yaprakları ince-uzun şekilli, sapları kısa ve kenarları kırmızı renktedir. Yaprakları 1-9 cm uzun 0.5-2.5 cm genişliğindedir. Çiçekleri parlak kırmızı renktedir (Şekil 2.46.). Haziran ve Temmuz aylarında açan çiçekleri, gösterişli olup 3 cm çapındadır [70].



Şekil 2.46. *Punica granatum* çiçeği ve gelişmekte olan meyvesi [71].

Çiçekleri sapsız, etli ve dökülmeyen türdendir. Şekil 2.46.'da görüldüğü gibi bir çiçekte 3 ile 7 adet yaprak bulunmaktadır. Meyveleri küre şeklinde ve portakal büyüklüğündedir. Şekil 2.47.'de görüldüğü gibi meyvelerin içinde küçük çekirdeklerin olduğu ve meyve gövdesini oluşturan birçok tanecikten oluşmaktadır. Meyve hafif ekşi ve bazende tatlıdır. Nar meyvesinde 600'e yakın tohum bulunmaktadır (Şekil 2.48.). Dünyanın birçok yerinde yetişmektedir. Ağaç  $-12^{\circ}\text{C}$  soğuğa ve kuraklığa dayanıklıdır.



Şekil 2.47. *Punica granatum* taneleri [71].

Nar içinde diğer meyve ve bitkilerde olduğu gibi çok miktarda organik madde içerimesinin yanında, C vitamini açısından çok zengin bir meyvedir. Diğer suda çözünen vitaminlerde vardır. Yağda çözünen vitaminlerin D vitamini hariç hepsi mevcuttur. Mineral açısından da zengindir. Protein, karbonhidrat ve yağ bakımından

da zengin bir meyve ürünüdür. Onun dışında ellagik asidinden elde edilen tannin türevi olan ellagitannin'ler vardır. Bitkinin kırmızı rengi antosiyanin türevi olan, delfinidin, siyanidin ve pelargonidin glikozid moleküllerinden ileri gelmektedir.



Şekil 2.48. Olgun *Punica granatum* meyvesi [71].

Nar, eskiden beri özellikle uzak doğu ülkelerinde ve İran'da bitkisel kaynaklı ilaç olarak kullanılmış ve bugün halen kullanılmaktadır. Günümüz dünyasında alternatif tıp yöntemlerinden birini oluşturmaktadır [70].

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

#### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Paulownia Tomentosa PPO enzimi ile yapılan çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrofotometre	UV-2600 UV-VIS	Shimatzu
Soğutmalı santrifüj	NF 800 R	Nüve
Santrifüj	NF 200	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	4000 i	IKA KS
Soğutucu kabin	Özel yapım	Özel yapım
pH metre	PHS-3BW	BANTE
Protein elektroforezi	Owl P8DS	Thermo Scientific
Su banyosu	Nb20	nüve
Hassas terazi	AS 220/C/2	RADWAG
Otomatik pipetler	Transferpette <sup>R</sup> S	Brand
Derin dondurucu	UDD 100BK	Uğur
Vorteks	QL-861	Vortez Shaker

#### 3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmalar sırasında triton-x 100, L-askorbik asit polivinil, pirolidon (PVP) ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfat ile hazırlanan tampon çözeltileri enzim ekstraksiyon işlemleri sırasında kullanılmıştır. Sodyum sitrat, sitrik asit monohidrat, potasyum dihidrojenfosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, trizma-base

ve trisaminometan hidroklorid ile tampon çözeltileri hazırlanmıştır. 4-metil katekol, L-dopa, pirokatekol, pirogallol, gallik asit, guaikaol, L-tirozin ve *o*-dianisidin substratları kinetik çalışmalarında kullanılmıştır. Daha sonra inhibitör çalışmaları için askorbik asit, tioüre, sodyum azid (NaN<sub>3</sub>) ve L-sistein maddeleri kullanıldı.

### 3.2. PPO Enziminin İzolasyonu

#### 3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması

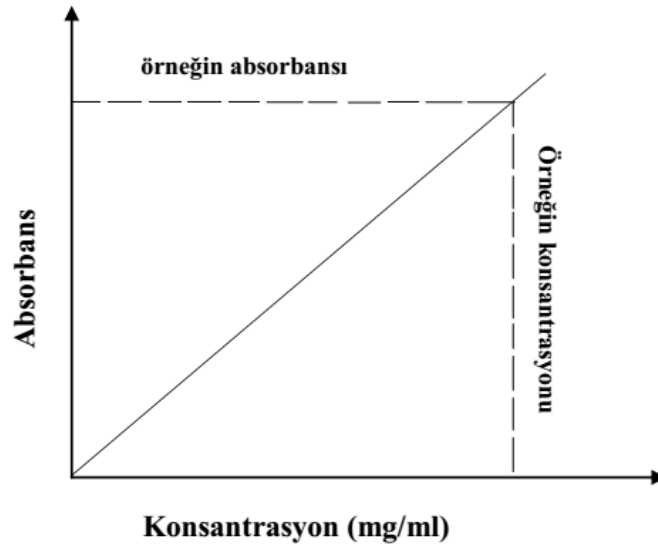
Önceden dondurucuda depolamış olduğumuz *Paulownia tomentosa* bitkisinin meyvesi doğranarak 5 gramı alınıp, %4 triton X-100, %0,5 polivinil piroolidon (0,15 gr), ve 5 mM askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile blender kullanılarak 10 dakika süresince muamele edilmiştir. Daha sonra homojenat süzölmüş ve 5000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Ekstraksiyon tüplerinde çökelti oluşmayana kadar santrifüjleme yapılmıştır. Santrifüj sonucunda ele geçen süpernatant, ham enzim özütü olarak kullanılmıştır [72].

#### 3.2.2. Üçlü faz saflaştırma metodu

Üçlü faz saflaştırma (ÜFS) yönteminde proteinlerin hazırlanmış sulu çözeltilerine tuz olarak amonyum sülfat ve organik çözücü olarak *tert*-butanol kullanılır. Dolayısıyla protein çözeltisi üç faza ayrılmaktadır. *tert*-Butanol üst fazda, alt fazda tuz çözeltisi ve protein çökeltisini içeren ara fazdan oluşur. Saflaştırılmış protein fazı üstteki organik çözücü fazı ile alttaki tuzlu fazın arasındaki çözünmeyen fazda görünür [73]. Daha önce yukarıdaki gibi hazırlanan ham enzim ekstraktından 2 mL alınıp değişik konsantrasyonlarda amonyum sülfat doygunluklarına (%10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90) getirilmiş ve değişik oranlarda enzim/*tert*-butanol oranları (1,0:1,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, ve 1,5:2,0) olacak biçimde *tert*-butanol ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen karışım 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenerek faz ayrımı yapılmıştır. Üst kısımdaki organik faz pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra, orta ve alt faz ise enzim aktivite ve protein miktar tayini için kullanılmıştır.

### 3.2.3. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini

Ham enzim özütün protein tayini, Bradford yöntemine göre yapılmıştır. Öncelikle bir standart protein grafiği hazırlanmıştır. Bunun için 1 mg/ml'lik BSA (sığır serum albümini) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl alınıp, hacim Bradford reaktifi ile 1 ml'ye tamamlanarak standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart protein grafiği elde edilen sonuçlara göre çizilmiştir. Örneklerin 595 nm'de absorbansı ölçülerek standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir [72, 74].



Şekil 3.1. Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği [65].

### 3.2.4. SDS jel elektroforezi

Yapılan çalışmada %10'luk Resolving (ayırma) jeli ve %5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. %10'luk Resolving jeli bileşenleri sırasıyla temiz bir beherde karıştırılıp temizlenen cam plakalar arasına önce Resolving jeli dökülmüştür. Resolving jeli 50 mL'lik beher içinde hazırlanır. Karışım Bio-Rad protokolüne göre hazırlanmıştır. Bio-Rad protokolüne göre miktarlar Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Ayırma jeli için kullanılan miktarlar

<b>Bileşen/Karışım</b>	<b>Miktar</b>
Resolving A	3 mL
Resolving B	3 mL
% 10 APS	30 ml
TEMED	3 µl

%10'luk Resolving Jeli Hazırlanışı: 50 ml'lik behere Tablo 3.2.'deki karışım eklenir, TEMED eklendiğinde zaman kaybetmeden hazırlanan karışım hemen cam plakalara eklenmiştir. Hazırlanan jel karışımı, 1 ml'lik otomatik pipetler yardımıyla yukarıdan 2 cm aralık bırakacak şekilde plakalar arasında boşaltılmıştır. Ayırma jelin üstüne polimerleşme olmadan önce jelin düzgün olması için propanol veya suyla doyurulmuş butanol ilave edilir. Jel 15 -20 dk süresince oda sıcaklığında polimerizasyon için bekletilir. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki propanol (ya da su ile doyurulmuş butanol) ince filtre kağıdı ile absorbe edilerek ortamdan uzaklaştırılır [75].

İkinci adımda yürütme (stacking) jeli hazırlanır. Stacking jelin hazırlanışı Bio-Rad protokolüne göre yapılmıştır. Yürütme jelinin hazırlanışı Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Yürütme jeli için kullanılan miktarlar

<b>Bileşen/Karışım</b>	<b>Miktar</b>
Stocker jel A	1 ml
Stocker jel B	1 ml
%10 APS	10 ml
TEMED	2 µl

%10'luk Stacking Jeli hazırlanışı: Bu karışımda küçük bir beher içinde hazırlanır ve Resolving jeli üzerine dökülmüştür. Jelin üzerine kuyucuklar oluşturmak üzere 12 adet diş içeren bir tarak konulmuştur. Tarak konulduktan sonra jelin polimerleşmesi için 15-20 dk bekletilmiştir. Daha önceden hazırlanmış ham özüt (PPO enzimini içeren) örnekleri 4x'lık bir yükleme tamponu karıştırılır. Yükleme tamponun hazırlanışı Tablo 3.4.'de verilmiştir [75].



Tablo 3.4. Yükleme tamponu için kullanılan miktarlar

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
0,5 M Tris Base pH=6,8	1,25 ml
Destile Su	4 ml
%10 SDS	1,6 ml
Gliserol	2,5 ml
BFB (bromofenol blue)	0,2 ml

Yükleme Tamponunun Hazırlanışı: Tablo 3.4.'deki miktarlar kullanılmıştır. Enzim çözeltisi yükleme tamponu ile karıştırılır. Enzim örnekleri denatüre olması için 14 dk 95°C'da ısıtılarak hazırlanır. Enzim örnekleri ısıtıldıktan sonra hemen buzun üzerine alınır (enzim örnekleri +4°C'de uzun süre bekletilebilir). Polimerleşmiş jeller, cam tabakalar ile birlikte tanka yerleştirilir ve tank yürütme tamponu ile doldurulur. Yürütme tamponu hazırlanışı aşağıda Tablo 3.5.'de verilmiştir [75].

Tablo 3.5. Yürütme tamponu için kullanılan miktarlar

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Tris-Base	9 gr
Glisin	48,3 gr
SDS	3 gr

Yürütme Tamponunun Hazırlanışı: Tablo 3.5.'deki verilen miktarlar, 1 litre suyun içinde çözülür, tankın içine eklenir. Hazırlanan enzim örnekleri yürütme tankındaki jelin içinde tarak ile oluşturulan havuzlara yüklenerek Jel 20-25 mA'de yürütülmüştür. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkarılır. Jelin üzerindeki enzimleri yada protein moleküllerini daha iyi görebilmek için jelin boyaması yapılmıştır. Boyanma yapılmadan önce, protein moleküllerin jelde sabitlenmesi için fiksatif çözelti içinde 30 dk kadar bekletilmiştir. Fiksatif çözeltisi %40 metanol, %10 asetik asit ve %50 sudan oluşmaktadır. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra, jel saf su ile yıkanır ve jeldeki enzim örneklerini görebilmek için boyama yapılmıştır. Boyama işleminde en çok kullanılan metotlardan biri, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama metodudur. Boyama çözeltisi 125 ml metanol içinde 0,25 gr Coomassie Brilliant Blue R250 çözülüp 25 ml asetik asit ve 100 ml destile su eklenerek hazırlanmıştır. Boyama işlemi yaklaşık 4 saat

sürmektedir. Bu işlem tamamlandıktan sonra, jelin tamamı boyandığı için protein moleküllerinin olmadığı yerlerden boyanın uzaklaştırılması gereklidir. Bunun için boya giderme çözeltisi kullanılmıştır. Boya giderme çözeltisi, 250 ml etanol, 100 ml asetik asit ve 650 ml destile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu işlem boya jelden tamamen uzaklaşana kadar, boya giderme çözeltisi birkaç saatte bir sürekli değiştirilerek devam ettirilmiştir [75].

### 3.2.5. Native-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının tespiti

Native-PAGE metodunun asıl amacı enzimin substrat ile olan reaksiyonunu görebilmeğdir. Jel'in belirli bölgesinde tutunan enzim proteini (genellikle SDS-Page'deki jelde enzim nerede çıktıysa Native-Page'de de aynı yerde çıkmaktadır) substrat ile reaksiyona girdiğinde, enzim proteini kararma jel kendini gösterir. Native-PAGE protokolü SDS-PAGE prokolü ile aynıdır. Native-PAGE'de hiçbir şekilde SDS kullanılmayacak ve enzimlerin denatürasyonu yapılmaz. Jel %10'luk hazırlanmıştır. Kullanılan substrat pirokatekol'dur. Pirokatekol 5 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır. SDS-PAGE yapıldığında Bio-Rad protokolüne göre yapılmıştır. Ancak Native-PAGE'deki jelin hazırlanması için gerekli miktarlar Tablo 3.6.'da verilmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi SDS-sodyum dodesil sulfat herhangi bir şekilde kullanılmayacaktır [76]. Aksi takdirde enzimi denatüre eder. Bu durumda beklenen reaksiyon gerçekleşmez.

Tablo 3.6. NATİVE PAGE için kullanılan miktarlar

Bileşen/Karışım	Miktar
Destile Su	3,2 ml
Acrylamide %30	2,67 ml
1,5 M Tris pH=8,8	2 ml
%10 APS	80 µl
TEMED	8 µl

### 3.3. PPO Enziminin Karakterizasyonu

Kinetik çalışmalarında substrat spesifikliği, optimum sıcaklık ve pH tayini, çeşitli kimyasal maddelerin enzim üzerine olan etkisi ve depolanma kararlılığı gibi çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3.1. PPO aktivite tayini

PPO enziminin aktivitesi için 420 nm'de 1 dk süre ile absorbanstaki artış ölçülerek tespit edilmiştir. Bu ölçüm, pH=7,0 fosfat tamponu, 4-metil katekol substrat çözeltisinde ve ham enzim özütü karıştırılarak oda sıcaklığında yapılmıştır [74]. Spektroskopik çalışmalarda absorbandsdaki artışları görmek için 3 mL'lik küvetler kullanılmıştır. Kullanılan bu küvetler her reaksiyon için toplam hacim 3 mL olarak sabit tutulmuştur. Absorbans değerleri grafiğe geçirilerek zamana karşı olarak ilk hız değerleri hesaplanmıştır. Diğer substratlar için de uygun pH değerlerinde aynı işlemler yapılmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

#### 3.3.2. Substrat spesifikliği

Enzimin hangi substratları dönüşüme uğratabildiği ve hangisine karşı afinitesinin daha yüksek olduğunun tayin edilmesi amacıyla substrat spesifikliği çalışması yapılmıştır. Enziminin 8 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla 4-metil katekol, pirokatekol, pirogallol, L-dopa, guaiakol, L-tirozin, *o*-dianisidin ve gallik asit substrat olarak kullanılmıştır. Her substrat için  $K_m$  değeri hesaplanmış ve kullanılan substratlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda enzim 4-metil katekol, pirokatekol, pirogallol ve L-dopa substratlarına karşı aktivite gösterirken gallik asit, L-tirozin, *o*-dianisidin ve guaiakol substratlarına karşı enzim aktivitesi belirlenememiştir [74].

### 3.3.3. pH etkisi

3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda daha önceden hazırlanmış tampon çözeltiler PPO enzimi aktivitesine pH etkisinin incelenmesi için kullanıldı. Aynı şekilde pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M tris tamponu hazırlanarak PPO enzimi aktivitesine pH etkisinin incelenmesi için kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, L-dopa) için optimum pH çalışması yapılmıştır. Enzim aktivite ölçümleri daha önce Bölüm 3.3.1.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Spektrofotometrik metot ile 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışları izlenmesi enzim aktivite tayinleri için gerçekleştirilmiştir [74].

### 3.3.4. Sıcaklığın etkisi

PPO enziminin en uygun sıcaklık aralığını yada tam olarak hangi sıcaklıkta yüksek aktivite gösterdiğini belirlemek amacıyla 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde enzim aktivitesine 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar (60 ve 70°C) için sıcak su banyosu ve düşük sıcaklıklar (5, 10 ve 20°C) için ise buz banyosu kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, L-dopa) için optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Her bir substrat 10 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır [72].

### 3.3.5. Enzim kinetiği

Kinetik çalışmalarda 0,05 mM ile 15 mM arasında değişen substrat çözeltileri kullanılmıştır. Bu değişik substrat çözeltileri enzimin maksimum hızının ( $V_{maks}$ ) ve Michaelis-Menten değerlerinin ( $K_m$ ) tespit edilmesi için kullanılmıştır. Çalışmalar spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 saniye boyunca enzim aktivitesi izlenmiştir. Ölçümler alındıktan sonra absorbanstaki zaman grafiğinden yararlanarak ilk hızlar hesaplanmıştır. Spektrofotometrik çalışmaları sonucunda elde edilen ilk hız değerleri Michaelis-Menten ( $[S]$ 'a karşı  $V$ ) ve Lineweaver-Burk grafiğinde ( $1/[S]$ 'ye karşı

1/V) gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra  $K_m$  ve  $V_{maks}$  sabitleri elde edilmiştir. Substrat olarak 4-metil katekol kullanılmıştır [74].

### 3.3.6. Enzim aktivitesi üzerine madde etkisi

PPO enzim aktivitesi üzerine madde etkisinin incelenmesi çalışmasında, bilinen inhibitörlerin etkisi ve çeşitli metallerin etkisi araştırılmıştır.

#### 3.3.6.1. Bilinen inhibitörlerin etkisi

Yapılan çalışmada PPO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit, tiyoüre, L-sistein ve sodyum azid inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. Her bir inhibitör için  $I_{C50}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu inhibitörlerin farklı konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen tayinler sonucunda hesaplanan aktivite değerleriyle Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve elde edilen grafiklerden inhibisyon tipi belirlenmiştir [74, 72]. Her inhibitör için  $K_i$  değeri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek amacıyla önce her bir inhibitör için  $I_{C50}$  değeri hesaplanmıştır.  $I_{C50}$  değeri enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonudur. Bu değeri hesaplamak için substrat konsantrasyonu 5 mM'da sabit tutularak birkaç farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Sonra çalışmada kullanılan inhibitörlerin tümü için [I]'e karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizilmiştir. Bu grafiğin denkleminde  $I_{C50}$  değeri hesaplanmıştır. Çalışmada tüm inhibitörler için 4-metil katekol ve pirogallol olmak üzere 2 farklı substrat kullanılmıştır. Aktivite tayinleri bu substratlar eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra inhibitör madde kullanılmaksızın, değişen substrat varlığında enzim aktivitesi ölçülerek Michaelis-Menten eğrisi elde edilmiştir ve aynı eğri bu kez reaksiyon ortamına sabit konsantrasyonda inhibitör eklenerek tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar her defasında farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan inhibitör miktarlarının seçimi için  $I_{C50}$  grafiğinden yararlanılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda  $1/[S]$ 'ye karşılık  $1/V$  grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler yardımıyla

inhibisyon türü ve  $K_i$  değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan  $K_i$  değerlerinin ortalamaları alınarak da her bir inhibitör için ortalama  $K_i$  değerleri bulunmuştur.

### 3.3.6.2. Metallerin etkisi

*Paulownia tomentosa* meyvesinden elde edilen PPO enzim aktifliği üzerine metallerin etkisini ölçmek ve incelemek için farklı konsantrasyonlarda metal çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmalar standart koşullarda yapılmıştır. Metallerin tercih edilen konsantrasyonu 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM'dır [74]. Enzim çözeltisi pH 7,0 fosfat tamponunda metallerle 30 dk boyunca 4°C'de bekletilmiştir. Reaksiyon ortamına sabit konsantrasyonda olan 4-metil katekol reaksiyon başlatılmıştır. Çalışmada metal olarak,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  kullanılmıştır. Kontrol olarak aynı şartlarda metalsiz ortamda reaksiyonlar yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

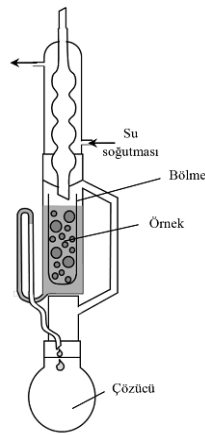
### 3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı

PPO enziminin depolanma kararlılığı çalışması -20°C, 4°C ve oda sıcaklığı (ortalama 25°C) olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiştir. Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek amacıyla oda sıcaklığında aktivitesindeki azalma saat başı 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değişimi ölçülerek kaydedilmiştir. Burada substrat olarak 5 mM 4-metil katekol kullanılmıştır. Enzimin -20°C'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim -20°C'de saklanarak haftada bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Yine substrat olarak 5 mM 4-metil katekol kullanılmıştır. 4°C'deki kararlılığın ölçülmesi amacıyla ise aynı şekilde aktivite ölçülmüştür fakat ölçüm sıklığı 4-5 saatte bir olarak ayarlanmıştır [72, 74].

## 3.4. PPO Enzimi üzerinde etkilerin incelenmesi için kullanılan bitkiler

Kosova Şar Dağları bölgesinde toplanan bitkiler için ekstraksiyon işlemleri her bitkiye farklı uygulandı [77]. Bitkilerin çoğunun ekstraksiyonu Soxhlet aparatında

yapılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu özel bir ekstraksiyon sistemidir (Şekil 3.2.). Soxhlet aparatı, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biri olmasına rağmen hala kullanımı geniştir. Soxhlet aparatı, bir çözücü şişesi, orta kısımda bir sıvı akış borusu (sifon), üst kısımda geri soğutucu ve çözücü şişesinin altında bulunan ısıtıcı sisteminden meydana gelmiştir. Numune (genelde katı yada yarı katı), orta kısmın içindeki ekstraksiyon bölgesinin içine yerleştirilir. Çözücü (organik olmalı) bunun altındaki çözücü şişesinin içine konur. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan çözücünden gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu soğutucuya hareket eder; yoğunlaşır, numuneye doğru damlar. Çözücü numuneyi ıslatır ve daha sonra çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, çözücü tüm numune bölgesini boşaltarak, çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Bu işlem 6 ya da 12 saat içinde iki ya da üç defa yapılması uygundur. Ekstrakte olan numuneler çözücü şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz çözücü buharlaştığından, her dolaşımında taze çözücü kullanılır. Soxhlet aparatında genellikle saf organik çözücüler yada bunların karışımları kullanılmaktadır [78]. PPO enzimi üzerinde inhibitör etkisi incelenen bitkiler Tablo 3.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Soxhlet ekstraktör cihazı [78].

Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan bitkilerin kısımları

No	Bitkinin Latince Adı	Bitkinin Türkçe Adı	Kullanılan kısmı
1	<i>Cydonia oblogna</i>	Ayva	Yaprak
2	<i>Punica granatum</i>	Nar	Kabuğu
3	<i>Datura stramonium</i>	Şeytan Elması ya da	Yaprak
4	<i>Datura stramonium</i>	Boru Çiçeği	Tohum
5	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Biberiye	Yaprak
6	<i>Solanum nigrum</i>	Köpek Üzümü	Meyve
7	<i>Solanum nigrum</i>		Yaprak
8	<i>Verbascum thapsus</i>	Sığırkuyruğu Otu	Çiçek
9	<i>Tanacetum vulgare</i>	Solucan Otu	Çiçek
10	<i>Momordica charantia</i>	Kudret Narı	Meyve

Toplanan bitkiler öncelikle yıkanıp, distile sudan geçirilmiştir ve 12 saat boyunca 45 -50°C aralığında kurutulmuştur. Kurutulan bitki örneklerinin yaprak, tohum ve çiçek kısmından alınıp ekstraksiyon işlemi için kullanılmıştır.

Kurutulan ayva yaprakların ekstraksiyon işlemi için, ayva yaprakları suda 10 dk boyunca kaynatılmıştır. Kaynama işlemi bittikten sonra karışım soğumaya bırakılıp karışım süzülerek ve santrifüjde 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süzüntü önceden darası alınan bir balona konulmuştur. Balon rotari evaporatörde 50°C'de düşük basınç altında su karışımından uzaklaştırılmıştır [79]. Elde edilen özüt miktarları tartılarak su ile belli konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler polifenol oksidaz enziminin inhibisyon işlemlerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

Kurutulan nar kabukları ve biberiye yaprakları için ekstraksiyon işlemi %20'lik metanol ile yapılmıştır. Numuneler erlenmayerde 1:10 oranında %20 metanol ile katıştırılarak ve 12 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım süzülüp 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süzüntü önceden darası alınan bir balona aktarılmıştır. Balon rotari evaporatörde 50°C'de düşük basınç altında %20 metanol karışımı uzaklaştırılmıştır [80, 81]. Elde edilen özüt miktarları tartılarak belli konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler polifenol oksidaz enziminin inhibisyon işlemlerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

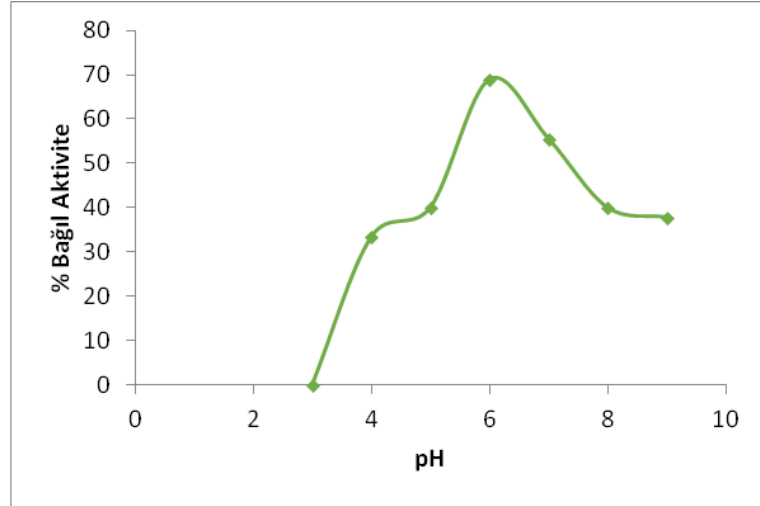


Diğer bitki örnekleri için ekstraksiyon işlemi Soxhlet aparatında yapılmıştır. Bitki örneklerinden belirli miktarlarda alınıp soxhletin orta kısmındaki kartuşun içine konulmuştur. Kartuş sisteme yerleştirildikten sonra çözücü olarak saf metanol kullanılmıştır. Karışım 8 ile 12 saat aralığında değişen aralıklarla ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Sıcaklık çözücünün kaynama noktasına yakın sıcaklıkta yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra, karışım soğutulur ve süzöntü önceden darası alınmış balona konulur ve balon evaporatörde düşük basınç altında çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır [82]. Elde edilen özütlerden belirli konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanır. İnhibisyon işlemlerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

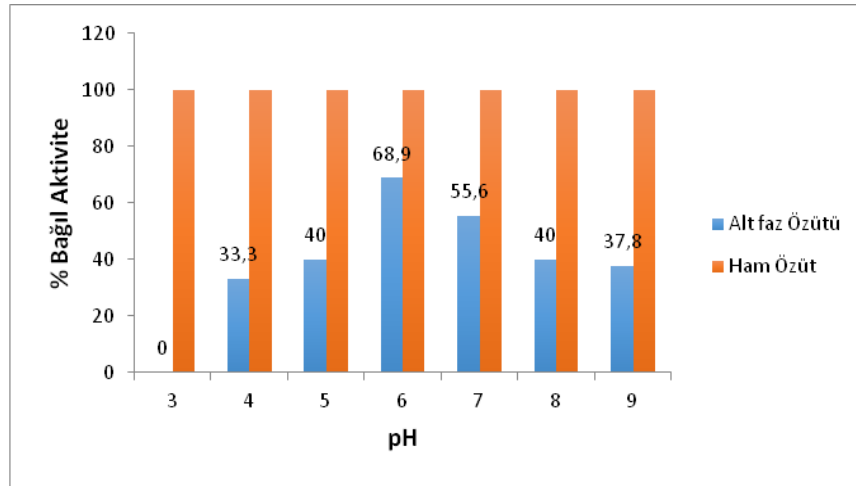
## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Üçlü Faz Saflaştırma yönteminin sonuçları

Yapılan çalışmalar sonucunda *Paulownia tomentosa* meyvesinden elde edilen enzim özütünü tek adımda saflaştırmak için Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS) yöntemi kullanılmıştır. Faz sistemini ayarlamak için farklı oranlarda enzim/*tert*-butanol (1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,5:2,0) ve farklı amonyum sülfat derişimleri (%10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90) kullanılmıştır. Spektrofotometrik çalışmalarda enzimin yüksek aktivite gösterdiği faz, ara faz olduğu tespit edilmiştir. En uygun amonyum sülfat derişimi alt faz için %10, ara faz için ise %80 oranında enzim yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *tert*-Butanol oranının ayarlanması sırasında en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği oran 1,0:2,0 olduğu tespit edilmiştir. Alt fazda elde edilen enzimin optimum pH grafiğı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. ÜFS metoduna göre saflaştırılan enzimin alt fazdaki aktivitesi ham enzim özütündeki aktivitesi ile kıyaslanması Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Şekil 4.2.'de alt fazdaki enzim bağıl aktivitesinin ilk adımda elde edilen enzim özütün bağıl aktivitesinden çok daha düşük olduğu belirlenmiştir.

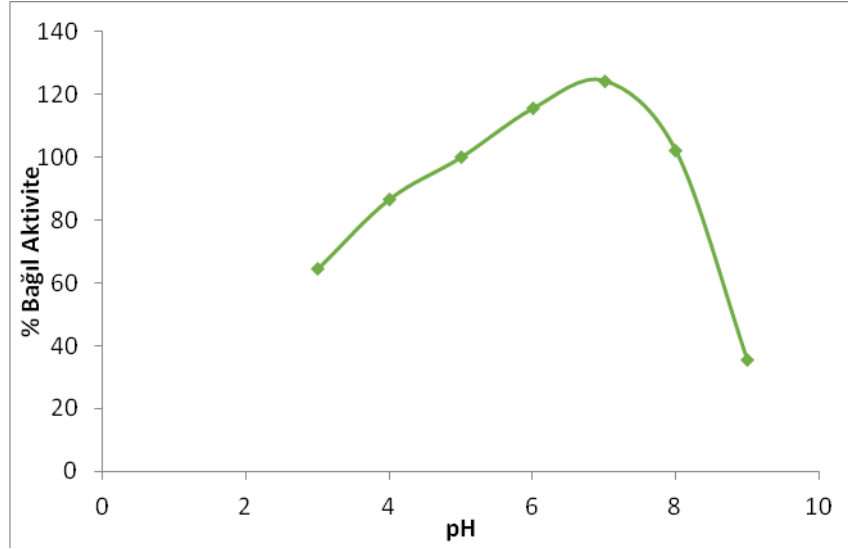


Şekil 4.1. ÜFS alt faz enzim özütün optimum pH grafiği

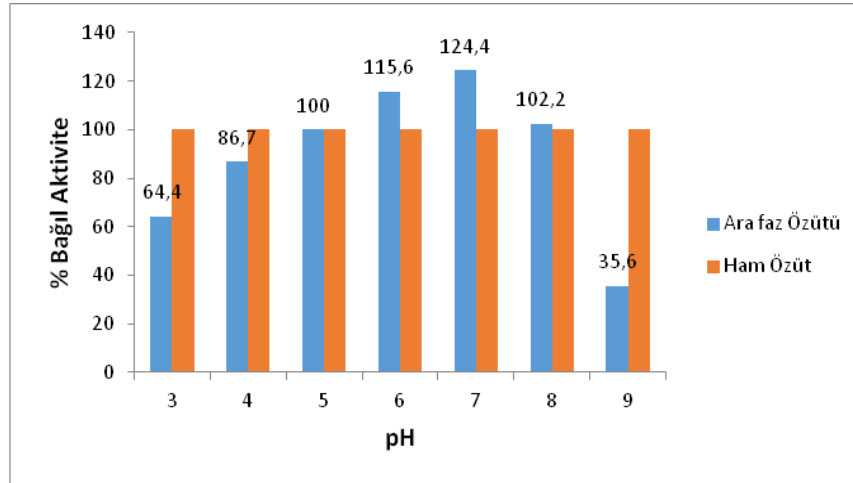


Şekil 4.2. ÜFS alt faz enzim özütün ham enzim özüt ile karşılaştırmalı optimum pH grafiği

Ara fazdaki enzimin, optimum pH grafiği Şekil 4.3.'de bağıl aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ham enzim özütündeki enzimin bağıl aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir. Şekil 4.4.'de pH 7,0'de ara faz'ın bağıl aktivitesi %124,4 olarak belirlenmiştir.

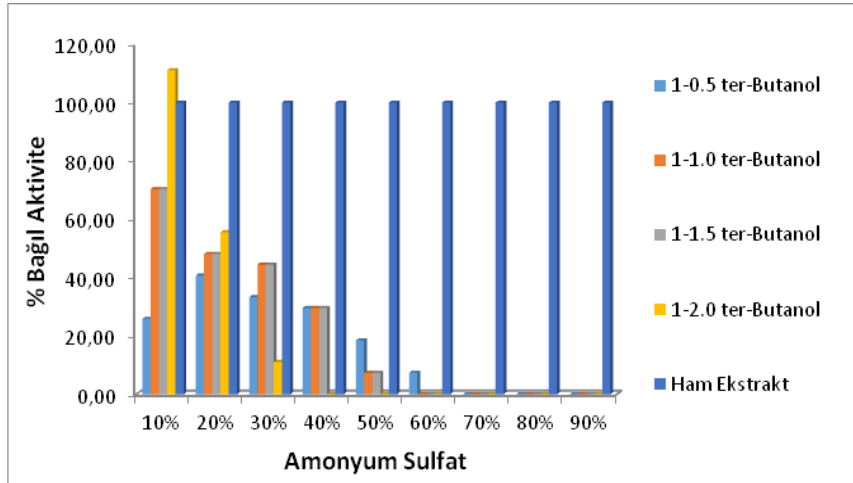
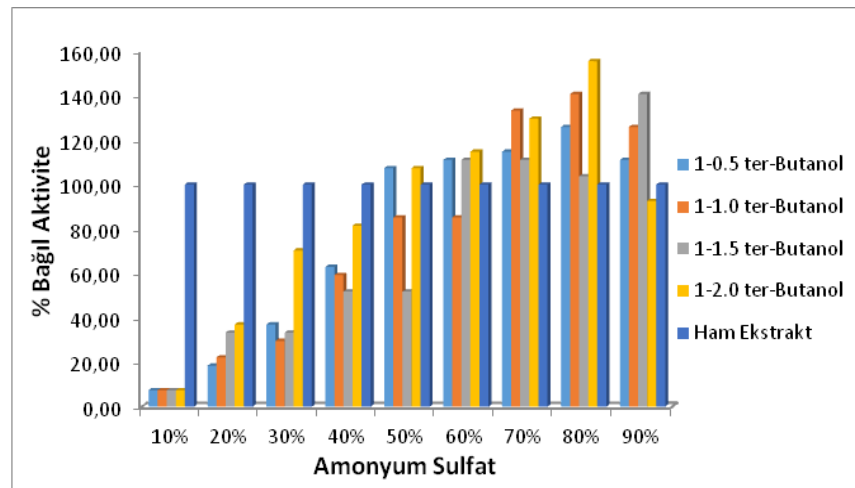


Şekil 4.3. ÜFS ara faz enzim özütün optimum pH grafiği



Şekil 4.4.ÜFS ara faz enzim özütün ham enzim özütü ile karşılaştırmalı optimum pH grafiği

Ham enzim özütündeki enzimin bağıl aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir. Şekil 4.4.'de pH 7,0'de ara fazın bağıl aktivitesi %124,4 oranında çıkmıştır. Alt fazda ise enzim aktivitesi ise ham enzim özütündeki enzim aktivitesinden çok daha düşük çıkmıştır. Şekil 4.5.'te alt faz için en uygun amonyum sülfat derişiminin %10, Şekil 4.6.'da ara faz için en uygun amonyum sülfat derişiminin ise %80 olduğu görülmektedir. Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da hem alt faz hem ara faz için *tert*-butanol oranın 1,0:2,0 olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.5. ÜFS alt fazın *tert*-butanol oran sonuçlarıŞekil 4.6. ÜFS Ara fazın *tert*-butanol oran sonuçları

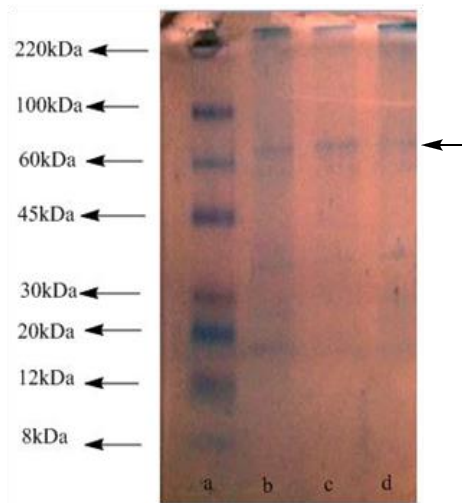
## 4.2. Bradford Yöntemiyle Toplam Protein Tayini

Bradford Protein miktarı tayin metodunda yapılan standart ölçümler sonucunda elde edilen sonuç, 100 mikrolitre ham ekstraktta 0,097 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

## 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Molekül Ağırlığının Tespiti ve Saflığı

SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi ile enzimin molekül ağırlığını tespit etmek amacıyla Bölüm 3.2.4.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS ve uygun şartlarda poliakrilamid jel elektrofrezine, *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan enzim

özütünün ve ÜFS metoduna göre saflaştırılan enzim özütün numuneleri tatbik edilmiştir. Enzim bantlarını içeren jelin fotoğrafı Şekil 4.7. verilmiştir. Şekil 4.7.'de SDS PAGE jelin a sütununda molekül ağırlıkları bilinen protein örnekleri, b sütununda enzim özütü, c sütununda ÜFS metoduna göre saflaştırılan enzim özütün alt fazı ve d sütununda ise ÜFS metoduna göre saflaştırılan enzim özütünün ara faz bantları verilmiştir. Her üç enzim özütü numunelerin bantları 60-100 kDa aralığında Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. PPO enziminin SDS-PAGE sonucu

a: Marker

b: Ham Ekstrakt

c: ÜFS sonucunda %10 Amonyum sülfat çöktürmesi'nde alt faz.

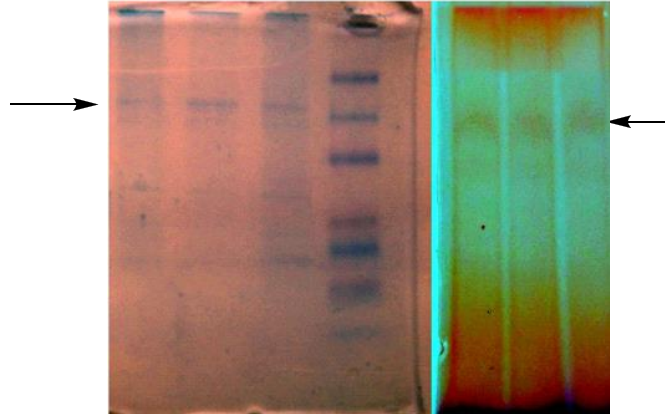
d: ÜFS sonucunda %80 Amonyum sülfat çöktürmesi'nde ara faz.

#### 4.4. Native-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Tespiti

Native poliakrilamid jel elektrofrezisi ile enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan poliakrilamid jel elektrofrezine, *Paulownia tomentosa*'dan ÜFS metoduna göre saflaştırılan enzim özütün ara faz numuneleri yüklenmiştir. Aktif PPO enzimin jeldeki varlığı gözlemlemek için 4 mM pirogallol substratı kullanılmıştır. Jel sonuçları Şekil 4.8.'de verilmiştir. Sonuçlara göre Native jeldede tek bant olarak aktif enzim belirlenmiştir.

#### 4.5. SDS-PAGE ve Native-PAGE Sonuçların Karşılaştırılması

SDS-PAGE'de çıkan sonuçları Native-PAGE sonuçları ile kıyaslanmıştır. Bu sonuçlara göre SDS-PAGE'de çıkan bantlar ile Native PAGE'deki bandların aynı seviyede tek bant olarak çıktığı tespit edilmiştir. Native ve SDS jel sonuçları Şekil 4.8.'de verilmiştir. Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi SDS-PAGE'de çıkan bandların Native-PAGE bandları ile aynı seviyede çıktığı tespit edilmiştir. Bu resim enzimin saflığını ve doğru bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir.



Şekil 4.8. PPO enzimin SDS-PAGE ve Native-PAGE sonuçların karşılaştırılması

#### 4.6. Enzim Kinetiği

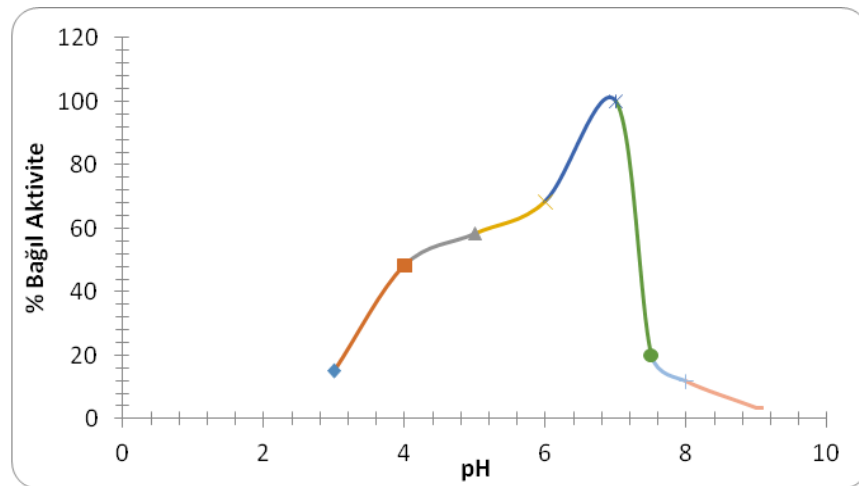
*Paulownia tomentosa* bitkisinden saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi için kinetik çalışmalar 4-metil katekol, L-dopa, pirokatekol, pirogallol, guaiakol, gallik asit, *o*-dianisidin ve L-tirozin substratları için yapılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik olarak, 420 nm'de 0,05-15 mM aralığında değişen substrat konsantrasyonları ile yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin gallik asit, guaiakol, *o*-dianisidin ve L-tirozin substratları ile reaksiyon vermediği görülmüştür.

Tablo 4.1. PPO enziminin reaksiyon verdiği substratlar için bulunan optimum sıcaklık, optimum pH,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri

Substrat	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	$K_m$ (mM)	$V_{maks}$ (mM/dk)
4-Metil katekol	7,0	25	2,17	0.020
Pirokatekol	7,5	25	4,55	0.023
Pirogallol	7,5	25	4,77	0.008
L-dopa	7,5	25	6,60	0,003
Gallik Asit	-	-	-	-
L-tirozin	-	-	-	-
Guaiakol	-	-	-	-
<i>o</i> -dianisidin	-	-	-	-

$K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hem Michaelis-Menten hemde Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzimin en iyi aktivite gösterdiği substratı 2,17 mM  $K_m$  ile 4-metil katekol olarak belirlenmiştir.

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pH etkisini 4-metil katekol substratı varlığında tespit etmek için pH 3'den 8'e kadar Bölüm 3.3.3.'de verilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesi asidik bölgede pH 3'ten 5'e kadar artan bir aktivite göstermiştir. pH 7,0'de en yüksek aktivite elde edilmiş, bu optimum pH olarak belirlenmiş olup, pH 7'den sonra enzim aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.9.).

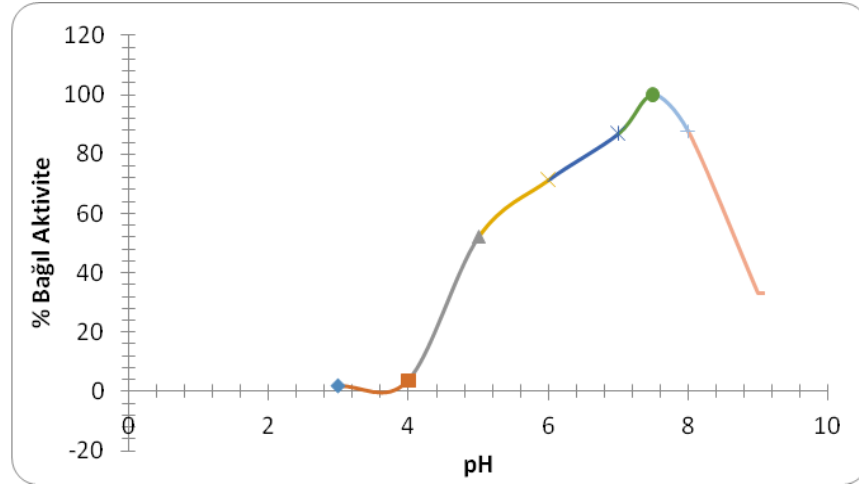


Şekil 4.9. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol varlığında optimum pH grafiği

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pH'ın etkisini pirokatekol substratı varlığında tespit etmek için pH 3'den 8'e

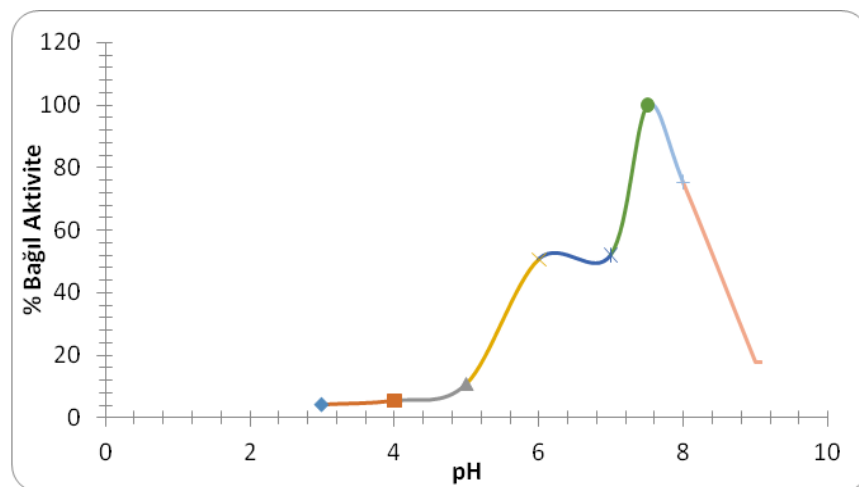


kadar Bölüm 3.3.3.'de verilen yÖnteme gÖre aktivite tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesi asidik bÖlgede pH 4'ten 6'ya kadar artan bir aktivite gÖstermiştir. pH 7,5'de en yÖksek aktivite elde edilmiş, bu optimum pH olarak belirlenmiş olup, pH 7'5'dan sonra enzim aktivitesinin dÖştÖğü tespit edilmiştir (şekil 4.10.).



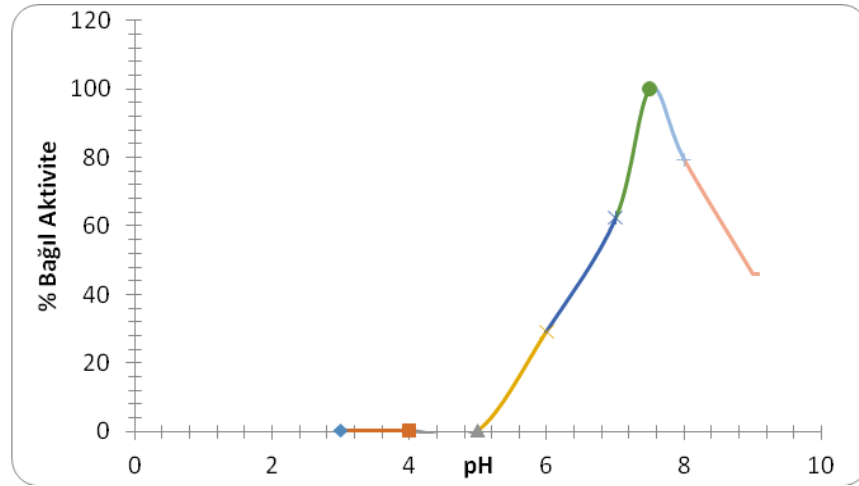
şekil 4.10. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol varlığında optimum pH grafiği

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna gÖre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pH'ın etkisini pirogallol substratı varlığında tespit etmek için aktivite tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesi asidik bÖlgede pH 3 ile 5 aralığında az olduğu pH 5,5'tan 7'ye kadar artan bir aktivite gÖstermiştir. pH 7,5'de en yÖksek aktivite elde edilmiş, optimum pH olarak belirlenmiş olup, pH 7,5'tan sonra enzim aktivitesinin dÖştÖğü tespit edilmiştir (şekil 4.11.).



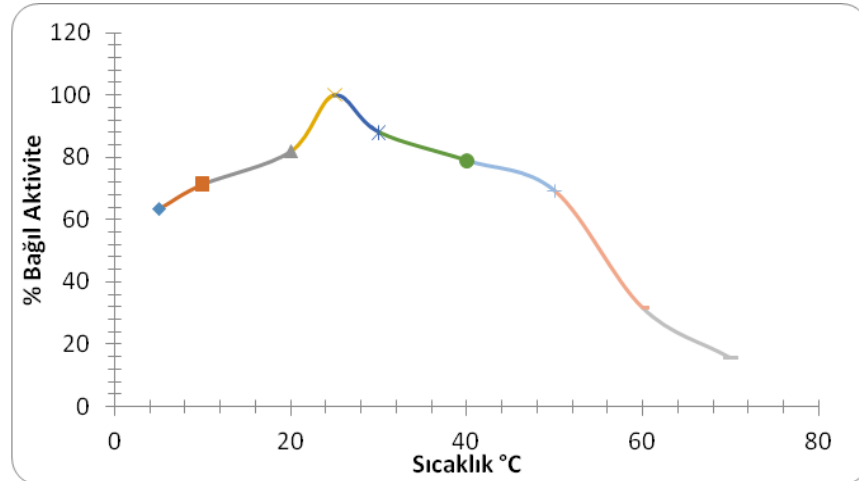
şekil 4.11. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol varlığında optimum pH grafiği

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pH'ın etkisini L-dopa substratı varlığında tespit etmek için pH 3'den 8'e kadar Bölüm 3.3.3.'de verilen yönteme göre enzim aktivite tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesi asidik bölgede pH 3 ile 5 aralığında 0'a yakın olduğu pH 5'ten 7'ye kadar artan bir aktivite göstermiştir. pH 7,5'ta en yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu optimum pH olarak kabul edilmiştir. pH 7,5'tan sonra enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür (Şekil 4.12.).



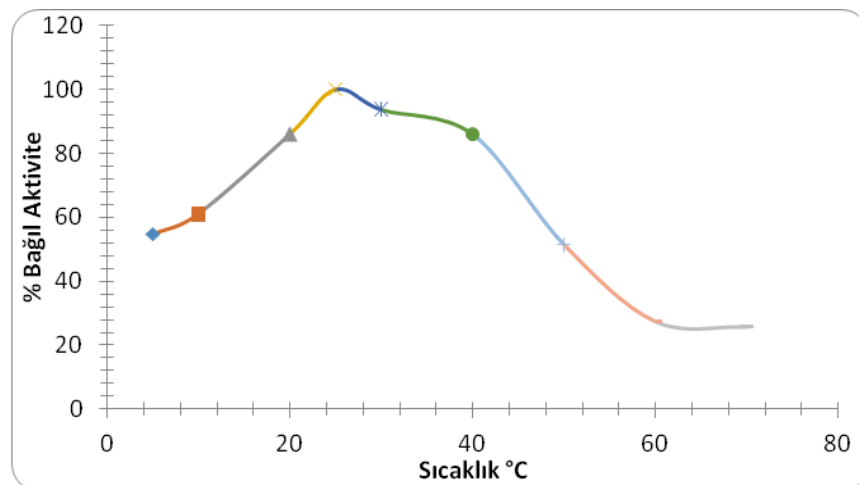
Şekil 4.12. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa varlığında optimum pH grafiği

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne 4-metil katekol substratın varlığında optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 5 ile 70°C arasındaki optimum sıcaklık tayinini tespit etmek için Bölüm 3.3.4.'te anlatılan yönteme göre aktivite tayinleri yapılmıştır. PPO enzimin 4-metil katekol ile olan optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.13.'de verilmiştir. Maksimum aktivitenin 25°C'de olduğu gözlenmiş ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol varlığında optimum sıcaklık grafiği

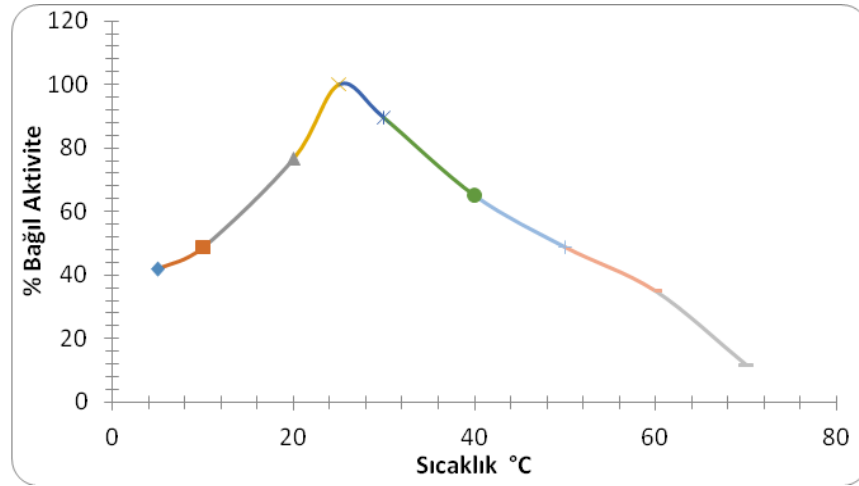
*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pirokatekol substratın varlığında optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 5 ile 70°C arasındaki optimum sıcaklık tayinini tespit etmek için Bölüm 3.3.4.'te anlatılan yöntemle göre aktivite tayinleri yapılmıştır. PPO enzimin pirokatekol ile olan optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.14.'te verilmiştir. Maksimum aktivitenin 25°C'de olduğu gözlenmiş ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol varlığında optimum sıcaklık grafiği

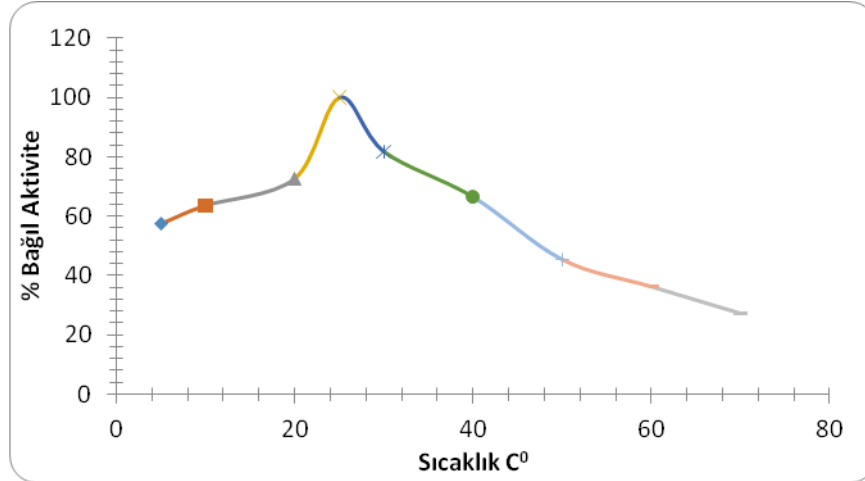
*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne pirogallol substratın varlığında optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın

belirlenmesi amacıyla 5 ile 70°C arasındaki optimum sıcaklık tayinini tespit etmek için Bölüm 3.3.4.'te anlatılan yöntemle göre aktivite tayinleri yapılmıştır. PPO enzimin pirogallol ile olan optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.15.'te verilmiştir. Maksimum aktivitenin 25°C'de olduğu gözlenmiş ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.



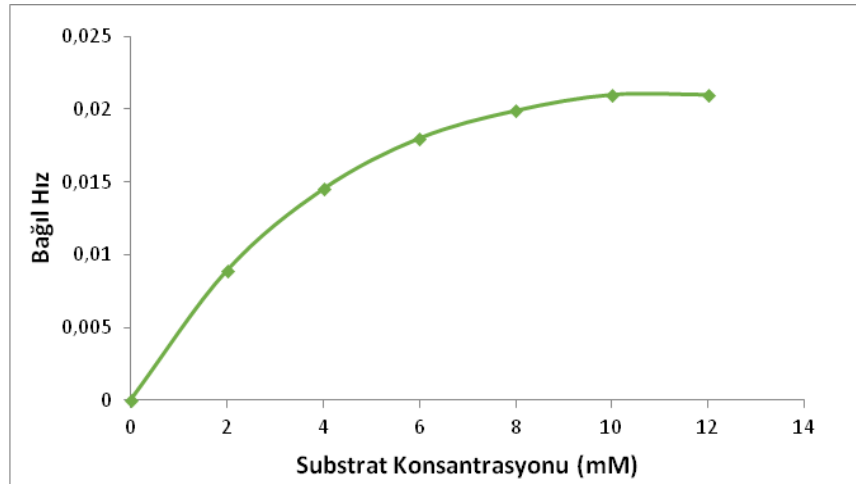
Şekil 4.15. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol varlığında optimum sıcaklık grafiği

*Paulownia tomentosa* meyvesinden ÜFS metoduna göre saflaştırılan PPO enzimin özütüne L-dopa substratın varlığında optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 5 ile 70°C arasındaki optimum sıcaklık tayinini tespit etmek için Bölüm 3.3.4.'te anlatılan yöntemle göre aktivite tayinleri yapılmıştır. PPO enzimin L-dopa ile olan optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.16.'da verilmiştir. Maksimum aktivitenin 25°C'de olduğu gözlenmiş ve optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.

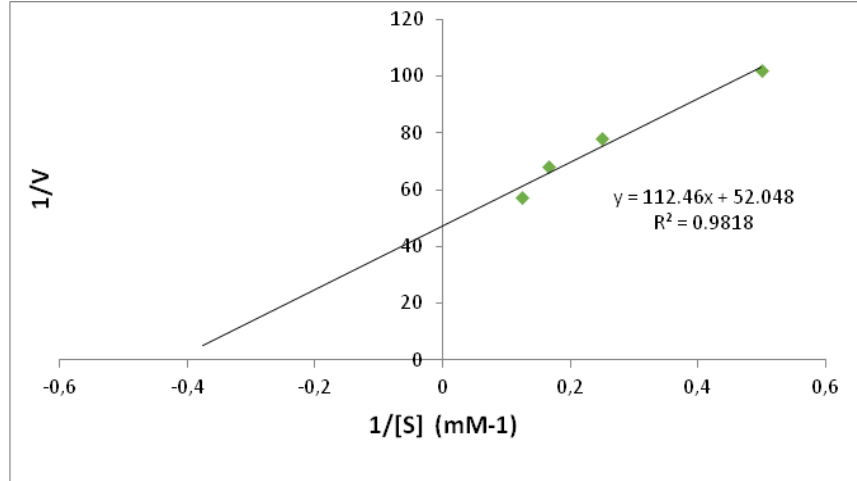


Şekil 4.16. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa varlığında optimum sıcaklık grafiği

Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerlerini belirleyebilmek için pH 7'de ve 25°C'de çeşitli konsantrasyonlarda 4-metil katekol kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin Michaelis-Menten grafiği (Şekil 4.17.) ve Lineweaver-Burk grafiğini (Şekil 4.18.) kullanılarak substrat için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

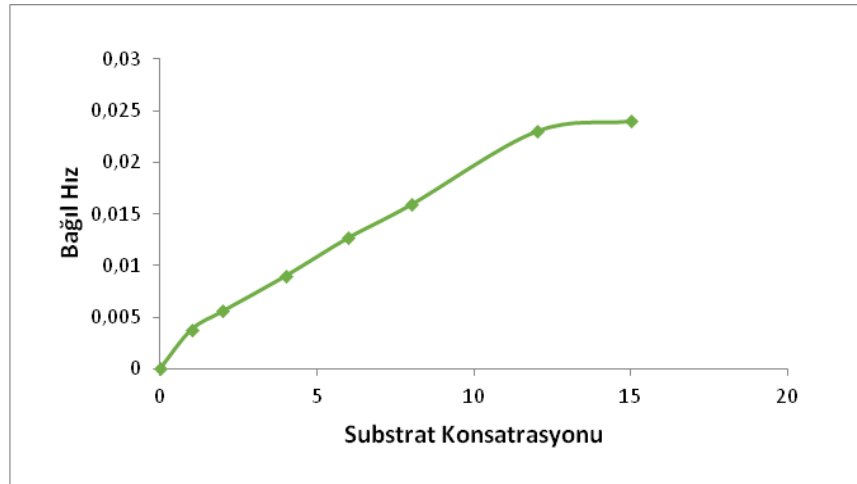


Şekil 4.17. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol substratın doygunluk eğrisi

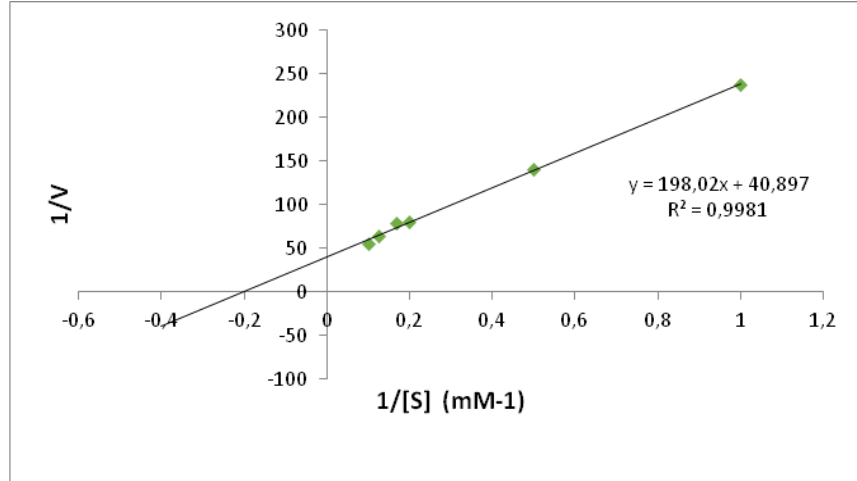


Şekil 4.18. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerlerini belirleyebilmek için pH 7,5 ve 25°C'de çeşitli konsantrasyonlarda pirokatekol kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten grafiği (Şekil 4.19.) ve Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.20.) çizilerek substrat için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

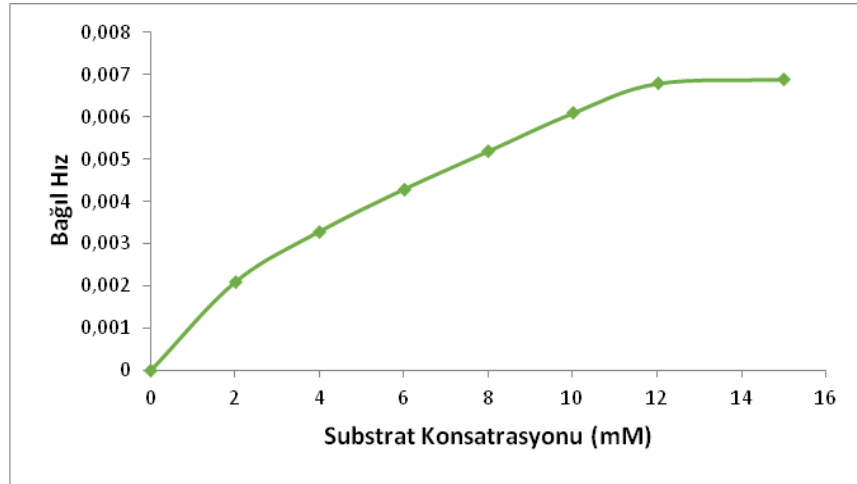


Şekil 4.19. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol substratın doygunluk eğrisi

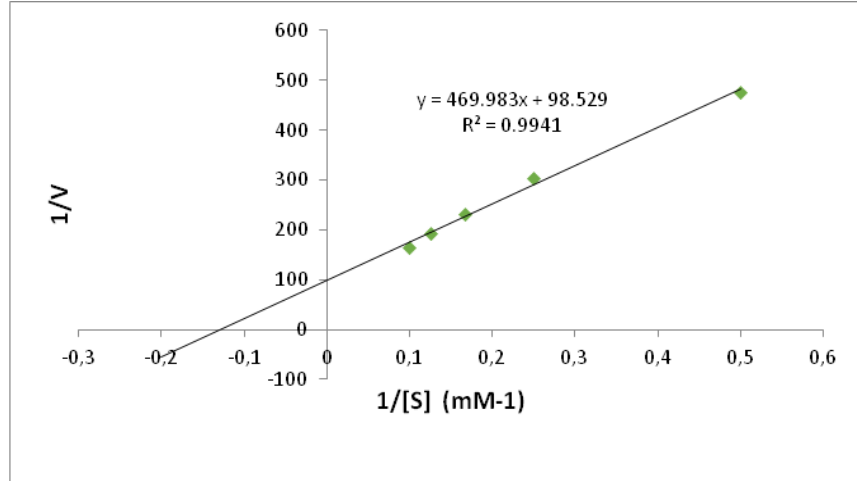


Şekil 4.20. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirokatekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerlerini belirleyebilmek için pH 7,5 ve 25°C'de çeşitli konsantrasyonlarda pirogallol kullanarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin Michaelis-Menten grafiği (Şekil 4.21.) ve Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.22.) çizilerek substrat için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri bu grafiklerden hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

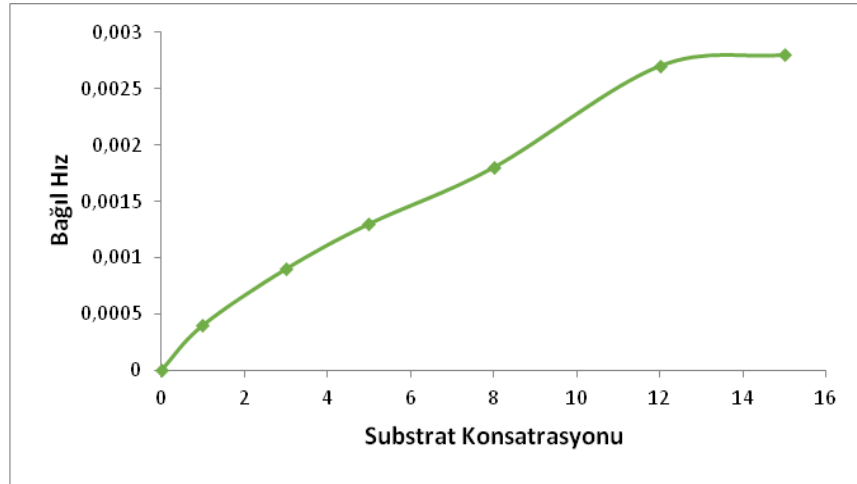


Şekil 4.21. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol substratın doyunluk eğrisi



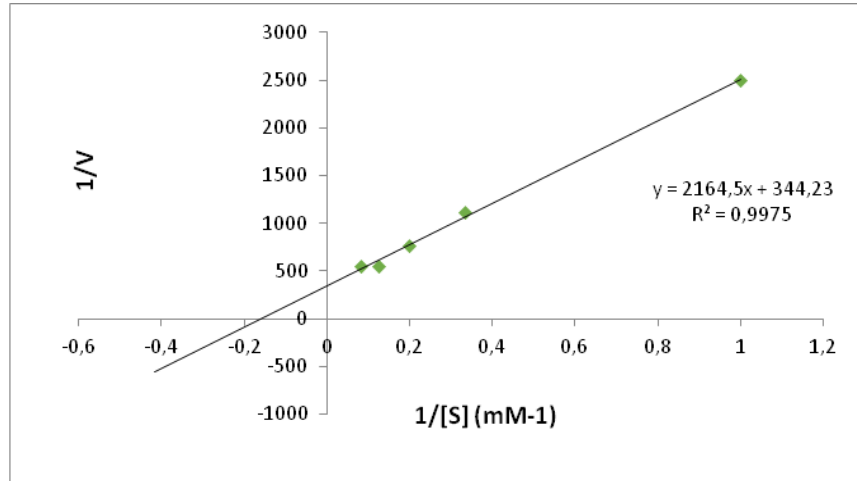
Şekil 4.22. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerlerini belirleyebilmek için pH 7,5 ve 25°C'de çeşitli konsantrasyonlarda L-dopa kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.23.'de ve Lineweaver-Burk grafiğini Şekil 4.24.'de verilmiş ve bu substrat için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri bu grafiklerden hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.23. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa substratın doygunluk eğrisi





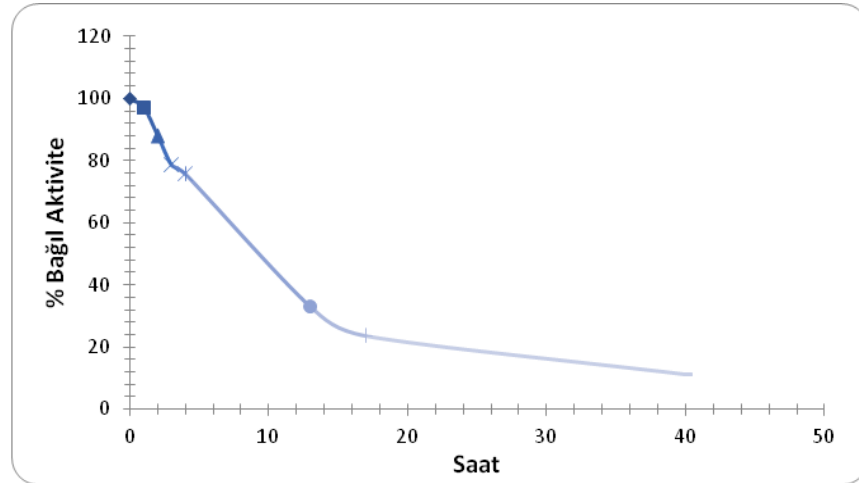
Şekil 4.24. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimin L-dopa substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Sonuçlara bakıldığında enzimin en iyi aktivite gösterdiği substrat 4-metil katekol olup  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri ile 2,17 mM ve 0,02 mM/dk olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1.).

#### 4.7. Enzim Depolanma Kararlılığı

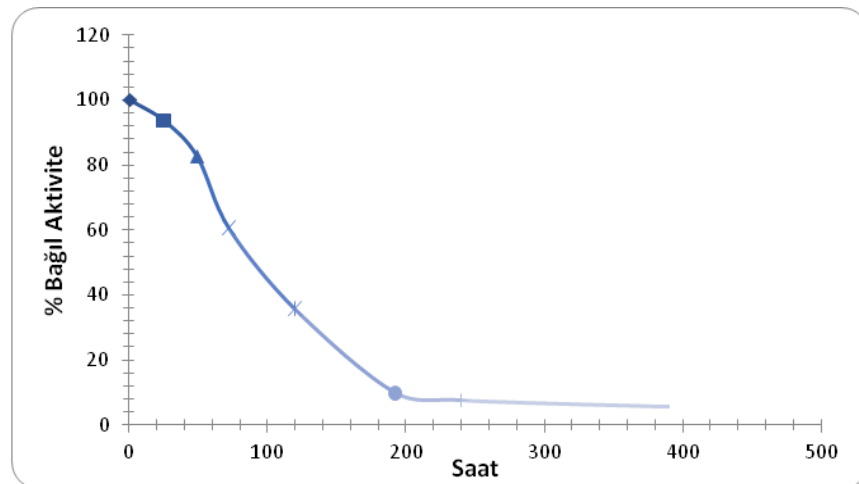
Enzimin değişen sıcaklık koşullarında saklandığında aktivitesinde nasıl bir değişim olduğunun incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada, enzim oda sıcaklığında, 4°C'de ve -20°C'de depolanmış ve belirli zaman periyotlarında aktivite ölçümü yapılmıştır. Oda sıcaklığında ve 4°C'de birkaç saatte bir ölçüm alınırken, -20°C'de haftada bir ölçüm alınmış ve enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolanma kararlılığı çalışması sonucunda, PPO enziminin aktivitesi ilk 10 saatte hızla azalarak yaklaşık yarısına inmiştir. Daha sonraki saatlerde aktivite neredeyse sabit kalmıştır. 24. saatten sonra aktivite tekrar hızla azalmış ve 40 saatin sonunda enzim, aktivitesinin % 95'ini kaybetmiştir (Şekil 4.25.).



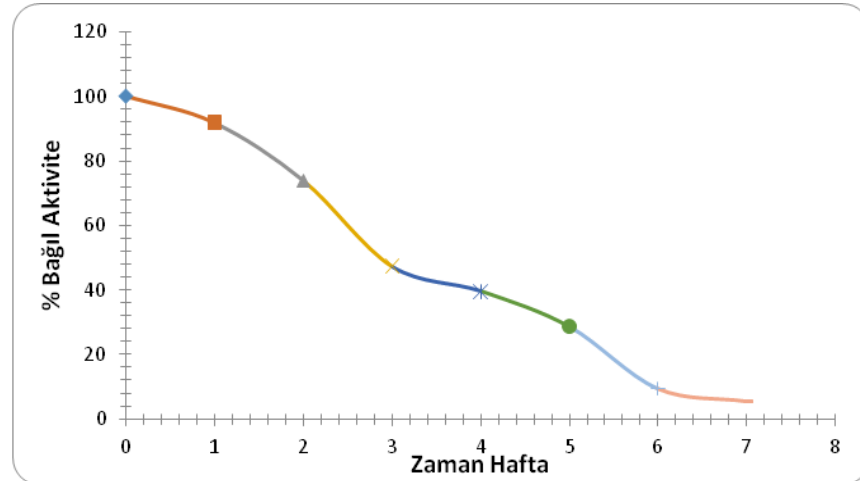
Şekil 4.25. PPO enziminin oda sıcaklığındaki (25°C) aktivitesinin zamanla değişimi

4°C'de ise PPO enziminin aktivitesi ilk 48 saatte oda sıcaklığında olduğu gibi hızla azalarak %20'ye düşmüştür. 90 saat sonra aktivitedeki düşüş yavaşlamış, sonunda bağlı aktivite %50'ye düşmüştür. Bundan sonra aktivitedeki düşüş tekrar hızlanmıştır ve 385 saat sonunda enzim aktivitesinin %94'ünü kaybetmiştir (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. PPO enziminin 4°C'deki aktivitesinin zamanla değişimi

Enzim -20°C'de depolandığında aktivitesinde daha düzenli ve yavaş bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Aktivite haftada bir bakıldığında hala sürmektedir. Dört hafta geçmesine rağmen aktivitede sadece yaklaşık %50'lik bir düşüş gerçekleşmiştir. Enzim aktivitenin yaklaşık yedi hafta sonunda aktivitesinin %95'ini kaybettiği görülmektedir (Şekil 4.27.).



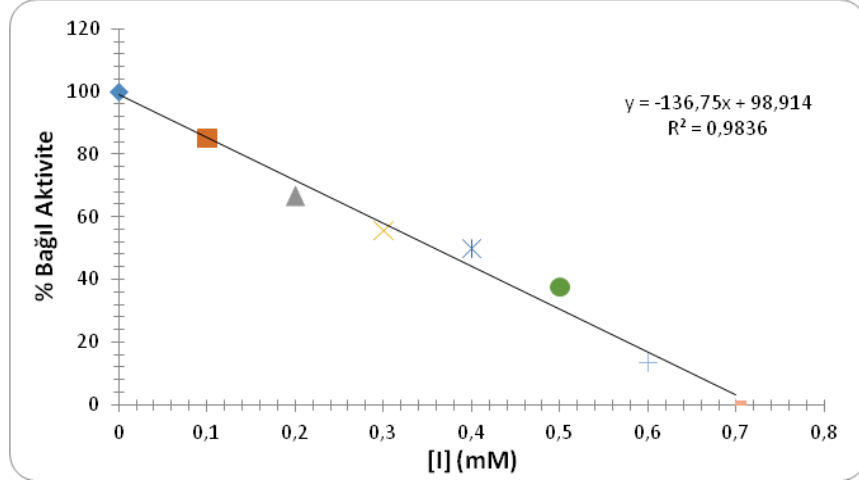
Şekil 4.27. PPO enziminin -20°C'deki aktivitesinin zamanla değişimi

#### 4.8. İnhibitörlerin Etkisi

*Paulownia tomentosa*'dan ÜFS metoduna göre saflaştırılan polifenol oksidaz enzimin üzerine bilinen inhibitörlerin etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada 4-metil katekol ve pirogallol olmak üzere sadece iki çeşit substrat ile dört farklı inhibitör denenerek toplam 8 farklı inhibisyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Her bir inhibitör için  $I_{C50}$  ve  $K_i$  değerleri, deneysel çalışmaların sonucunda elde edilen grafiklerden hesaplanarak sonuçlar Tablo 4.2. ve 4.3.'de verilmiştir.

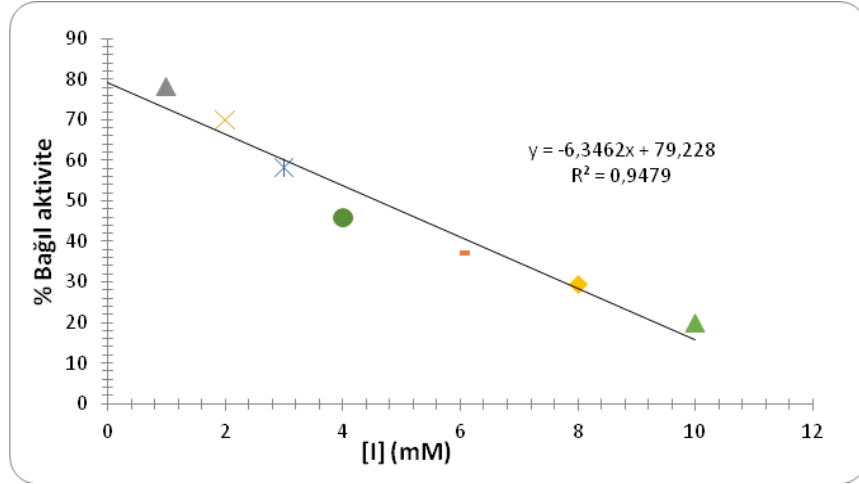
Tablo 4.2. *Paulownia tomentosa* meyvesinden saflaştırılan PPO enzim aktivitesi üzerine etki eden inhibitörlerin 4-metil katekol ve Pirogallol substratların varlığında  $I_{C50}$  değerleri

İnhibitör	4-metil Katekol $I_{C50}$ (mM)	Pirogallol $I_{C50}$ (mM)
Askorbik Asit	0,35	0,16
NaN <sub>3</sub>	5,00	2,72
Tiyüre	1,80	3,00
Sistein	0,18	0,31



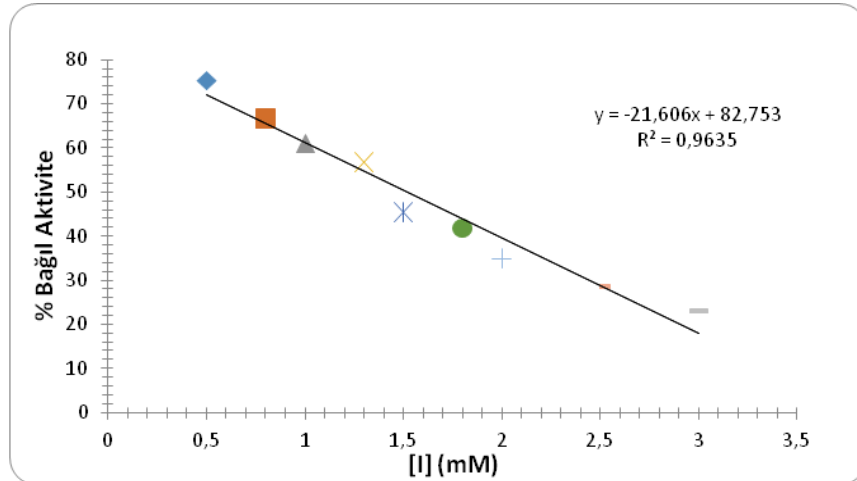
Şekil 4.28. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit etkisi

Şekil 4.28.'de polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında askorbik asit ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonu 0,35 mM olarak tespit edilmiştir.



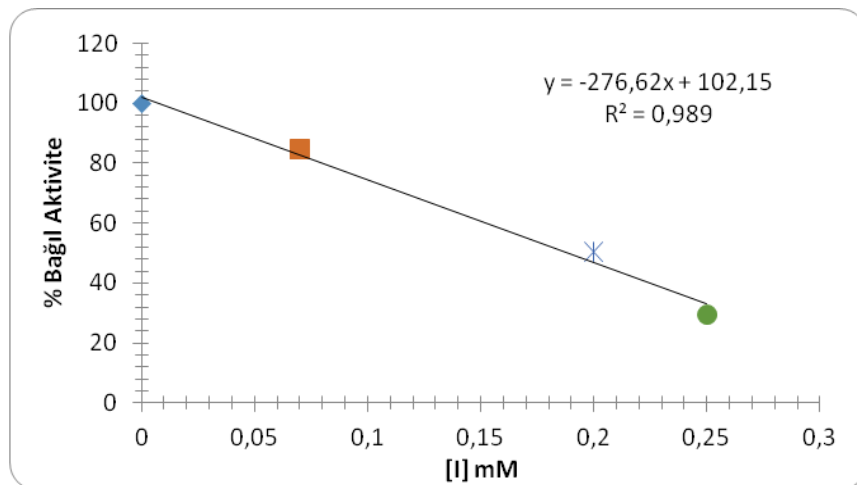
Şekil 4.29. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında sodyum azid etkisi

Şekil 4.29.'da polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında sodyum azid ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 5,0 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



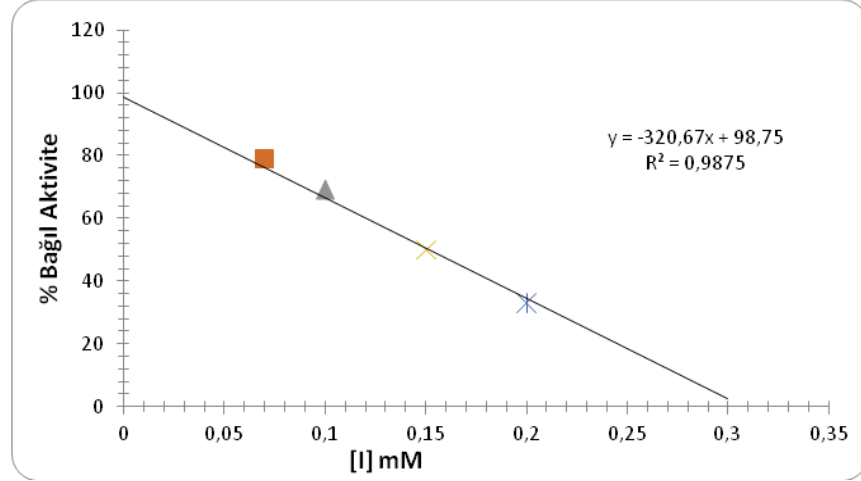
Şekil 4.30. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında tiyoüre etkisi

Şekil 4.30.'de polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında tiyoüre ile olan inhibitör etkisi incelenmiş ve grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 1,8 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



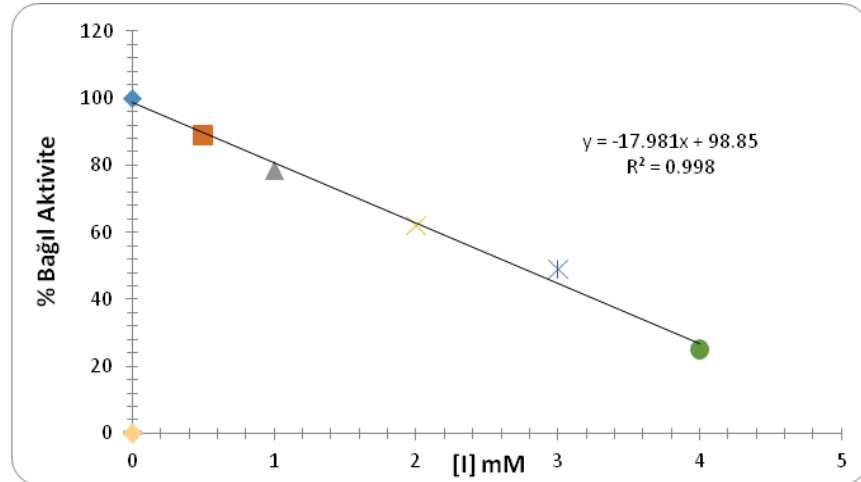
Şekil 4.31. *Paulownia tomentosa* bitkisinden elde edilen PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında L-sistein etkisi

Şekil 4.31.'de polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında L-sistein ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,18 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



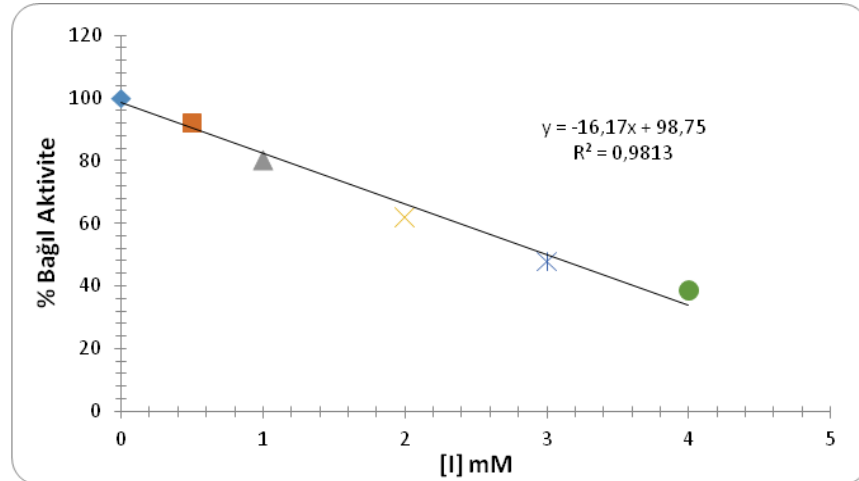
Şekil 4.32. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında askorbik asit etkisi

Şekil 4.32.'de polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı varlığında askorbik asit ile olan inhibitör etkisi incelenmiş ve grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,16 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



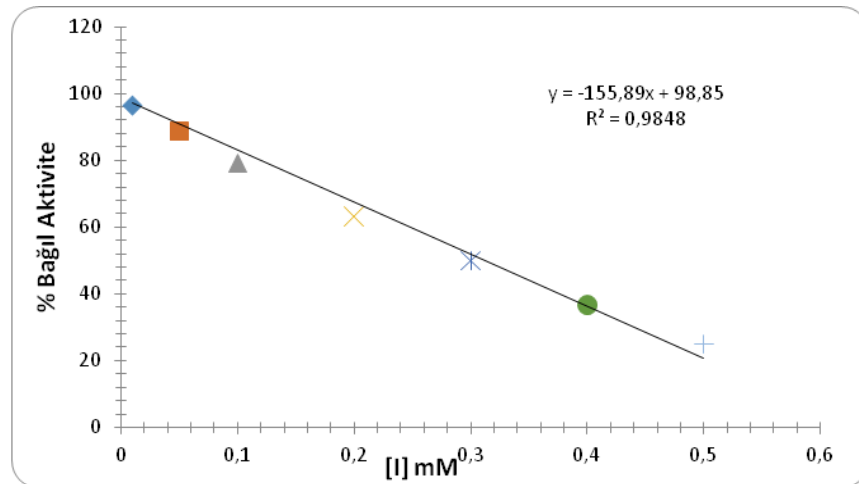
Şekil 4.33. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında sodyum azid etkisi

Şekil 4.33.'de polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı varlığında sodyum azid ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 2,72 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında tiyoüre etkisi

Şekil 4.34.'de polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı varlığında tiyoüre ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 3,00 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerine pirogallol substratı varlığında L-sistein etkisi

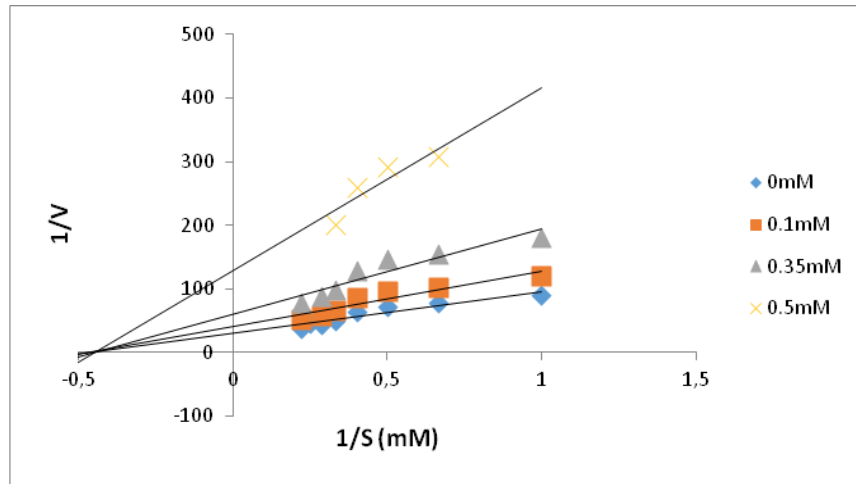
Şekil 4.35.'de polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı varlığında L-sistein ile olan inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,31 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

PPO enzimi için, PPO'nun bilinen inhibitörlerinin *Paulownia tomentosa*'dan saflaştırılan PPO enzimi üzerindeki inhibisyon çeşidinin belirlenmesi yapılmış ve toplu olarak  $K_i$  değerleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve  $K_i$  (mM) değerleri

İnhibitor	Substrat	
	4-Metil Katekol	Pirogallol
Askorbik Asit	Yarışmasız $K_i= 0.631$ mM	Yalancı (Pseudo) $K_i=56.8$ mM
Sodyum Azid	Yarı yarışmalı $K_i=2.1$ mM	Yarı yarışmalı $K_i=1.26$ mM
Tioure	Yarı yarışmalı $K_i=0.95$ mM	Karışık $K_i=0.836$ mM
L-Sistein	Yarışmasız $K_i=0.567$ mM	Karışık $K_i=0.497$ mM

Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile olan reaksiyonunda askorbik asidin yarışmasız inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.36.'da gösterilmiştir. Şekil 4.36.'da inhibitör konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin  $K_m$  sabiti ile aynı olduğu ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmektedir. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,631 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.

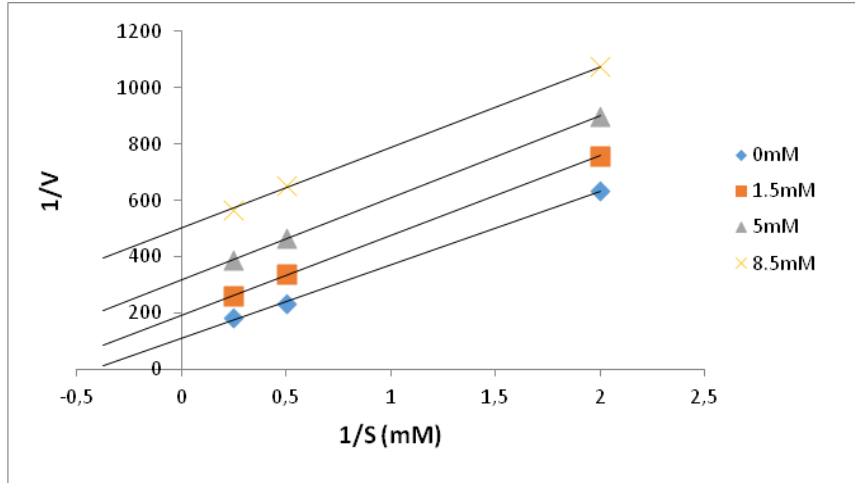


Şekil 4.36. PPO enziminin 4-metil katekol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile olan reaksiyonunda sodyum azidin yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.37.'de gösterilmiştir. Şekil 4.37.'de inhibitör konsantrasyonları arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar

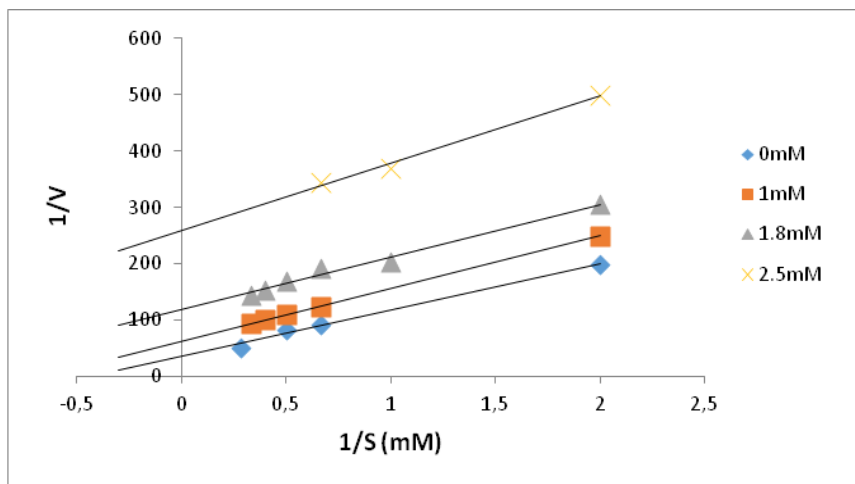


sonucunda  $K_i$  değerinin 2,1 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



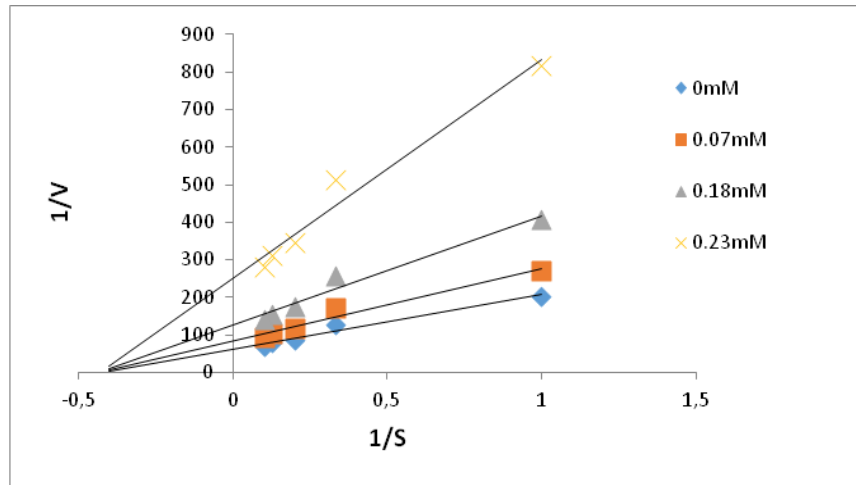
Şekil 4.37. PPO enziminin 4-metil katekol ile  $\text{NaN}_3$  varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile olan reaksiyonunda tiyoürenin yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.38.'de gösterilmiştir. Şekil 4.38.'de inhibitör konsantrasyonları arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin ve  $V_{\text{maks}}$ 'ın azaldığı belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,95 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



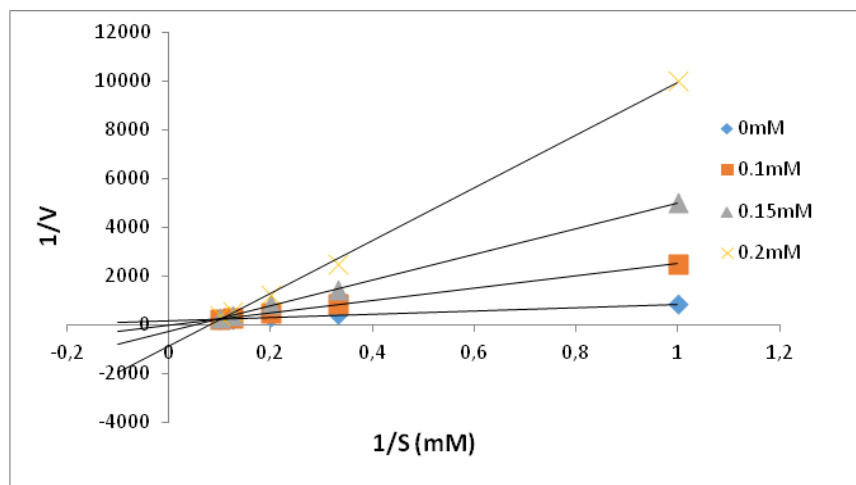
Şekil 4.38. PPO enziminin 4-metil katekol ile tiyoüre varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile olan reaksiyonunda L-sisteinin yarışmasız inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.39.'dan belirlenmiştir. Şekil 4.39.'da inhibitörün konsantrasyonları arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin  $K_m$  sabiti ile aynı olduğu ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,567 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



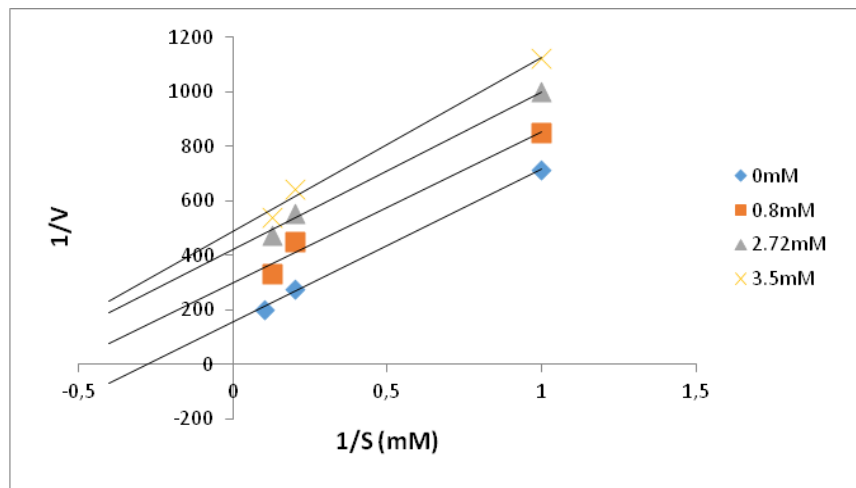
Şekil 4.39. PPO enziminin 4-metil katekol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı ile olan reaksiyonunda askorbik asidin yalancı (pseudo) inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.40.'ta belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 56,8 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



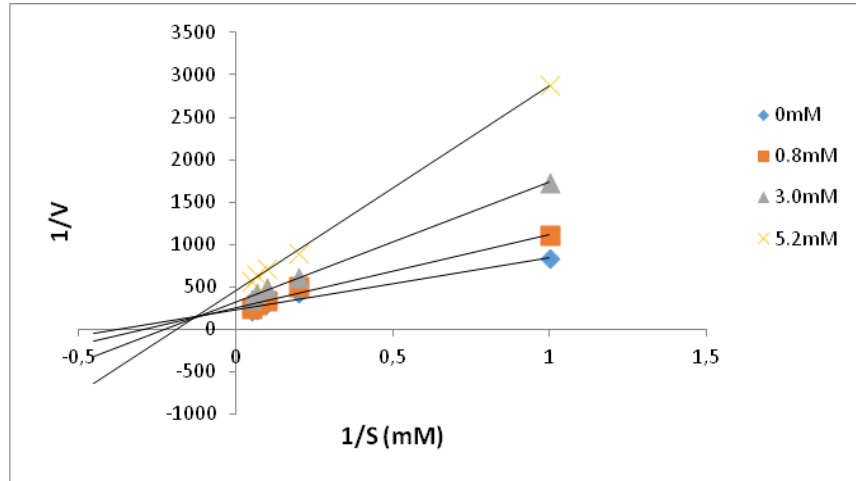
Şekil 4.40. PPO enziminin pirogallol ile askorbik asit varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı ile olan reaksiyonunda sodyum azidin yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.41.'de gösterilmiştir. Şekil 4.41.'de inhibitörün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı gözlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 1,26 mM olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



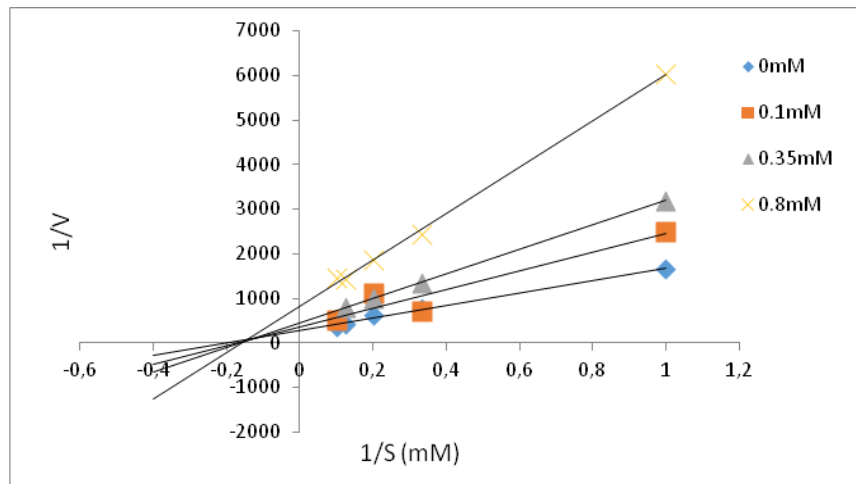
Şekil 4.41. PPO enziminin pirogallol ile  $\text{NaN}_3$  varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı ile olan reaksiyonunda tiyoürenin karışık (mixed) inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.42.'de belirlenmiştir. Şekil 4.42.'de inhibitörlerin konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,836 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.42. PPO enziminin pirogallol ile tiyöüre varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Polifenol oksidaz enziminin pirogallol substratı ile olan reaksiyonunda tiyöürenin karışık (mixed) inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.43'de gösterilmiştir. Şekil 4.43.'de inhibitör konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,497 mM olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.43. PPO enziminin pirogallol ile L-sistein varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

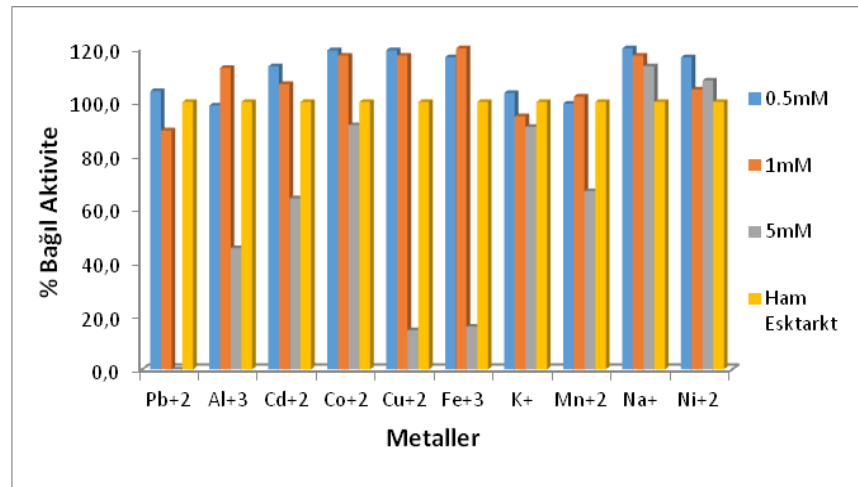
#### 4.9. Metallerin Etkisi

PPO enzim aktivitesi üzerinde metallerin etkisi incelenmiştir. Bunun için 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal çözeltileri ile enzim 5 dk

boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra zamana karşı 60 sn boyunca enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak UV cihazında 420 nm'de ölçülmüştür. Substrat olarak 4-metil katekol 10 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır. Bazı metallerin enzim aktivitesini arttırdığı bazılarının ise azalttığı görülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.6.'da gösterilmiştir

Tablo 4.4. PPO enzimi üzerine etki eden metallerin etkisi

PPO % Kalan Aktivite			
Metal	Metal Konsantrasyonu		
	0.5 mM	1 mM	5 mM
Metalsiz	100	100	100
Pb <sup>+2</sup>	104,0	89,3	0,0
Al <sup>+3</sup>	98,7	112,7	45,3
Cd <sup>+2</sup>	113,3	106,7	64,0
Co <sup>+2</sup>	119,3	117,3	91,3
Cu <sup>+2</sup>	119,3	117,3	14,7
Fe <sup>+3</sup>	116,7	120,0	16,0
K <sup>+</sup>	103,3	94,7	90,7
Mn <sup>+2</sup>	99,3	102,0	66,7
Na <sup>+</sup>	120,0	117,3	113,3
Ni <sup>+2</sup>	116,7	104,7	108,0



Şekil 4.44.PPO enzimi üzerinde metallerin etkisi

PPO enziminin 1 mM'lık metal konsantrasyonlarına dayanıklı olduğu görülmüştür ve 5 mM'lık konsantrasyonda aşağıda sıralanan veriler elde edilmiştir:

- Fe<sup>+3</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metal iyonlarının 5 mM düzeyinde reaksiyon ortamında bulduklarında enzimi %85 oranında inhibe etmiştir.
- Mn<sup>+2</sup> ve Cd<sup>+2</sup> iyonları ise 5 mM düzeyinde reaksiyon ortamında bulduklarında enzimi %35 inhibe etmiştir.

- $Al^{+3}$  iyonun ise 5 mM konsantrasyonda enzimi %55 inhibe etmiştir.
- $Pb^{+2}$  metal iyonun 5 mM'lık konsantrasyonun PPO enzimini tamamen inhibe etmiştir. Bu veriler Şekil 4.44.'deki grafikte de gösterilmiştir.

#### 4.10. Kullanılan bitki ekstratların $I_{C50}$ değerleri ve enzim üzerindeki etkileri

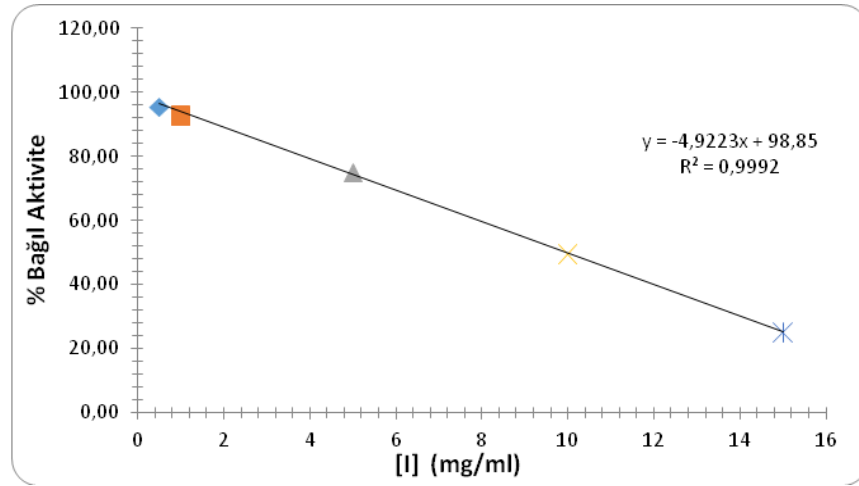
Kosova'nın Şar bölgesinde toplanan bitkilerin özütlemeye işlemleri tamamlandıktan sonra, PPO enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini incelemek üzere  $I_{C50}$  değerleri belirlenerek  $K_i$  değerleri ve inhibisyon çeşitleri belirlenmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Kullanılan bitkilerin  $I_{C50}$  değerleri ve bitki ekstratların enzim üzerindeki inhibitör çeşitleri

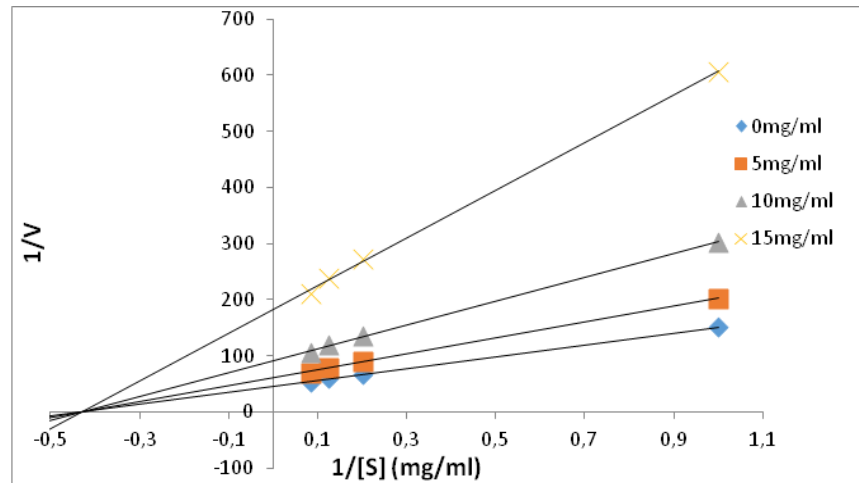
No	Bitkinin Latince Adı	Bitkinin Türkçe Adı	Kullanılan kısmı	$I_{C50}$ Değerleri	$K_i$ değerleri ve İnhibisyon çeşidi
1	<i>Cydonia Oblogna</i>	Ayva	Yaprak	9,9 mg/ml	$K_i=4,65$ mg/ml Yarışmasız
2	<i>Punica Granatum</i>	Nar	Kabuğu	4,5 mg/ml	$K_i=2,29$ mM Yarışmasız
3	<i>Datura Stramonium</i>	Şeytan Elması	Yaprak	6,7 mg/ml	$K_i=0,69$ mg/ml Karışık
4	<i>Datura Stramonium</i>		Tohum	1,65 mg/ml	$K_i=0,65$ mg/ml Karışık
5	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Biberiye	Yaprak	20,6 mg/ml	$K_i=8,05$ mg/ml Yarı yarışmalı
6	<i>Solanum Nigra</i>	Köpek Üzümü	Meyve	10,7 mg/ml	$K_i=1,44$ mg/ml Karışık
7	<i>Solanum Nigra</i>		Yaprak	3,12 mg/ml	$K_i=0,76$ mg/ml Yarışmalı
8	<i>Verbascum Thapsus</i>	Sığırkuyruğu Otu	Çiçek	0,0006 mg/ml	$K_i=0,48$ mg/ml Karışık
9	<i>Tanacetum Vulgare</i>	Solucan Otu	Çiçek	0,00043 mg/ml	$K_i=0,21$ mg/ml Karışık
10	<i>Momordica Charantia</i>	Kudret Narı	Meyve	0,495 mg/ml	$K_i=0,3047$ mg/ml Karışık

Şekil 4.45.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında kurutulmuş *Cydonia oblogna* yaprağı özütü ile inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 9,9 mg/ml

olduğu tespit edilmiştir. *Cydonia oblogna* yaprağı özütü yarışmasız inhibisyon etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.46.). Şekil 4.46.'da *Cydonia oblogna* yaprağı özütünün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  değeri değişmezken  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 4,65 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



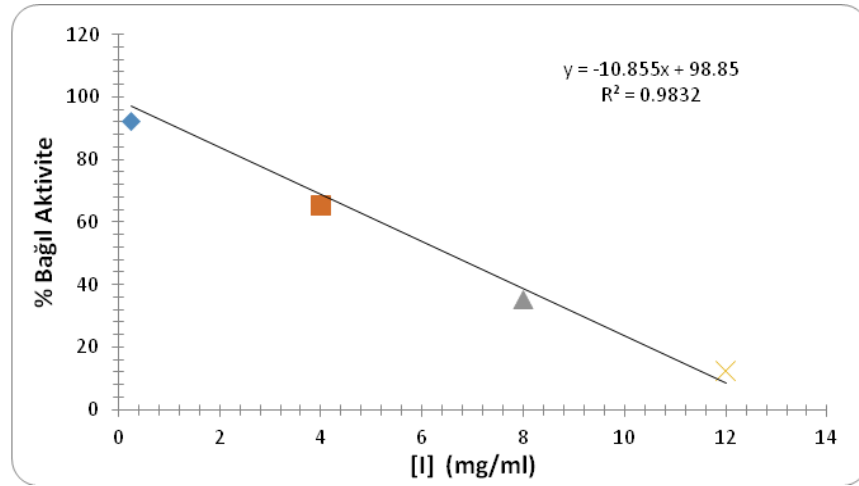
Şekil 4.45. *Cydonia oblogna* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



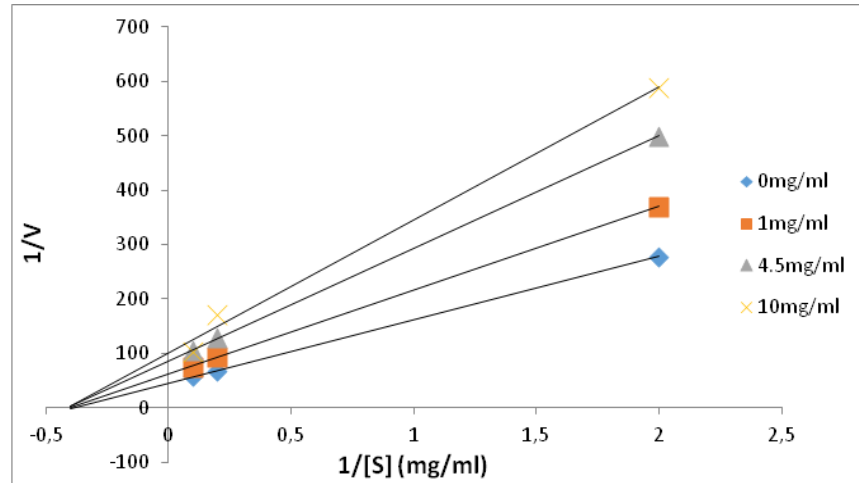
Şekil 4.46. *Cydonia oblogna* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.47.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında kurutulmuş, *Punica granatum* meyvesinin kabuk özütünün inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 4,5 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Punica granatum* meyvesinin kabuk özütünün yarışmasız

inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.48.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.48.'de *Punica granatum* meyvesinin kabuk özütünün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  değeri değişmezken  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 2,29 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.47. *Punica granatum* kabuğunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi

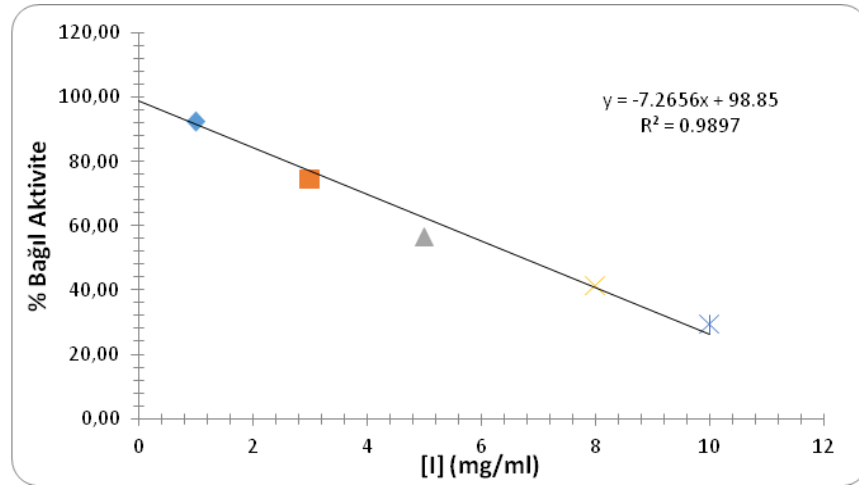


Şekil 4.48. *Punica granatum* kabuğunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

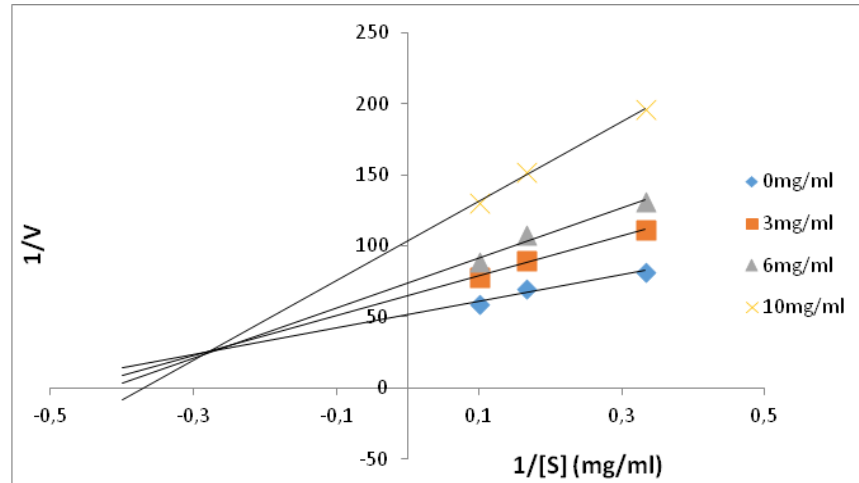
Şekil 4.49.'da görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Datura stramonium*'un kurutulmuş yaprak özütü ile inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $IC_{50}$  konsantrasyonunun 6,7 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Datura stramonium*'un kurutulmuş yaprak özütü karışık



inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.50.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.50.'de *Datura stramonium*'un kurutulmuş yaprak özütünün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,69 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



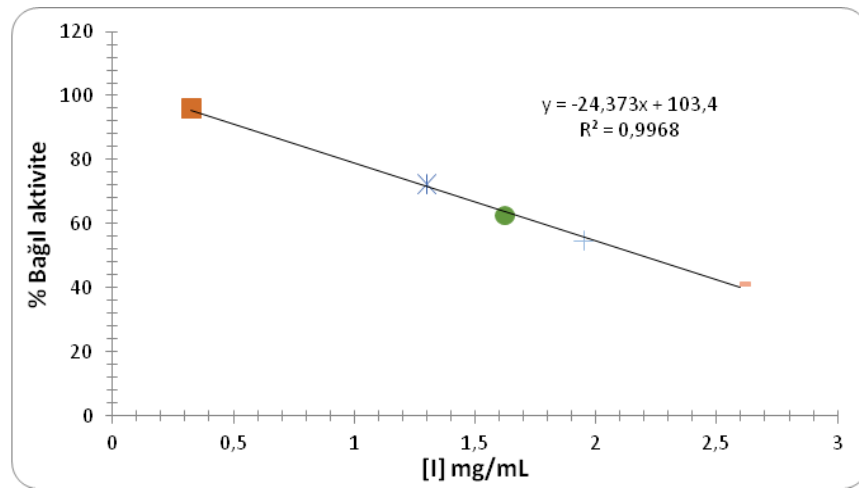
Şekil 4.49. *Datura stramonium* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



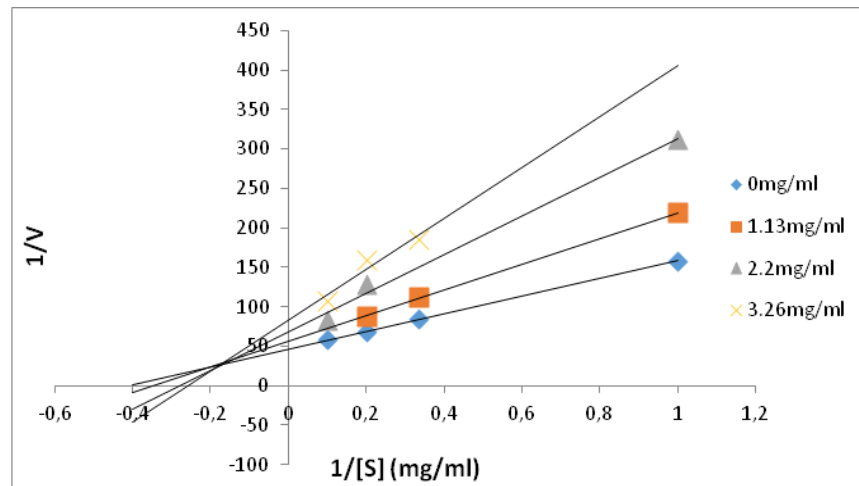
Şekil 4.50. *Datura stramonium* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.51.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Datura stramonium*'un kurutulmuş tohum özütü ile inhibitör etkisi incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 1,65 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Datura stramonium*'un kurutulmuş tohum özütü

karışık inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.52.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.52.'de *Datura stramonium*'un kurutulmuş tohum özütü konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,65 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Datura stramonium*'un kurutulmuş yaprak ve tohum özütlerinin  $K_i$  değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu ve aynı inhibisyon etkili olduğu görülmektedir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



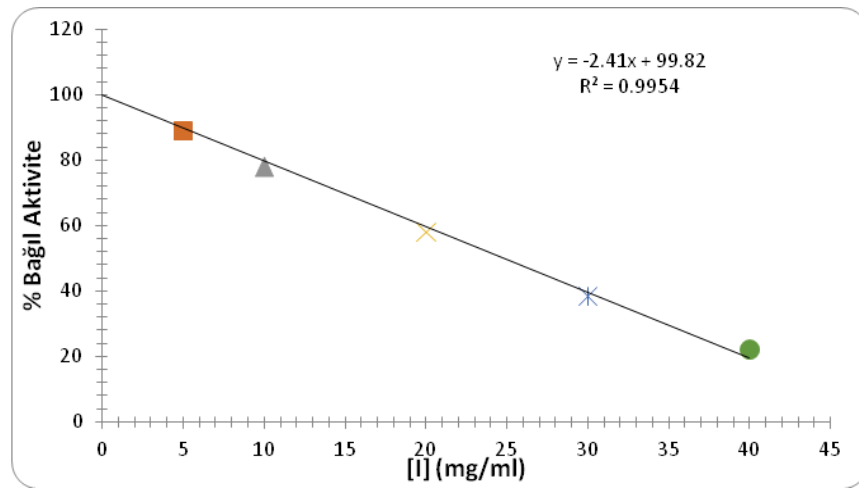
Şekil 4.51. *Datura stramonium* tohumunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



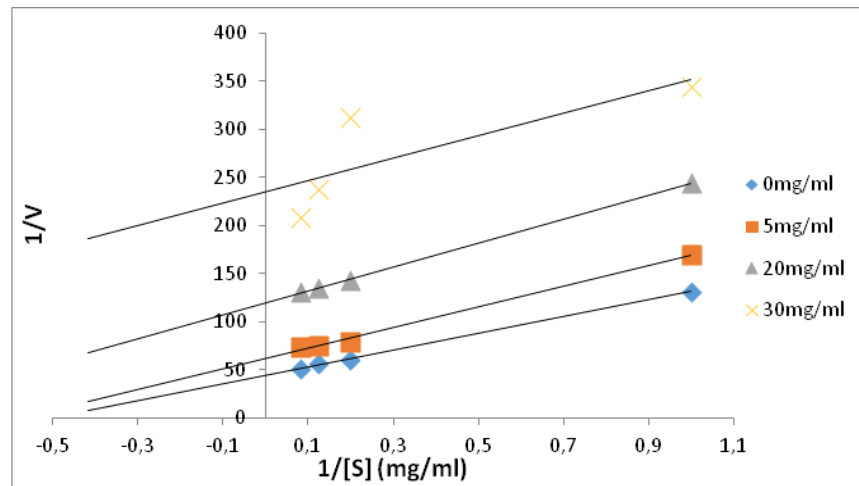
Şekil 4.52. *Datura stramonium* tohumunun ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.53.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Rosmarinus officinalis*'in kurutulmuş yaprak özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 20,6 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Rosmarinus officinalis*'in kurutulmuş yaprak özütü yarı yarışmalı inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.52.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.54.'de *Rosmarinus officinalis*'in kurutulmuş yaprak özütü konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 8,05 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



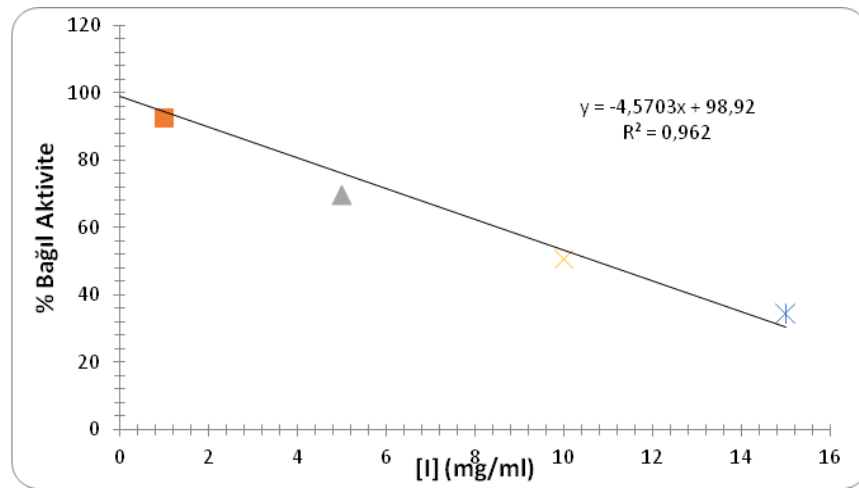
Şekil 4.53. *Rosmarinus officinalis* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



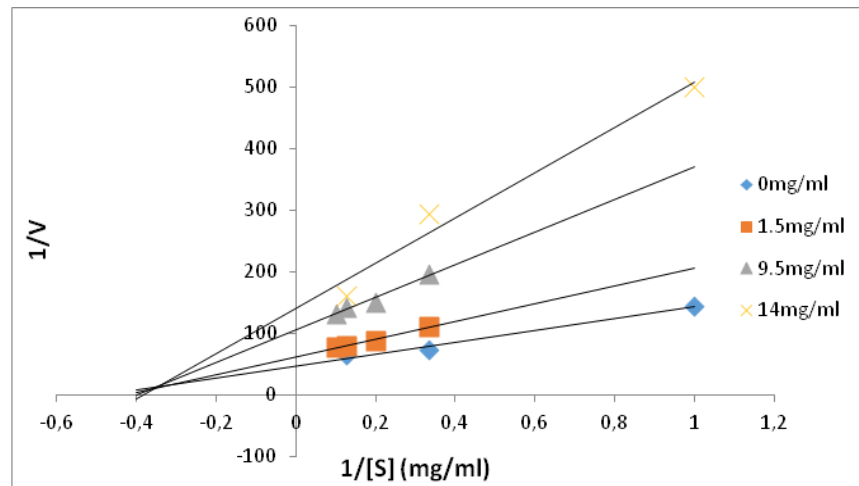
Şekil 4.54. *Rosmarinus officinalis* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.55.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Solanum nigrum*'un kurutulmuş meyve özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{c50}$  konsantrasyonunun 10,7 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Solanum nigrum*'un kurutulmuş meyve özütü karışık inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.56.'daki grafikten görülmektedir. Şekil 4.56.'da *Solanum nigrum*'un kurutulmuş meyve özütün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 1,44 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



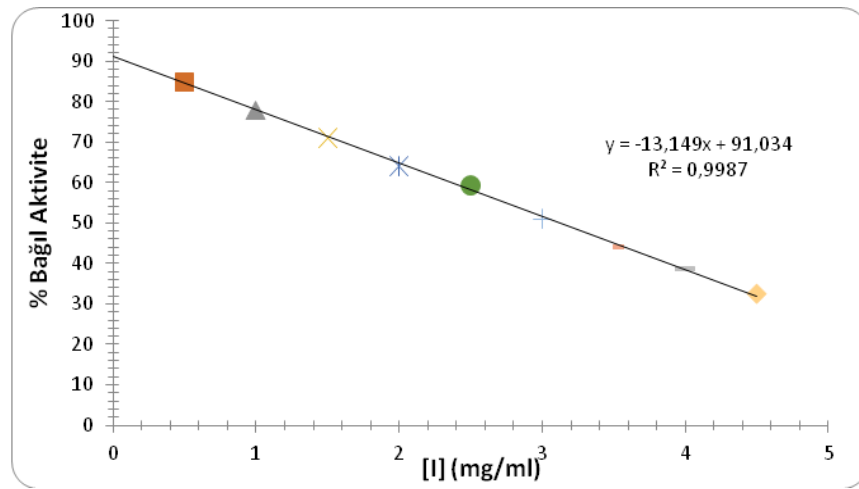
Şekil 4.55. *Solanum nigrum* meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



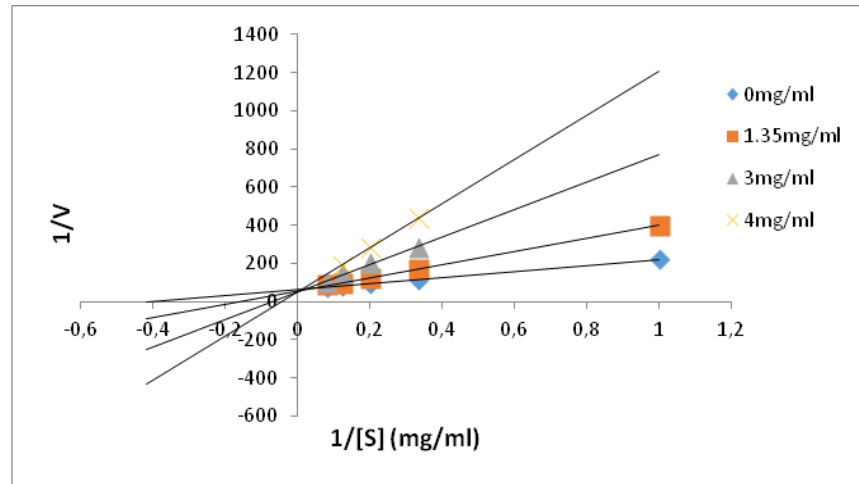
Şekil 4.56. *Solanum nigrum* meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.57.'de görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Solanum nigrum*'un kurutulmuş yaprak özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 3,12 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Solanum nigrum*'un kurutulmuş yaprak özütün yarışmalı inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.58.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.58.'de *Solanum nigrum*'un kurutulmuş yaprak özütün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın değişmediği görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,76 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



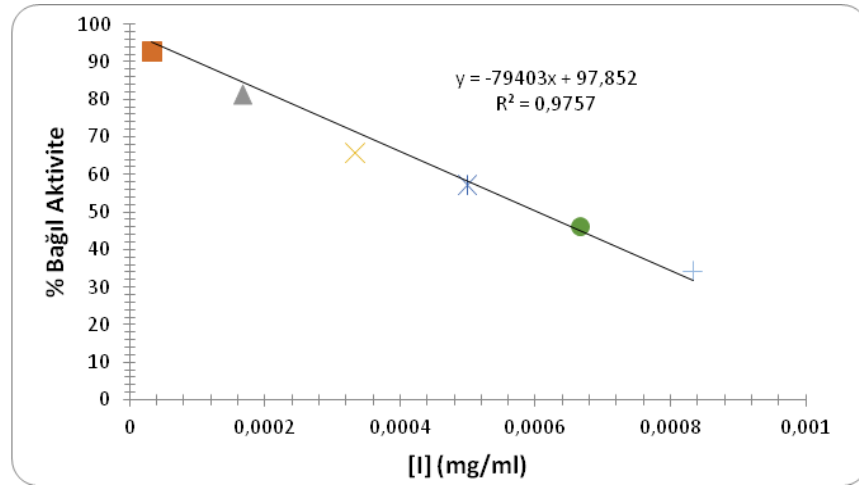
Şekil 4.57. *Solanum nigrum* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



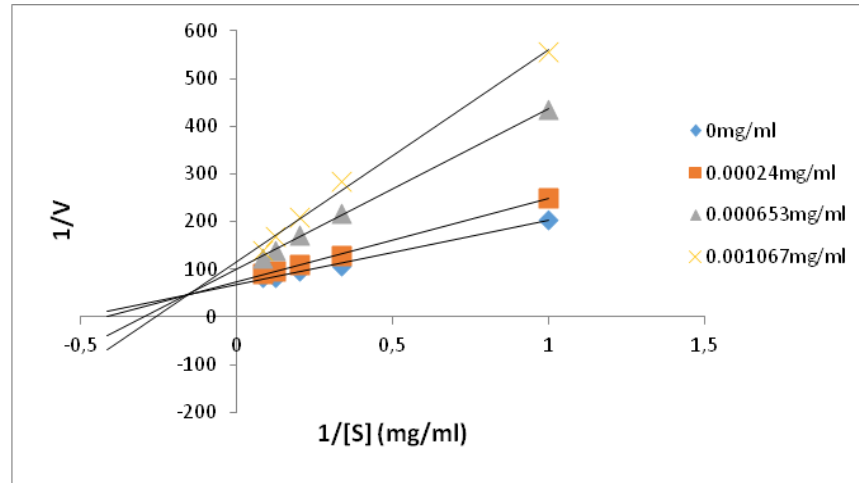
Şekil 4.58. *Solanum nigrum* yaprağının ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.59.'da görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Verbascum thapsus*'un kurutulmuş çiçek özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,0006 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Verbascum thapsus*'un kurutulmuş çiçek özütün karışık inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.60.'daki grafikten görülmektedir. Şekil 4.60.'da *Verbascum thapsus*'un kurutulmuş çiçek özütün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,48 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



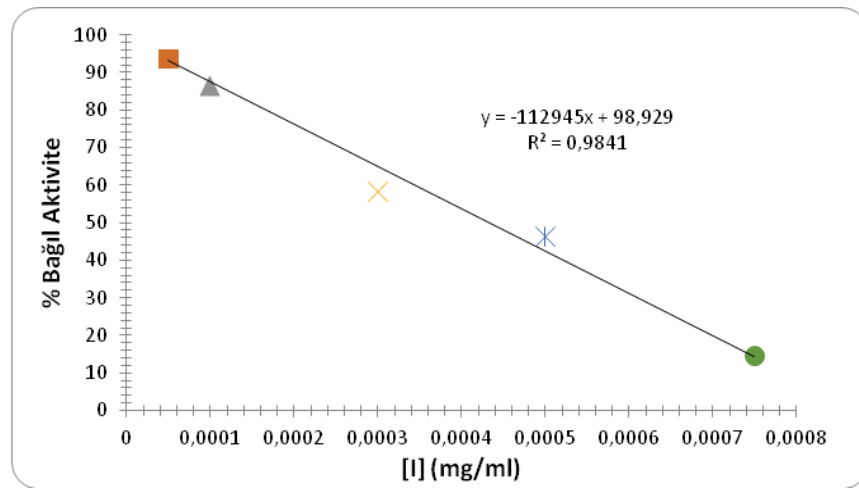
Şekil 4.59. *Verbascum thapsus* çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



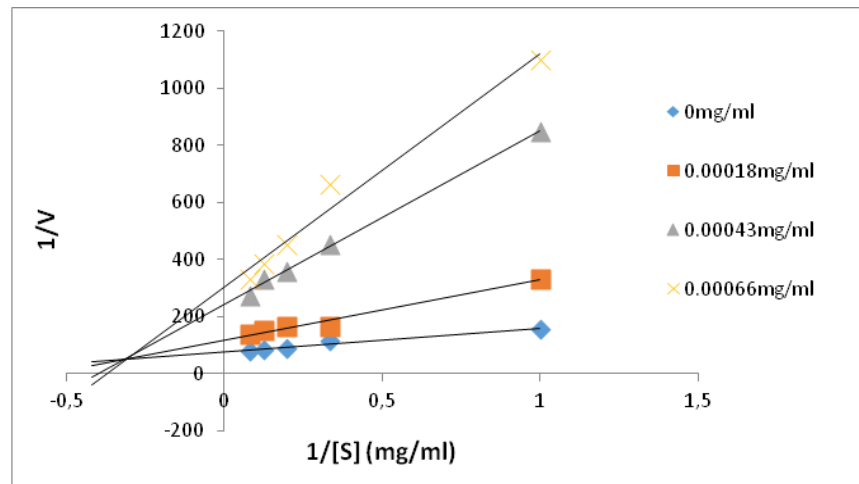
Şekil 4.60. *Verbascum thapsus* çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.61.'da görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında *Tanacetum vulgare*'nin kurutulmuş çiçek özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,00043 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Tanacetum vulgare*'nin kurutulmuş çiçek özütün karışık inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.62.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.62.'de *Tanacetum vulgare*'nin kurutulmuş çiçek özütün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,21 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



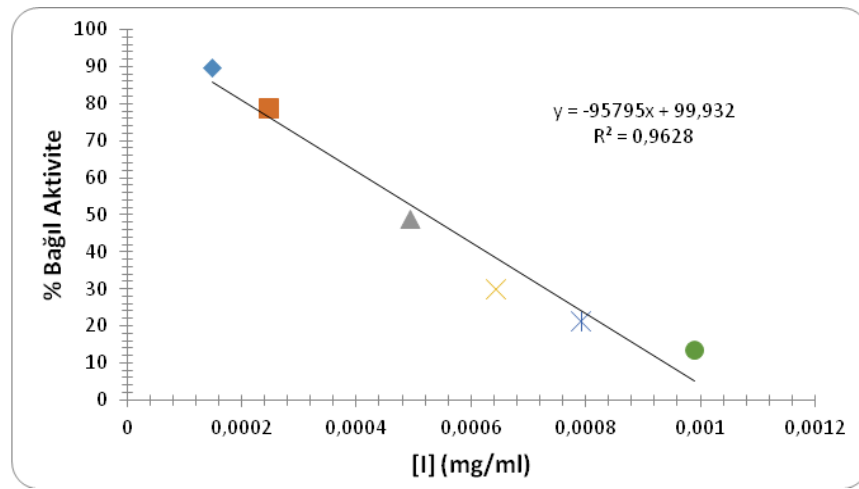
Şekil 4.61. *Tanacetum vulgare* çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



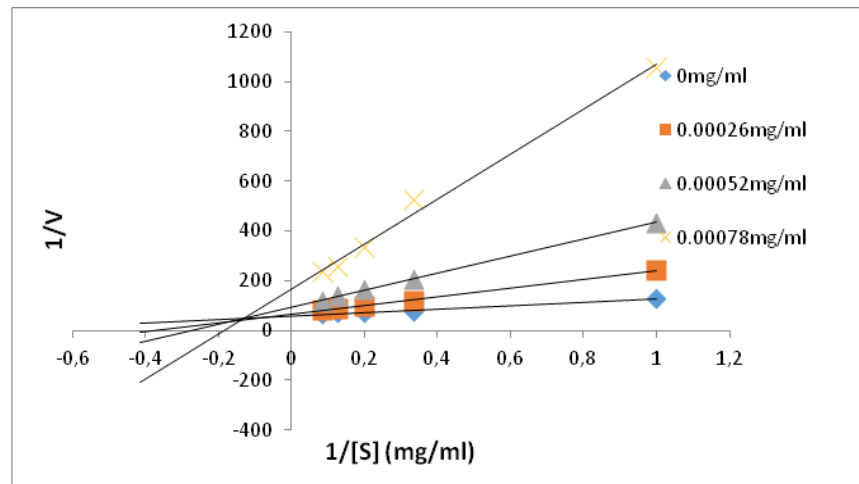
Şekil 4.62. *Tanacetum vulgare* çiçeğinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.63.'da görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin 4-metil katekol substratı varlığında kurutulmuş *Momordica charantia* kabuğu özütü ile inhibitör etkisi

incelenmiştir. Grafikteki değerlerden yararlanarak  $I_{C50}$  konsantrasyonunun 0,495 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Kurutulmuş *Momordica charantia* kabuğu özütünün karışık inhibisyon etkili olduğu Şekil 4.64.'deki grafikten görülmektedir. Şekil 4.64.'de kurutulmuş *Momordica charantia* kabuğu özütün konsantrasyonu arttırıldıkça  $K_i$  sabitinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı görülmüştür. Lineweaver-Burk grafiğinden yola çıkarak yapılan hesaplamalar sonucunda  $K_i$  değerinin 0,3047 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.63. *Momordica charantia l.* meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığındaki etkisi



Şekil 4.64. *Momordica charantia l.* meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütün PPO enzimi üzerine 4-metil katekol substratı varlığında verdiği Lineweaver-Burk grafiği



## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada *Paulownia tomentosa* ağacının meyve kısmından ham PPO enzim özütü elde edilmiştir. Daha sonra *Paulownia Tomentosa* meyvesinden elde edilen ham enzim özütünden Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS) yöntemi ile enzim tek adımda saflaştırılmıştır. Ara fazda toplanan enzimin yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. En uygun amonyum sülfat konsantasyonu alt faz için %10, ara faz için ise %80 oranında olduğu belirlenmiştir. *tert*-Butanol oranının ayarlanması sırasında, en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği oran 1,0:2,0 olduğu ve pH 7,0'de ara fazın bağıl aktivitesi %124,4 oranında olduğu tespit edilmiştir. Alt fazda ise enzim aktivitesi ham enzim özütünün aktivitesinden çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Literatürde Kat ve arkadaşları [73] tarafından invertaz enzimi aynı yöntemle saflaştırılmış ve enzim aktivitesinin en yüksek ara fazda olduğunu belirtilmiştir. *Paulownia tomentosa* PPO enziminin ÜFS yöntemi ile saflaştırılmasında bulunan sonuçlar invertaz enzim saflaştırılması sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Protein miktarını belirlemek için Bradford yöntemi ile yapılan standart ölçümler sonucunda 100 µL ham enzim özütünde 0,097 mg/mL protein olduğu tespit edilmiştir. Yi-Ming Tao ve arkadaşları [83] tarafından yapılan çalışmada Jackfruit adlı meyveden saflaştırılan PPO enzimin miktarı Bradford sonuçları ile kıyaslandığında çıkan sonuçların benzer olduğu görülmüştür.

*Paulownia tomentosa* PPO enziminin saflığı SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edilmiş ve sonuçlarda molekül ağırlıkları bilinen proteinler (marker) ve PPO enzim örneklerinin yürüme mesafeleri karşılaştırıldığında, her üç bandında 60-100 kDa aralığında çıktığı belirlenmiştir. Nardana Esmaili ve arkadaşları [84] tarafından PPO enzimi ile yapılan çalışmada SDS-PAGE sonucuna bakıldığında PPO ham enzim ekstraktının 66,2 kDa'da çıktığı tespit etmişlerdir. Yi-Ming Tao ve arkadaşları [83]

Jackfruit adlı meyve ile yaptıkları çalışmada SDS-PAGE sonuçlarından PPO enzim özütünün 60-70 kDa aralığında olduğunu belirlemişlerdir. *Paulownia tomentosa* PPO enzimi için yapılan saflaştırma sonucunda SDS-PAGE'de ham özüt ve ÜFS ile saflaştırılan enzimin SDS-PAGE bantlarının 60-100 kDa aralığında gözlemlendiği ve molekül ağırlığının bu aralıkta olduğu belirlenmiş olup literatürdeki çalışmalarla paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Native-PAGE yöntemi ile PPO enzimin kontrolü yapılmış ve sonuçlar Gülçin ve arkadaşlarının [34] ısırgan otundan saflaştırdıkları PPO enziminin Native-Page sonuçları ile kıyaslandığında her iki sonucunda benzer oranlarda olduğu tespit edilmiştir.

*Paulownia tomentosa* ağacının meyvesinden izole edilen PPO enziminin substrat seçiciliğini belirlemek için çeşitli substratlar ile kinetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda 4-metil katekol, L-dopa, pirokatekol, pirogallol, guaiakol, gallik asit, L-tirozin ve *o*-dianisidin substratları kullanılmıştır. PPO enziminin monofenolik, difenolik ve trifenolik substratlar ile gerçekleştirilen substrat spesifikliğı denemeleri sonuçlarına göre enzim monofenollere karşı yani gallik asit, L-tirozin, guaiakol ve *o*-dianisidin substratlarından herhangi birine aktivite göstermediğı tespit edilmiştir. *Paulownia tomentosa* PPO enzimi diğere di ve trifenol substratlarına karşı aktive göstermiştir. Enzimin substratlardan 4-metil katekole karşı  $K_m$  ve  $V_{maks}$  2,17 mM ve 0,02 mM/dk değerleri ile en yüksek oranda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Belirlenen sonuçların, Gisela Palma-Orozco ve arkadaşlarının [37] Mango meyvesinden saflaştırdıkları PPO enzimi üzerine yaptığı çalışmalar ile uygunluk gösterdiği görülmüştür. Mango PPO enziminin de sadece di ve trifenollere karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Yi-Ming Tao ve arkadaşlarının [83] Jackfruit adlı meyveden saflaştırılan PPO enzimin substratlar ile olan etkileşiminin sadece di ve trifenoller ile olduğu deneysel olarak ispatlanmıştır. *Paulownia tomentosa* PPO enziminin substrat seçimliliğı sonuçları literatürdeki çalışmalarla benzer olduğu tespit edilmiştir.

Optimum sıcaklık çalışmalarında PPO enziminin, 25-30°C'de en iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir. PPO enziminin optimum sıcaklık çalışmalarında bütün substratlar ile aktivite tayinleri yapılmış ve aktivite gösteren substratların hepsinde enzimin 25°C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Şakiroğlu ve arkadaşları [35] dere otundan saflaştırdıkları PPO enzimi için optimum sıcaklık değerlerinin daha düşük sıcaklıklarda olduğunu tespit etmiştir. Yi-Ming Tao ve arkadaşlarının [83] Jackfruit adlı meyve ile yaptıkları çalışmada, PPO enzimin optimum sıcaklık değerlerinin 30°C olarak belirlemişlerdir. Gülçin ve arkadaşları [34] ısırgan otundan saflaştırdıkları PPO enziminin optimum sıcaklık değerlerinin difenoller ile 25-30°C aralığında olduğunu belirlenmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen sıcaklık sonuçları literatürdeki sonuçlarla benzerlik içerisindedir.

*Paulownia tomentosa* PPO enzimi için yapılan optimum pH çalışmaları, PPO enziminin asidik ve nötral bölgede en iyi aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Enzim, 4-metil katekol ve pirokatekol substratlarıyla pH 4,0 ile pH 7,5 aralığında yüksek aktivite gösterirken, pirogallol ve L-dopa substratlarıyla ise sadece pH 5,0 ile pH 7,5 aralığında yüksek aktivite göstermiştir. Genel olarak enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık çalışmalarında belirlenen değerlerin enzim çeşidine ve substrat çeşidine göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Gisela Palma-Orozco ve arkadaşlarının [37] Mango meyve çeşitlerinden saflaştırdıkları PPO enzimi üzerinde optimum sıcaklık değerlerinin meyve çeşidine göre farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuçlar değerlendirildiğinde genellikle 5,0 ila 7,5 pH aralığında PPO enziminin difenoller ve trifenoller ile yüksek aktivite sahip olduğu tespit edilmiştir.

PPO enziminin değişen sıcaklık koşullarında saklandığında aktivitesinde nasıl bir değişim olacağını belirlemek amacıyla depolanma kararlılığı incelenmiştir. Bunun için enzim oda sıcaklığında, +4°C'de ve -20°C'de depolanmış ve belirli zaman aralıklarında enzim aktivite tayini yapılmıştır. Oda sıcaklığındaki enzimin, 10 saat içinde enzim bağıl aktivitesi %50'ye düşüp 40 saat sonra %5'lik bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. +4°C'deki depolanma kararlılığında ise 90 saat içinde enzimin bağıl aktivitesinde %50 oranında bir azalma olduğu ve 385 saatin sonunda enzimin %6'lik bir aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. -20°C'de ise düzenli bir

düşüş gerçekleşmemektedir. Dört hafta içinde enzimin bağıl aktivitesinde %50 oranında bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Yedi hafta sonra enzimin bağıl aktivitesi %5 olarak ölçülmüştür. *Prunus dulcis* adlı bitkisindeki polifenol oksidaz enziminin oda sıcaklığında 16 saatte, -20°C'de 13 günde aktivitesinin tamamını yitirdiği tespit edilmiştir [74]. Elde edilen sonuçlara göre, *Paulownia tomentosa* PPO enziminin -20°C'de oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir.

*Paulownia tomentosa* PPO enzimi üzerine ayrıca çeşitli metallerin etkisi incelenmiştir. Bunun için 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM oranında hazırlanan metal çözeltileri ile zamana karşı 60 sn boyunca enzim aktivitesi ölçülmüştür. Substrat olarak 10 mM konsantrasyonunda 4-metil katekol kullanılmıştır. *Paulownia tomentosa*'dan elde edilen PPO enziminin metallere karşı özellikle metallerin 1 mM konsantrasyonuna karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Fe<sup>+3</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metal iyonlarının 5 mM düzeyinde reaksiyon ortamında bulduklarında enzimi %85 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Mn<sup>+2</sup> ve Cd<sup>+2</sup> iyonları ise 5 mM düzeyinde reaksiyon ortamında bulduklarında enzimi %35 inhibe ederken, Al<sup>+3</sup> iyonunun ise 5 mM konsantrasyonda enzimi %55 inhibe ettiği bulunmuştur. Pb<sup>+2</sup> metal iyonun 5 mM'lık konsantrasyonun PPO enzimini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. Metal iyonların özellikleri incelendiğinde, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisinin az olduğu görülmüştür. K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının canlı organizmaların hücre yapısında ve diğer çeşitli biyokimyasal faktörlerde önemli rol oynadığından enzim üzerinde etkileri bulunmadığı düşünülmektedir. Diğer test edilen metaller biyolojik sistemlerin temel yapılarında bulunan N, S ve O gibi atomları içeren imidazol, tiyol ve karbonil gibi ligandlarla kolaylıkla etkileşme özelliklerine sahiptirler. Bu nedenden dolayı test edilen metaller enzimin bünyesinde bulunan ligantlarla etkileşerek, enzimin konformasyonunda değişimlere neden olup enzimi değişik oranlarda inhibe etmiş olabilecekleri düşünülmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda metal çözeltilerin etkileri polifenol oksidaz enzimleri üzerinde aktiviteyi arttırdığı yönünde bulgulara da rastlanmaktadır. Gedikli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre [85] lakkaz enzimi üzerine metal iyonlarını (Mn, Pb, Ni, Zn, Co, Cd ve Cu) ihtiva eden kot boyar maddesinin etkisi incelenmiştir. Bu boyar maddedeki metal iyon tuzlarının enzimi aktive ettiğini tespit etmişlerdir. Tao ve

arkadaşları ise [83] yaptıkları çalışmada Jackfruit adlı meyveden saflaştırdıkları PPO enzimi üzerinde 0,1 mM, 1 mM ve 4 mM konsantrasyondaki metal iyonlarının etkisini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak 4 mM konsantrasyonda kullanılan  $Mn^{+2}$  iyonunun PPO enzimin aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Buna karşın  $Zn^{+2}$  iyonun 4 mM'lık konsantrasyonunun PPO enzimini %40 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Palma-Orozco ve arkadaşlarının ise [37] mango meyve çeşitlerinden saflaştırdıkları PPO enzimi üzerinde 0,1 mM, 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlardaki metal iyonlarını test etmişlerdir. Sonuçları,  $K^+$  iyonlarının PPO enzimi üzerindeki etkisinin az olduğunu tespit etmişlerdir. Oysa 0,1 mM konsantrasyonunda kullanılan  $Na^+$  iyonları PPO enzimini %10 oranında inhibe ettiğini belirlemişlerdir.  $Cu^{+2}$  iyonları ise 0,1 mM konsantrasyonda %87 oranında, 2,5 mM konsantrasyonda %67 oranında, 5,0 mM konsantrasyonda %56 oranında ve 10 mM konsantrasyonda %49 oranında PPO enzimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar ile *Paulownia tomentosa* PPO enzimleri yüksek metal konsantrasyonunda inhibe edilmekte ancak 1 mM ve daha düşük metal konsantrasyonlarda aktivitesini korumaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki metal iyonlarının canlılar için toksik olduğu bilindiğinden, metallerin yüksek konsantrasyonlarda enzimlerin çeşitli bölgeleri ile etkileşerek enzimi inhibe ettiği düşünülmektedir.

*Paulownia tomentosa* PPO enzimi için bilinen inhibitör etkilerinin araştırılmasında iki çeşit substrat ile dört farklı inhibitör denenerek toplam 8 farklı inhibisyon denemesi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda inhibitörler içerisinde en etkili inhibitör 0,5 mM'lık  $K_i$  değeriyle yarışmasız olarak L-Sistein inhibitörünün olduğu tespit edilmiştir. Sodyum azid inhibitörünün PPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi çok düşük olarak belirlenmiştir. Palma-Orozco ve arkadaşlarının [37] mango meyve çeşitlerinden saflaştırdıkları PPO enzimi üzerine inhibitör etkisi çalışmalarında, L-sisteinin en etkili inhibitör olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda inhibitör etkilerinin meyve çeşidine göre de farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Şakiroğlu ve arkadaşları [35] dereotundan saflaştırdıkları PPO enzimi üzerine inhibitör çalışmalarında L-sistein'in yarışmasız olarak etkili bir inhibitör olduğunu tespit etmişlerdir. *Paulownia tomentosa* PPO

enzimi için yapılan inhibitör çalışmaları sonuçlarının literatür ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Bilinen inhibitör çalışmalarına ilave olarak *Paulownia tomentosa* PPO enzimi üzerine Kosova'nın Şar Dağları bölgesinde toplanan bitkilerin inhibitör etkileri de ilk defa bu çalışmada incelenmiştir. *Cydonia oblogna* yaprağı, *Punica granatum* meyve kabukları ve *Rosmarinus officinalis* yaprakları Bölüm 3.4.'de bahsedildiği gibi ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra belirli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin inhibitör etkileri PPO üzerinde ve 4-metil katekol substratı varlığında gerçekleştirilmiştir. *Datura stramonium* tohum ve yaprakları, *Solanum nigrum* meyve ve yaprakları, *Verbascum thapsus* çiçekleri, *Tanacetum vulgare* çiçekleri ve *Momordica charantia* meyve kabukları kurutulup soxhlet aparatında ekstraksiyon işlemleri sonucunda belirli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile bunların PPO enzim üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Sonuçlara göre bitkiler arasında *Tanacetum vulgare*'nin çiçek özütünün karışık inhibisyon şeklinde 0,2 mg/ml'lik  $K_i$  değeriyle PPO enzimi için en etkili inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. *Tanacetum vulgare*'nin kurutulmuş çiçek özütünün konsantrasyonu arttırıldıkça karışık inhibisyon şekline uygun olarak  $K_i$  değerinin arttığı ve  $V_{maks}$ 'ın azaldığı belirlenmiştir. *Rosmarinus officinalis*'in kurutulmuş yaprak özütünün enzim üzerinde yarı yarışmalı inhibisyon şeklinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı *Rosmarinus officinalis*'in kurutulmuş yaprak özütü 8,05 mg/ml'lik  $K_i$  değeriyle PPO enzimini en az oranda etkilediği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada diğer bitki özütlerinin inhibisyon etkilerine bakıldığında çoğunun enzim üzerinde karışık inhibisyon şeklinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmelerden birinin biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olması nedeniyle çeşitli reaksiyonlarda kullanılabilecek organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlardan hızlı ve yüksek verimle ürün oluşumuna neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanımları mümkündür. Polifenol oksidazlar özellikle fenollerin oksidasyonu ile ilgili reaksiyonları

katalizleyen enzimler olduklarından, bu açıdan son yıllarda oldukça ilgi görmektedirler. Bu nedenle, polifenol oksidaz enzimleri için yeni kaynak bulunarak saflaştırılması, karakterize edilmesi ve bazı yeni ürünlerin enzimatik sentezi mümkün olabileceği düşünülmektedir. Polifenol oksidaz enzimlerin potansiyel kaynakları bitkiler olup *Paulownia tomentosa* ağacından saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılıp, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceği açısından önem arz etmektedir. Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem insan beslenmesi hemde sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın olumlu sonuçları ile endüstrinin farklı alanlarında enzim kararlılığını ve kullanımını arttırmak için ilk olarak *Paulownia tomentosa* ağacından polifenol oksidaz enzimi, üç fazlı saflaştırma (ÜFS) metodu ile tek basamakta saflaştırılmış olup literatüre yeni PPO kaynağı sağlamış olacaktır. ÜFS metodu diğer çok adımlı, maliyeti yüksek kromatografik saflaştırma tekniklerine kıyasla uygulanması basit, maliyeti düşük, geniş hacimlerde kullanılabilir ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen bir biyoayırım tekniğidir. Bu özellikleri tekniğin daha yaygın olarak diğer enzimlerinde saflaştırılmasına da kullanımını arttırmaktadır.

Sonuç olarak, polifenol oksidaz enzimi *Paulownia tomentosa* ağacından literatürde ilk defa bu çalışmada üçlü faz saflaştırma (ÜFS) metodu ile saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenerek karakterize edilmiştir. Çalışmanın devamında toplanan çeşitli bitki özütlerinin polifenol oksidaz enzimi üzerinde inhibitör etkileri incelenmiştir. Bu olumlu sonuçlar ile hem yeni PPO enzim kaynağı hemde yeni doğal bitkisel kaynaklı PPO inhibitörlerinin literatüre kazandırılması çevre, sağlık ve PPO enziminin endüstriyel uygulamaları açısından önem arz ettiği öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Mdluli, K. M., Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chem.*, 92(2), 311-323, 2005.
- [2] Arslan, O., Doğan, S., Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *J. Sci. Food Agr.*, 85(9), 1499-1504, 2005.
- [3] Quevedo, R., Diaz, O., Ronceros, B., Pedreschi, F., Aguilera, J. M., Description of the kinetic enzymatic browning in banana (*Musa cavendish*) slices using non-uniform color information from digital images. *Food Res. Int.*, 42(9), 1309-1314, 2009.
- [4] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., *Biochemistry*. 5th Ed., W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2002.
- [5] Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., Scrimgeour, K. G., *Principles of Biochemistry*. 2nd Ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA, 1996.
- [6] Eisenthal, R., Danson, M. J., *Enzyme Assays*. 1st Ed., Oxford University Press, New York, USA, 1992.
- [7] Whitford, D., *Proteins: Structure and Function*. 1st Ed., John Wiley Sons Ltd., West Sussex, England, 2005.
- [8] Metzler, D. E., *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. Elsevier Academic Press, 459, USA, 2001.
- [9] Keha, E. E., Kfrevioğlu, . İ., *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, 92-139, Erzurum, 2004.
- [10] Telefoncu, A., *Enzimoloji (Enzimlerin Endstriyel Uygulamaları)*. Ege niversitesi Basımevi, İzmir, 249-307, 1997.



- [11] Kuzmic, P., Cregar, L., Millis, S. Z., Goldman, M., Mixed-type noncompetitive inhibition of anthrax lethal factor protease by aminoglycosides. *The FEBS Journal*, 273, 3054-3062, 2006.
- [12] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Companies, 69, USA, 2003.
- [13] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M., Çeviri Editörü: Nedret Kılıç, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayınevi, 2005.
- [14] Karol, S., Ayvalı, C., Suludere, Z., Hücre Biyolojisi. Dördüncü Baskı. Öğün Matbaacılık, 2000.
- [15] Kutlu, M., Özata, A., Enzimoloji Ders Notları. 1. Baskı, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 15, 2000.
- [16] Copeland, R. A., Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. Wiley-VCH, USA, 281, 2000.
- [17] <http://www.rose-hulman.edu/search.>, Erişim Tarihi: 11.05.2012, Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [18] Wilson, K., Walker, J. Principles and Techniques Biochemistry and Molecular Biology, 7th edition, Cambridge University Press 2010.
- [19] Sanchez-Amat, A., Solano, F., A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic Marine *Alteromonas* sp. Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 240(3), 787-792, 1997.
- [20] Gasparetti C., Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *VTT Science* 16, 18, 2012.
- [21] Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H., Halaban, R., Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(21), 7473-7477, 1987.
- [22] Sugumaran, M., Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis Comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.*, 293(1-2), 4-10, 1991.
- [23] Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke, A., Merk, H., Biomelanin antioxidants in cosmetics: Assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacol. Appl.*, 13, 143-149, 2000.

- [24] Kubo, I., Kinst-Hori, I., 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Med.*, 65(1), 19-22, 1999.
- [25] Mantle, D., Gok, M. A., Lennard, T. W., Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Adverse Drug React. T.*, 20, 89-103, 2001.
- [26] Vamos-Vigyazo, L., Haard, N. F., Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *Crc Cr. Rev. Food Sci.*, 15(1), 49-127, 1981.
- [27] Günendi, G., Polifenoloksidaz enziminin mantardan (*Agaricus bisporus*) izole edilmesi ve mikroenkapsilasyon tekniği ile immobilize edilerek özelliklerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1996.
- [28] Özel, A., *Boletus erythropus* mantarından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve sentetik kimyada katalitik etkinliğinin incelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008.
- [29] Cuff, M. E., Miller, K. I., Van Holde, K. E., Hendrickson, W. A., Crystal structure of a functional unit from *Octopus hemocyanin*<sup>1</sup>. *J. Mol. Biol.*, 278(4), 855-870, 1998.
- [30] Bhattacharya, P. K., *Metal Ions in Biochemistry*. Alpha Science, 190-194, London, 2005.
- [31] Kim, Y. J., Uyama, H., Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(15), 1707-1723. 2005.
- [32] Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H., Inlow, J. K., Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.*, 100(1), 108-123, 2006.
- [33] Marshall, M. R., Kim, J., Wei, C., Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods. *Food Agr. Org.*, 41, 259-312, 2000.
- [34] Gülçin, I., Küfrevioğlu, I., Oktay, M., Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *J. Enzym Inhib. Med. Ch.*, 20(3), 297-302, 2005.

- [35] Şakiroğlu, H., Öztürk, A. E., Pepe A. E., Erat, M., Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from dill (*Anethum graveolens*). J. Enzym Inhib. Med. Ch., 23(3), 380-385, 2008.
- [36] Jang, M. S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., Ohshima, T., Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. LWT-Food Sci. Technol., 35(8), 697-702, 2002.
- [37] Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N. A., Sampedro J. G., Nájera H., Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from Mango (*Mangifera indica* cv. Manila). J. Agr. Food Chem., 62(40), 9832-9840, 2014.
- [38] Xie, L. P., Chen, Q. X., Huang, H., Wang, H. Z., Zhang, R. Q., Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. Biochemistry (Moscow), 68(4), 487-491, 2003.
- [39] Chen, Q. X., Song, K. K., Wang, Q., Huang, H., Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes. J. Enzym Inhib. Med., 18(6), 491-496, 2003.
- [40] <https://www.hobbyseeds.com/paulownia-tomentosa-princess-tree-50.html>, Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [41] Zhu, Z. H., Chao, C. J., Lu, X. Y., Xiong, Y. G., Paulownia in China: Cultivation and utilization by Chinese Academy of Forstry Staff, Asian Network For Biological Sciences And International Development Research Centre, 1986.
- [42] Gilman, E. F., Watson, D. G., *Paulownia tomentosa*, Princess-Tree<sup>1</sup>. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 1-3, 1994.
- [43] Aytekin, T., *Paulownia tomentosa* Steud.'nin invitro doku kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltılması. Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2003.
- [44] Shieh, J. P., Cheng, K. C., Chung, H. H., Kerh, Y. F., Yeh, C. H., Cheng, J. T., Plasma glucose lowering mechanisms of catalpol, an active principle from roots of *Rehmannia glutinosa*, in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Agr. Food Chem., 59(8), 3747-3753, 2011.

- [45] Šmejkal, K., Chudík, S., Klouček, P., Marek, R., Cvacka, J., Urbanová, M., Julínek, O., Kokoška, L., Šlapetová, T., Holubová, P., Zima, A., Dvorska, M., Antibacterial C-Geranylflavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. *J. Nat. Prod.*, 71(4),706-709, 2008.
- [46] Meng, Z. F., Guo, X. F., Zhu, Y., Jing, S. K., Analysis of antioxidant properties and major components of the extract of *Paulownia tomentosa* steud flowers. *Adv. Mat. Res.*, 1010-1012, 164-177, 2014.
- [47] Keun, C. J., Marcus, J. L., Ho, L. K., Wook, K. D., Won, R. H., Joo, Y. H., Hun, P. K., Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*. *Bioorgan. Med. Chem.*, 21, 3051-3057, 2013.
- [48] Khan, S. A., Rajyalakshmi, E., Morphological and anatomical study of *Verbascum thapsus* L., Research and Development Centre, Bharathiar University, Coimbatore, 641 046.
- [49] Ansari, S., Daehler, C. C., Common Mullein (*Verbascum thapsus*): a literature review. Pacific Cooperative Studies Unit, University of Hawaii at Manoa, Department of Botany, 2000.
- [50] Mihailovic, V., Kreft, S., Benkovic, E. T., Ivanovic, N., Stankovic, M. S., Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Ind. Crop. Prod.*, 89, 141-151, 2016.
- [51] [https://en.wikipedia.org/wiki/Verbascum\\_thapsus](https://en.wikipedia.org/wiki/Verbascum_thapsus), Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [52] Weaver, S. E., Warwick, S. L., The Biology of Canadian Weeds: 64. *Datura stramonium* L., *Can. J. Plant Sci.*, 64, 979-991, 1984.
- [53] Sharma, P., Bhardwaj, R., Yadav, A., Sharma, R. A., Study of antioxidant activity of *Datura stramonium* Linn. *Res. J. Phytochem.*, 8(3), 112-118, 2014.
- [54] [https://en.wikipedia.org/wiki/Datura\\_stramonium](https://en.wikipedia.org/wiki/Datura_stramonium), Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [55] Edmonds, J. M., Chiveya, J. A., Black nightshades *Solanum Nigrum* L. and related species. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 1997.

- [56] Schmelzer G. H., Fakim A. G., Medicinal Plants 1, Plant Resources of Tropical Africa 11 (1), 2008, pp. 528
- [57] Kaushik, D., Jogpal, V., Kaushik, P., Lal, S., Saneja, A., Sharma, C., Aneja, K. R., Evaluation of activities of *Solanum nigrum* fruit extract. Archives of Applied Science Research, 1(1), 43-50, 2009.
- [58] Bravo, C., Velilla, S., Bautista, L. M., Peco, B. Effects of great bustard (*Otis tarda*) gut passage on black nightshade (*Solanum nigrum*) seed germination. Cambridge University Press, Seed Sci. Res., 24(3), 265-271, 2014.
- [59] Lim, T. K., Edible Medicinal and Non-Medical Plants. Springer Science Business Media 7, 501-513, 2013.
- [60] Mureşan, M. L., Variability Of Chemical Composition In *Tanacetum Vulgare* L. Essential Oils Over The World. AMT, 20(4), 163, 2015.
- [61] Chapman, D. S., Dytham, C., Oxford, G. S., Landscape and fine-scale movements of a leaf beetle: the importance of boundary behaviour. Oecologia, 154, 55-64, 2007.
- [62] Hendel, N., Larous, L., Belbey, L., Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. Int. Food Res. J., 23(4), 1725-1732, 2016.
- [63] Isabel, B. L., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. Int. J. Mol. Sci., 15, 2014.
- [64] Churchill, J., The Pharmaceutical Journal and Transactions: A Weekly Record of Pharmacy and Allied Sciences. Published by the Pharmaceutical Society of Great Britain. 804–804, 1887.
- [65] Ross, I. A., Medicinal Plants of the World Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. 2nd Ed., 2001.
- [66] <http://www.aboutgardendesign.com/plant-guide/item/cydonia-oblonga>, Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [67] Silva, B. M., Andrade, P. B., Ferreres, F., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira M. A., Composition of quince (*Cydonia Oblongamiller*) seeds: Phenolics, organic acids and free amino acids. Nat. Prod. Res., 19(3), 275-281, 2005.

- [68] Ivan A. Ross, Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses, Medicinal Plants of the World. 1, 337-354, 2003.
- [69] Sathishsekar, D., Subramanian, S., Antioxidant properties of Momordica Charantia (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. Asia Pac. J. Clin. Nutr.;14(2), 153-158, 2005.
- [70] Ivan A. Ross, Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses, Medicinal Plants of the World. 1, 431-444, 2003.
- [71] <https://en.wikipedia.org/wiki/Pomegranate>, Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [72] Cerrahoğlu, E., Arabacı, G., Eflatun çiçekli ballıbabası (*lamium purpureum*) polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve inhibisyonu. Sakarya Üniversitesi, Fen Bil. Der. 20(2), 245-250, 2016.
- [73] Kat, B., Yılmaz Keskin S., Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi. Sakarya Üniversitesi. Fen Bil. Der. 17(2), 291-294, 2013.
- [74] Güngör, K., Çağla badem (*Prunus dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [75] [http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin_6040.pdf)  
[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin_6040.pdf), Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [76] [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/nativepage\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/nativepage_man.pdf), Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- [77] Primavera, A. Products, calendar, map of the Herbs value chain in Dragash (Kosovo). International Link and Services for Local Economic Development Agencies, 2013.
- [78] Büyüktuncel, E., Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242, 2012.
- [79] Oliveria, A., Pereira, J., Andrade, P. P., Seabra, R., Silva, A., Phenolic profile of cydonia oblonga miller leaves. J. Agric. Food Chem., 55, 7926-7930, 2007.
- [80] Boutekedjiret, C., Belabbes, R., Isolation of Rosemary oils by different processes. J. Essent. Oil Res., 16, 195-199, 2004.

- [81] Kabir, F., Tow, W. W., Hamauzu, Y., Katayama, S., Tanaka, S., Nakamura, S., Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products, *Food Chem.* 167, 358–362, 2015.
- [82] Azwanida, N. N., A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, *Med. Aromat. Plants*, 4(3) 2015.
- [83] Tao, Y. M., Yao, L. Y., Qin, Q. Y., Shen, W., Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. *J. Agric. Food Chem.*, 61(51), 12662-12669, 2013.
- [84] Esmaili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., Correlation between polyphenol oxidase (PPO) activity and total phenolic contents in *Crocus sativus* L. corms during dormancy and sprouting stages. *Pharmacogn. Mag.*, 13(3), 519-524, 2017.
- [85] Gedikli, Ş., Aytar, P., Çabuk, A., Ünal, A., Kolankaya, N., Lakkaz Enzimi İle Kot Boyarmaddesinin Dekolorizasyonu, *Anadolu University Journal of Science And Technology Life Sciences And Biotechnology* 1(1), 59-70, 2010.

## ÖZGEÇMİŞ

Cengiz ÇESKO, 10 Mayıs 1983'de Prizren'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Prizren'de tamamladı. 2005-2006 eğitim öğretim yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden yabancı öğrenciler bazında birincilikle mezun oldu. 2008-2009 eğitim öğretim yılında Priştine Üniversitesi Matematik-Fen Bilimleri Fakültesi Organik Kimya Bölümü'nde yüksek lisans yaptı. 2010-2012 yılları Kosova Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığında Kosova Türklerini temsilen Topluluklar Danışma Konseyi üyeliğinde bulunmuştur. Kosova Demokratik Türk Partisi'nde üçüncü dönem yönetim kurulu üyeliğini yürütmektedir. Prizren "Gjon Buzuku" Lisesi'nde 2007 yılından beri Kimya öğretmeni olarak çalışmaktadır. "Ukshin Hoti" Prizren Üniversitesi'nde 2011 yılından bu yana öğretim üyesi olarak çalışmaktadır. Yurtdışında çeşitli konferanslara ve kongrelere konuşmacı olarak katılmış, uluslararası düzeyde gerçekleşen bazı kongrelerde Kongre Başkanlığı görevinde bulunmuş ve Kosova'yı temsilen çeşitli organizasyonlarda yer almıştır. 2011 yılından bu yana Türkiye Mezunları Derneği'nde başkan olarak görevine devam etmektedir. Evli ve iki çocuk babası olan Cengiz Çesko, Arnavutça, Sırpça ve temel düzeyde İngilizce bilmektedir.