

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



**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI  
VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ADEM ERGÜN**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2016**

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



**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ADEM ERGÜN**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Tez Danışmanı)**

**Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU**

**Doç. Dr. Nahit GENÇER**

**Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN**

**Doç. Dr. Baki ÇİÇEK**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

ADEM ERGÜN tarafından hazırlanan "POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24.02.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye  
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU



Üye  
Doç. Dr. Nahit GENCER



Üye  
Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN



Üye  
Doç. Dr. Baki ÇİÇEK



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 110T133 nolu proje ve Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014-096 nolu projeler ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ  
ADEM ERGÜN

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, ŞUBAT - 2016

Polifenol oksidaz enzimi, Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kromotografisi jeli kullanılıp *Musa sapientum var. Cavendishii* (Muz) meyvesinden saflaştırılmıştır. Saflaştırdığımız enzimin aktivitesi üzerinde 44 adet orijinal Flavonoid türevlerinin etkileri araştırılmıştır. 44 maddenin tamamı PPO enzimini inhibe etmiştir. En güçlü inhibitör özelliğini 7-O-sellebiyozil apigenidin ( $[IC_{50}] = 10.7 \mu M$ ,  $K_i = 7.45 \mu M$ ) bileşiği göstermiştir.

Ayrıca, PPO enziminin saflaştırılması için kullanılan Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kromotografisi jeline ilaveten iki yeni afinite kromotografisi jeli sentezlenmiştir. Bu jeller, CNBr ile aktive edilen Sepharose-6B ve Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak anilin bağlandıktan sonra p-aminobenzoik asitin aniline kenetlenmesi sonucu elde edilmiştir. Her iki jellede aynı enzim kaynağı kullanılarak PPO enzimi saflaştırılmıştır. Sepharose-4B ve Sepharose-6B içeren jeller kullanılarak sırasıyla, %7.05 - %4.49 verim ve 105.042 - 33.4 saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. Enzimin saflığı ve molekül ağırlığı, SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Daha sonra 4 adet pestisit, PPO enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve söz konusu enzimi inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Aralarında en güçlü inhibitörün Glifosfat izopropil amin ( $[IC_{50}] = 33.5 \text{ mM}$ ,  $K_i = 20.7 \text{ mM}$ ) olduğu saptanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Polifenol oksidaz (PPO), Flavonoid türevleri, Pestisit, İnhibisyon, Afinite kromotografisi

## ABSTRACT

### PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME AND INVESTIGATION EFFECTS OF SOME COMPOUNDS ON THE ENZYME

PH.D THESIS  
ADEM ERGÜN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
CHEMISTRY  
(SUPERVISOR: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, FEBRUARY 2016

Polyphenol oxidase enzyme was purified from *Musa sapientum* var. *Cavendishii* (banana) by using Sepharose 4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid affinity gel. In this study, 44 original flavonoide derivatives used to investigate their effects on the pure enzyme activity. All of the 44 compounds inhibited the PPO enzyme activity. The most powerful inhibitor is 7-O-cellobiosile apigenidine ( $[IC_{50}] = 10.7 \mu\text{M}$ ,  $K_i = 7.45 \mu\text{M}$ ).

In addition to Sepharose 4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid affinity gel, two novel affinity chromatography gels were synthesized for purifying PPO enzyme. The affinity chromatography gels were synthesized by coupling aniline as a spacer arm to CNBr activated Sepharose-4B and Sepharose-6B. Then, p-amino benzoic acid was coupled to aniline as a ligand. PPO was purified from the same enzyme source by using the gels. 7.05 % – 4.49 % yield and 105.042 – 33.4 fold purification were achieved from the gel contain Sepharose-4B and Sepharose-6B, respectively. Purity and molecular weight of the enzyme were controlled with SDS-PAGE. Then, four pesticides' effects on the pure enzyme activity were investigated. The results showed that all of the pesticides inhibited the enzyme activity. Among the four pesticides that tested, Glyphosate isopropylamine was found to be the most powerful inhibitor with  $[IC_{50}] = 33.5 \text{ mM}$ ,  $K_i = 20.7 \text{ mM}$ .

**KEYWORDS:** Polyphenol oxidase (PPO), pesticides, flavonoide derivatives, inhibition, affinity chromatography

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	xi
SEMBOL LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Polifenol Oksidaz Enzimi (PPO).....	1
1.1.1 PPO Enziminin Katalizlediği Reaksiyon Mekanizmaları.....	3
1.1.2 PPO Enziminin İnhibitörleri ve Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonlarının Önlenmesi.....	4
1.2 PPO Enziminin Saflaştırılması.....	5
1.3 PPO Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	6
1.4 Flavonoidler.....	7
1.4.1 Flavonoidlerin Biyolojik Önemi.....	10
1.5 Pestisitler .....	11
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>12</b>
2.1 Materyaller .....	12
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	12
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	21
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	22
2.2 Yöntemler.....	25
2.2.1 PPO Enziminin Saflaştırılması .....	25
2.2.1.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	25
2.2.1.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme.....	25
2.2.1.3 Diyaliz .....	26
2.2.1.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	26
2.2.1.5 Enzim Çözeltilisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu .....	26
2.2.2 Yeni Afinite Jellerinin Sentezi.....	27
2.2.2.1 Matriksin Aktifleştirilmesi ve Anilin Bağlanması .....	27
2.2.2.2 p-Aminobenzoik Asidin Bağlanması .....	28
2.2.3 SDS-PAGE İle Enzimin Saflığının ve Molekül Ağırlığının..... Kontrolü .....	28
2.2.4 Protein Tayini .....	30
2.2.4.1 Kalitatif Tayin .....	30
2.2.4.2 Kantitatif Tayin .....	30
2.2.5 PPO Enziminin Aktivite Tayini.....	31
2.2.6 PPO Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar .....	31
2.2.6.1 Katekol Substratı için Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ .....	31
Değerlerinin Bulunması.....	31
2.2.6.2 İnhibitörler için $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması .....	32
2.2.6.3 İnhibitörler için $K_i$ Değerlerinin Bulunması.....	32

<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>33</b>
3.1 Muz PPO Enziminin Katekol Substratı için Optimum Şartlarda .....	
$K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	33
3.2 Muz PPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için $IC_{50}$ Değerlerinin ve .....	
$K_i$ Sabitlerinin Bulunması .....	34
3.3 Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan .....	
Standart Eğri .....	85
3.4 Yeni Sentezlenen Afinite Jelleriyle Muz Meyvesinden PPO .....	
Enziminin Saflaştırılması .....	85
3.5 MPPO Enzimi için SDS-PAGE .....	88
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>89</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>96</b>





## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1.1:</b> Polifenol oksidaz'ın üç boyutlu yapısı.....	2
<b>Şekil 1.2:</b> Kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.....	3
<b>Şekil 1.3:</b> Katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.....	3
<b>Şekil 1.4:</b> Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonlar.....	10
<b>Şekil 2.1:</b> Flavonoid C- ve O-glikozitlerin oluşumu ve yapısı.....	13
<b>Şekil 2.2:</b> Apigeninin 7-pozisyonuna bağlanabilen bazı şeker birimleri ve yapıları.....	13
<b>Şekil 2.3:</b> Sepharose 4B, 2B-anilin-p-aminobenzoik asitin son hali.....	28
<b>Şekil 3.1:</b> Muz PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	33
<b>Şekil 3.2:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	35
<b>Şekil 3.3:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	35
<b>Şekil 3.4:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	36
<b>Şekil 3.5:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	36
<b>Şekil 3.6:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	37
<b>Şekil 3.7:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	37
<b>Şekil 3.8:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	38
<b>Şekil 3.9:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	38
<b>Şekil 3.10:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorophenylürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite-[I] grafiği.....	39
<b>Şekil 3.11:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorophenylürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	39
<b>Şekil 3.12:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	40
<b>Şekil 3.13:</b> Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	40
<b>Şekil 3.14:</b> Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	41

<b>Şekil 3.15:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	41
<b>Şekil 3.16:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği .....	42
<b>Şekil 3.17:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin'nin inhibisyon etkisi .....	42
<b>Şekil 3.18:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği... ..	43
<b>Şekil 3.19:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi .....	43
<b>Şekil 3.20:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	44
<b>Şekil 3.21:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-apigenidin'un inhibisyon etkisi.....	44
<b>Şekil 3.22:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite-[I] grafiği.....	45
<b>Şekil 3.23:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi .....	45
<b>Şekil 3.24:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	46
<b>Şekil 3.25:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin'nin inhibisyon etkisi.....	46
<b>Şekil 3.26:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği .....	47
<b>Şekil 3.27:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	47
<b>Şekil 3.28:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği .....	48
<b>Şekil 3.29:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	48
<b>Şekil 3.20:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite-[I] grafiği .....	49
<b>Şekil 3.31:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	49
<b>Şekil 3.32:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-glikozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	50
<b>Şekil 3.33:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-glikozil-apigenidin'in İnhibisyon etkisi.....	50
<b>Şekil 3.34:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-d-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	51

<b>Şekil 3.35:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-d-glikopiranozil-apigenin'nin inhibisyon etkisi.....	51
<b>Şekil 3.36:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-galaktozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	52
<b>Şekil 3.37:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-galaktozil-apigenidin'in inhibisyon etkisi. ....	52
<b>Şekil 3.38:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-d-galaktopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	53
<b>Şekil 3.39:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-d-galaktopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	53
<b>Şekil 3.40:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil )-apigenin için % aktivite – [I] grafiği .....	54
<b>Şekil 3.41:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi .....	54
<b>Şekil 3.42:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil )-naringenin için % aktivite – [I] grafiği .....	55
<b>Şekil 3.43:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil)-naringenin'nin inhibisyon etkisi.....	55
<b>Şekil 3.44:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil) -apigenin için % aktivite-[I] grafiği .....	56
<b>Şekil 3.45:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	56
<b>Şekil 3.46:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-naringenin için % aktivite-[I] grafiği .....	57
<b>Şekil 3.47:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-naringenin'in inhibisyon etkisi.....	57
<b>Şekil 3.48:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0.1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	58
<b>Şekil 3.49:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	58
<b>Şekil 3.50:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	59
<b>Şekil 3.51:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil apigenin'in inhibisyon etkisi.....	59
<b>Şekil 3.52:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Diosmidin için % aktivite – [I] grafiğ...	60
<b>Şekil 3.53:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Diosmidin'in inhibisyon etkisi...	60
<b>Şekil 3.54:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Diosmin için % aktivite – [I] grafiği ...	61
<b>Şekil 3.55:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Diosmin'in inhibisyon etkisi .....	61

<b>Şekil 3.56:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-sellebiyozil apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.....	62
<b>Şekil 3.57:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-sellebiyozil apigenidin'in inhibisyon etkisi.....	62
<b>Şekil 3.58:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-sellebiyozil apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	63
<b>Şekil 3.59:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-sellebiyozil apigenin'in inhibisyon etkisi..	63
<b>Şekil 3.60:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-naringenin için % aktivite – [I] grafiği.....	64
<b>Şekil 3.61:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-naringenin'in inhibisyon etkisi.....	64
<b>Şekil 3.62:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-heptaasetilsellebiozil Apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	65
<b>Şekil 3.63:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-heptaasetilsellebiozil Apigenin'in inhibisyon etkisi.....	65
<b>Şekil 3.64:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 3-O-rutinozil Kuarsetidin için % aktivite – [I] grafiği..	66
<b>Şekil 3.65:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 3-O-rutinozil Kuarsetidin'nin inhibisyon etkisi.....	66
<b>Şekil 3.66:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Rutin için % aktivite – [I] grafiği.....	67
<b>Şekil 3.67:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Rutin'in inhibisyon etkisi.....	67
<b>Şekil 3.68:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Hesperidin için % aktivite – [I] grafiği..	68
<b>Şekil 3.69:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Hesperidin'in inhibisyon etkisi...	68
<b>Şekil 3.70:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil naringenin için % aktivite – [I] grafiği.....	69
<b>Şekil 3.71:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil naringenin'in inhibisyon etkisi.....	69
<b>Şekil 3.72:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	70
<b>Şekil 3.73:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	70
<b>Şekil 3.74:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	71
<b>Şekil 3.75:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin'nin inhibisyon etkisi.....	71
<b>Şekil 3.76:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-Tetraasetil-β-D-galaktopiranozil-4'-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	72

<b>Şekil 3.77:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-Tetraasetil- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-O-(Tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	72
<b>Şekil 3.78:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	73
<b>Şekil 3.79:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	73
<b>Şekil 3.80:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(Heptaasetil- $\beta$ -D-sellobiyozil)-4'-O-(tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	74
<b>Şekil 3.81:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(Heptaasetil- $\beta$ -D-sellobiyozil)-4'-O-(tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	74
<b>Şekil 3.82:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	75
<b>Şekil 3.83:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	75
<b>Şekil 3.84:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	76
<b>Şekil 3.85:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	76
<b>Şekil 3.86:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	77
<b>Şekil 3.87:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	77
<b>Şekil 3.88:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.....	78
<b>Şekil 3.89:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.....	78
<b>Şekil 3.90:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda İmazetapir için % aktivite – [I] grafiği...	79
<b>Şekil 3.91:</b>	Muz PPO enzimi üzerine İmazetapir'in inhibisyon etkisi....	79
<b>Şekil 3.92:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 2,4 dimetilamin için % aktivite-[I] grafiği.....	80
<b>Şekil 3.93:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 2,4 dimetilamin'in inhibisyon etkisi.....	80
<b>Şekil 3.94:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Glyfosfat izopropilamin için % aktivite – [I] grafiği.....	81
<b>Şekil 3.95:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Glyfosfat izopropilamin'in inhibisyon etkisi.....	81
<b>Şekil 3.96:</b>	Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Propamokarb HCl için % aktivite – [I] grafiği.....	82

<b>Şekil 3.97:</b>	Muz PPO enzimi üzerine Propamokarb HCl'in inhibisyon etkisi.....	82
<b>Şekil 3.98:</b>	Bradford yöntemine göre hazırlanan protein standart grafiği.....	85
<b>Şekil 3.99:</b>	Sepharose 6B-anilin- <i>p</i> -amino benzoik asit afinite jeline ait elüatların 280 nm'deki protein absorbanları ve 420 nm'deki aktiviteleri .....	86
<b>Şekil 3.100:</b>	Sepharose 6B-anilin- <i>p</i> -amino benzoik asit afinite jeline ait elüatların 280 nm'deki protein absorbanları ve 420 nm'deki aktiviteleri .....	86
<b>Şekil 3.101:</b>	Sepharose 4B-anilin- <i>p</i> -amino benzoik asit (1) ve Sepharose 6B-anilin- <i>p</i> -amino benzoik asit (2) afinite kromatografisi jelleri ile saflaştırılan MPPO enzimlerinin SDS poliakrilamid jel elektroforezi.....	88



## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1:</b> Flavonoidlerin hetero halkadaki -C <sub>3</sub> - yapısına göre sınıflandırılması.....	9
<b>Tablo 1.2:</b> Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler.....	9
<b>Tablo 2.1:</b> İnhibisyon çalışmalarında kullanılan maddelerin şekilleri.....	14
<b>Tablo 2.2:</b> SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	24
<b>Tablo 3.1:</b> Muz PPO enziminin katekol substrat için K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> değerleri .....	34
<b>Tablo 3.2:</b> Flavonoidler için, Muz PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K <sub>i</sub> , % aktivite grafiklerinden bulunan IC <sub>50</sub> değerleri ve inhibisyon türleri.....	83
<b>Tablo 3.3:</b> Pestisitler için, Muz PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K <sub>i</sub> , % aktivite grafiklerinden bulunan IC <sub>50</sub> değerleri ve inhibisyon türleri.....	84
<b>Tablo 3.4:</b> MPPPO enziminin saflaştırma tablosu .....	87

## SEMBOL LİSTESİ

<b>PPO</b>	: Polifenol oksidaz enzimi
<b>MPPPO</b>	: Muz polifenol oksidaz enzimi
<b>EC</b>	: Enzim kod numarası
<b>U</b>	: Enzim ünitesi
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>TEMED</b>	: N, N, N', N', -tetrametil etilendiamin
<b>CNBr</b>	: Siyanojen Bromür
<b>V<sub>max</sub></b>	: En yüksek reaksiyon hızı
<b>K<sub>m</sub></b>	: V <sub>max</sub> 'ın yarısındaki substrat konsantrasyonu
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
<b>K<sub>i</sub></b>	: İnhibisyon sabiti
<b>PEG</b>	: Polietilen glikol
<b>4-FFÜAd</b>	: 4'-(4-florofenilürenil)-apigenidin
<b>4-FFÜ6HAd</b>	: 4'-(4-florofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin
<b>4-FFÜ7HAd</b>	: 4'-(4-florofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin
<b>4-KFÜAd</b>	: 4'-(4-klorofenilürenil)-apigenidin
<b>4-KFÜ6HAd</b>	: 4'-(4-klorofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin
<b>4-KFÜ7HAd</b>	: 4'-(4-klorofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin
<b>4-NFÜAd</b>	: 4'-(4-nitrofenilürenil)-apigenidin
<b>4-NFÜ6HAd</b>	: 4'-(4-nitrofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin
<b>4-NFÜ7HAd</b>	: 4'-(4-nitrofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin
<b>4-NFTÜAd</b>	: 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-apigenidin
<b>4-NFTÜ6HAd</b>	: 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin
<b>4-NFTÜ7HAd</b>	: 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin
<b>4-KFTÜAd</b>	: 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-apigenidin
<b>4-KFTÜ6HAd</b>	: 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin
<b>4-KFTÜ7HAd</b>	: 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin
<b>7-OGAd</b>	: 7-O-glikozil-apigenidin
<b>7-OβdGPA</b>	: 7-O-β-d-glikopiranozil-apigenin
<b>7-OGaAd</b>	: 7-O-galaktozil-apigenidin
<b>7-OβdGaPA</b>	: 7-O-β-d-galaktopiranozil-apigenin
<b>7-OTAβdGPA</b>	: 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil)-apigenin
<b>7-OTAβdGPN</b>	: 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-glikopiranozil)-naringenin
<b>7-OTAβdGaPA</b>	: 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-apigenin
<b>7-OTAβdGaPN</b>	: 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-naringenin
<b>7-ORAd</b>	: 7-O-rutinozil apigenidin
<b>7-ORA</b>	: 7-O-rutinozil apigenin
<b>Dsd</b>	: Diosmidin
<b>Ds</b>	: Diosmin
<b>7-OSAd</b>	: 7-O-sellebiyozil apigenidin
<b>7-OSA</b>	: 7-O-sellebiyozil apigenin
<b>7-OHβDSN</b>	: 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-naringenin
<b>7-OHASA</b>	: 7-O-heptaasetilsellebiozil Apigenin
<b>3-ORK</b>	: 3-O-rutinozil Kuarsetidin
<b>Rt</b>	: Rutin



<b>Hsd</b>	:	Hesperidin
<b>7-ORTN</b>	:	7-O-rutinozil naringenin
<b>7,4'-dOTA<math>\beta</math>dGA</b>	:	7,4'-di-O-(Tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin
<b>7,4'-dO<math>\beta</math>DGA</b>	:	7,4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin
<b>7-OT<math>\beta</math>DGa4'OTA<math>\beta</math>DGA</b>	:	7-O-Tetraasetil- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-O-(Tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin
<b>7-O<math>\beta</math>D-Ga4'O<math>\beta</math>DGA</b>	:	7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin
<b>7-O<math>\beta</math>DS4'OTA<math>\beta</math>DGA</b>	:	7-O-(Heptaasetil- $\beta$ -D-sellobiyozil)-4'-O-(tetraasetil- $\beta$ -D-glikopiranozil)-apigenin
<b>7-O<math>\beta</math>DS4'O<math>\beta</math>DGA</b>	:	7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin
<b>7-O<math>\beta</math>DGa4'O<math>\beta</math>DGA<sub>d</sub></b>	:	7-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenidin
<b>7,4'- O<math>\beta</math>DGA</b>	:	7,4'-di-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenin
<b>7-O<math>\beta</math>DS4'O<math>\beta</math>DGA<sub>d</sub></b>	:	7-O- $\beta$ -D-sellobiyozil-4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-apigenidin
<b>Imzpr</b>	:	Imzetapir
<b>2,4-DMA</b>	:	2,4-D dimetilamin
<b>GFIPA</b>	:	Glyfosfat izopropillamin
<b>PP-HCl</b>	:	Propamokarb HCl

## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın tamamlanmasında ve doktora süresince bana yol gösteren, tecrübelerinden faydalandığım ve her zaman yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Oktay Arslan'a saygılarımı arz ederim.

Çalışmalarında her zaman yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Nahit Gençer ve Yrd. Doç. Dr. Dudu Demir'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez süresince vermiş olduğu katkılar için, Prof. Dr. Mustafa Küçükislamoğlu ve Doç. Dr. Mahmut Erzengin'e teşekkür ederim.

İnhibisyon çalışmalarında kullandığım maddelerin sentezini yapan, Prof. Dr. Mustafa Küçükislamoğlu, Prof. Dr. Mustafa Arslan ve ekibine şükranlarımı sunarım.

# 1. GİRİŞ

Önerilen tez kapsamında, ilk defa Erzenin ve arkadaşları tarafından sentezlenen afinite jeli ile Musaceae (muz) meyvesinden PPO enziminin saflaştırılıp, orijinal olarak sentezlenen bazı flavonoid türevlerinin ve pestisitlerin söz konusu enzim üzerindeki etkileri araştırılmıştır [1]. Ayrıca, bu enzimin saflaştırılması için mevcut afinite jellerinden farklı jeller de sentezlenmiştir. Daha sonra bu jellerin PPO enzimini saflaştırabilme kapasiteleri araştırılmıştır.

## 1.1 Polifenol Oksidaz Enzimi (PPO)

PPO enzimi, oksidoredüktaz sınıfına giren ve aktif bölgesinde bakır içeren bir metalo enzimdir. Bu enzim, oksijen varlığında monofenolik bileşenlerin o-difenollere hidroksilasyonu ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu sağlayan reaksiyonları katalizler. Bu iki reaksiyon sonucu oluşan maddeler kahverengi, siyah veya kırmızı pigmentler oluşturur [2,3].

Enzim isimlerindeki karışıklığı önlemek için bitki polifenol oksidaz enzimlerinin adlandırılmasında değişiklikler olmuştur. Tirozinaz (monofenol mono oksijenaz) EC.1.14.18.1, katekol oksidaz (katekolaz, difenoloksidaz) EC.1.10.3.2, lakkaz ise EC.1.10.3.1 enzim kodlarıyla gösterilmişlerdir [4].

Bazı kaynaklarda Lakkaz enziminin de PPO enziminin bir sınıfı olduğu belirtilmiştir. Lakkaz, metoksi ile yer değiştirmiş polifenoller ve aromatik diaminler gibi bir çok bileşiğin oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Ancak tirozinazın okside ettiği tirozini oksitleyemez [5].

İlk olarak 1856 yılında yemeklik mantarlarda bulunan PPO enzimi, doğada yaygın olarak bulunur [6]. Bitkiler aleminde, kabuklu deniz hayvanlarında ve bazı hayvansal organlarda bulunan bir enzimdir [7]. Bitkinin türüne ve yetiştiriliş biçimine göre PPO içerikleri değişik olabilir. Meyve ve sebzelerin olgunluklarına göre de bu enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi farklılık gösterebilir. Meyve ve

sebzelerde hatta kabuklu deniz ürünlerinde mekanik işlemlerden sonra “esmerleşme” denilen renk değişimleri olabilir. Bu renk değişimleri belirli bir noktadan sonra istenilen noktada durdurulamaz ve rengiyle birlikte tadını ve kalesini de bozar. Bu istenmeyen reaksiyonların önüne geçebilmek için PPO enziminin inhibe edilerek aktivitesinin sınırlandırılması veya tamamen durdurulması gerekmektedir. Bunun için de PPO enziminin kinetik özelliklerinin vs. çok iyi bilinmesi gerekir [8-11]. Bu özellikleri belirleyebilmek için; mantar, muz, çay, muşmula, enginar, ananas, Napoleon üzümü, patlıcan, elma, tütün, şeftali, patetes, vanilya tohumu, yeşil fasulye, dut, armut, elma, domates, kiraz, kaju fıstığı, enginar, brokoli, göbek marul, nane, kayısı gibi çeşitli kaynaklardan PPO enzimi saflaştırılmıştır [1-3,6-23]. PPO enziminin moleküler yapısı enzimin kaynağına göre, sayısı ise enzim kaynağına ve saflaştırmada uygulanan metotlara göre değişiklikler gösterebilir [24].

PPO enzimini ihtiva eden kaynaklar çeşitli fenolik bileşiklere sahiptir. Ancak bu bileşiklerin birçoğu söz konusu enzimin substratı değildir [25-33]. PPO enziminin meyve ve sebzelerde bulunan en önemli substratları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenil alenin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozin gibi flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerin en yaygın doğal substratı da klorojenik asittir [34,35].



**Şekil 1.1:** Polifenol oksidaz'ın üç boyutlu yapısı [36].



### 1.1.2 PPO Enziminin İnhibitörleri ve Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonlarının Önlenmesi

Meyvelerde, sebzelerde ve bazı deniz ürünlerinde mekanik zedelenmeler sonucu “esmerleşme” denilen bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. PPO enzimi, ortamda bulunan fenolik bileşikleri kinonlara oksitleyerek bunların polimerizasyonu ile esmerleşmeyi gerçekleştiren kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır [39]. Endüstriyel amaçla kullanılan bu ürünlerin hazırlanmaları sırasında ortaya çıkan bu tür reaksiyonlar kaliteyi düşürür ve bu ürünlerin ekonomik değerini de azaltır [40].

Normal şartlarda PPO enzimi hücrede oksijensiz bir ortamdadır. Fakat bu ürünler zedelenğinde enzim oksijenle temas edeceği için hemen aktivite gösterir ve esmerleşme reaksiyonları başlamış olur [41-42]. Esmerleşme reaksiyonlarının gerçekleşebilmesi için PPO enzimi, substratları ve moleküler oksijenin bir arada olmaları gerekir. Bu üçünden birinin ortadan kaldırılması ile reaksiyon durdurulur veya azaltılır. Enzim aktivitesine etki eden parametrelerin de, sıcaklık ve pH gibi, optimum düzeylerde olmaları gerekir. Optimum şartlarda da bir değişiklik olursa, ortamın pH'ının düşürülmesi gibi, reaksiyon engellenebilir [40].

Bir enzimin aktivitesinin azaltılması veya tamamen durdurulması olayına “inhibisyon”, buna neden olan maddelere de “inhibitör” denir. PPO enziminin birçok inhibitörü bilinmektedir. Bu inhibitörler kullanılarak ürünlerin raf ömürleri daha da uzatılmış olur. Bu amaçla kullanılan inhibitörler insan sağlığına zararlı olmamalı ve besinlerin kalitesine etki etmemelidir [43]. Sülfidler iyi birer PPO inhibitörü olmalarına rağmen insan sağlığı üzerindeki negatif etkilerinden dolayı kullanılmalarına izin verilmez [44]. PPO enziminin önemli inhibitörlerinden biri sisteindir. Sistein, PPO enziminin inhibisyonunu, enzim aktivitesi sonucu oluşan o-kinonları ilgili fenollere dönüştürerek gerçekleştirmiş olur [45,46]. PPO enzimi, aktif bölgesinde bakır içeren bir metaloenzim olduğundan siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metallerle kolayca bağ yapabilen reaktiflerle de inhibe edilebilir [47]. Kompferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavonoidler potansiyel birer PPO enzimi inhibitörleridir [48-51].

Sentetik olarak imal edilen çeşitli inhibitörler de mevcuttur. Bunlar maddelerden bazıları; antidepresif ilaç olarak kullanılabilmektedir [(2S)-1-(3-merkaptio-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olarak kullanılan methimazol (1-metil-2-merkaptioimidazol)'dür [52,53]. Gelişim ve stres tepkileri de dahil olmak üzere bitkilerde önemli fizyolojik işlevlere sahip olan Serotonin (5-hidroksitriptamin) askorbik asit ile kıyaslandığında esmerleşmenin önlenmesinde önemli ölçüde etkilidir. PPO enziminin kinetik parametreleri incelendiğinde unkompatatif inhibitörü olduğu anlaşılmıştır [54]. 2-4 °C' de saf CO<sub>2</sub>'in taze kesilmiş dulavrat otu ile muamele edildiğinde esmerleşmenin engellendiği ve raf ömrünü uzadığı gözlemlenmiştir [55]. Yağlı ve yağsız pirinç kepeği ekstraktlarının patates ve elmadaki enzimatik esmerleşmeyi inhibe etme kapasiteleri kıyaslandığında yağlı pirinç kepeği ekstraktının daha etkili olduğu görülmüştür. Pirinç ekstraktlarındaki beş fenolik bileşik (protokateşuik asit, vanilik asit, p-kumarik asit, ferulik ve sinapik asit) HPLC ile tespit edilmiş ve yağlı pirinç kepeği ekstraktında ferulik asitin, yağsız pirinç kepeği ekstraktında ise p-kumarik asitin daha etkin inhibisyon özelliği gösterdikleri saptanmıştır [56]. Na<sub>8</sub>SiW<sub>11</sub>CoO<sub>40</sub> gibi polioksometalalar da tirozinaz aktivitesini kontrol etmek için kullanılabilir [57]. Fattouch ve arkadaşları, benomyl, carbaryl, deltamethrine ve parathion methylin gibi bazı pestisitlerin yüksek konsantrasyonlarda (8-12 µM) PPO enzimini inhibe ettiğini saptamıştır [58].

## 1.2 PPO Enziminin Saflaştırılması

Enzim kaynağı olarak bitkiler kullanılacağı zaman, homojenizasyon sırasında dokulara hasar geleceğinden, fenolik bileşiklerin de PPO enziminin aktivite göstermesiyle yükseltgenmeleri sonucu ortaya istenmeyen kinon bileşikleri çıkacağı için enzim aktivitesinin durdurulabilmesi için sıvı azot ortamında bu homojenizasyonun yapılması daha sağlıklı olacaktır [59,60]. Saflaştırmada kullanılacak tampon çözeltilerin pH'ı da oldukça önemlidir. Bazen homojenizasyon çözeltilisine enzim aktivitesinin bir müddet durdurulması için sodyum azid, askorbik asit, glutatyon, ditiyotreitol, sistein, sodyum metabisülfid veya tiyoüre gibi çeşitli indirgen reaktifler veya inhibitörleri eklenebilir [61].

Homojenizasyon işleminden sonra elde edilen ekstraktan PPO enziminin saflaştırılması için, amonyum sülfat çöktürmesi, homojenizasyon sırasında eklenen askorbik asit gibi küçük moleküllerin uzaklaştırılması için diyaliz işlemi daha sonrasında ise iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi veya afinite kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılır [62]. Afinite kromatografisi biyolojik moleküllerin saflaştırılması için güçlü bir tekniktir. Lerman, 1953 yılında selülöze mantar PPO enzimini bağlayarak bunun benzoik asit türevi inhibitörler ve fenolik maddeler için önemli bir afinite absorbanı olduğunu göstermiştir [63]. 1973 yılında ise Gutteridge ve Robb 4-amino benzoat'ı Sepharose-4B'ye bağlayarak PPO enziminin saflaştırılmasında kullanışlı olduğunu göstermiştir [64]. Yine 1973 yılında O'Neill ve arkadaşları Sepharose-4B'ye benzoil grublarını bağlayarak afinite jelleri hazırlamış ve PPO enzimine spesifik olduğunu kanıtlamıştır. Ancak kolonların kendiliğinden okside olmalarından dolayı tekrar tekrar saflaştırma işleminde kullanılamamıştır [65]. 1992 yılında Pathak ve arkadaşları afinite kromatografisi üzerine araştırmalar yapmıştır. Bunun için CNBr ya da divinilsülfon (DVS) ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye çeşitli uzantı kolları, bunlara da ligand olarak p-aminobenzoik asit bağlayarak afinite kolonları sentezlemiş ve oluşturulan afinite jellerinin PPO enzimine ilgilerinin yüksek olduğunu saptamıştır. [66]. 2004 yılında ise Arslan ve arkadaşları CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin, uzantı koluna da p-aminobenzoik asidi bağlayarak Sepharose-4B-L-tirosin-p-aminobenzoik afinite jelini sentezlemiştir. Bu jel ile de dut meyvesinden tek adımda 74 kat saflaştırma yapılmıştır [1]. 2012 yılında da Sepharose-4B-L-tirosin-m-aminobenzoik afinite jeli Demir tarafından sentezlenmiş ve kolondan % 6.13 verim ve 73.91 saflaştırma derecesi ile Muz PPO enzimi saflaştırılmıştır [67].

### **1.3 PPO Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi**

Enzim aktivitesi, birim zamanda substrat miktarındaki azalma veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Eğer analitik şartlar ürün oluşumunu ölçmeye imkan veriyorsa bu yolu seçmek daha sağlıklıdır. Çünkü başlangıçta hiç ürün olmadığı için onun miktarının belirlenmesi daha kesin veriler sunar. PPO enzimi katalizlediği reaksiyonlarda kısa zamanda o-dihidroksi fenollerin



oksidasyonunu yavaşlattığından dolayı reaksiyonun başlangıçtaki hızını ölçerken dikkatli olmak gerekir [68].

Esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşan kinonlar görünür bölgede absorbanans verdikleri için spektrofotometrede ölçümler yapılabilir [69]. Aktivite ölçümleri esnasında PPO'nun reaksiyon inaktivasyonunu ötelemek için kinonları indirgeyen hidrokinon, negative indirgenme-yükseltgenme kapasitesi olan askorbik asit gibi bileşikler kullanılır [70]. Askorbik asit konsantrasyonunun azalmasıdaki hızı ve PPO enziminin aktivitesi arasında bir orantı vardır. Reaksiyon hızını belirleyen basamak kinon↔substrat geçiştir. Askorbik asidin yükseltgenmesi sınıçları da etkiler. Bir diğeryöntem ise, reaksiyon ortamındaki askorbik asidin tamamen tükenmesi için geçen süreyi ölçmek yerine, oluşan ürünlerin absorbananslarının ölçülmesidir.  $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$  420 nm'de absorbanans verir ve askorbik asit yerine kullanılabilir. Böylece askorbik asidin ortamada bulunması veya 265 nm'de absorbanans veren diğeryöntemler ölçümlere etki etmez. Bu yöntemin bir diğeryöntem ise ferrosiyanyürün asidik bölgede pH değışimlerine karşı askorbik aside göre daha az hassas olması ve çözeltide içerisinde daha kararlı olmasıdır [71]. Reaksiyon aktivasyonunun durdurulmasını engellemek için bazı prosedürler oluşturulmuştur. Bu prosedürler reaksiyon ortamından kinonların uzaklaştırılması prensibine dayanır. 3-metil-2-benzotiyazolon hidrazon hidroklorik kinonlarla kondansasyon ürünleri oluşturur. Daha sonar bu ürünler reaksiyon ortamından kloroform fazına alınır ve bu organik fazın absorbsiyonu 500 nm'de okunur [72]. Diğeryöntem göre her bir tiyol molekülü için bir mol kinon tüketen ve renksiz bileşikler oluşturan sarı bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit anyonu kullanılır. Enzim aktivitesi sarı bileşiğın 412 nm'deki absorbanansındaki azalmasıın spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle takip edilir [73].

#### **1.4 Flavonoidler**

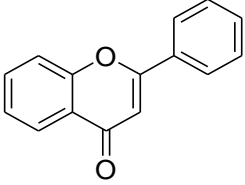
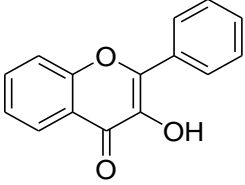
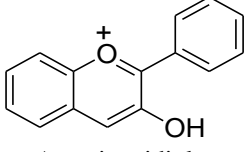
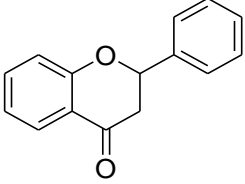
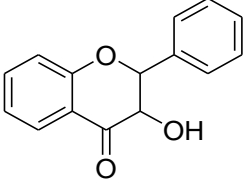
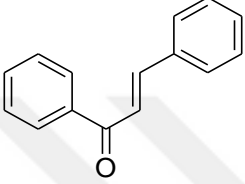
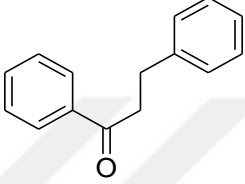
Flavonoidler çoğı bitkinin tohum, yaprak, meyve ve çiçeklerinde yoğun olarak bulunan doğal bileşiklerdir. Flavonoidlerin hidroksil radikallerini, süperoksit anyonlarını ve lipit peroksi radikallerini yakaladığı, bu yüzden de çok iyi bir antioksidant olduğı çeşitli araştırmalar sonunda tespit edilmiştir [74]. İki fenil ve bir heterohalkadan oluşan bu bileşikler, hetero halkanın farklı yükseltgenme derecelerine

göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller, kalkonlar, dihidrokalkonlar, antosiyanidinler gibi çeşitli alt sınıflara ayrılmıştır [75]. Flavonoid glikozitleride benzer olarak bitki aleminde yaygın olarak bulunan [75], antioksidant [76], hepatoprotektant [77], UV-ışığa karşı koruyucu [78], antibakteriyel ve antikanserojen [79] gibi çok farklı biyolojik etkiye sahip bileşiklerdir. Bitkilerde yaygın olarak bulunmakla birlikte, miktarlarının az oluşu ve önemli farmakolojik aktivitelere sahip olmaları, araştırmacıları bu bileşiklerin izolasyonu ve sentezine yöneltmiştir. Flavon ve flavonol glikozitlerden 1975 yılında sadece 360 tanesinin yapısı bilinirken, takip eden beş yıl boyunca bu sayı ikiye katlanarak 720 yapıyı bulmuştur. 1981-1985 yılları arasında da 90 tane daha yeni flavon glikozit bileşiği keşfedilmiştir [80]. Günümüze kadar dört binden fazla flavonoid ve flavonoid glikozit türevlerinin bitkilerden izole edildiği bilinmektedir [81]. Apigenidinler, flavonoid grubunun büyük bir kısmını oluşturan antosiyaninlerin alt türüdür. Bu maddeler genellikle çiçekler, meyveler ve kapalı tohumluların yapraklarında pembeden kırmızıya vemordan laciverte siyanik renk dizilişinden sorumludur [82].

Flavonoidler bitkilerden izole edilen bileşikler olup doğada yaygın olarak bulunurlar. Genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek ve yapraklarda rastlanır. Geleneksel tıpta son yirmi yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve yapılan araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Son yıllarda flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması için yürütülen araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidant özellikleri, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metallerle bileşik oluşturma ve tabaklama maddelerinin bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalurji, tıp, ziraat ve benzer alanlarda kullanılma olasılıkları artmaktadır [83].

Tübitak projesi kapsamında, Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Laboratuvarı'nda Arslan, Küçükislamoğlu ve ark. tarafından flavonoid türevleri sentezlenmiştir. İlk olarak, naringenin bileşiğinin 7 konumundaki -OH grubuna D-şeker grubunun bağlanıp, daha sonrada, bu bileşiklerin apigenine okside edilmesi ve apigenidine indirgenerek glikozil-apigenidin türevleri elde edilmiştir [84].

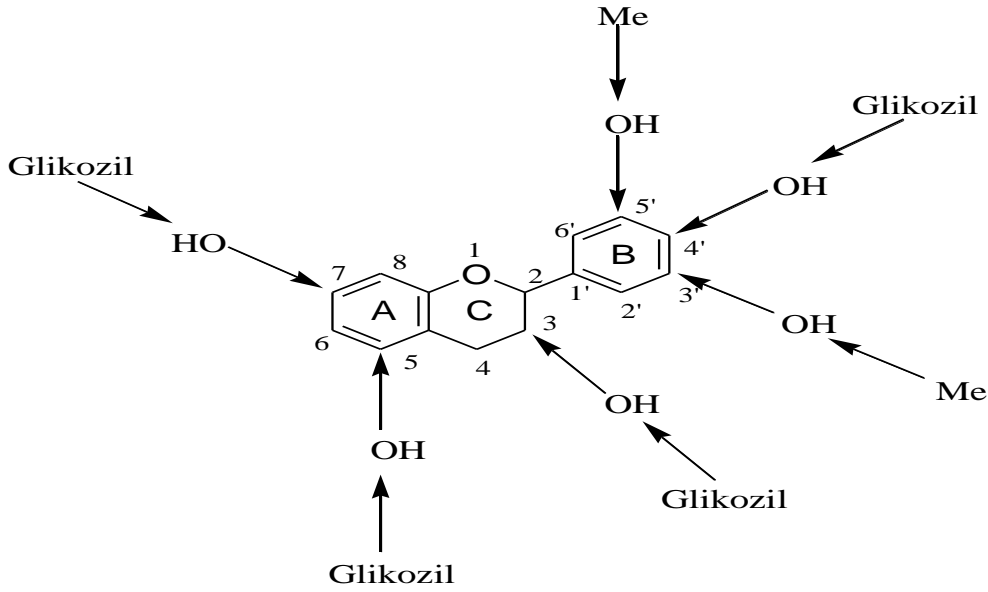
**Tablo 1.1:** Flavonoidlerin hetero halkadaki -C<sub>3</sub>- yapısına göre sınıflandırılması [84].

 <p>Flavonlar</p>	 <p>Flavonoller</p>	 <p>Antosiyanidinler</p>
 <p>Flavanonlar</p>	 <p>Flavanonoller</p>	
 <p>Kalkonlar</p>	 <p>Dihidrochalkonlar</p>	

**Tablo 1.2:** Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler [84].

<b>Flavonlar</b>	<b>Flavonoller</b>	<b>Flavanonlar</b>
Chrysin	Quercetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Naringin
Luteolin	Kaempferol	Hesperidin
	Rhamnetin	Eriodiktol
<b>Flavanoller</b>	<b>Flavanonoller</b>	<b>Antosiyanidinler</b>
Catechin	Taksifolin	Apigenidin
Epicatechin	Slibin	Cyanidin

Flavonoidlerin yapı çeşitliliği, yalnız difenil propan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenme özelliği ile sınırlı değildir. Aynı zamanda, her sınıf içinde, aromatik halkalara bağlı sübstituentlerin sayısı, türü ve pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine neden olan faktörlerdir. Flavonoid yapılarında fonksiyonel grupların en yaygın pozisyonları Şekil 1.4’de verilmiştir [74].



**Şekil 1.4:** Flavonoid yapılarında fonksiyonel grupların en yaygın pozisyonları [84].

#### 1.4.1 Flavonoidlerin Biyolojik Önemi

1940'lı yıllardan sonra, flavonoidlerin önemli bir kısmını oluşturan apigenidin türevlerinin biyolojik aktiviteye sahip olduklarının anlaşılmasından dolayı flavonoidlere karşı ilgi artmıştır. Bu ilginin nedenlerinden biri 1936 yılında limon kabuğundaki flavonoidli bir preparatın eldesi ve bunun P-vitamin aktivitesi göstermesidir [74].

Flavonoid üzerine yapılan araştırmaların en yoğunlaştığı alan insan sağlığı üzerine sağladığı faydalardır. Flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antioksidant, antimikrobiyal, antibakteriyal ve antikanserojenik etkileri de başka araştırmacılar tarafından bulunmuştur [85-87].

Flavonoidlerin ilk tespit edilen biyolojik özelliği kılcal damarlarda kan sızdırmanın önlenmesi, kırılgnalık ve geçirgenliğin ortadan kaldırılması gibi pozitif etkileridir. Bu etkilerin yanısıra kuersetin, rutin ve bazı flavonollerin zayıf kalp kuvvetlendirici ve nabzı normalleştirici özellikleri de mevcuttur. Karaciğer fonksiyonuna olumlu etkileri flavonoidlerin en önemli özelliklerinden biridir. Safra salgısının artmasını hızlandırmada, karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etkili olduğu tespit edilmiştir [74].

Bitkilere renk verme, UV ışınlarından koruma gibi etkilere de sahip olduğu tespit edilen bu maddeler kozmetik ürünlerde özellikle koruyucu kremlerde önemli bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [88]. Bahsi geçen etkilerinin dışında flavonoidler, bitkilerde enerjinin dönüşümüne, büyüme hormonlarına da etki ederler. Ayrıca, solunum ve fotosentezi düzenlemede ve bulaşıcı hastalıklara karşı direncin artırılmasında da önemli etkileri vardır [89].

## 1.5 Pestisitler

Pestisit terimi kısaca, pest (haşarat) adı verilen zararlıları öldürmek amacı ile kullanılan madde anlamına gelir. İnsan, hayvan ve bitki üzerinde, çevresinde bulunan veya yaşayan, ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerini azaltan, hasara uğratan zararlıları öldürmek için kullanılan kimyasallardır. Bu zararlılar, çeşitli hastalıkları taşıyan parazitler, tarım ve bitki zararlısı böcekler, yabancı ot ve mantarlar, insan, hayvan, çevre ve barınaklardaki sinek, bit, pire, kene, uyuz, hamam böceği gibi uçan ve yürüyen canlılardır [90, 91].

Pestisitler tarım ilacı olarak kullanılır. 2005 yılında 1979 yılına göre yaklaşık %49'luk bir artış olmuştur. Buna rağmen ülkemizdeki kullanımı gelişmiş ülkelere göre çok daha düşüktür. Ancak, Akdeniz ve Ege gibi entansif tarım yapılan bölgelerdeki pestisit kullanımı Türkiye ortalamasının çok üzerindedir [92].

Pestisitlerin aşırı ve yanlış uygulamalarından en fazla etkilenenler zirai ilaçlama yapan kişilerdir. Yapılan araştırmalar zirai ilaçlama yapan kişilerin kanlarında pestisit kalıntılarının saptandığına ve bu kişilerin kanlarındaki enzimlerinin ve organlarının olumsuz etkilendiğine dikkat çekmektedir. Özellikle paraoksonaz (PON) enzimi insektisit ve sinir gazı yapımında yaygın olarak kullanılan organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemekte önemli bir enzim olduğu için bu enzimdeki değişiklikler kişilerin pestisitlerden ne kadar etkilendiğinin belirlenmesinde önemli bir ölçüttür[93,94].

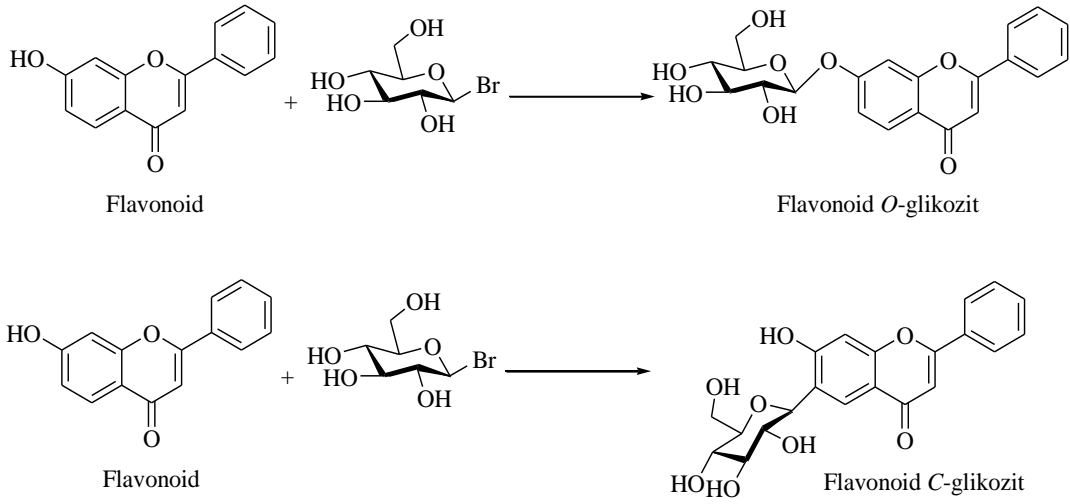
## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

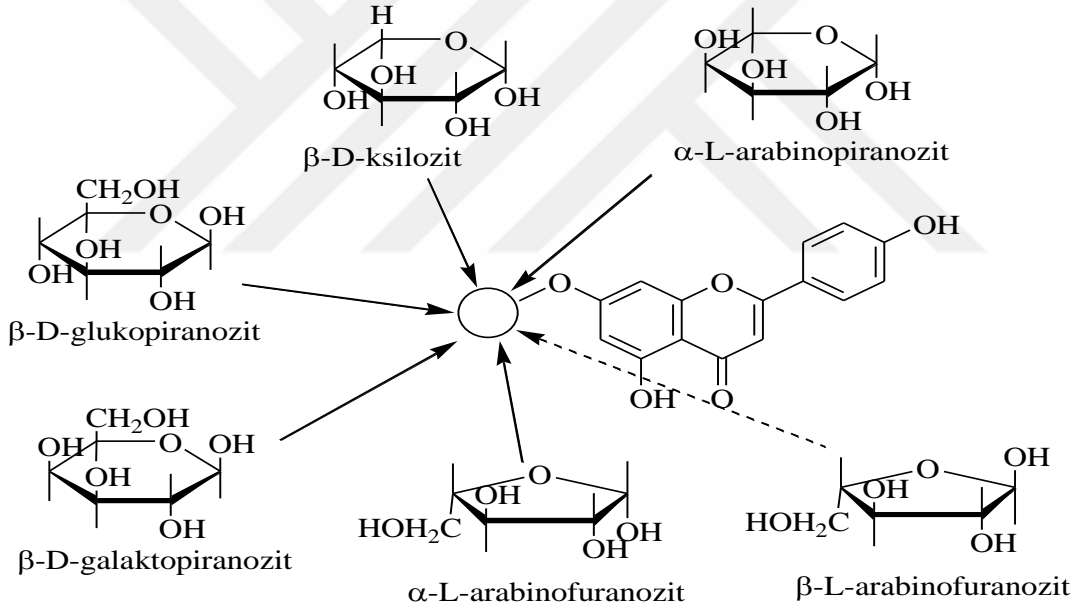
#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda, Sepharose-4B, Sepharose-6B, p-aminobenzoik asit, anilin, standart sığır serum albümin, N,N,N,N' tetrametiletilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, trikloro asetik asit (TCA), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum karbonat, sodyum sitrat, trihidroksimetil aminometan (Tris), siyanojen bromür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum bikarbonat, askorbik asit, polietilen glikol (PEG) ve katekol kullanılmıştır. Bu kimyasallar Merck veya Sigma'dan; akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, SDS, bromtimol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue da R-250 Fine Chemical'dan temin edilmiştir.

PPO enzimi üzerindeki etkileri araştırılan organik bileşikler Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Laboratuvarları'nda, Arslan, Küçükislamoğlu ve ark. tarafından sentezlenen orijinal flavonoid türevleridir. Bu maddelerin sentezleri örnek olarak Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir [84]. Ayrıca yine bu çalışmada kullanılan pestisitler ticari olarak satın alınmıştır. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan tüm bileşiklerin şekilleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1:** Flavonoid C- ve O-glikozitlerin oluşumu ve yapısı [84].



**Şekil 2.2:** Apigeninin 7-pozisyonuna bağlanabilen bazı şeker birimleri ve yapıları [84].

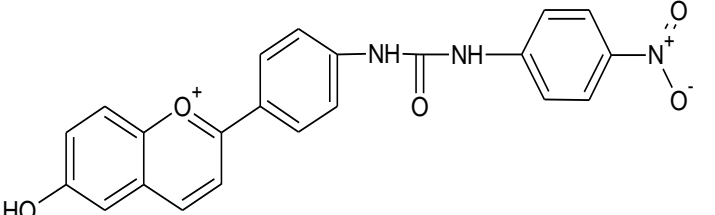
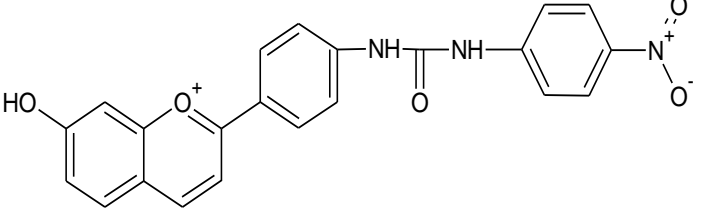
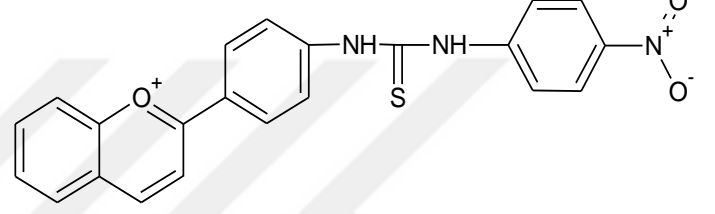
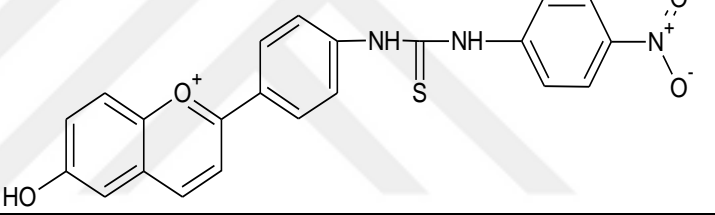
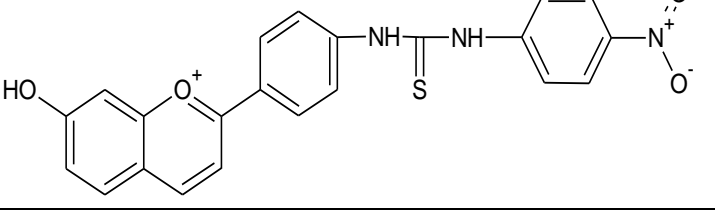
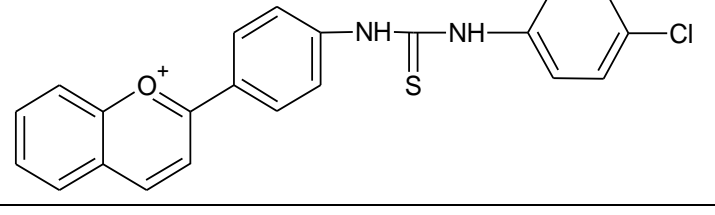
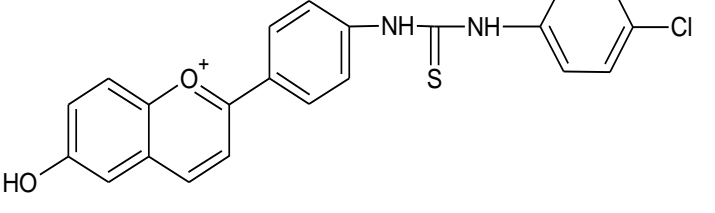
Apigenidin glikozitler, yapılarında bulunan şekerlerin yarı asetal hidroksil grubunun konfigürasyonuna bağlı olarak  $\alpha$ - veya  $\beta$ - glikozitler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Örneğin, kuersetinin, L-arabinofuranozitin farklı anomerleri ile oluşturduğu glikozitler, kuersetin 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranozit ve kuersetin 3-O- $\beta$ -L-arabinofuranozit olarak gösterilebilir [74].

**Tablo 2.1:** İnhibisyon çalışmalarında kullanılan maddelerin şekilleri.

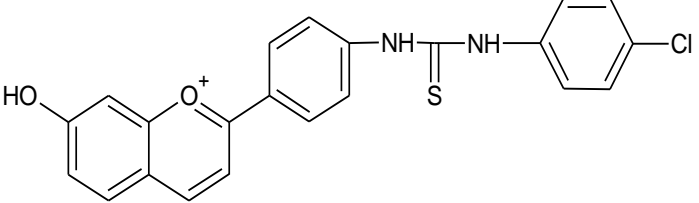
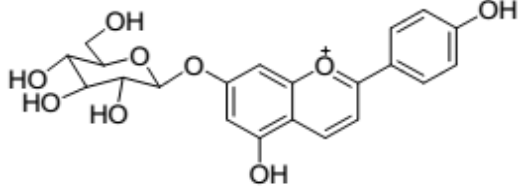
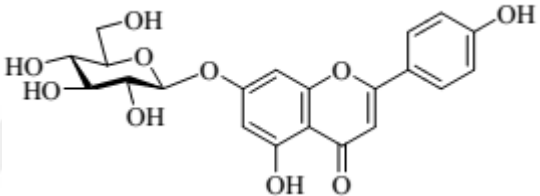
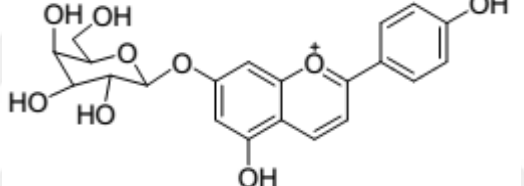
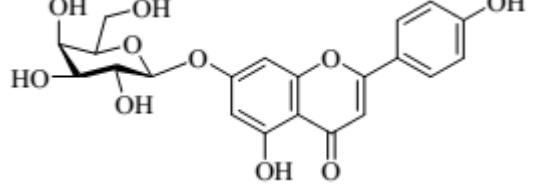
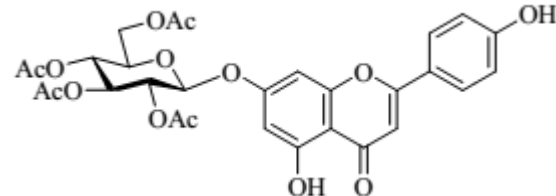
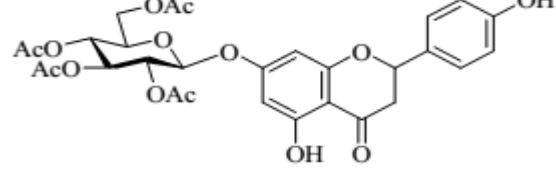
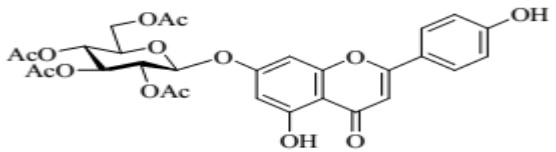
Kod	Şekil
4-FFÜAd	
4-FFÜ6HAd	
4-FFÜ7HAd	
4-KFÜAd	
4-KFÜ6HAd	
4-KFÜ7HAd	
4-NFÜAd	



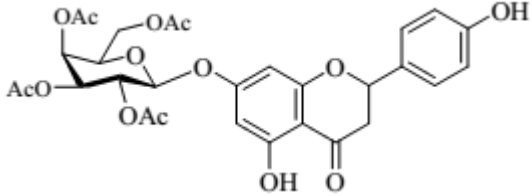
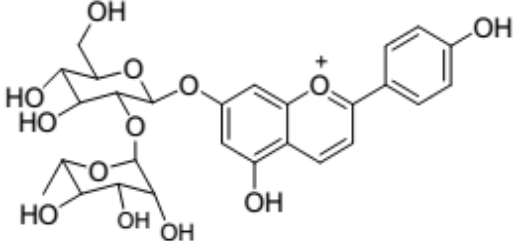
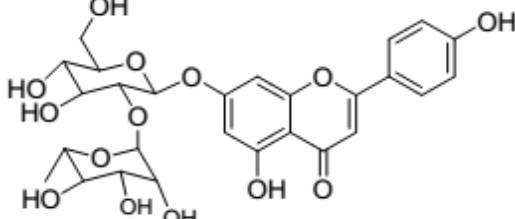
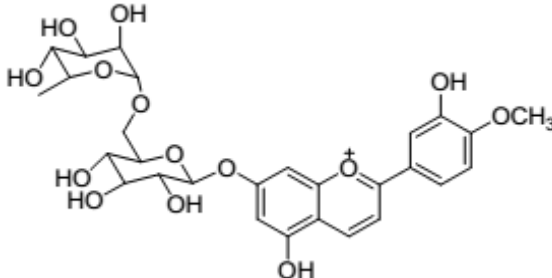
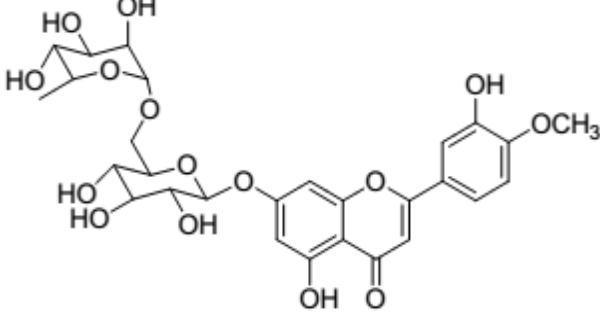
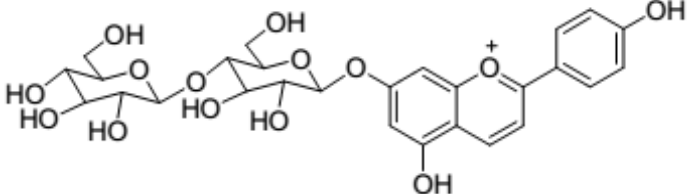
**Tablo 2.1** (devamı).

<b>4-NFÜ6HAd</b>	
<b>4-NFÜ7HAd</b>	
<b>4-NFTÜAd</b>	
<b>4-NFTÜ6HAd</b>	
<b>4-NFTÜ7HAd</b>	
<b>4-KFTÜAd</b>	
<b>4-KFTÜ6HAd</b>	

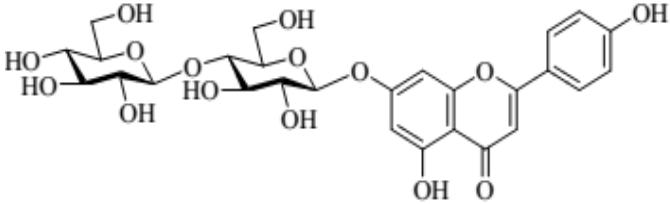
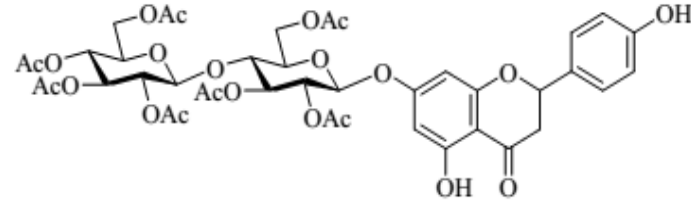
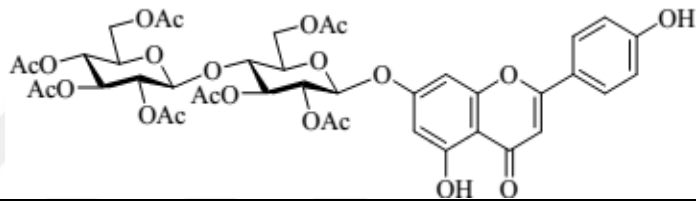
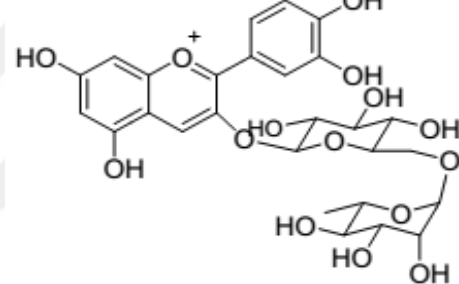
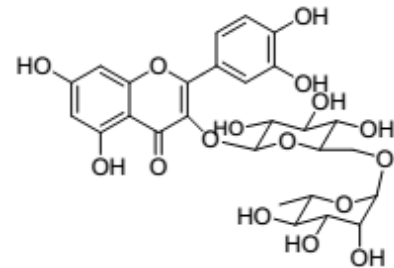
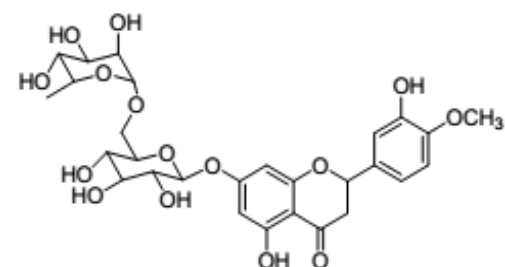
**Tablo 2.1** (devamı).

<p><b>4-KFTÜ7HAd</b></p>	
<p><b>7-OGAd</b></p>	
<p><b>7-OβdGPA</b></p>	
<p><b>7-OGaAd</b></p>	
<p><b>7-OβdGaPA</b></p>	
<p><b>7-OTAβdGPA</b></p>	
<p><b>7-OTAβdGPN</b></p>	
<p><b>7-OTAβdGaPA</b></p>	

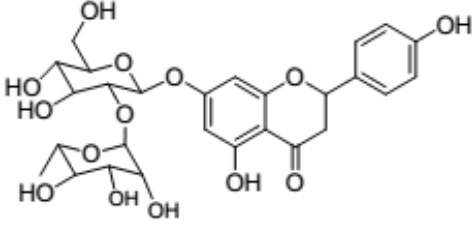
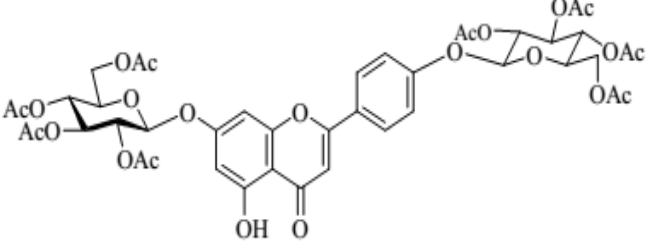
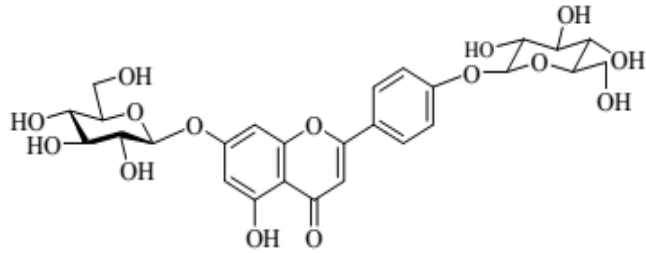
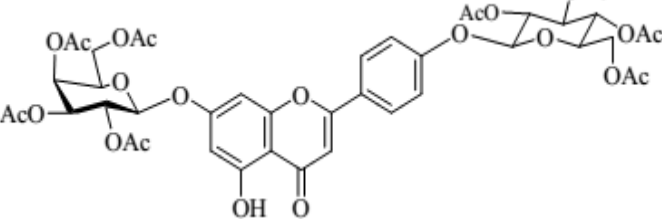
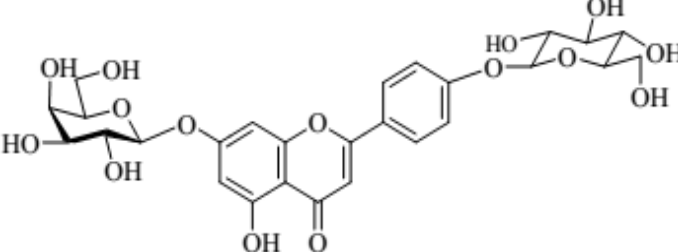
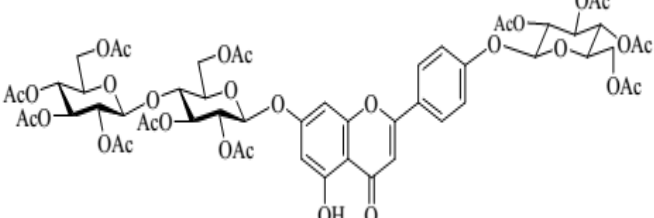
**Tablo 2.1** (devamı).

<p><b>7-OTAβdGaPN</b></p>	
<p><b>7-ORAd</b></p>	
<p><b>7-ORA</b></p>	
<p><b>Dsd</b></p>	
<p><b>Ds</b></p>	
<p><b>7-OSAd</b></p>	

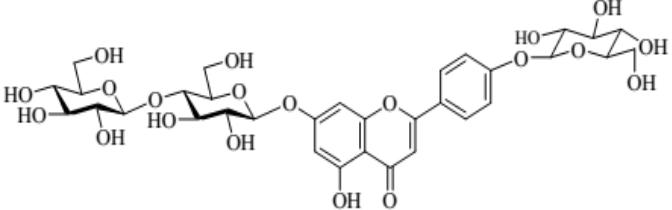
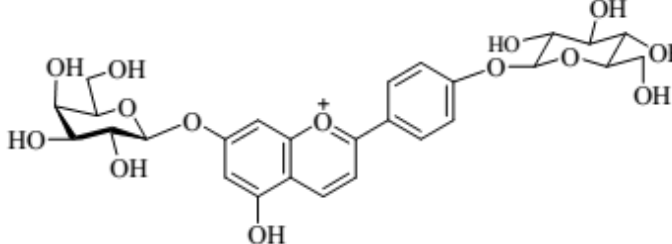
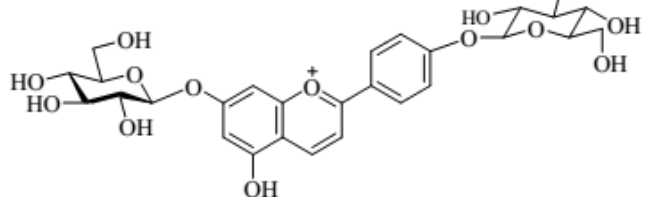
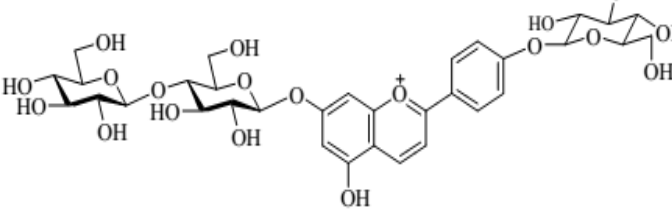
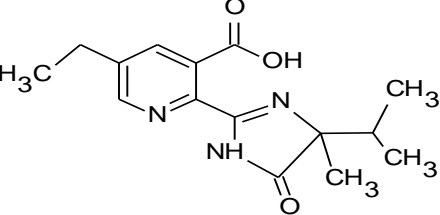
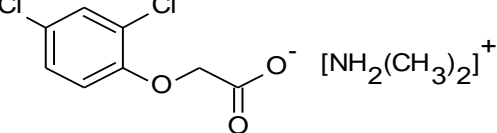
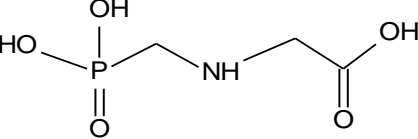
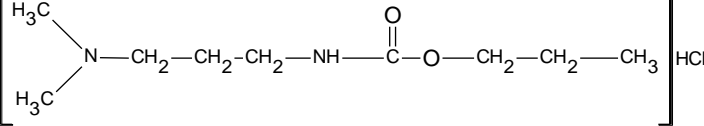
**Tablo 2.1** (devamı).

<p><b>7-OSA</b></p>	
<p><b>7-OH<math>\beta</math>DSN</b></p>	
<p><b>7-OHASA</b></p>	
<p><b>3-ORK</b></p>	
<p><b>Rt</b></p>	
<p><b>Hsd</b></p>	

**Tablo 2.1** (devamı).

<p><b>7-ORTN</b></p>	
<p><b>7,4'-dOTAβdGA</b></p>	
<p><b>7,4'-dOβDGA</b></p>	
<p><b>7-OTβDGA4'OTAβDGA</b></p>	
<p><b>7-OβD-Ga4'OβDGA</b></p>	
<p><b>7-OβDS4'OTAβDGA</b></p>	

**Tablo 2.1** (devamı).

<p><b>7-O<math>\beta</math>DS4'O<math>\beta</math>DGA</b></p>	
<p><b>7-O<math>\beta</math>DGa4'O<math>\beta</math>DGAd</b></p>	
<p><b>7,4'- O<math>\beta</math>DGA</b></p>	
<p><b>7-O<math>\beta</math>DS4'O<math>\beta</math>DGAd</b></p>	
<p><b>Imzpr</b></p>	
<p><b>2,4-DMA</b></p>	
<p><b>GFIPA</b></p>	
<p><b>PP-HCl</b></p>	

### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

<b>Soğutmalı santrifüj</b>	: Hettich zentrifugen, EBA-12R
<b>pH metre</b>	: Orion- model 920A
<b>UV-Spektrofotometre</b>	: Biotek UV-Visible Spectrophotometer
<b>Manyetik karıştırıcı</b>	: IKA Combimag RCO
<b>Peristaltik Pompa</b>	: Pharmacia Fine Chemicals
<b>Kronometre</b>	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
<b>Terazi</b>	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
<b>Otomatik pipetler</b>	: Eppendorf, Brand
<b>Homojenize Edici</b>	: Felix ev tipi bilender
<b>Elektroforez tankı</b>	: Hoefler, HIS
<b>Kromatografi Kolonu</b>	: Pharmacia Fine Chemicals
<b>Derin dondurucu</b>	: Beko buzdolabı
<b>Etüv</b>	: Elektromag
<b>Çalkalayıcı</b>	: Clifton
<b>Vorteks</b>	: Fisons Whirli Mixer

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### 1) Ekstraksiyon tamponu:

% 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit, 0.5 M fosfat tamponu, pH: 7.30; 8.7 gr (0.05 mol)  $K_2HPO_4$ , 0.5 gr polietilen glikol(PEG), 0.176 gr (0.001 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.30'a kadar pH metre yardımıyla titre edildi. Çözelti daha sonra saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

#### 2) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeğin çözeltiye alındığı ve diyalizin yapıldığı tampon:

5 mM fosfat tamponu, pH: 6.30; 0.87 gr ( 0.005 mol)  $K_2HPO_4$  950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.30'e kadar titre edildi ve saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

#### 3) Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:

1 M  $NaHCO_3$  tamponu, pH: 10.00; 8.401 gr (0.1 mol)  $NaHCO_3$  950 mL destile suda çözümlenerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.00'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M  $NaHCO_3$  tamponu, pH: 8.80; 8.401 gr (0.1 mol)  $NaHCO_3$  450 mL destile suda çözümlenerek, 1 N NaOH ile pH'sı 8.80'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M  $Na_2HPO_4$  tamponu, pH: 6.00; 1.42 gr (0.01 mol)  $Na_2HPO_4$  950 mL destile suda çözümlenerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.00'a getirildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

#### 4) Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar:

0.05 M fosfat tamponu, pH: 5.00; 3.55 gr (0.025 mol)  $Na_2HPO_4$  450 mL destile su içinde çözümlenerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

#### 5) Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elusyonu için kullanılan çözelti:

0.05 M  $Na_2HPO_4$  / 1 M NaCl tamponu, pH: 8.00; 3.55 gr (0.025 mol)  $Na_2HPO_4$  ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözümlenerek pH'sı 8.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

#### 6) Aktivite Tamponu:

0.1 M  $Na_2HPO_4$  tamponu, pH: 6.80; 7.1 gr (0.05 mol)  $Na_2HPO_4$  450 mL destile su içinde çözümlenerek pH'sı 6.80'e getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.



**7) Substrat Çözeltisi:**

Substrat çözeltisi 10 mL, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 gr ( $1 \times 10^{-3}$  mol) katekol son hacim 10 mL olacak şekilde destile su ile çözüldü.

**8) Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL):**

25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözüldü.

**9) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:**

100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**10) Stok inhibitör çözeltileri:**

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltileri (orijinal üre türevleri)  $10^{-3}$  M olacak şekilde hazırlandı.

**11) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:**

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'lük SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
$\beta$ -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Destile su	0.5 mL

**12) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:**

Tris-HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

Destile su ile son hacim 1Lt'ye tamamlandı

**13) SDS-PAGE'de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:**

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.2'de verilmektedir.

**Tablo 2.2:** SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	<b>Ayrırma Jeli</b>	<b>Yığılma Jeli</b>
	<b>% 10</b>	<b>% 3</b>
<b><u>Akril amid/Bis (% 30)</u></b> Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr Son hacim destile su ile 50 mL’ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<b><u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u></b> Tris-HCl 11.82 gr pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL’ye tamamlandı.	12.5 mL	–
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u></b> Tris-HCl 3.94 gr pH: 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL’ye tamamlandı.	–	5 mL
<b><u>% 10’luk SDS</u></b> SDS 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL’ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<b><u>TEMED</u></b>	25 µL	20 µL
<b><u>% 10’luk amonyum persülfat</u></b> Amonyum persülfat 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL’ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

**14) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:**

0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

**15) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi:**

% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 PPO Enziminin Saflaştırılması

#### 2.2.1.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılan muz ithal olup ticari bir işletmeden alındı. Ham ekstrakt hazırlanırken, 50 g muz 100 mL ekstraksiyon tamponu içinde ev tipi blender ile 2 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenat tülbent ile süzüldükten sonra, süzüntü soğutmalı santrifüjde +4°C'de 15000 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edildi. Çöken kısım atıldı ve elde edilen supernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

#### 2.2.1.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme işlemleri % 0-80 arasında doyumlukta yapılır. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları aşağıda formüle göre hesaplandı.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

**V:** Süpernatant hacmi

**S<sub>1</sub>:** l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyumluğu

**S<sub>2</sub>:** l'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyumluğu

Katı amonyum sülfat miktarı tespit edildikten sonra ham ekstrakta katı (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yavaş bir şekilde azar azar katıldı ve her ilave sonrasında daha önce katılan (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. % 80 Amonyum sülfat doyumluğuna getirilen suspansiyon 15000 rpm'de 45 dakika süreyle soğutmalı

santrifüjde +4°C'de santrifüjlendi. Ekstrakt santrifüj edildikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı kısımlar atılıp oluşan çökelek 5 mM fosfat tamponunun (pH: 6.3) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

### **2.2.1.3 Diyaliz**

5 mM fosfat tamponundaki enzim çözeltisi diyaliz torbasına (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) yerleştirildi ve yine aynı tampona (5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3) karşı en az 3 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat boyunca +4°C'de diyaliz edildi.

### **2.2.1.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması**

Çalışma grubumuz tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak PPO enzimi saflaştırıldı [1]. PPO enziminin saflaştırılması için uygulanan en etkili metodlardan birisi de afinite kromatografisi ile saflaştırma yöntemidir. Bu yöntem, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılmak istenen moleküle spesifik bir ligandın, katı destek metaryeline bağlanmasıyla sentezlenen jel ile saflaştırma sağlanan bir tekniktir. Bu yöntem sayesinde saflaştırılması çok zor ve bazen imkânsız gibi görünen biyomolekülleri çok kısa sürede ve yüksek verimle saflaştırmak mümkündür [95].

### **2.2.1.5 Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu**

Sentezlenen afinite jeli 1x15 cm'lik kolonlara paketlenerek 0.05 M fosfat tamponu (pH: 5) ile yıkılarak dengeleme sağlandı. Dengelenip dengelenmediğini de pH kontrolü yaparak tespit edilir. Diyaliz işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine aynı tampon ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutundu ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0,05 M pH=7,00 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 M NaCl tamponu ile elüsyon işlemi yapıldı ve 2'şer mL elüatlar toplandı. Elüatlarda, 280 nm'de kalitatif protein, Coomassie

blue metoduyla kantitatif, ve 420 nm’de enzim aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafik halinde Şekil 3.99 ve 3.100’de verildi.

### **2.2.2 Yeni Afinite Jellerinin Sentezi**

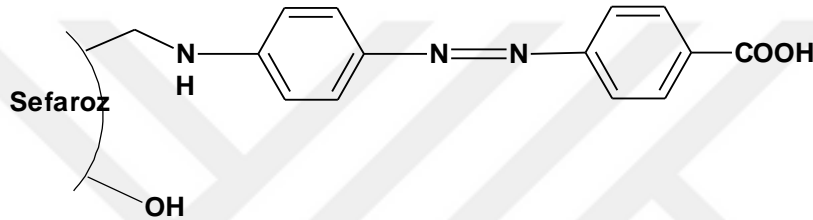
Matriks olarak kullanılan Sepharose-4B ve Sepharose-6B’nin serbest -OH guruplarının aktifleştirilme işleminde CNBr yöntemi kullanıldı [66]. Matriksler CNBr ile aktifleştirildikten sonra, anilin kovalent olarak jel yapısına katıldı. Daha sonra aniline diazolanmış p-amino benzoik asidin bağlanması işlemi gerçekleştirildi. Burada anilin, afinite jelinin uzantı kolunu, p-aminobenzoik asit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını (ligand) oluşturmaktadır. P-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörüdür ve afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanıldı. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

#### **2.2.2.1 Matriksin Aktifleştirilmesi ve Anilin Bağlanması**

10’ar mL Sepharose-4B ve Sepharose-6B saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi ve eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Hafif tempoda karışan jel süspansiyonuna 5M’lık CNBr çözeltisinden yaklaşık 7,5 mL ilave edildi. Süspansiyonun pH’sı 4 M NaOH çözeltisi kullanılarak hemen 11’e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH’da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi. Çok miktarda buz süspansiyona katılır ve karışım bir buchner hunisine alınıp 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi ile (pH: 10) ile yıkandı. Yıkama bittikten sonra aktifleştirilmiş matriks aynı tamponun 40 mL’sine alınıp üzerine, 20 mL’sinde 50 mg anilin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek hafif tempoda 90 dakika karıştırıldıktan sonra buzdolabına kaldırıldı ve 16 saat +4°C’de bekletildi. Daha sonra süspansiyon yaklaşık 1 lt saf su ile iyice yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen anilin tamamen uzaklaştırılmış olur. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH: 8.8) tekrarlandı. Anilin ile aktifleştirilmiş matriksler aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

### 2.2.2.2 p-Aminobenzoik Asidin Bağlanması

25 mg p-aminobenzoik asit, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözülüp, 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olan p-aminobenzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-Anilin ve 40 mL Sepharose-6B-Anilin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9.5'a çıkarılarak sabit tutulup 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra bol miktarda saf su ve ardından 200 mL 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi. Sentezlenen jelin kimyasal yapısı Şekil 2.4 de gösterilmektedir.



Şekil 2.3: Sepharose 4B, 6B-anilin-p-aminobenzoik asitin son hali.

### 2.2.3 SDS-PAGE İle Enzimin Saflığının ve Molekül Ağırlığının Kontrolü

Muz PPO enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [96].

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Tablo 2.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya

kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi. (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Safılaştırdığımız enzimin yaklaşık molekül ağırlığını kontrol etmek için, 10 ile 250 kDA molekül ağırlığına sahip proteinleri içeren marker kullanıldı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel kesililip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 3.101).

## 2.2.4 Protein Tayini

### 2.2.4.1 Kalitatif Tayin

Afinite kromatografi tekniğiyle elde ettiğimiz elüatların kalitatif protein tayinleri 280 nm'deki absorbans ölçümleri alınarak yapıldı. Bu metodun temel prensibi, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin 280 nm'de UV ışınlarını absorblamalarıdır [97]. Elüatlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak alındı.

### 2.2.4.2 Kantitatif Tayin

Saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri, Bradford yöntemiyle belirlendi. Bradford yöntemi, proteinlerin fosforik asitli ortamda Coomassie brillant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [98]. Diğer kantitatif yöntemlere göre üstün olmasının nedeni ise uygulama süresinin çok kısa olması, bozucu faktörlerin az olması ve protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mg/mL olacak şekilde hazırladığımız standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 5 mM fosfat tamponu (pH: 6.3) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brillant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks edildikten 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 5 mM fosfat tamponu (pH: 6.3) olan 1. Tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.98).

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0.1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra



595 nm’de absorpsanları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorpsanına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

### **2.2.5 PPO Enziminin Aktivite Tayini**

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 40 µL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 960 µL tampon + substrat (0,1 M katekol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm’de köre karşı bir dakikada absorpsanda meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (EU) reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakika sonunda meydana gelen 0,001’lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak “1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorpsansta meydana gelen 0,001 birimlik değişme” kullanıldı.

### **2.2.6 PPO Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar**

Katekol substratı kullanarak, PPO enziminin optimum koşullarda  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Ayrıca farklı inhibitörler için, optimum şartlarda,  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri bulundu.

#### **2.2.6.1 Katekol Substratı için Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması**

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol substratlarının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.1).  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### 2.2.6.2 İnhibitörler için IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

İnhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, optimum şartlarda 0,01 M katekol substratıyla çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu ve bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı ve % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ve 96). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3.2'de verildi.

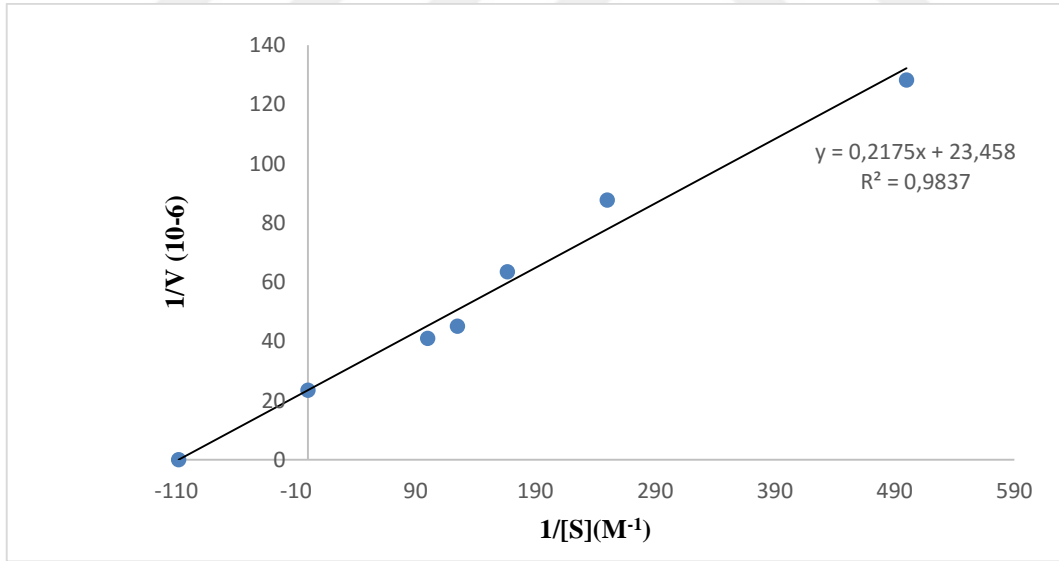
### 2.2.6.3 İnhibitörler için K<sub>i</sub> Değerlerinin Bulunması

Farklı inhibitörler için K<sub>i</sub> değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda farklı katekol substratı konsantrasyonları kullanarak aktivite bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 2 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda optimum şartlarda aktivite katekol substratı kullanılarak tespit edilerek 1/V ve 1/[S] değerlerinden yararlanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 ve 97). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K<sub>i</sub> değerleri tespit edildi (Çizelge 3.2). K<sub>i</sub> değerleri yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan  $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$  ifadesinden, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için eğrinin 1/V eksenini kestiği noktayı veren  $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$  ifadesinden yararlanarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3.2'de verildi. Denklemlerde kullanılan K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Muz PPO Enziminin Katekol Substratı için Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol substratının değişen konsantrasyonlarında 420 nm'de enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak bulunan değerlerin ortalaması hesaplandı. Aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak katekol substratı için Linewear-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.1).  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafikten yararlanarak doğru denklemden hesaplandı. Bulunan  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max}/K_M$  değerleri Tablo 3.1 de verildi.



Şekil 3.1: Muz PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.

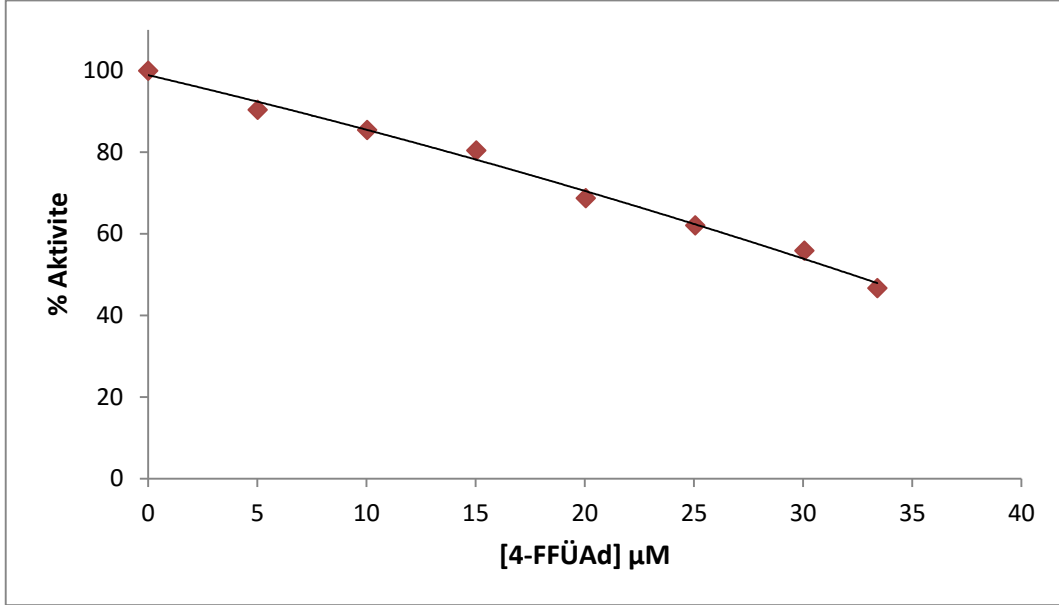
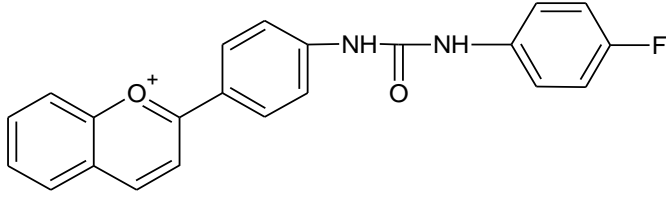
**Tablo 3.1:** Muz PPO enziminin katekol substrat için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri.

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (U/mLdak)	$V_{max}/K_M$
Katekol	9,27	42628	4598

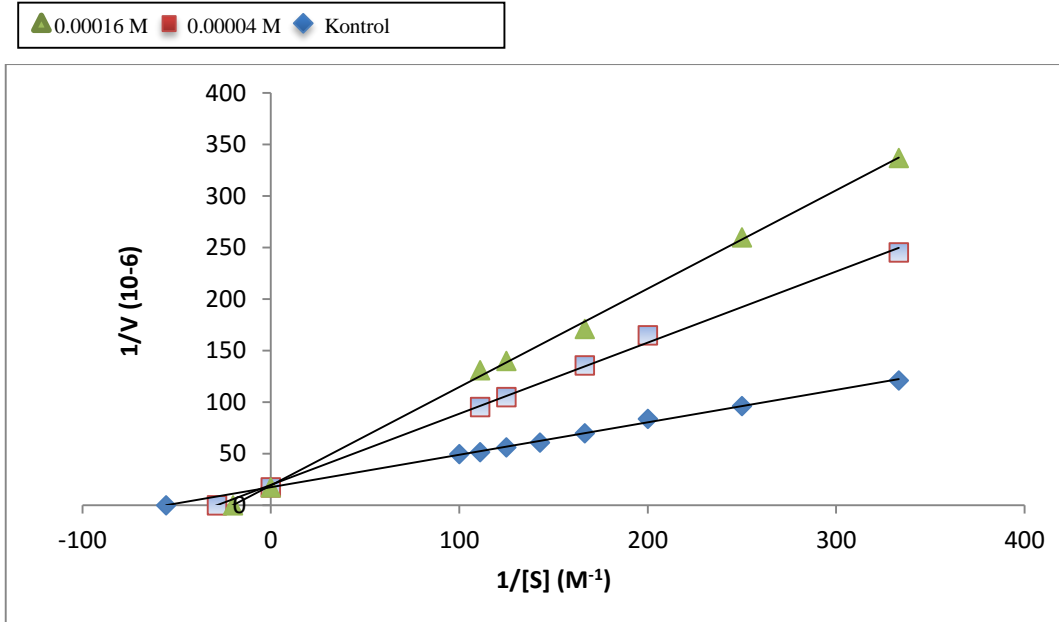
### 3.2 Muz PPO Enziminin Farklı İnhibitörleri için $IC_{50}$ Değerlerinin ve $K_i$ Sabitlerinin Bulunması

Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 0.1 M sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0,1 M katekol hazırlandı ve her ölçümde 80  $\mu$ L alındı. İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 1000  $\mu$ L'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 40  $\mu$ L enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 960  $\mu$ L tampon + substrat + inhibitör çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviter hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ve 96). (I= küvetteki 1 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3.2'de verildi.

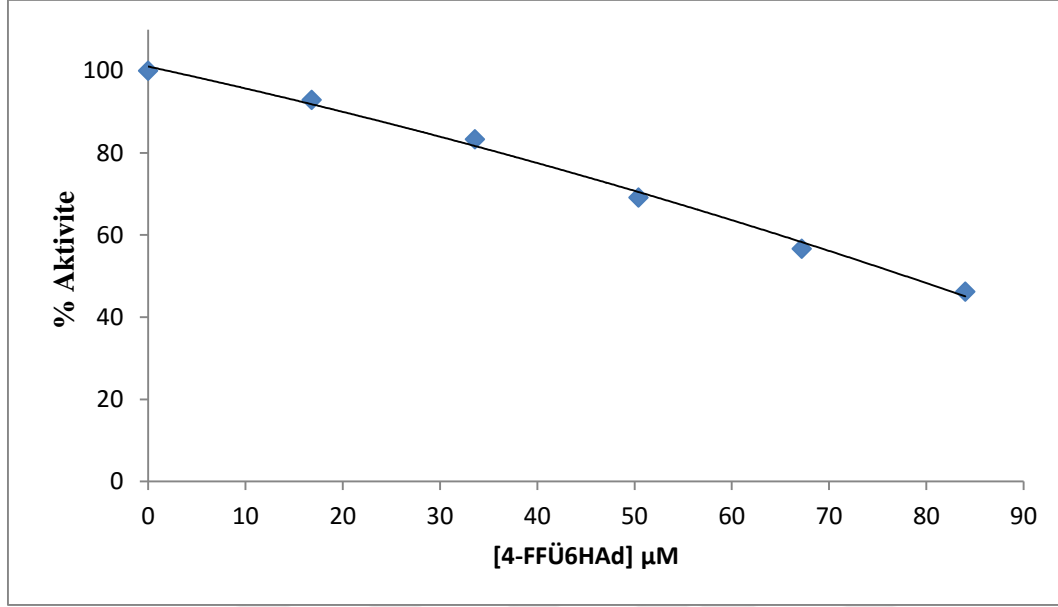
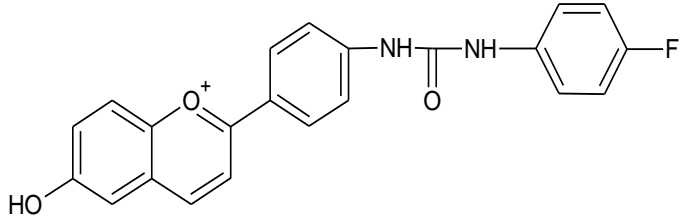
Farklı inhibitörlerin  $K_i$  sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda farklı katekol substratı konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviter bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 2 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, optimum şartlarda, katekol substratı kullanılarak aktiviter belirlendi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 ve 97). Bu grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi (Tablo 3.2).



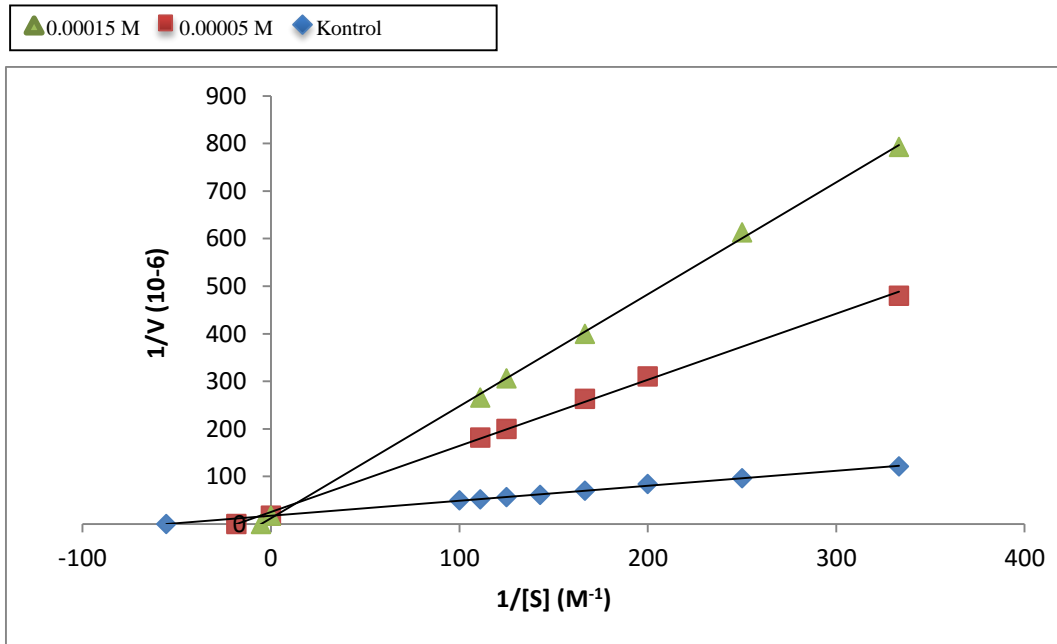
**Şekil 3.2:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



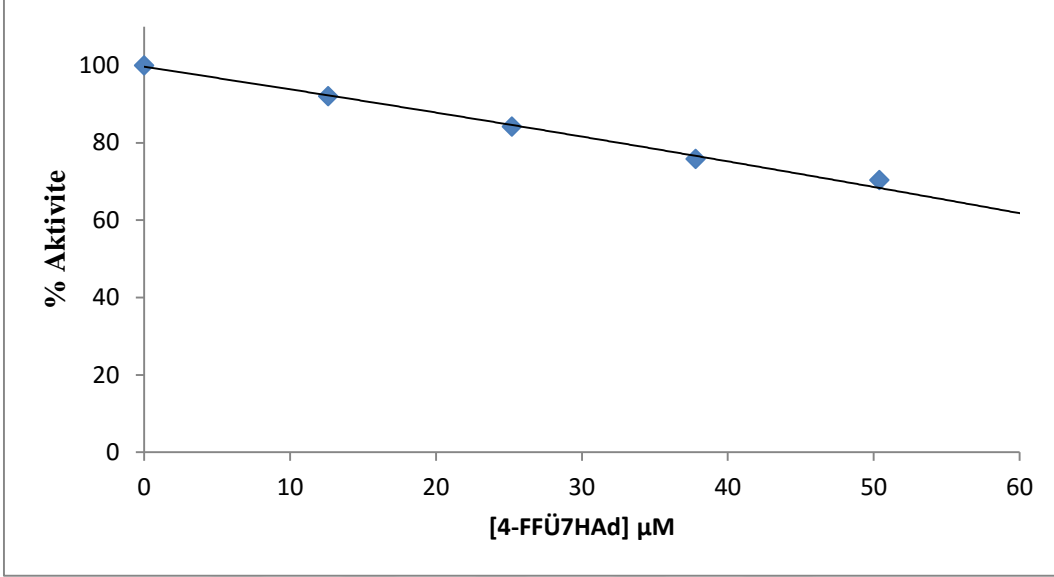
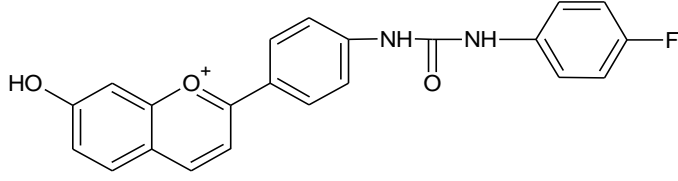
**Şekil 3.3:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



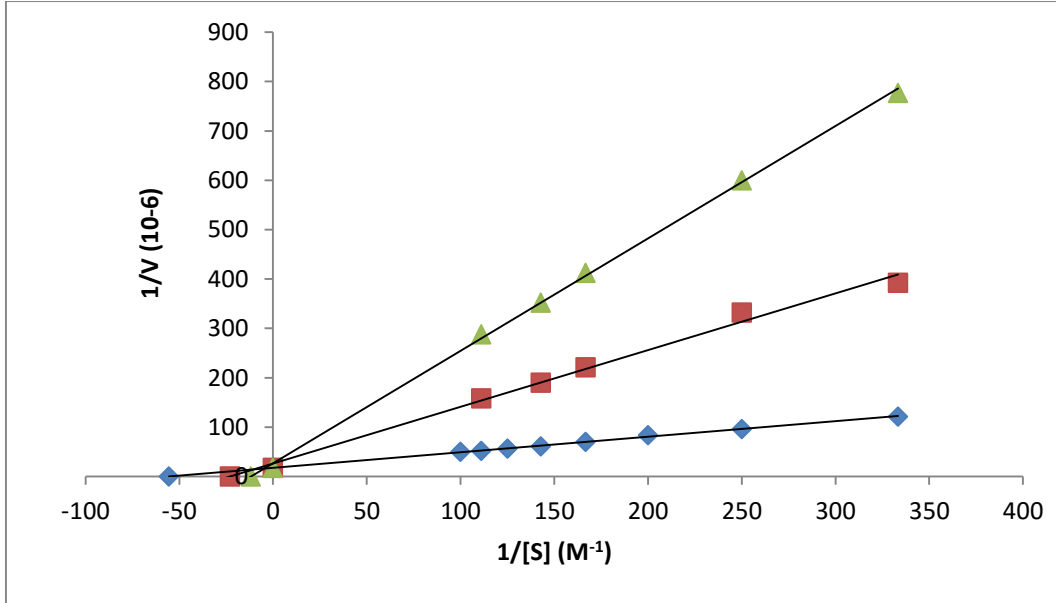
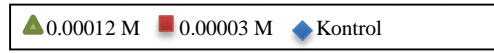
Şekil 3.4: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



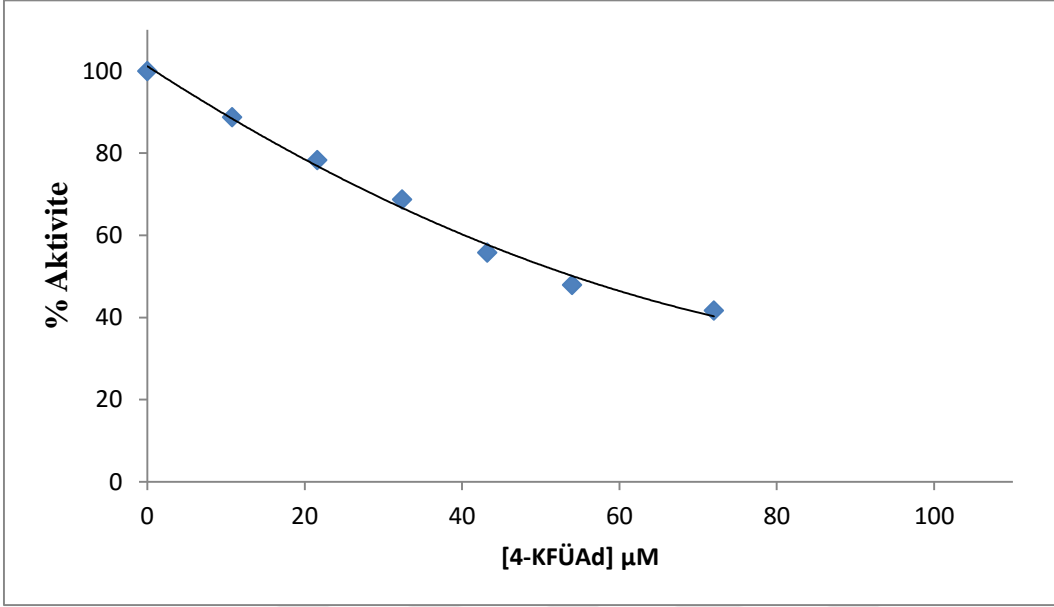
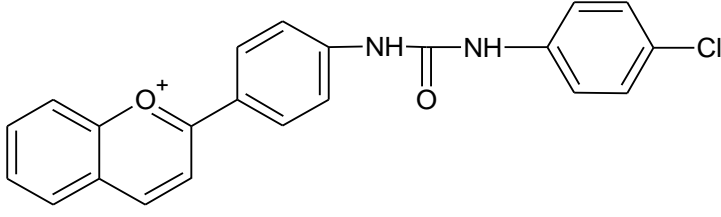
Şekil 3.5: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



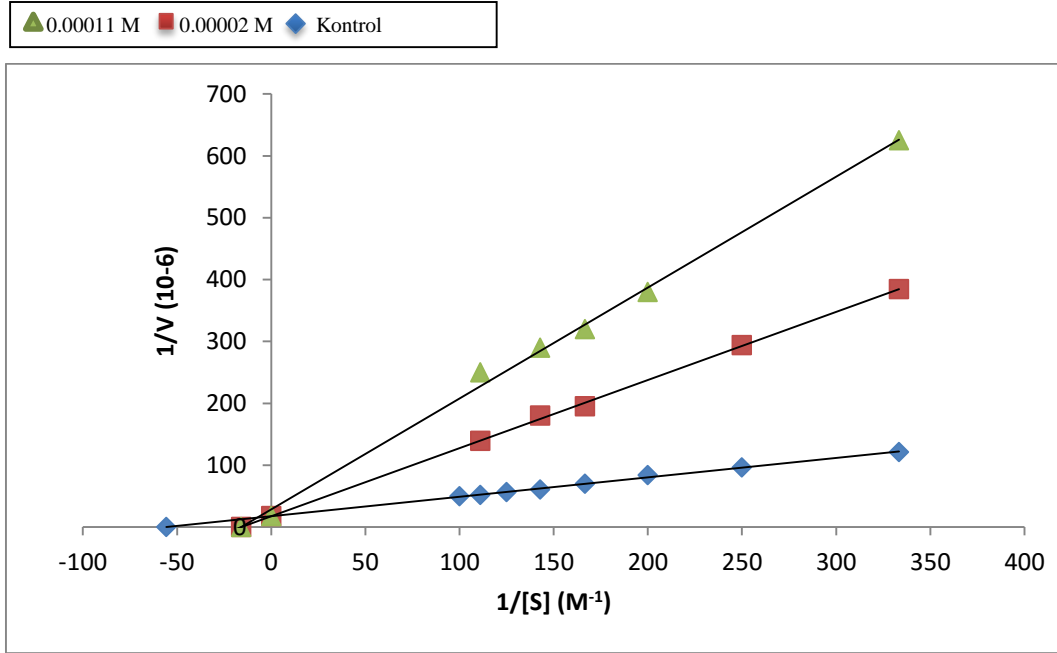
Şekil 3.6: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-florofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.7: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-florofenilürenil)-7-hidroksi- apigenidin'in inhibisyon etkisi.

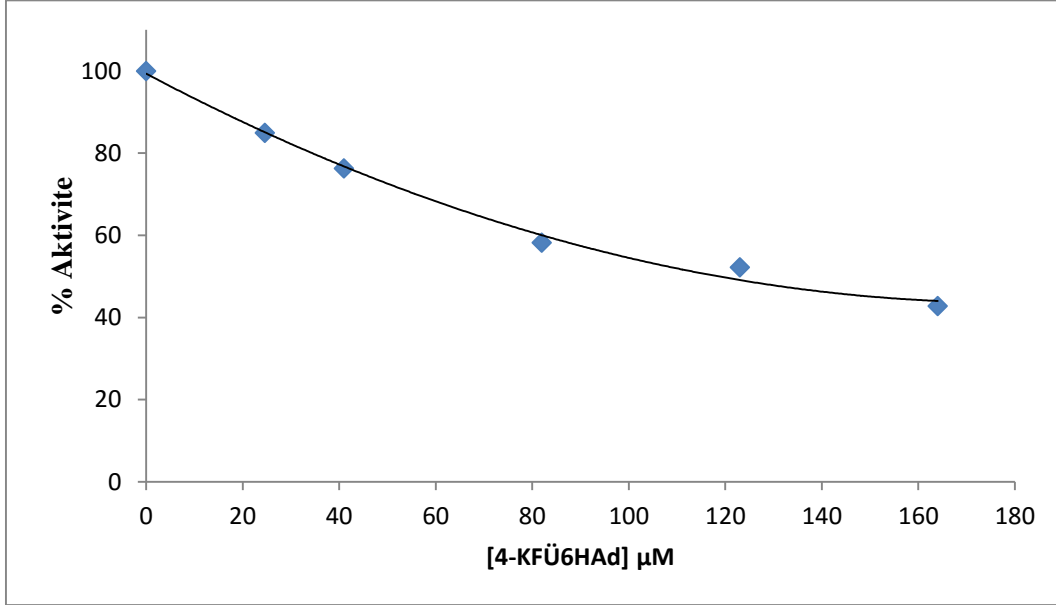
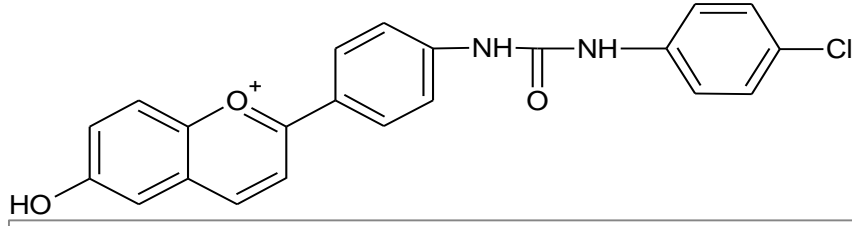


**Şekil 3.8:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.

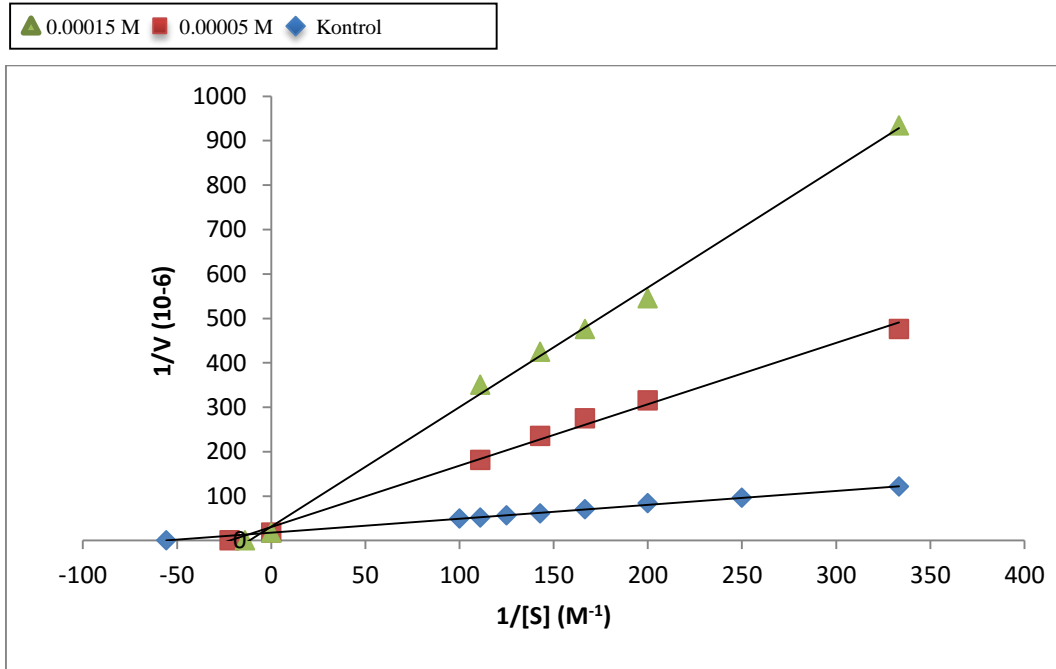


**Şekil 3.9:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.

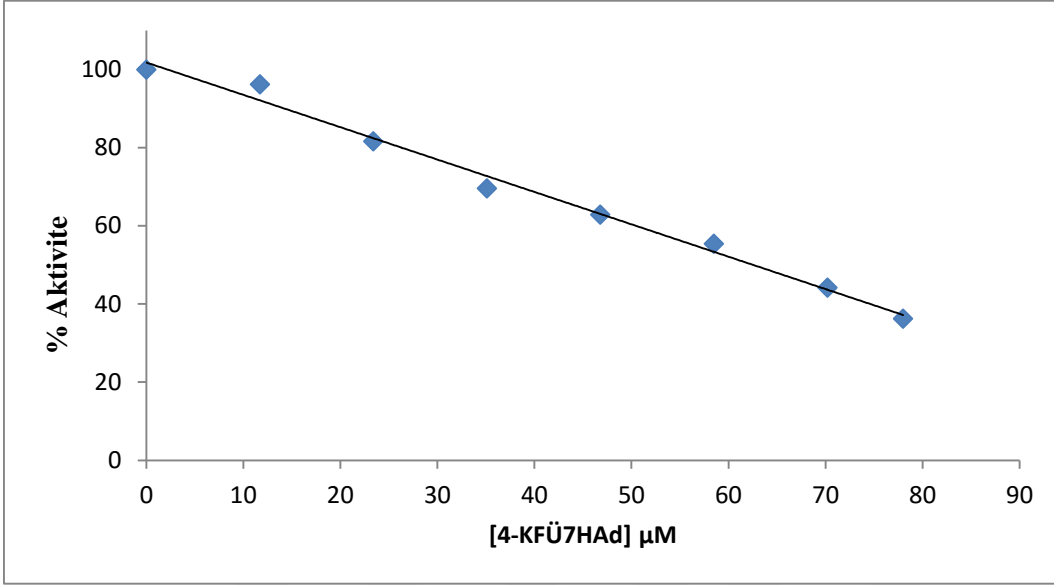
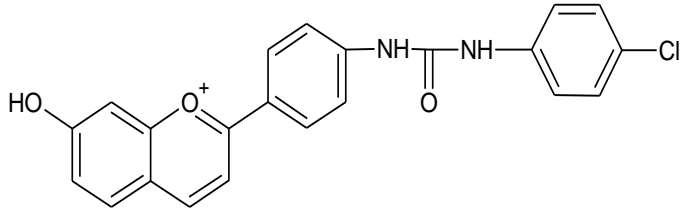




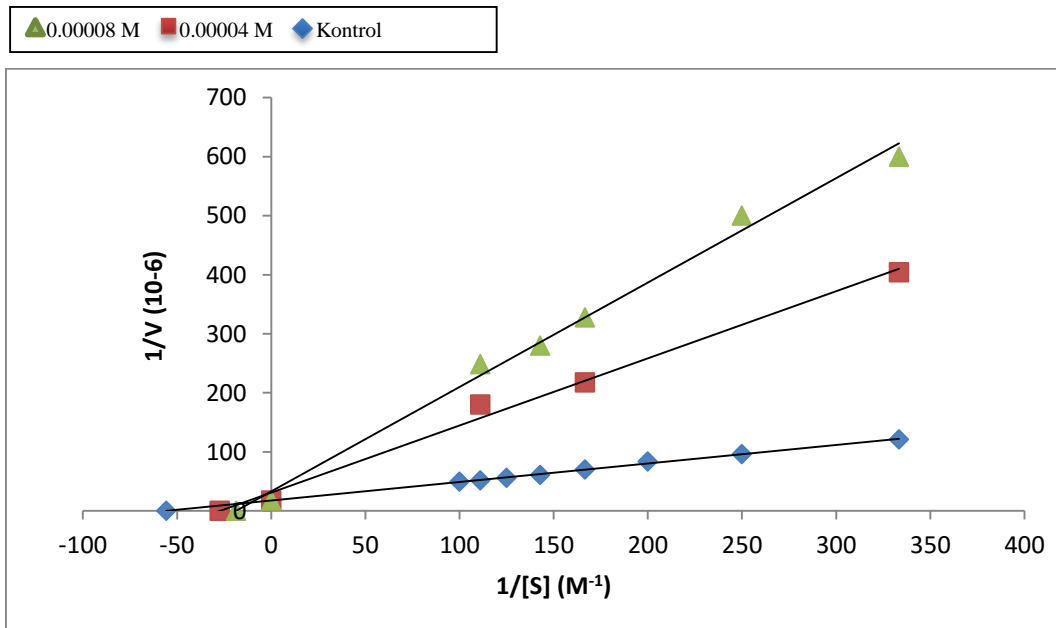
**Şekil 3.10:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorophenylurenyl)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



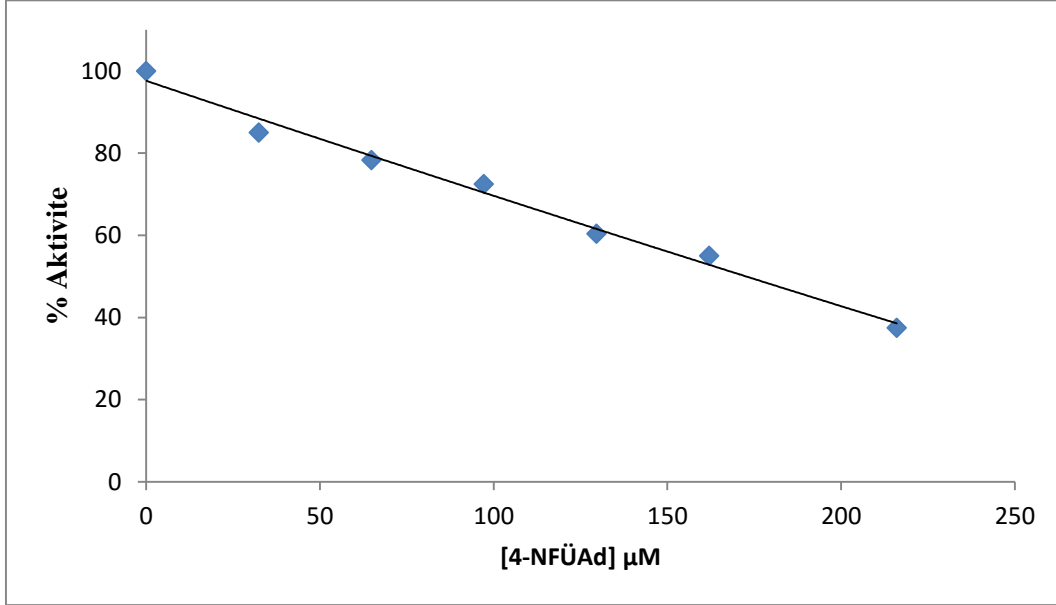
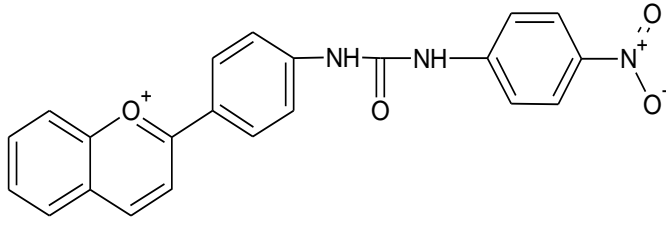
**Şekil 3.11:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorophenylurenyl)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



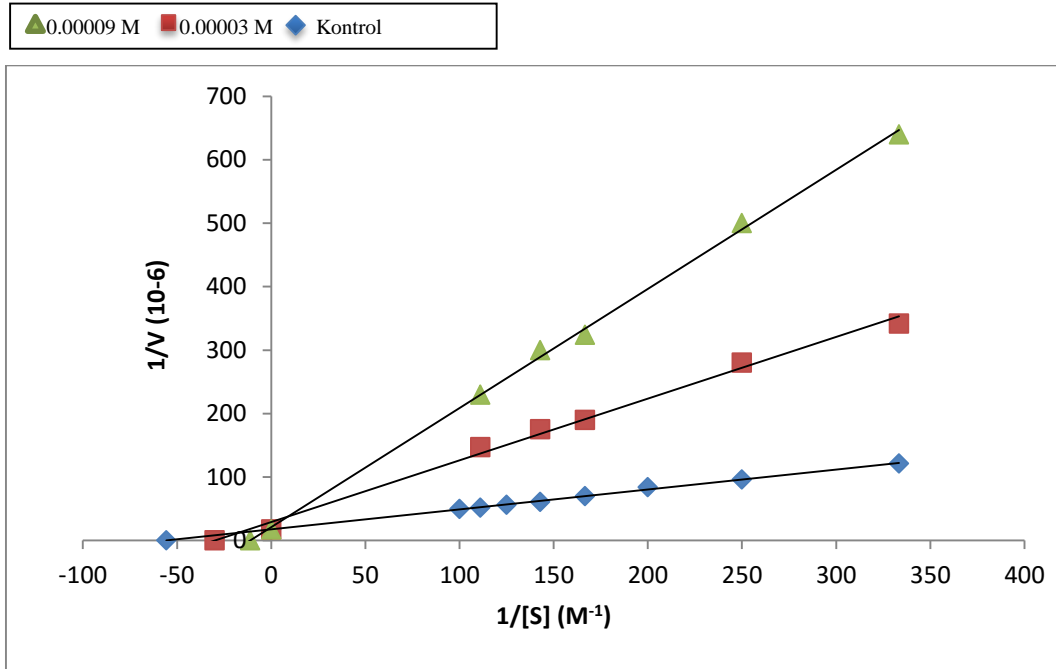
**Şekil 3.12:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



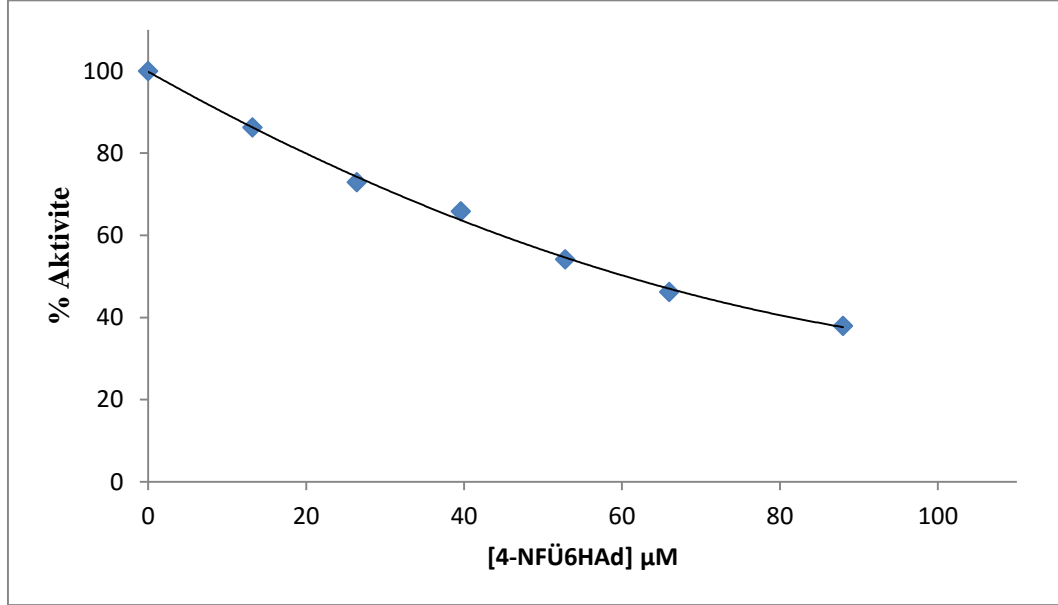
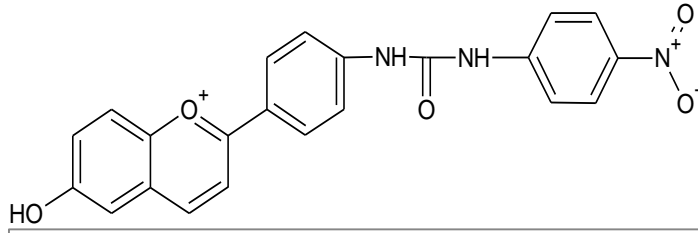
**Şekil 3.13:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



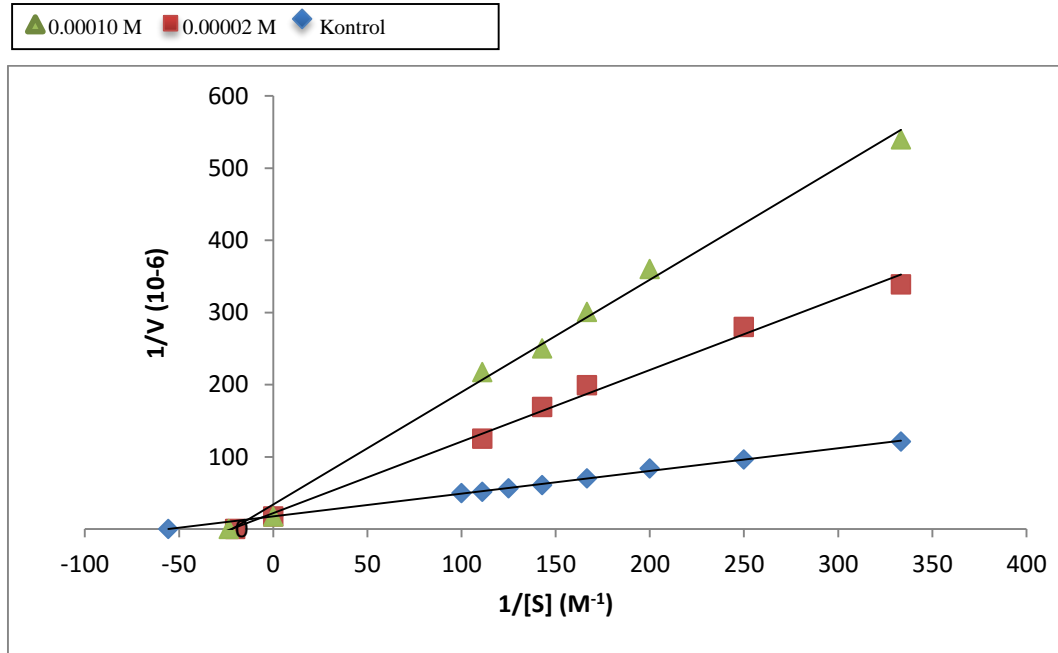
Şekil 3.14: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



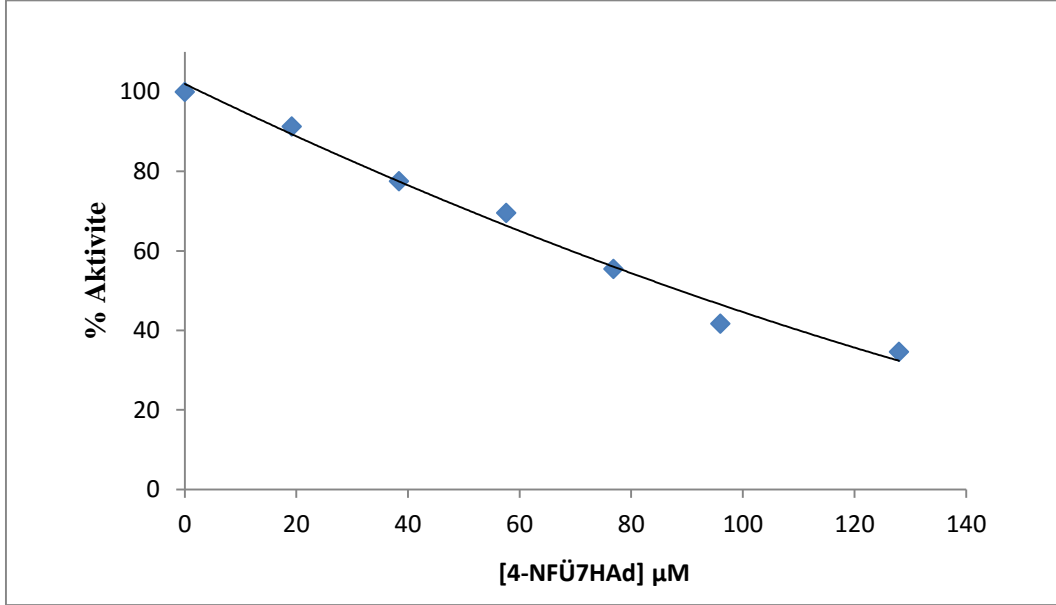
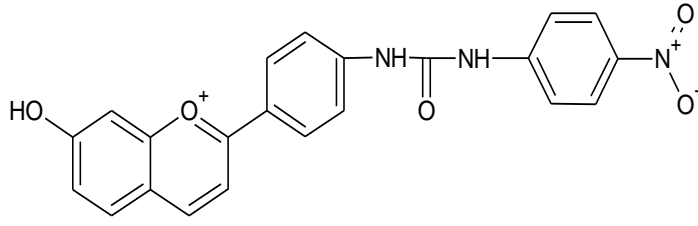
Şekil 3.15: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



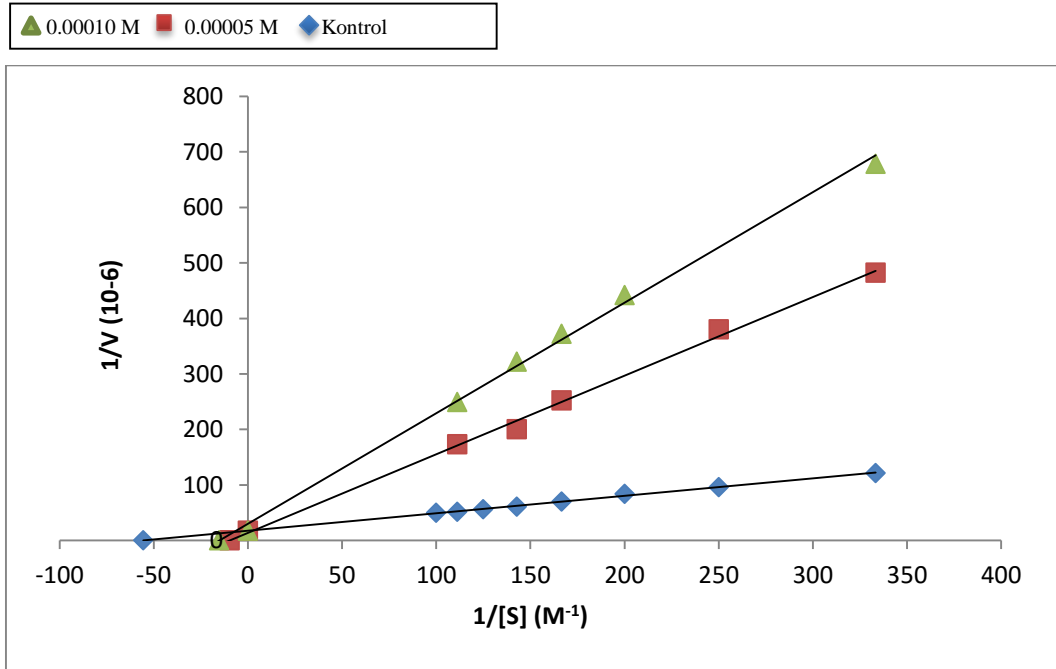
**Şekil 3.16:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



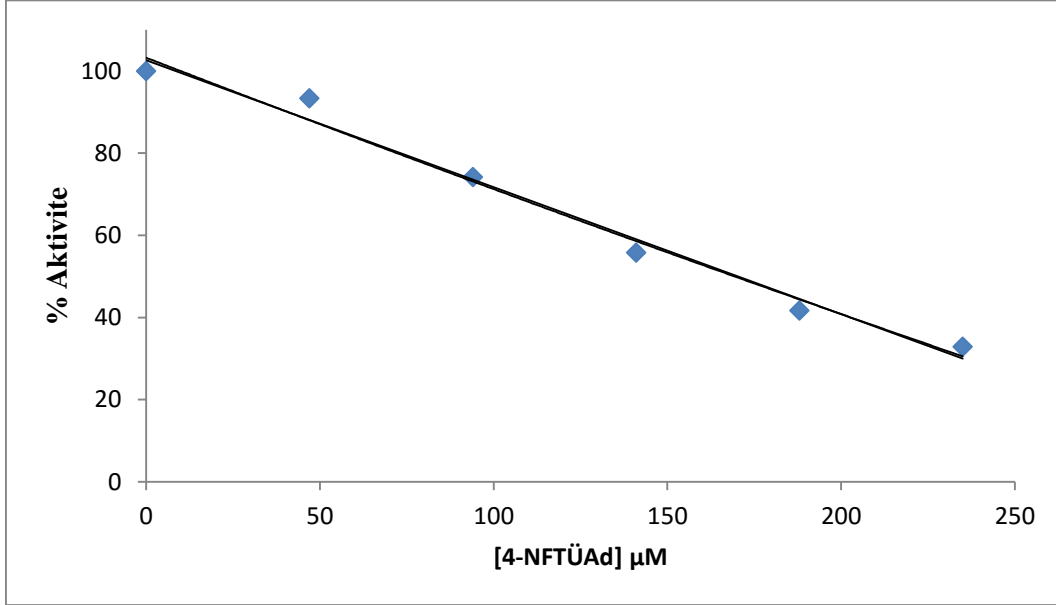
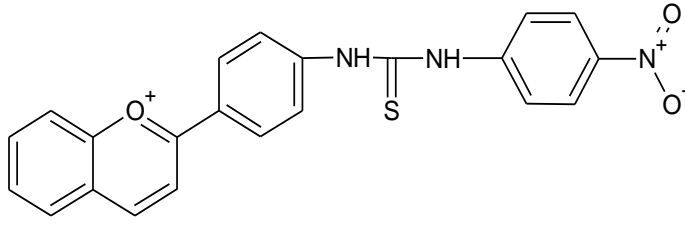
**Şekil 3.17:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-6-hidroksi-apigenidin'nin inhibisyon etkisi.



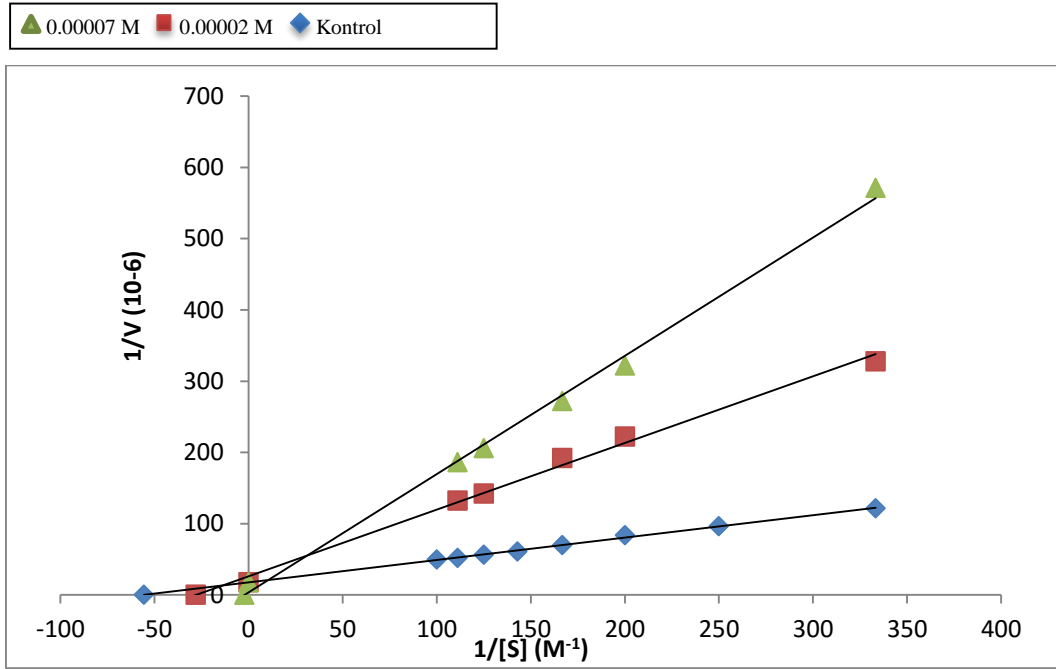
Şekil 3.18: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



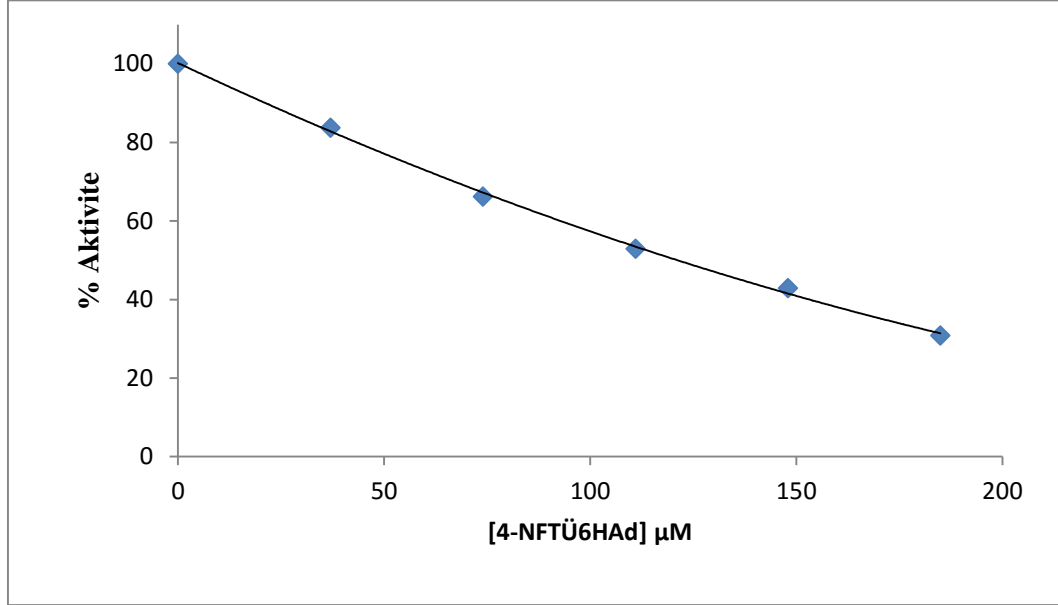
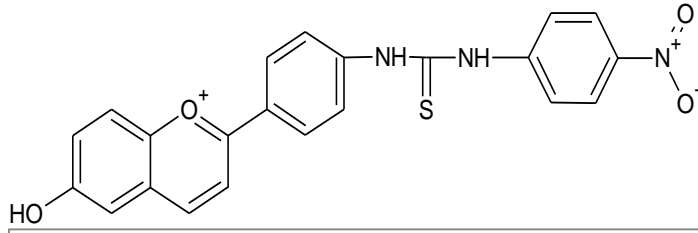
Şekil 3.19: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofenilürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



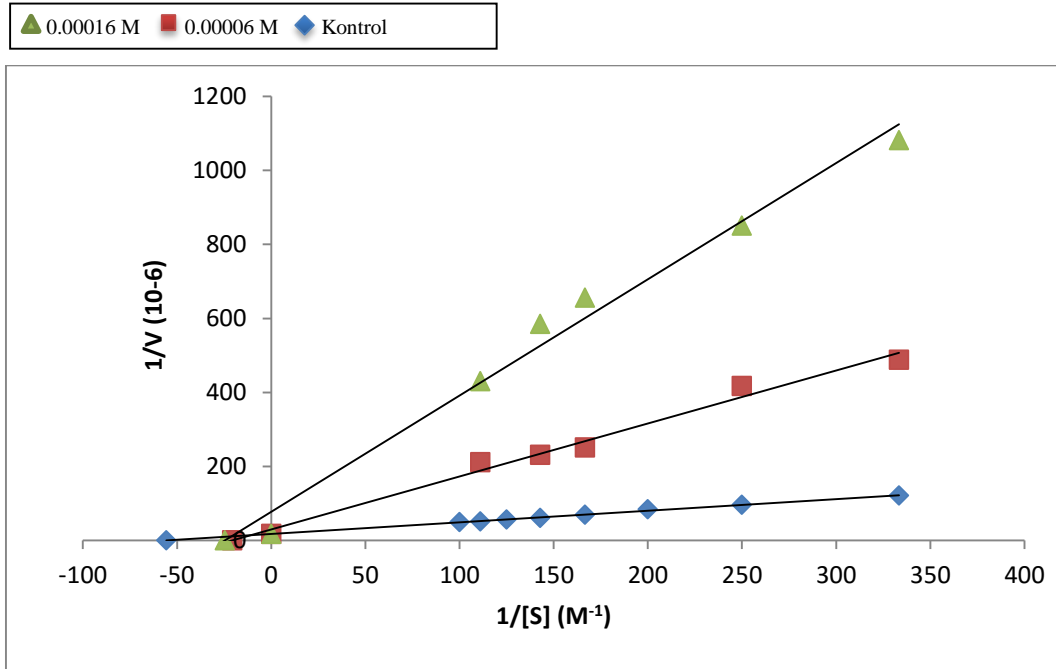
**Şekil 3.20:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyürenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



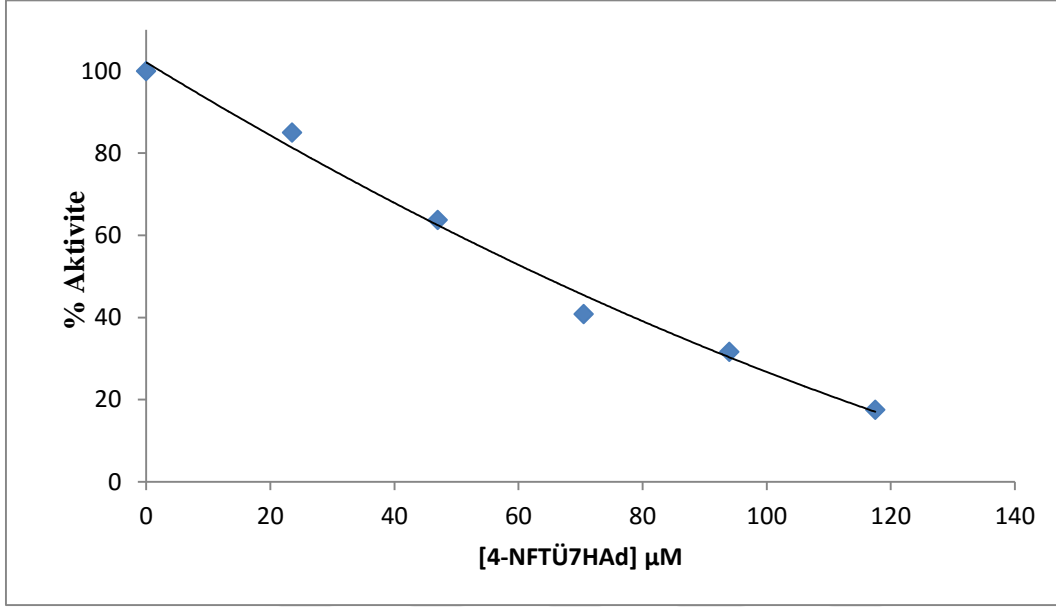
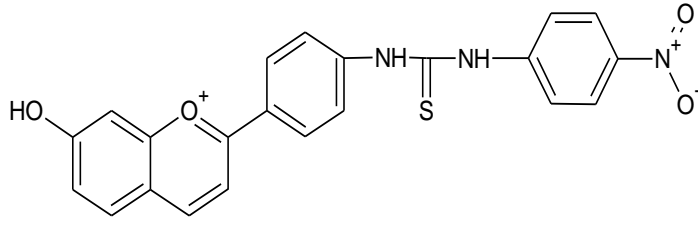
**Şekil 3.21:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyürenil)-apigenidin'un inhibisyon etkisi.



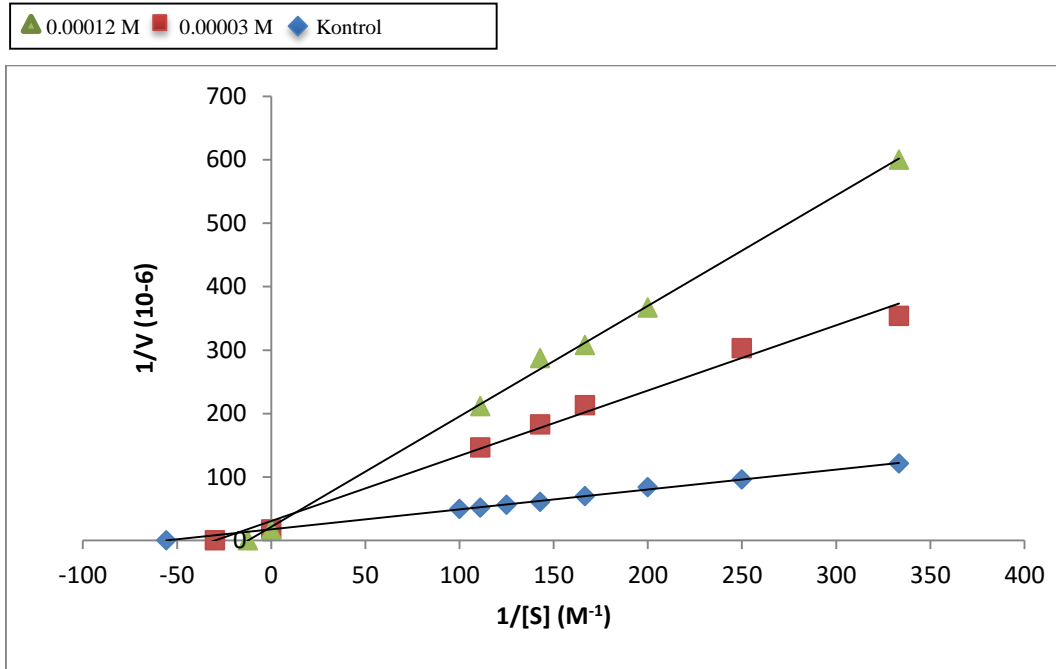
Şekil 3.22: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.23: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.

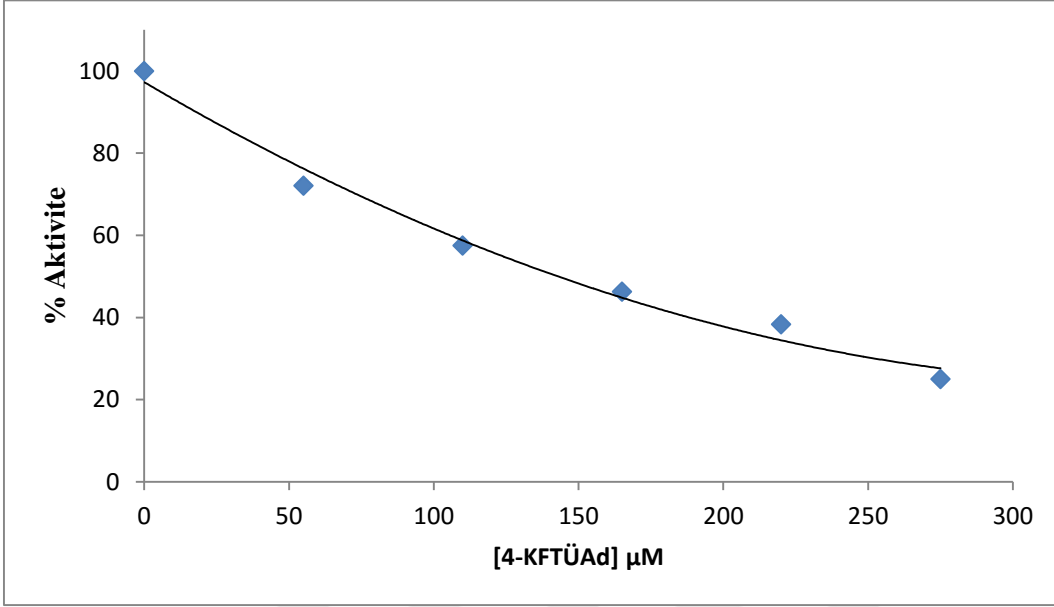
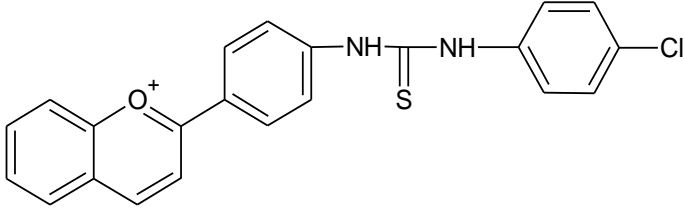


Şekil 3.24: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.

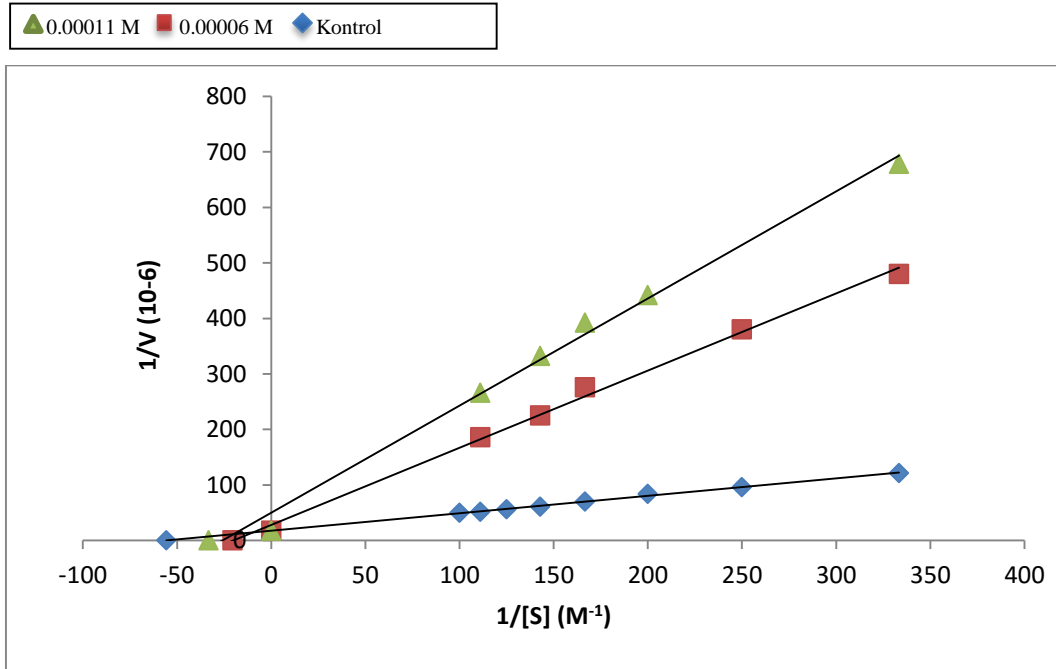


Şekil 3.25: Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-nitrofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin'nin inhibisyon etkisi.

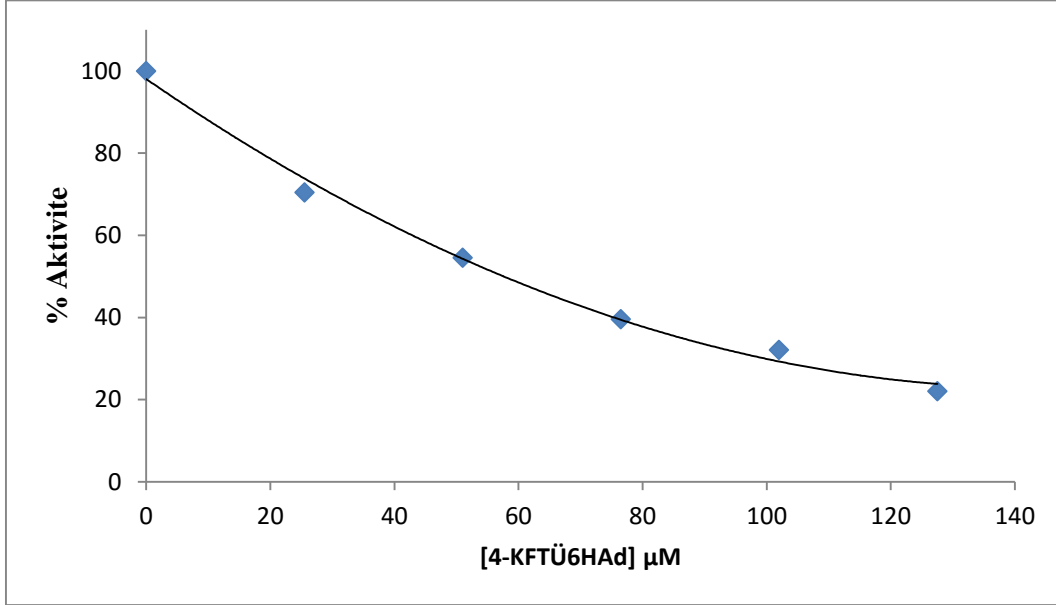
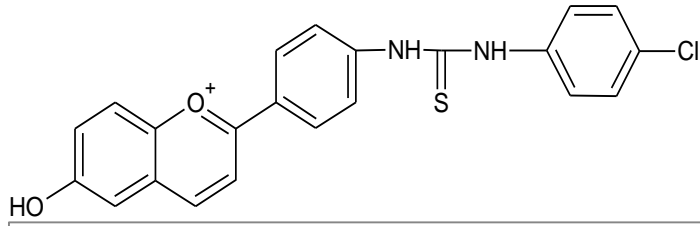




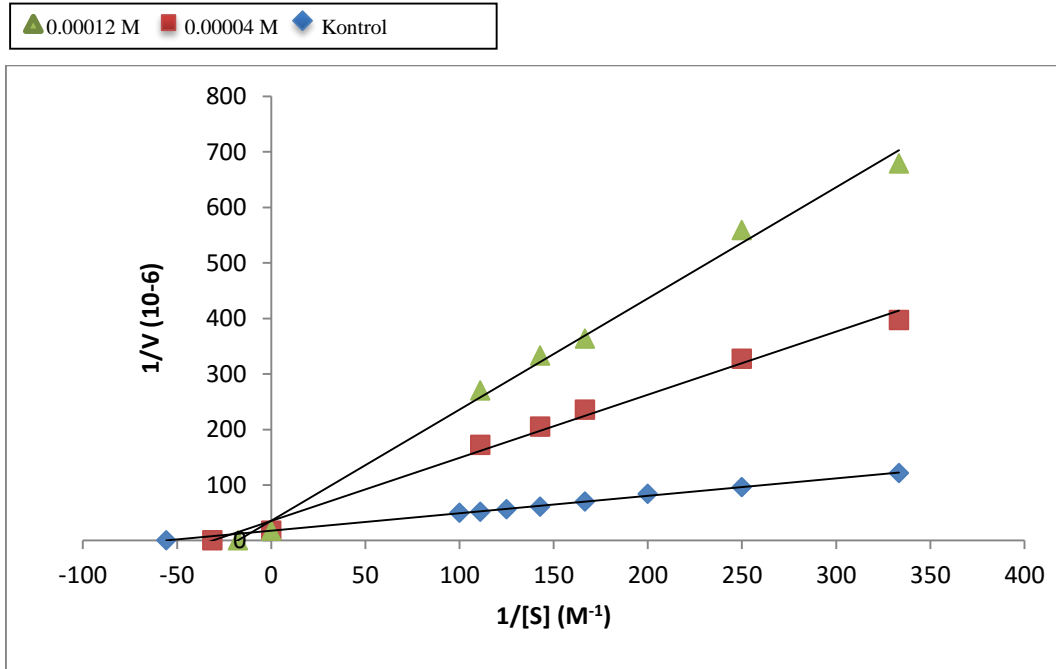
**Şekil 3.26:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyörenil)-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



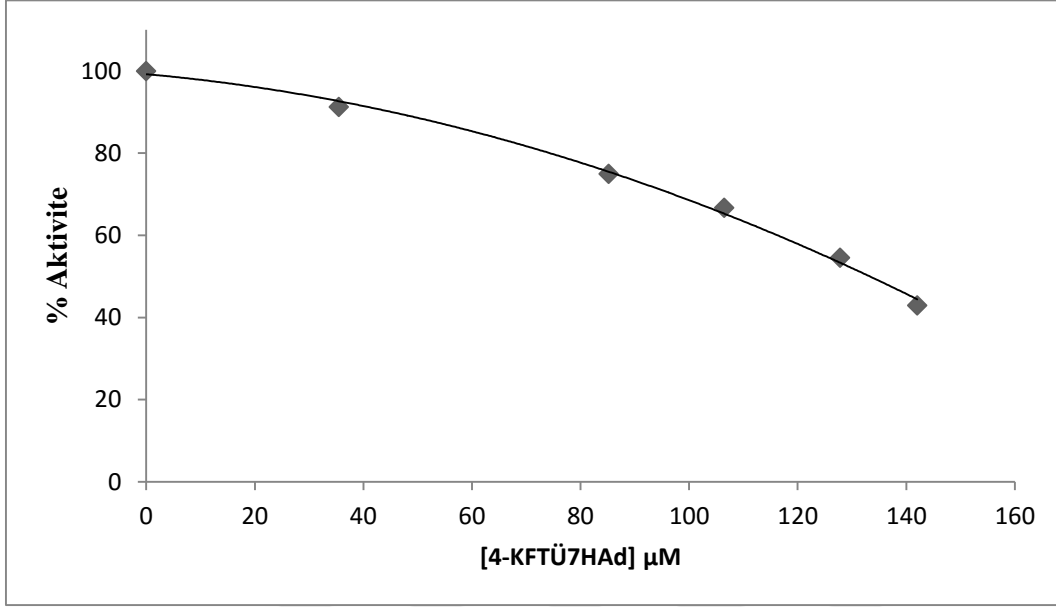
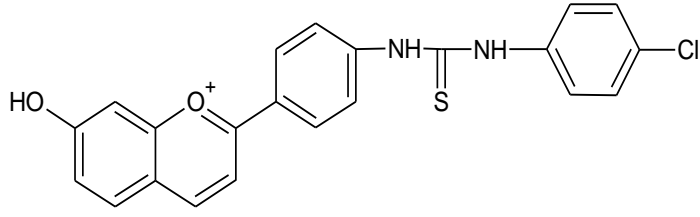
**Şekil 3.27:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyörenil)-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



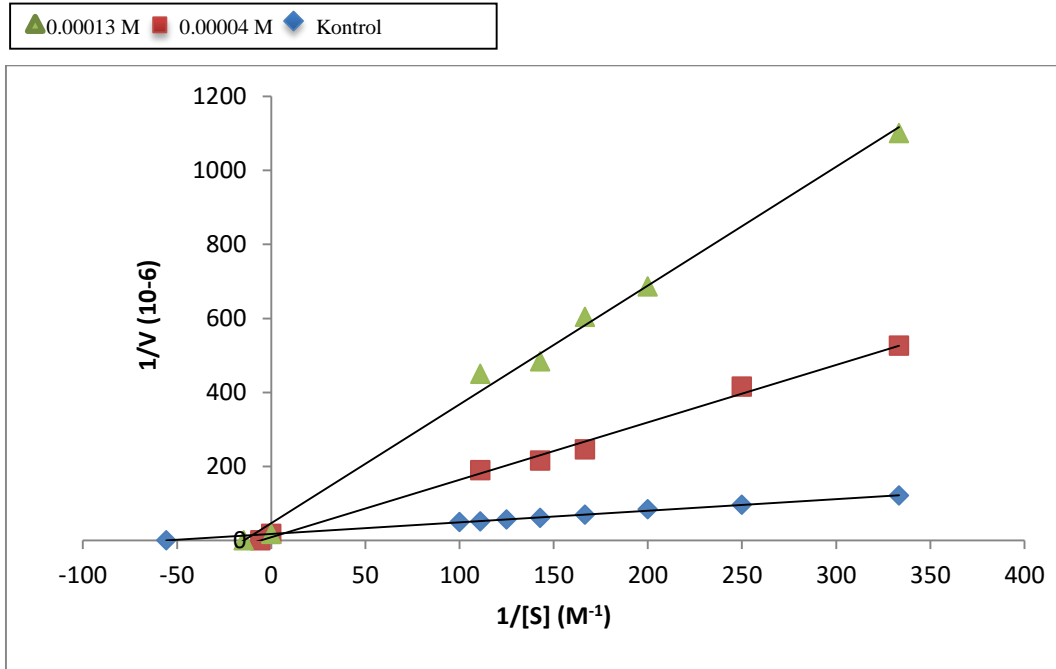
**Şekil 3.28:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



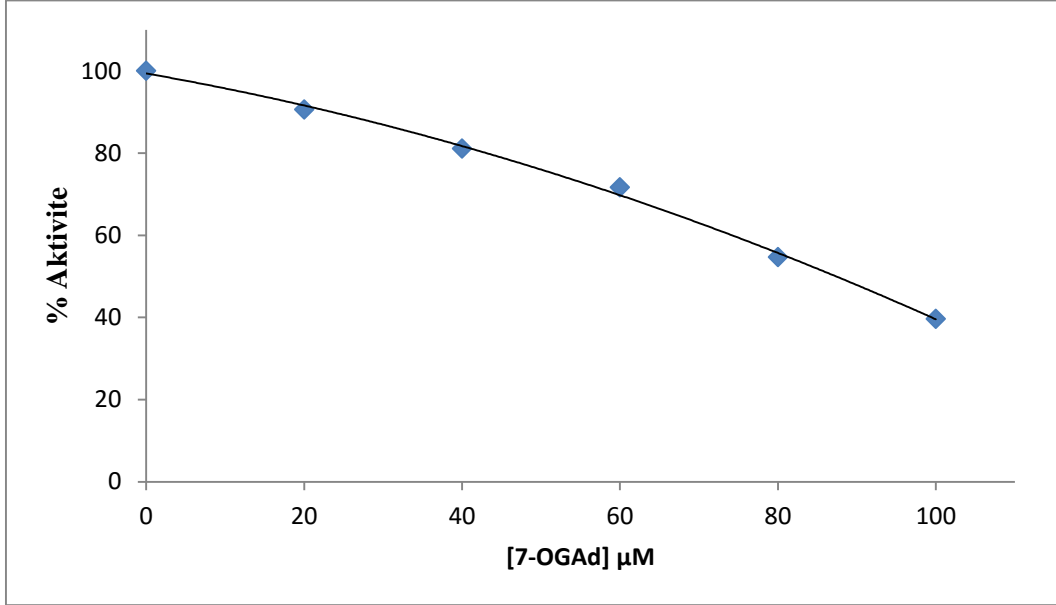
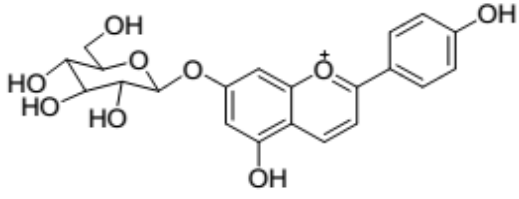
**Şekil 3.29:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-6-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



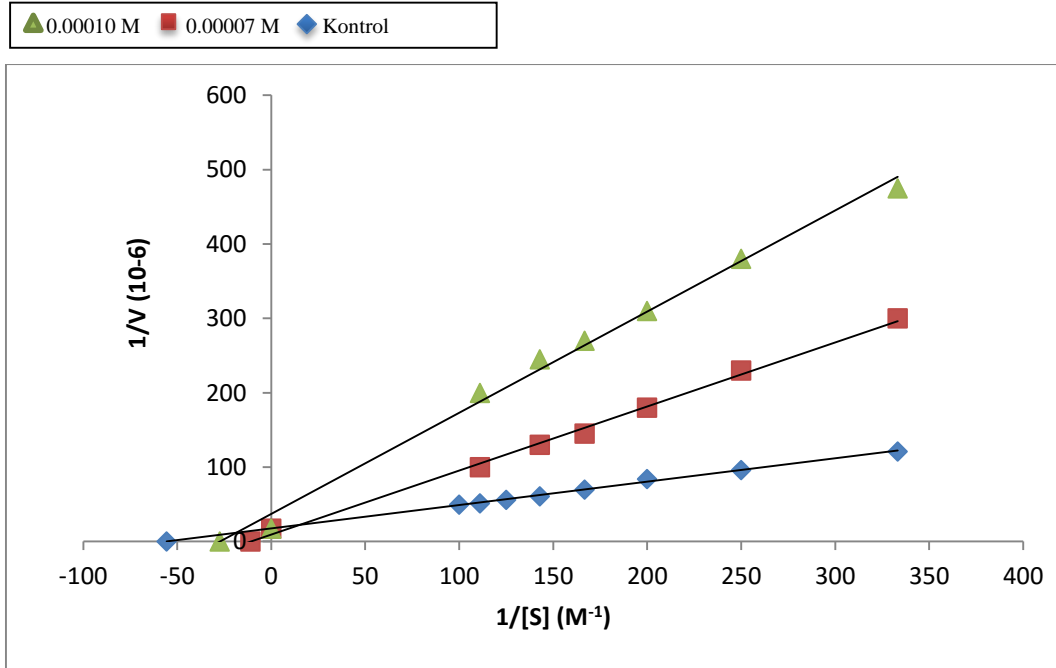
**Şekil 3.30:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



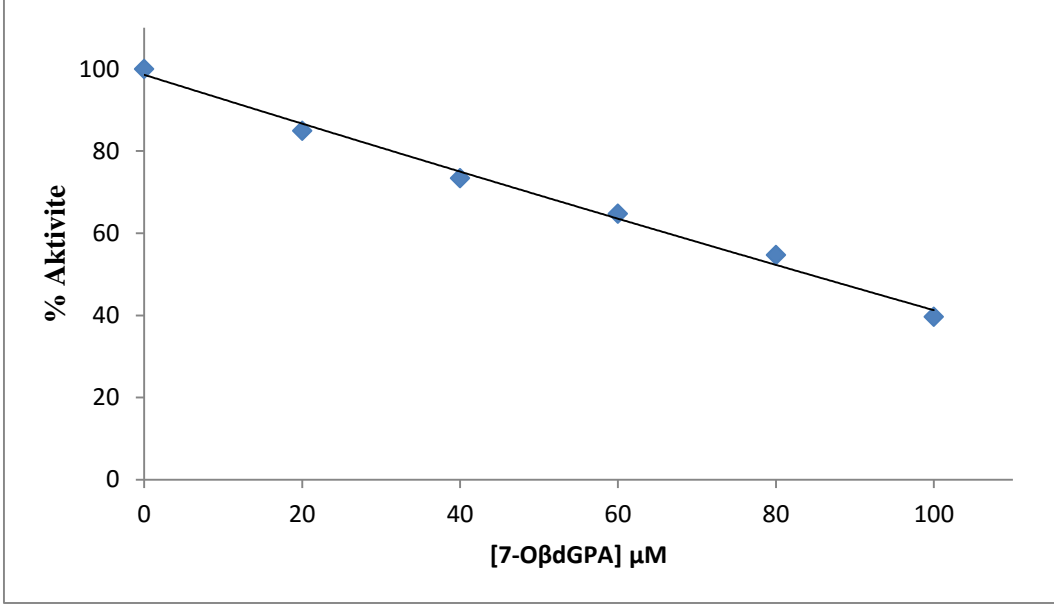
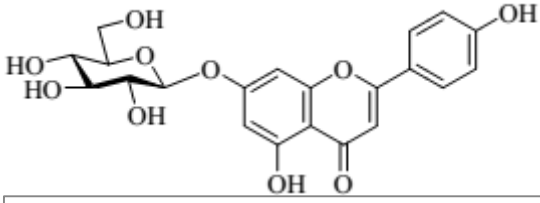
**Şekil 3.31:** Muz PPO enzimi üzerine 4'-(4-klorofeniltiyöürenil)-7-hidroksi-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



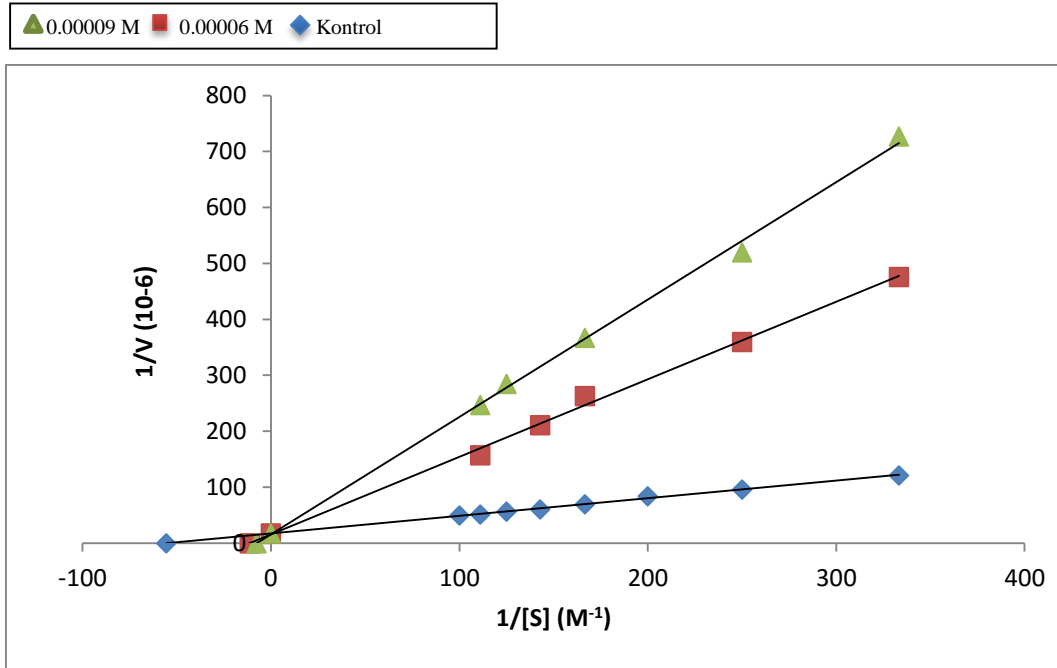
Şekil 3.32: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-glikozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



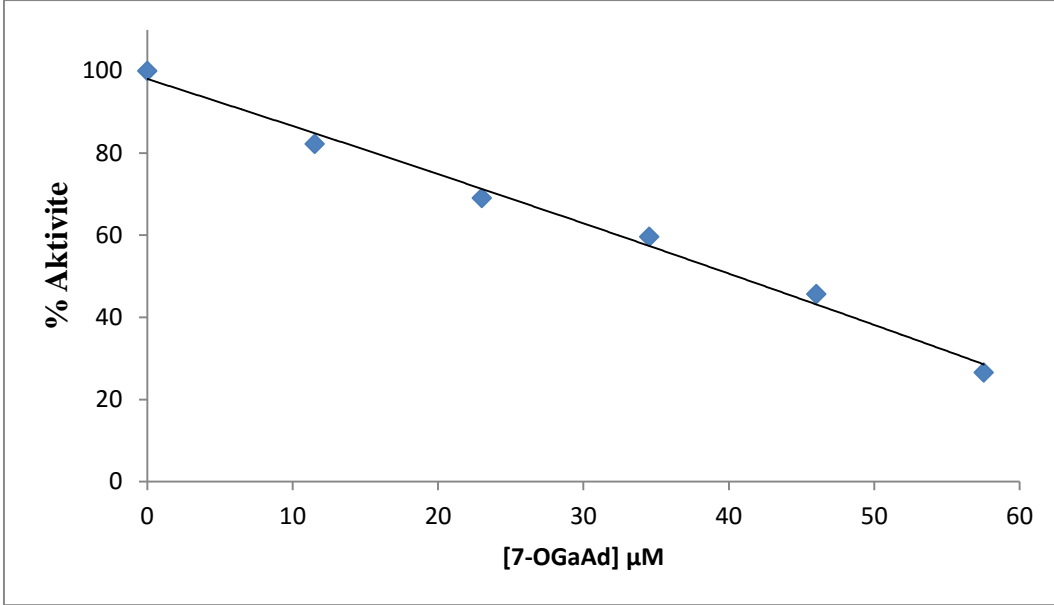
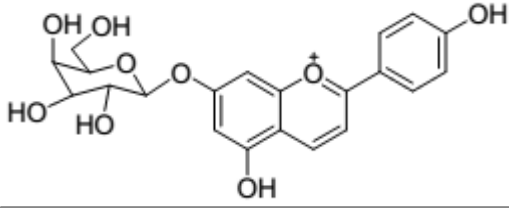
Şekil 3.33: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-glikozil-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



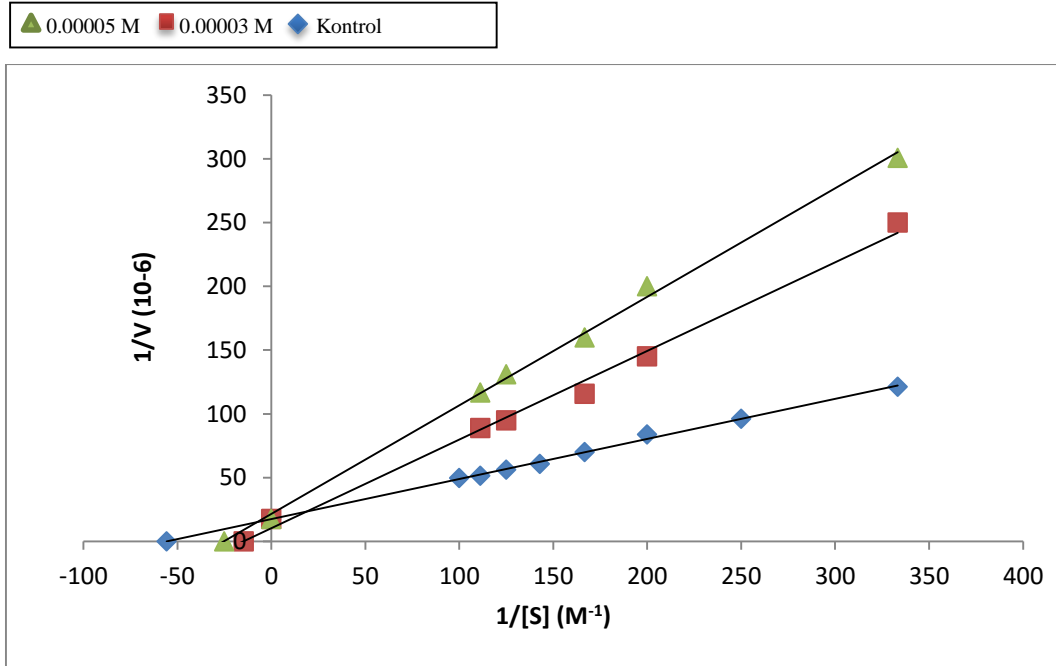
Şekil 3.34: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-d-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



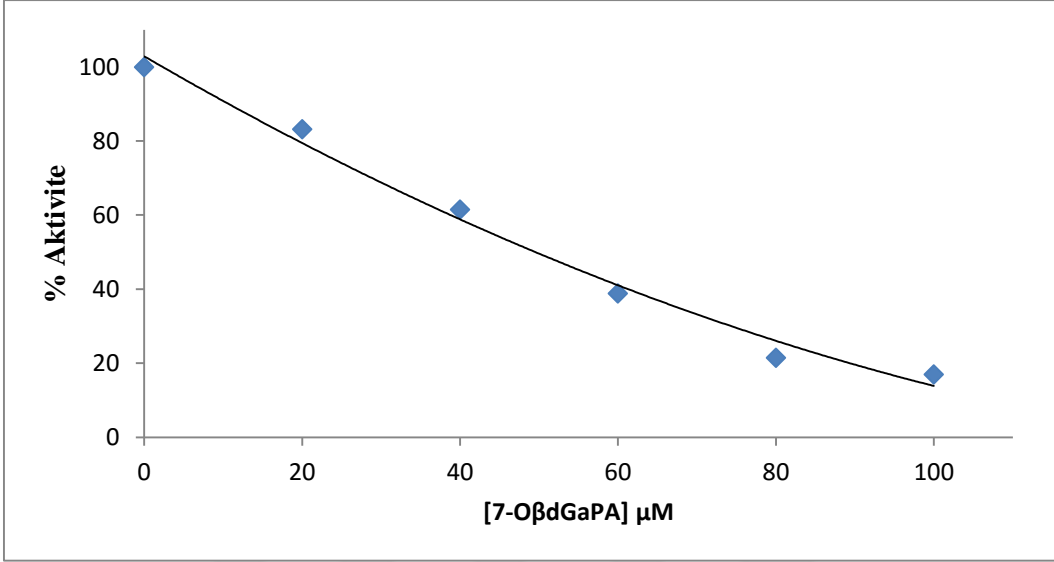
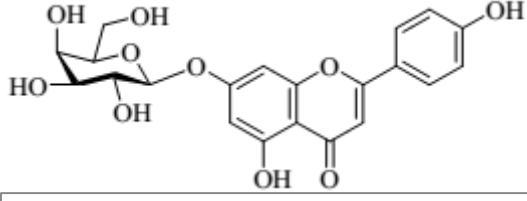
Şekil 3.35: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-d-glikopiranozil-apigenin'nin inhibisyon etkisi.



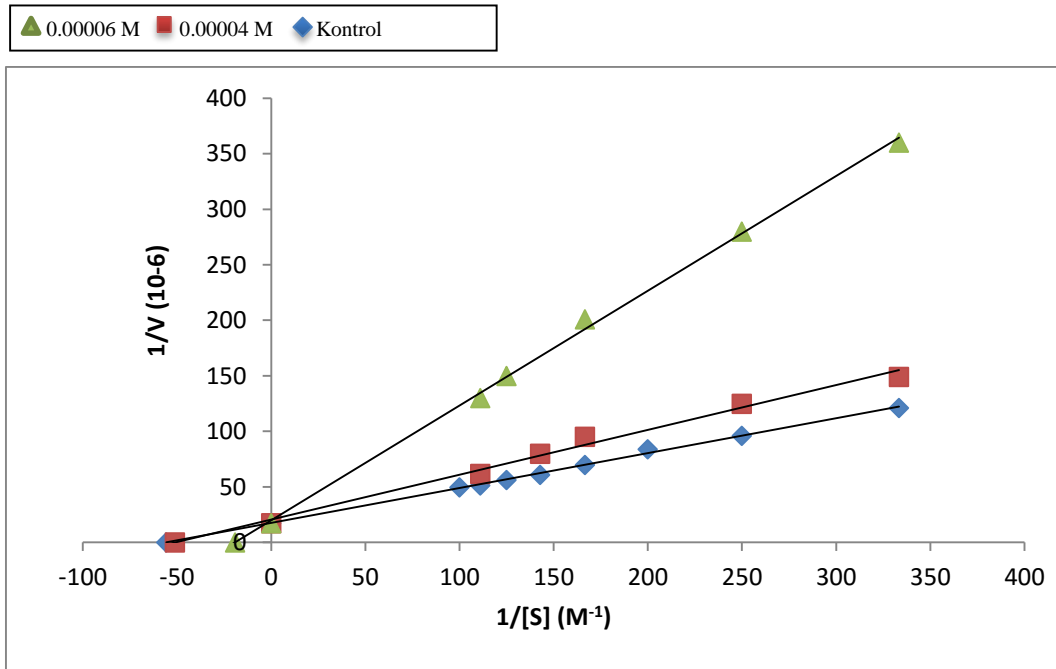
Şekil 3.36: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-galaktozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



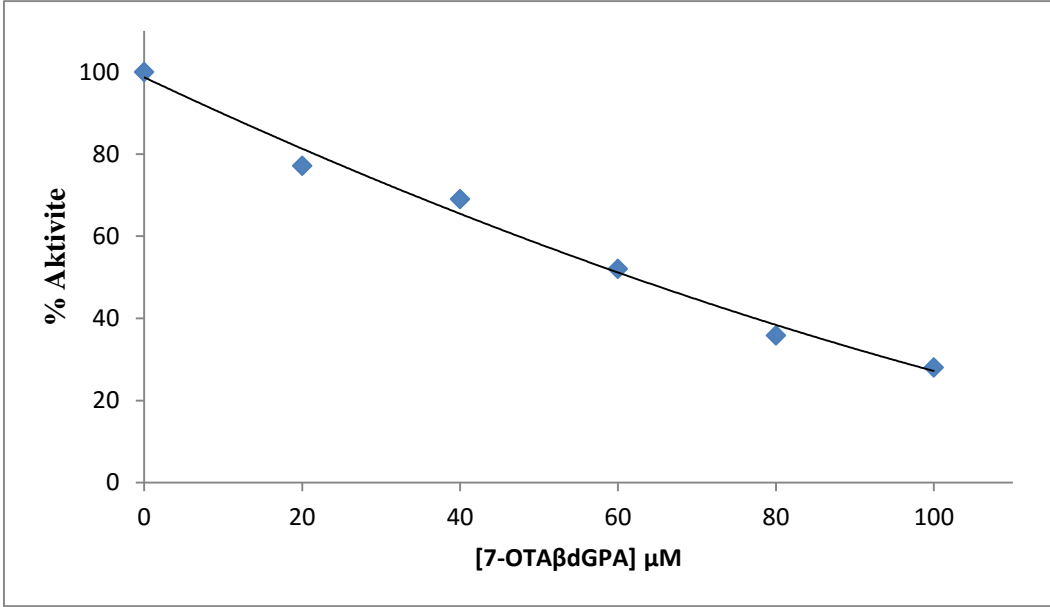
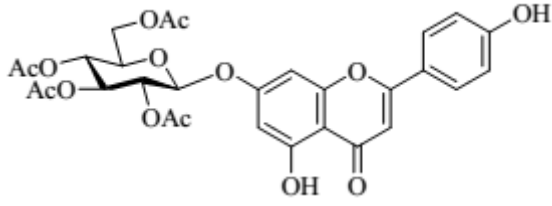
Şekil 3.37: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-galaktozil-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



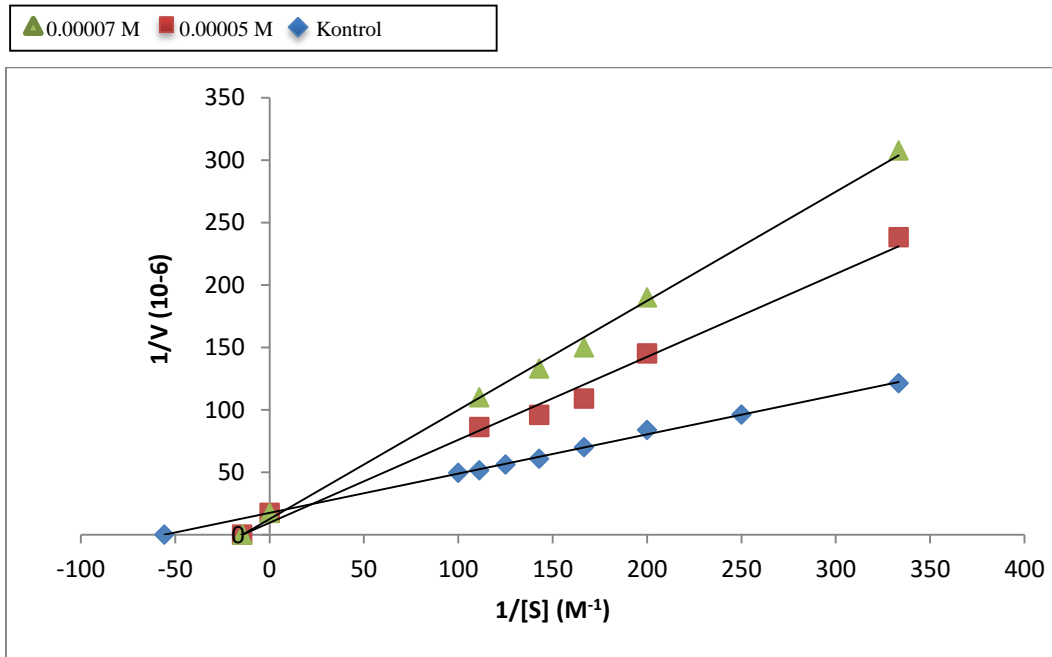
**Şekil 3.38:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-d-galaktopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



**Şekil 3.39:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-d-galaktopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.

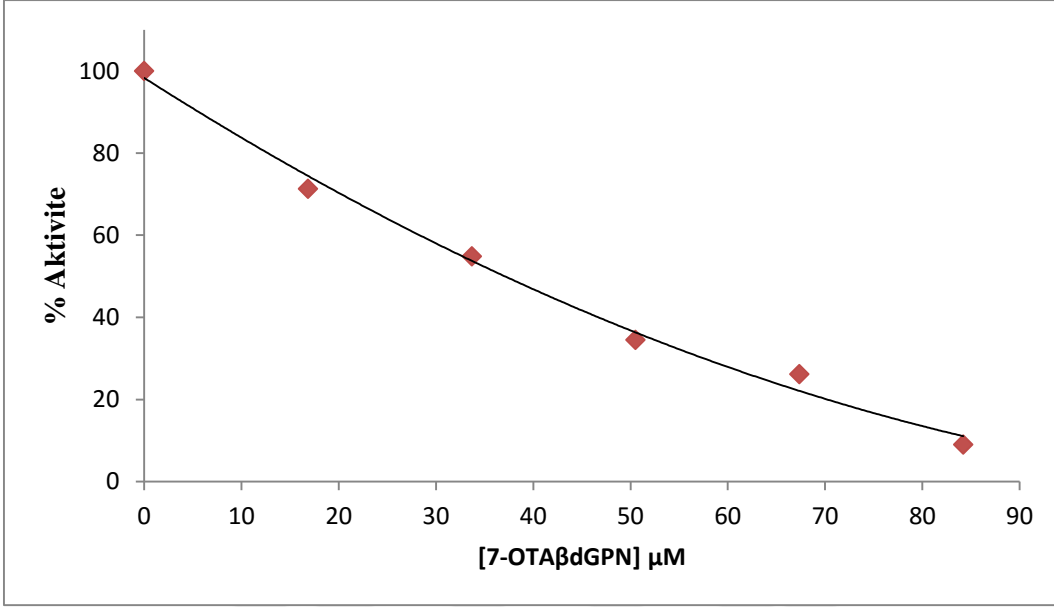
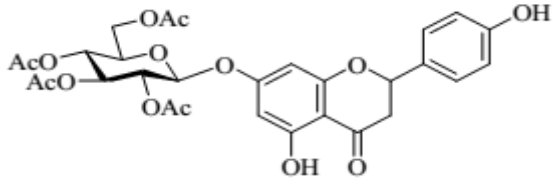


Şekil 3.40: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.

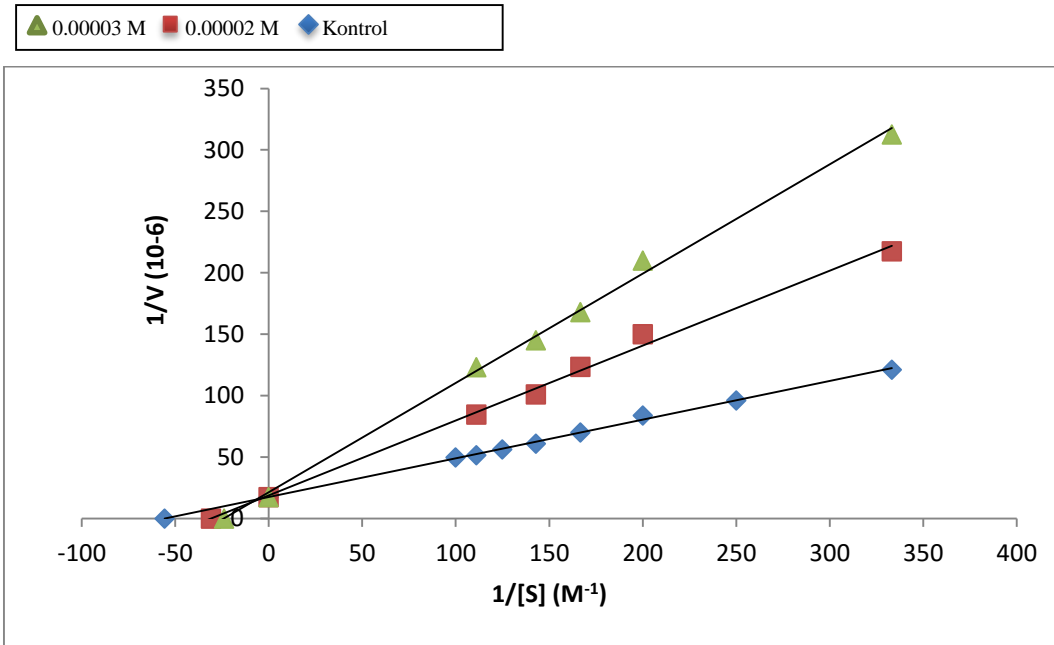


Şekil 3.41: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.

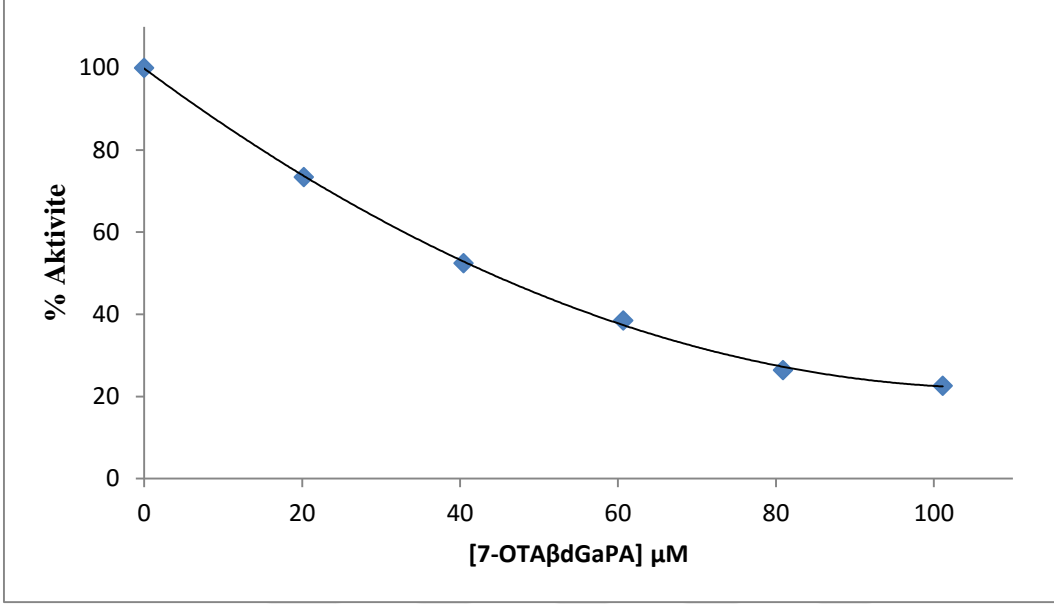
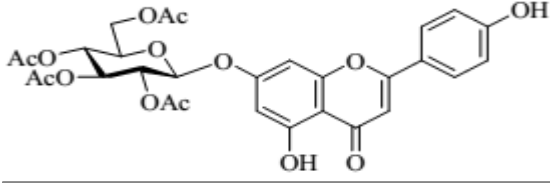




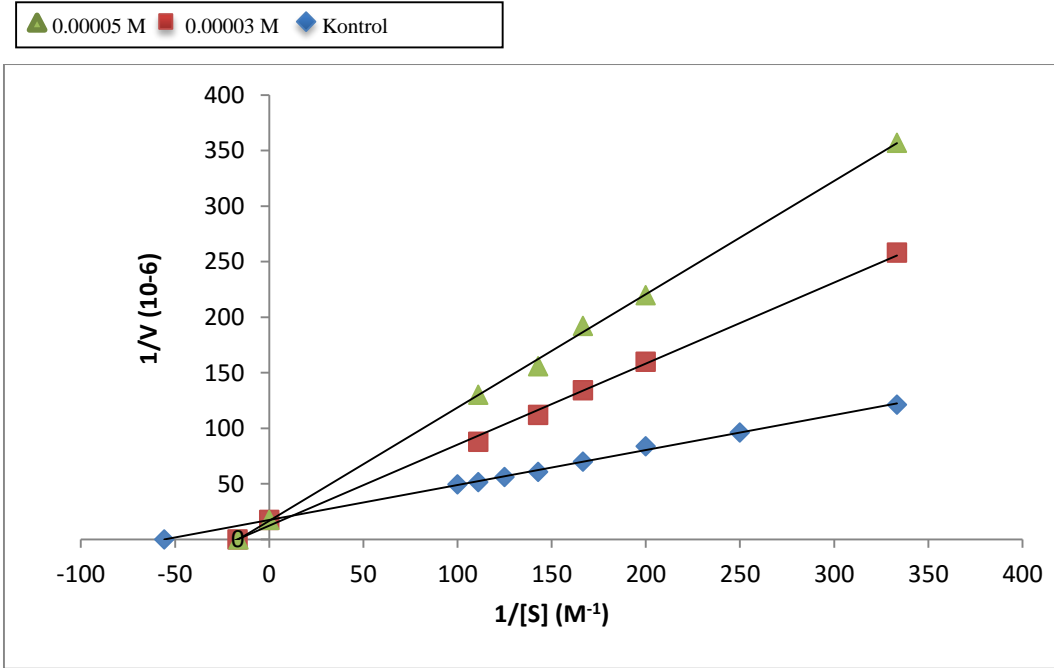
Şekil 3.42: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-glikopiranozil)-naringenin için % aktivite – [I] grafiği.



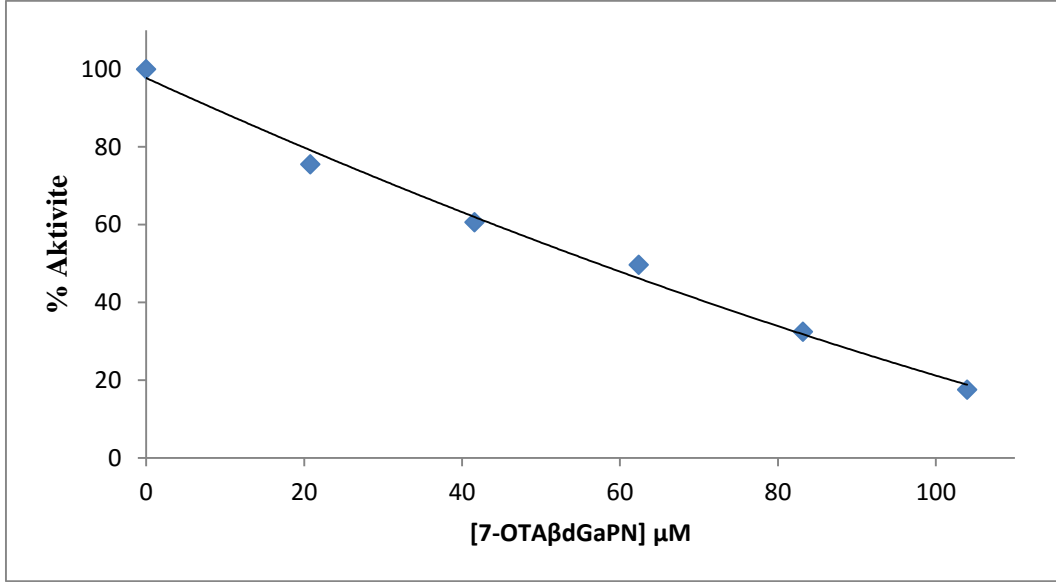
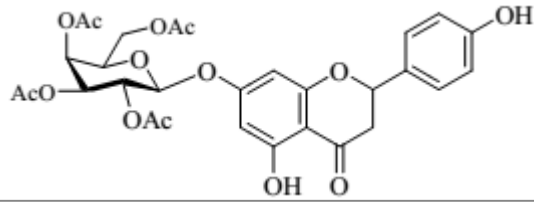
Şekil 3.43: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-glikopiranozil)-naringenin'nin inhibisyon etkisi.



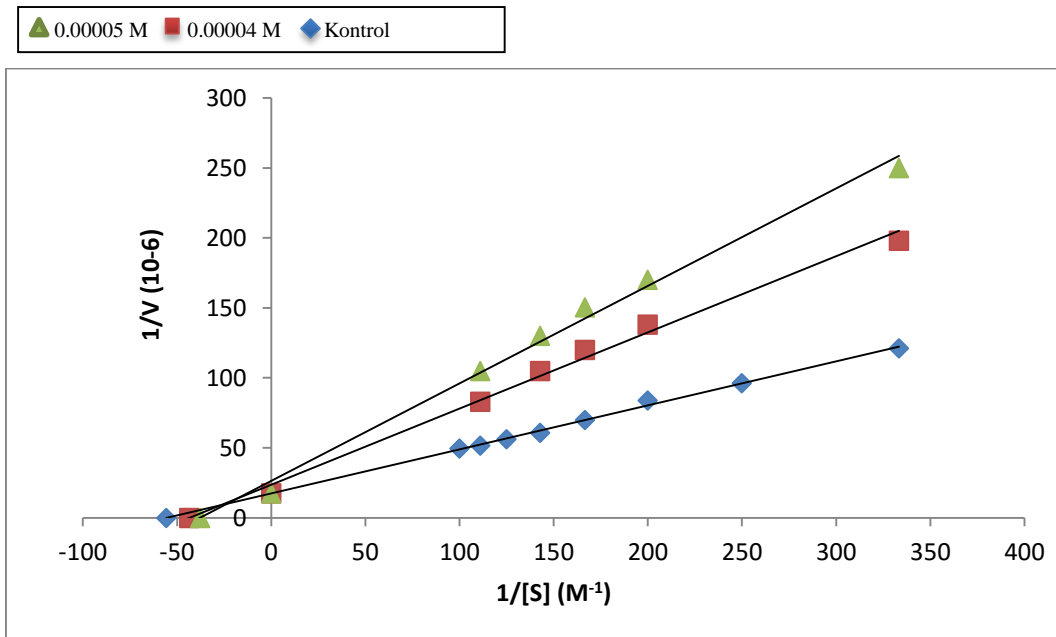
**Şekil 3.44:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-galaktopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



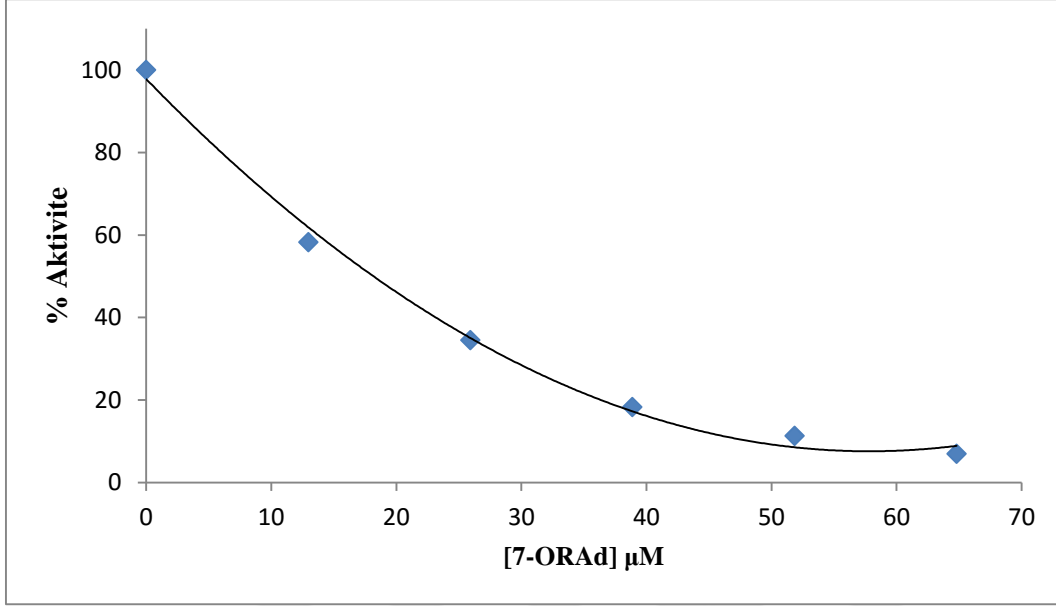
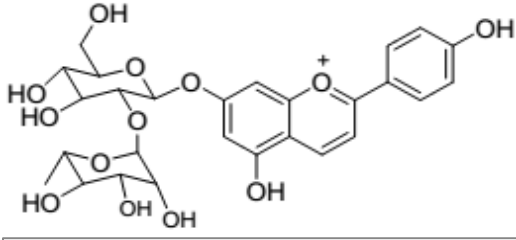
**Şekil 3.45:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil- $\beta$ -d-galaktopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.



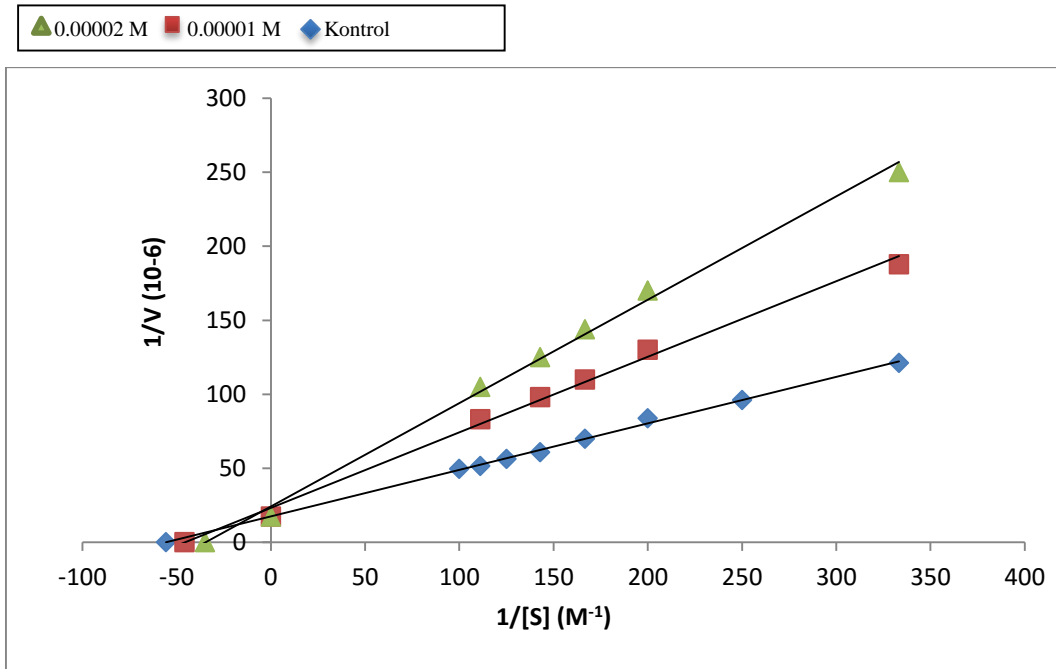
Şekil 3.46: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-naringenin için % aktivite – [I] grafiği.



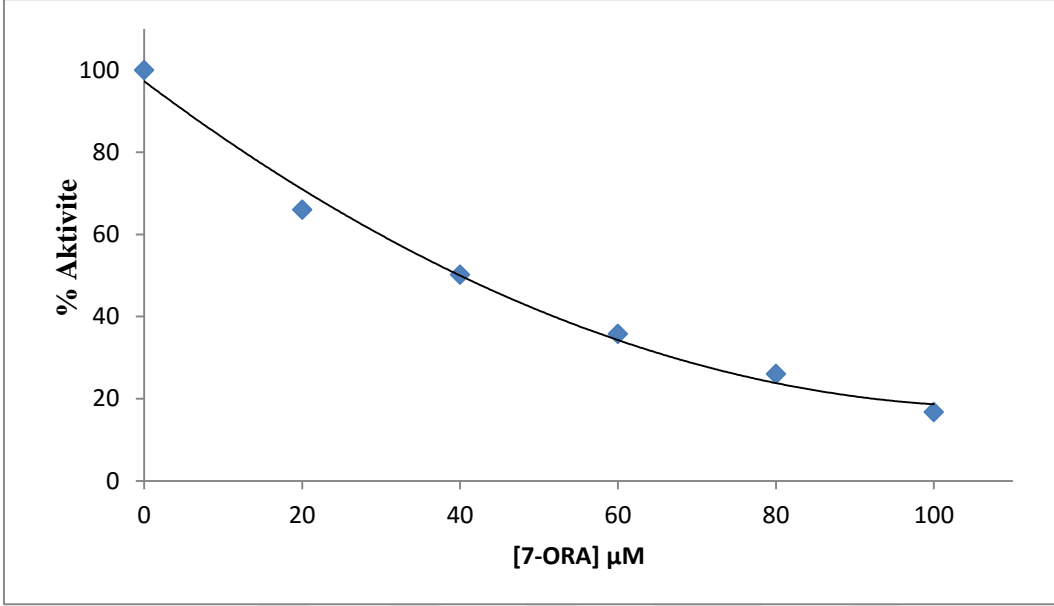
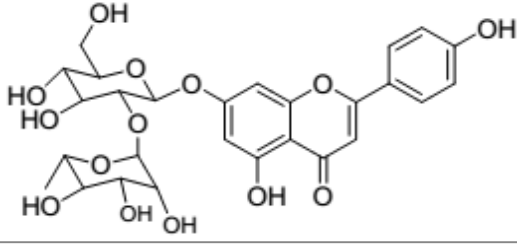
Şekil 3.47: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(2,3,4,6-Tetraasetil-β-d-galaktopiranozil)-naringenin'in inhibisyon etkisi.



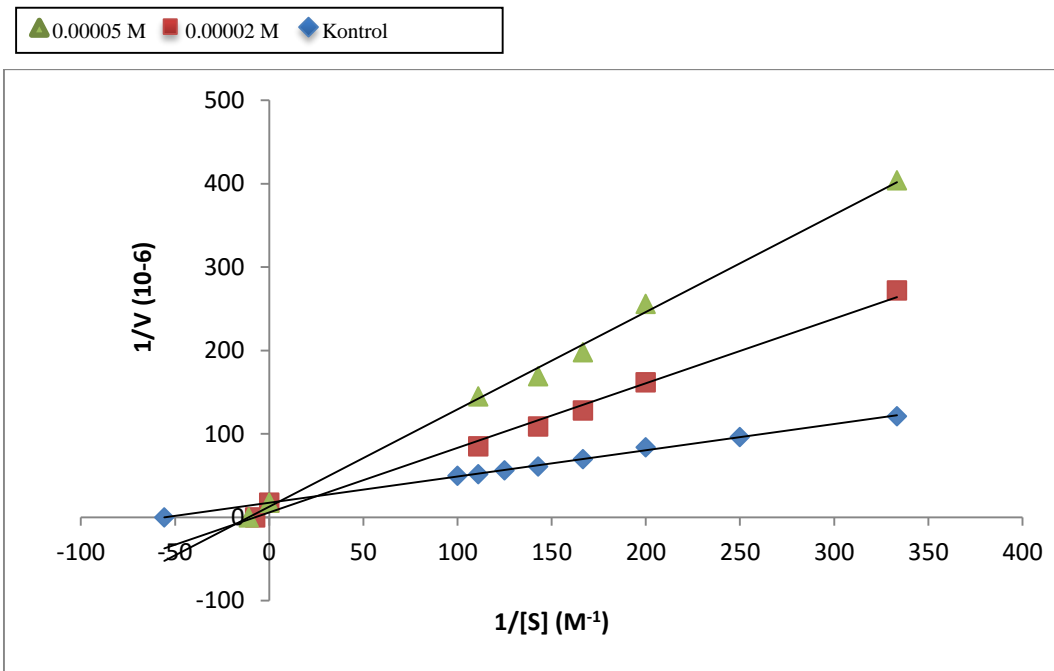
Şekil 3.48: Muz PPO enzimi üzerine 0.1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



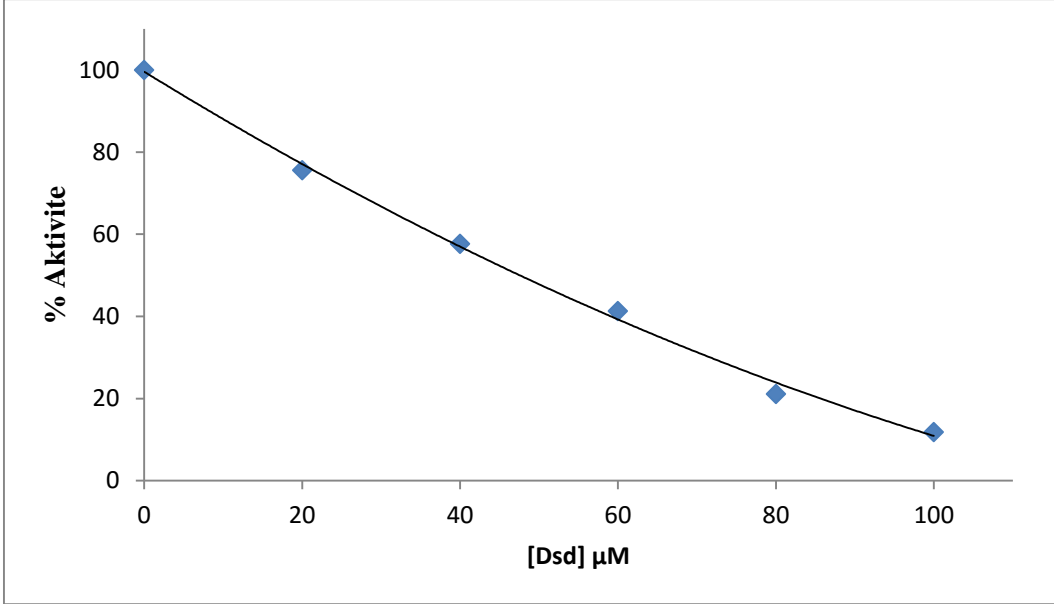
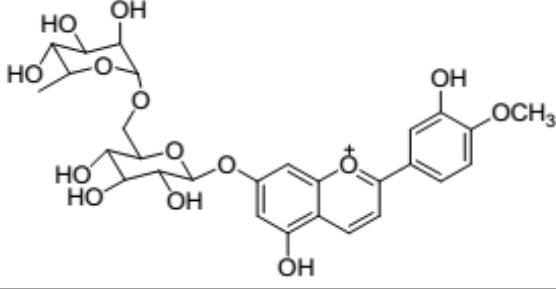
Şekil 3.49: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil apigenidin'in inhibisyon etkisi.



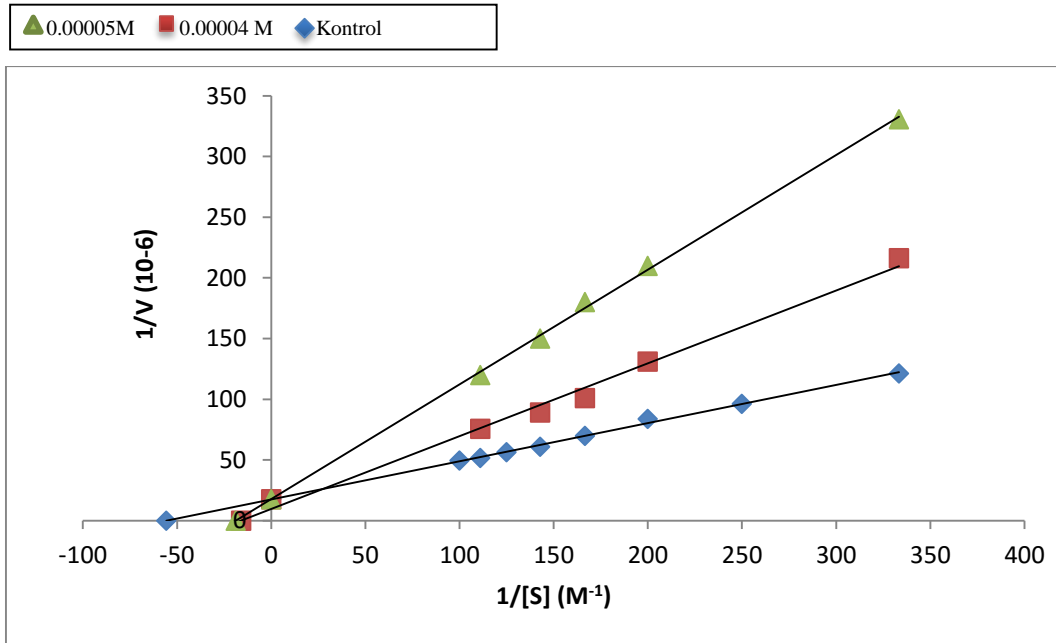
Şekil 3.50: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



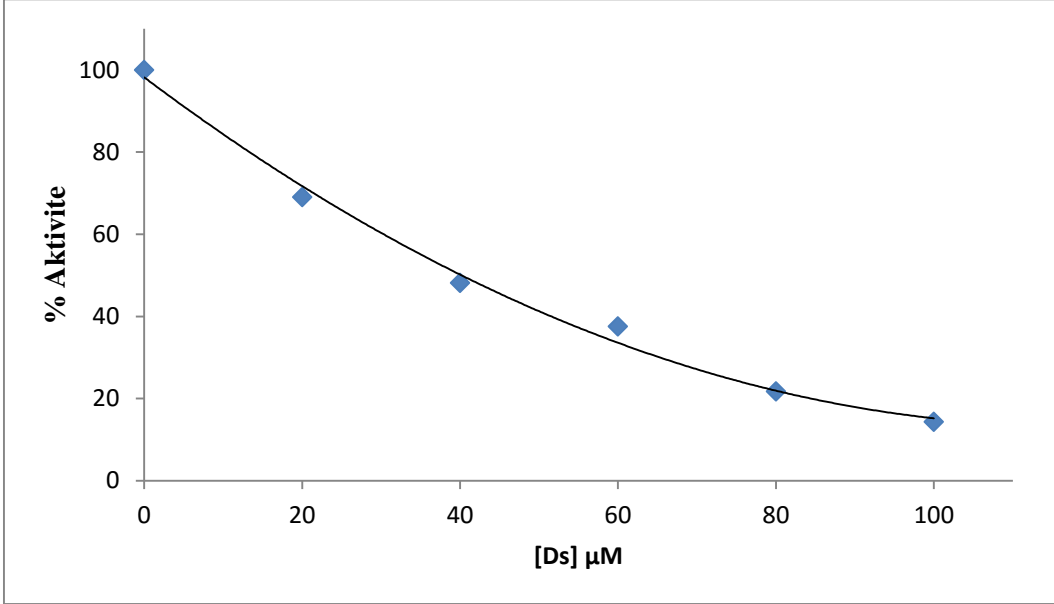
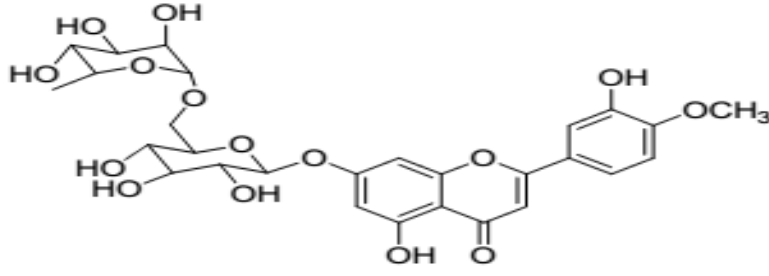
Şekil 3.51: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil apigenin'in inhibisyon etkisi.



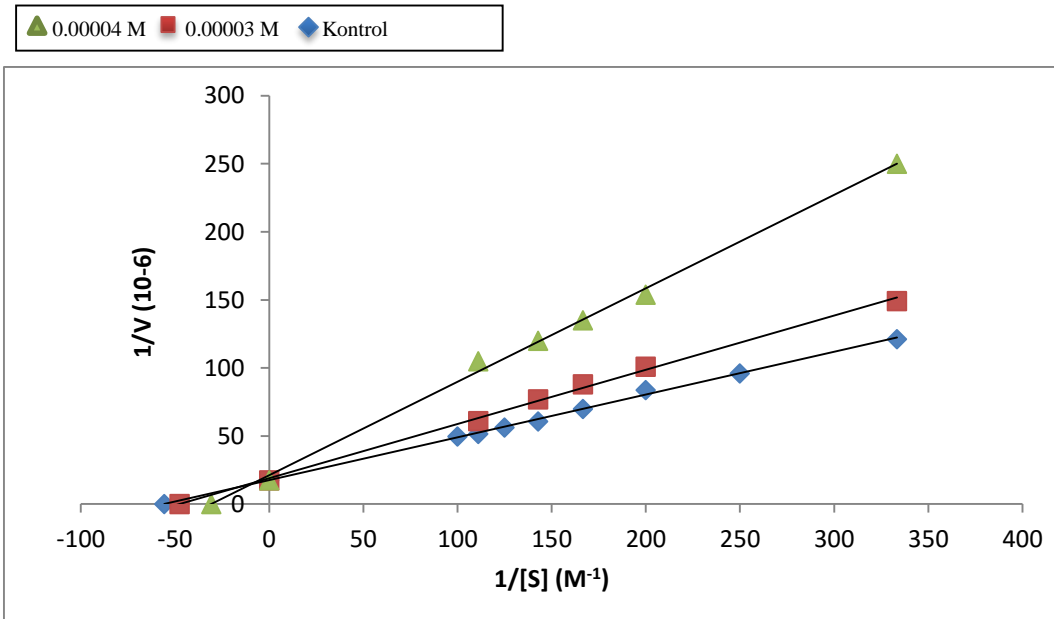
Şekil 3.52: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Diosmidin için % aktivite – [I] grafiği.



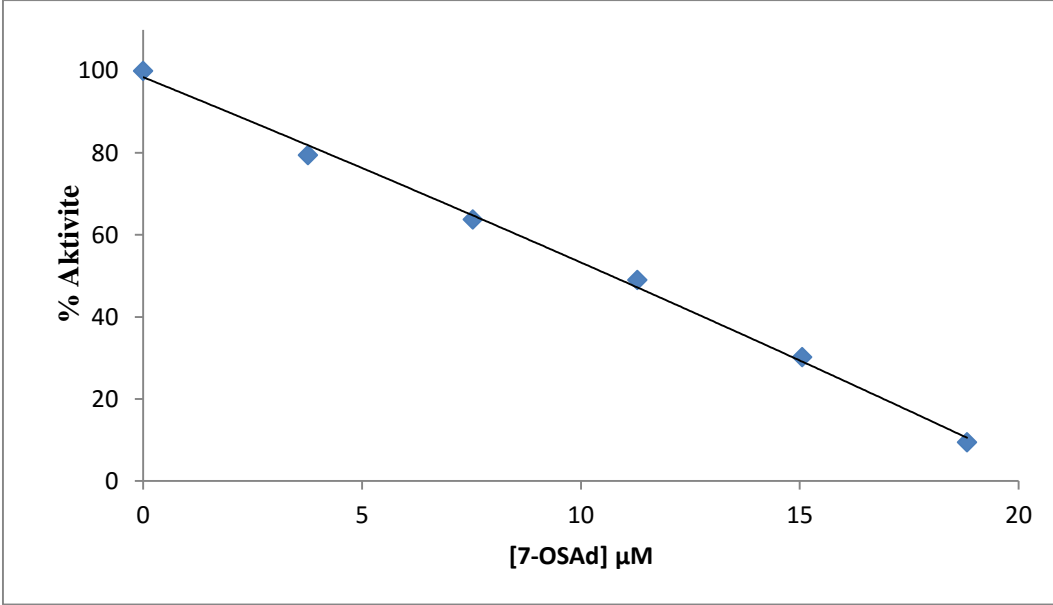
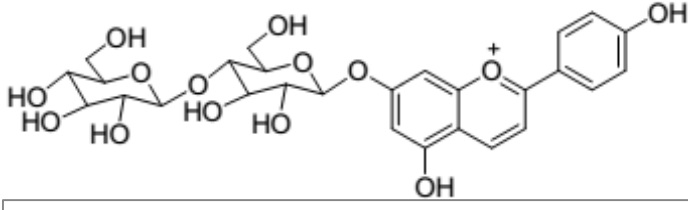
Şekil 3.53: Muz PPO enzimi üzerine Diosmidin'in inhibisyon etkisi.



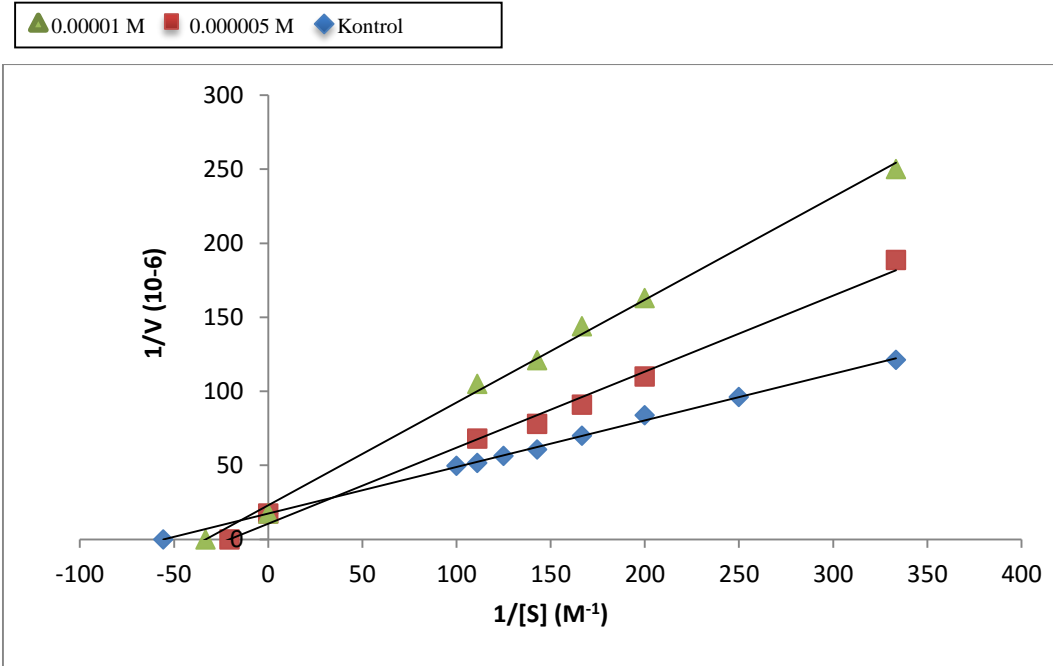
Şekil 3.54: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Diosmin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.55: Muz PPO enzimi üzerine Diosmin'in inhibisyon etkisi.

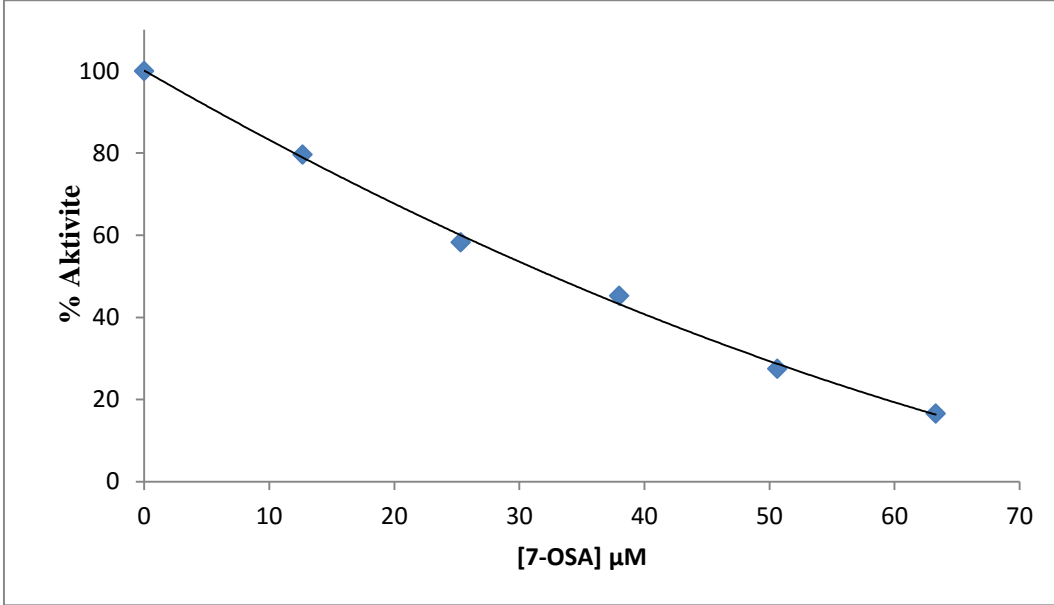
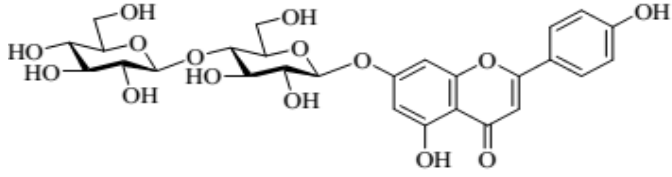


Şekil 3.56: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-sellebiyozil apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.

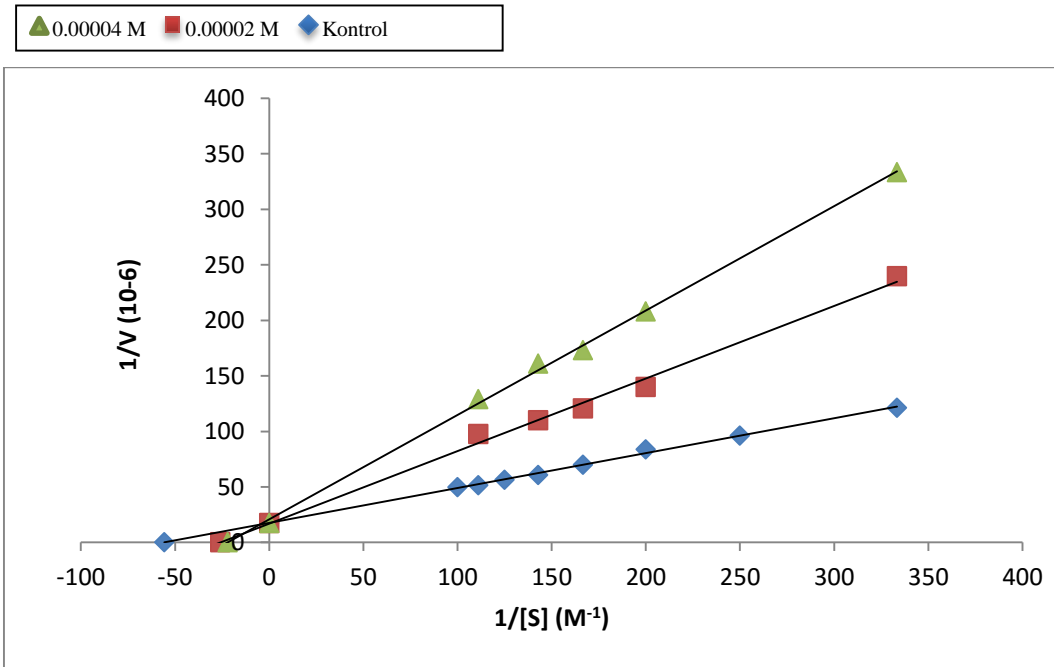


Şekil 3.57: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-sellebiyozil apigenidin'in inhibisyon etkisi.

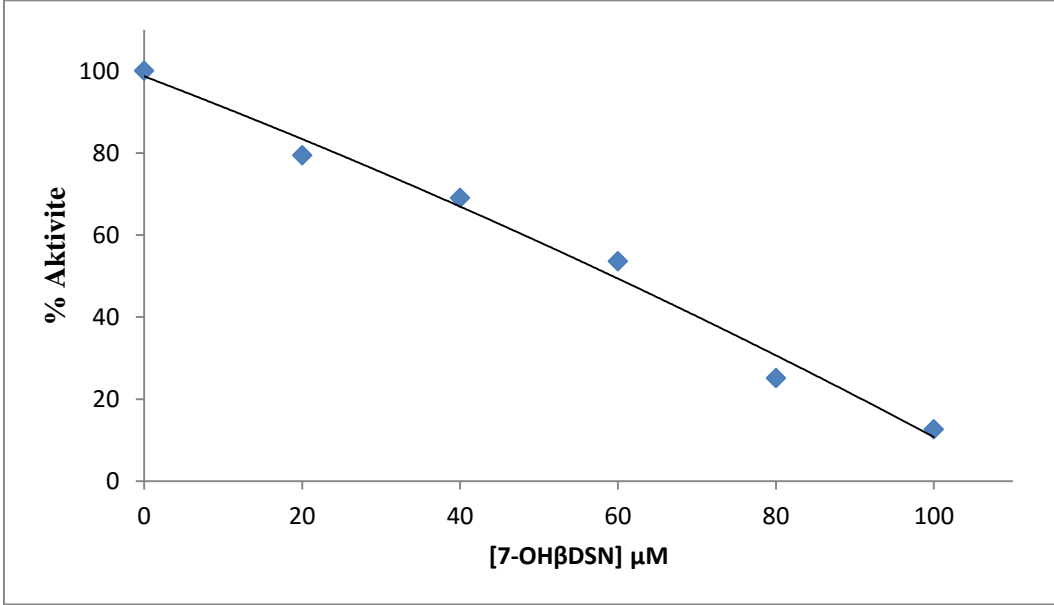
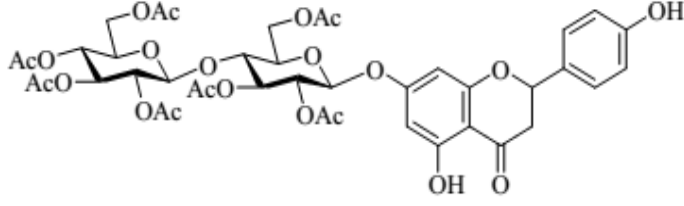




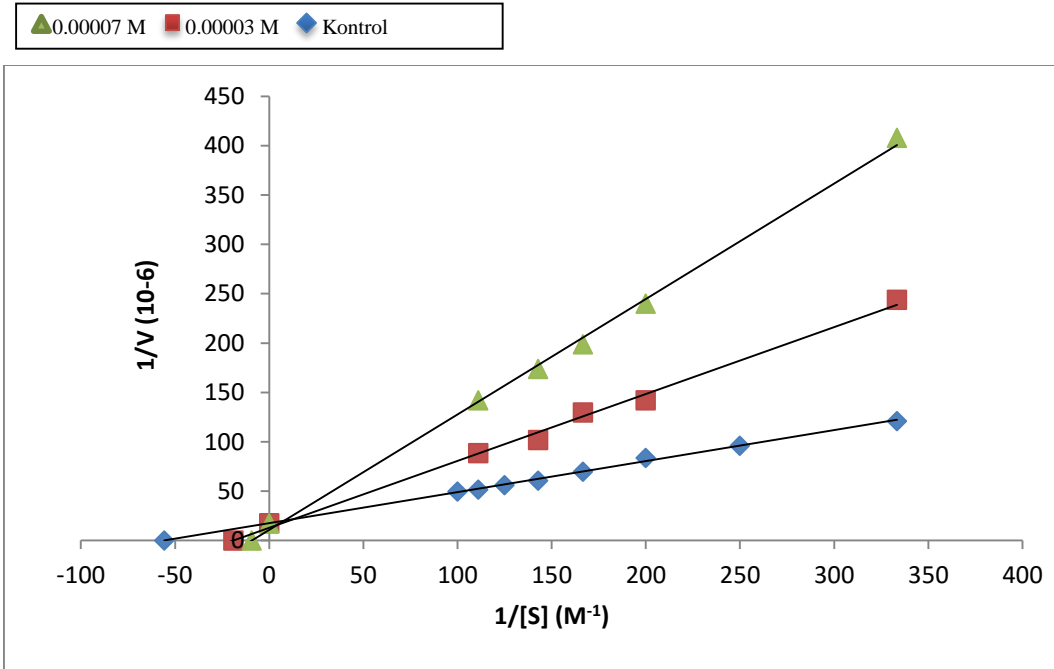
Şekil 3.58: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-sellebiyozil apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



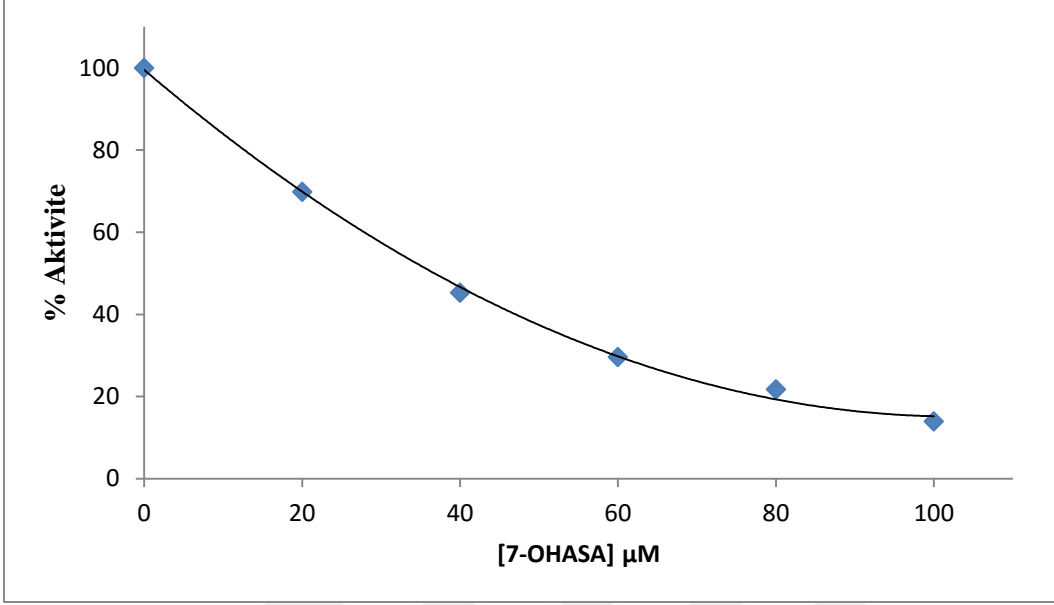
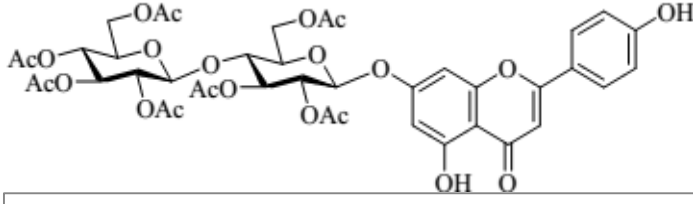
Şekil 3.59: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-sellebiyozil apigenin'in inhibisyon etkisi.



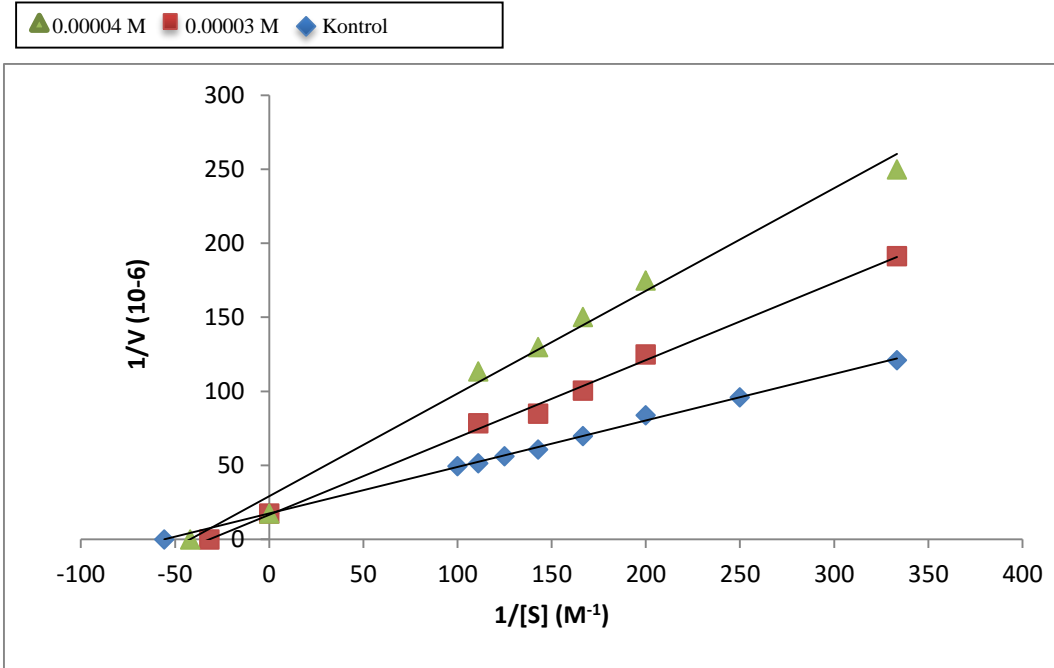
**Şekil 3.60:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-naringenin için % aktivite – [I] grafiği.



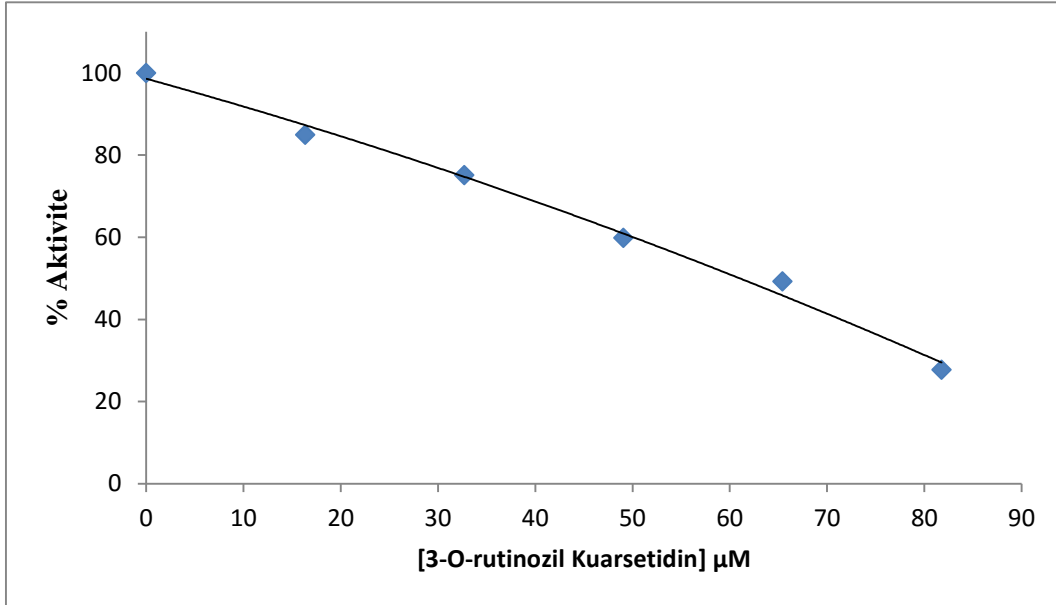
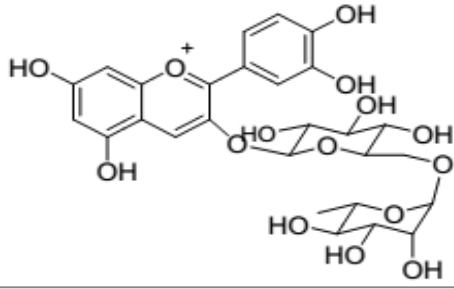
**Şekil 3.61:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-naringenin'in inhibisyon etkisi.



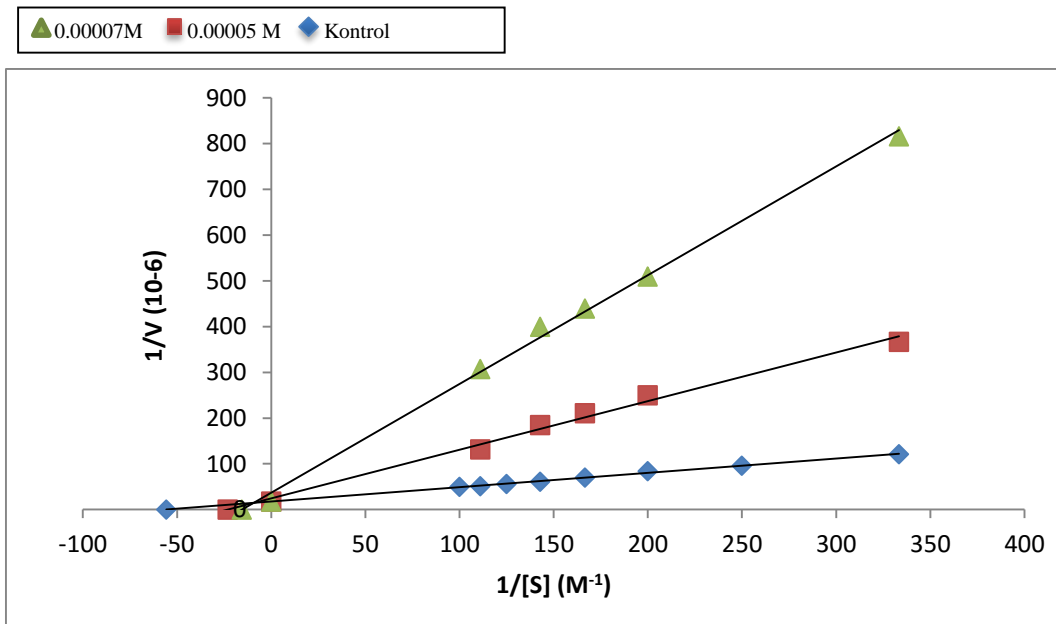
**Şekil 3.62:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-heptaasetilsellebiozil Apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



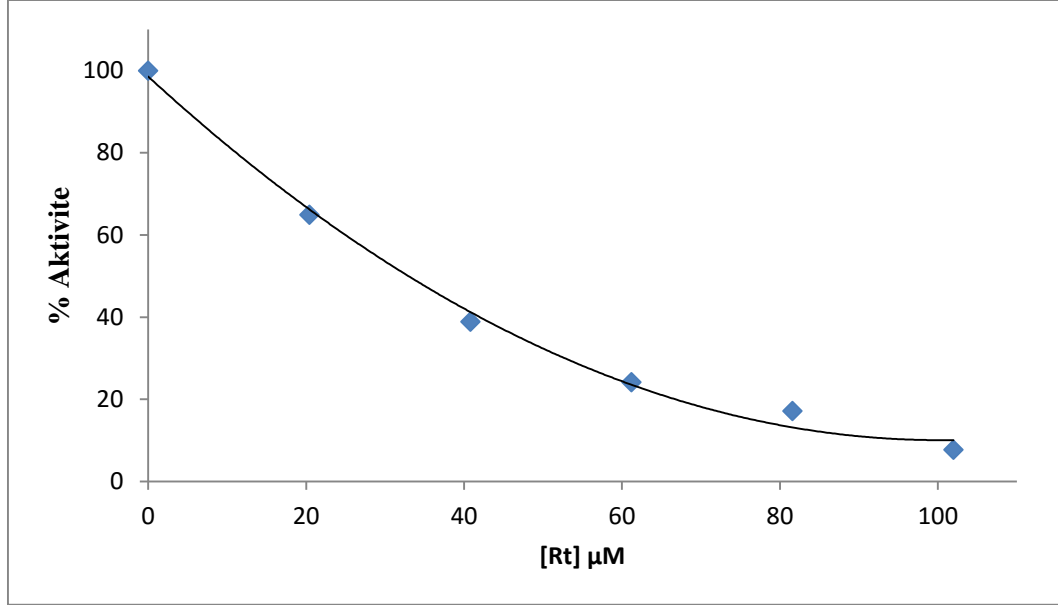
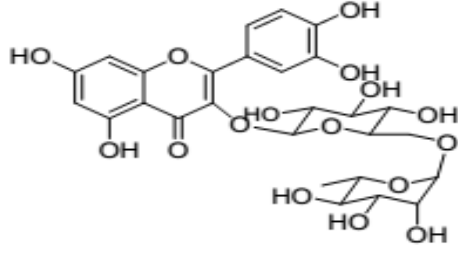
**Şekil 3.63:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-heptaasetilsellebiozil Apigenin'in inhibisyon etkisi.



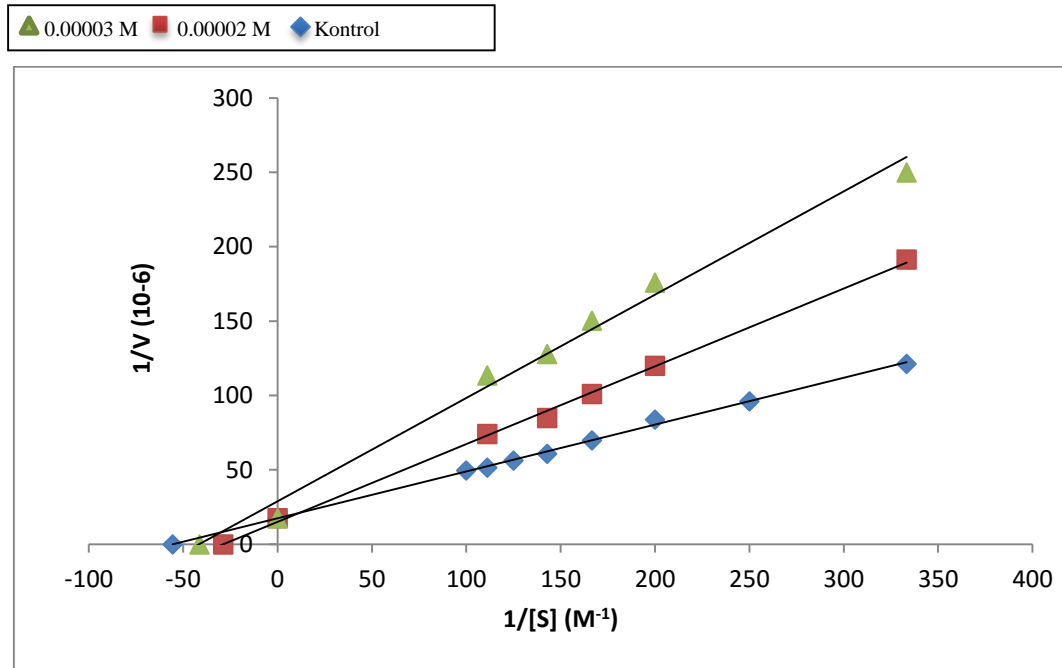
Şekil 3.64: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 3-O-rutinosil Kuarsetidin için % aktivite – [I] grafiği.



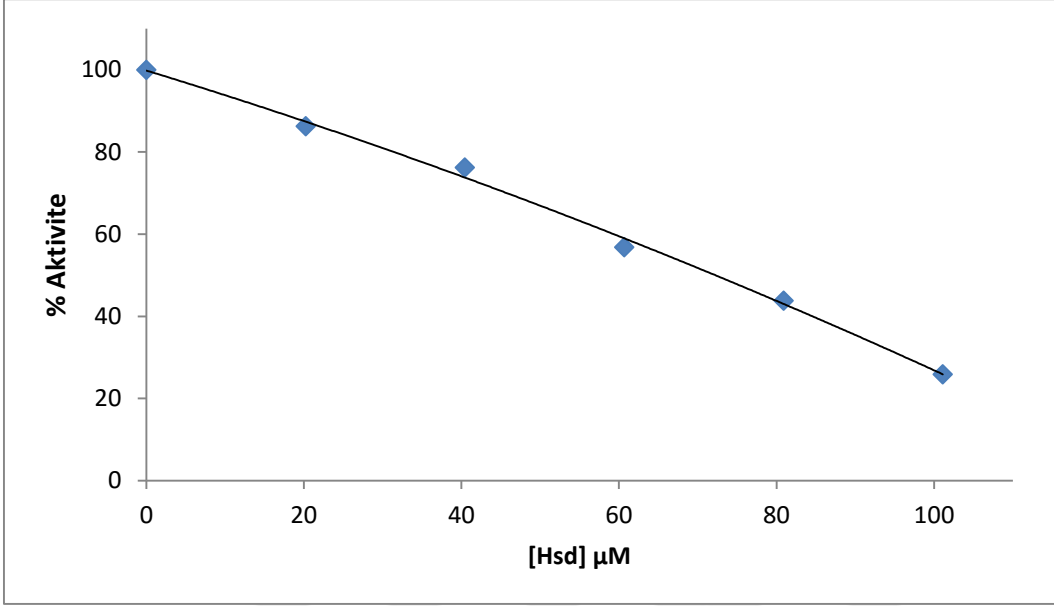
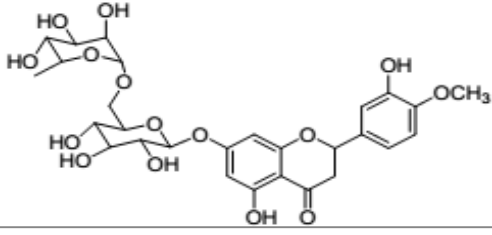
Şekil 3.65: Muz PPO enzimi üzerine 3-O-rutinosil Kuarsetidin'nin inhibisyon etkisi.



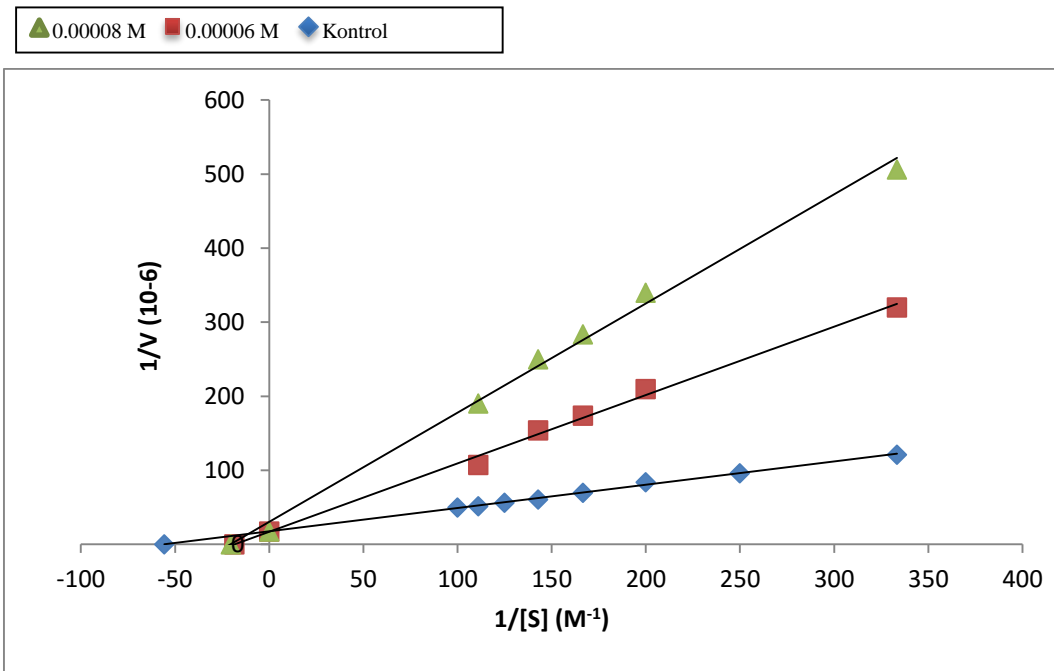
Şekil 3.66: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Rutin için % aktivite – [I] grafiği.



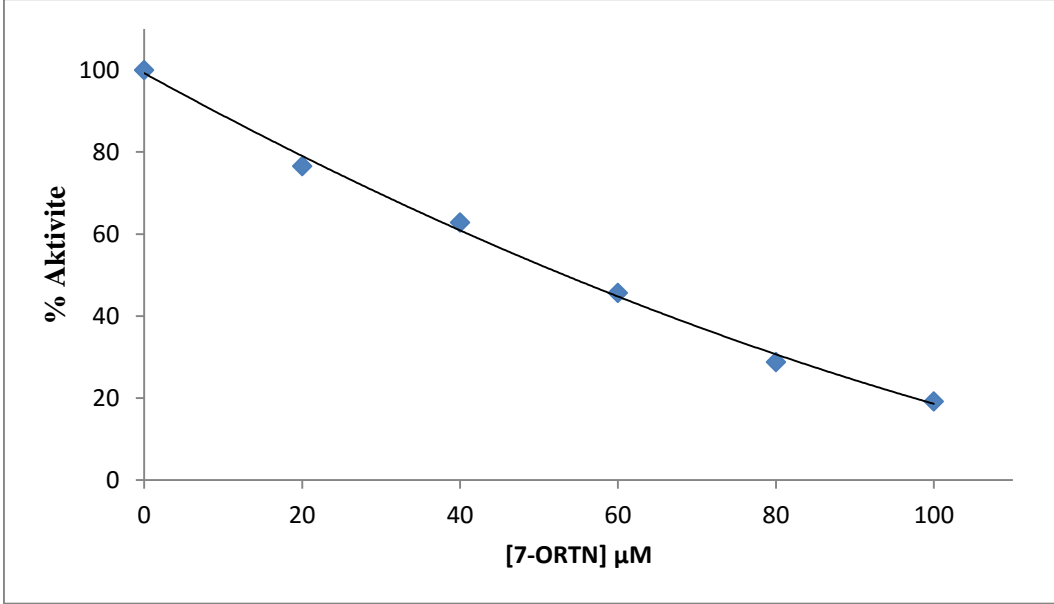
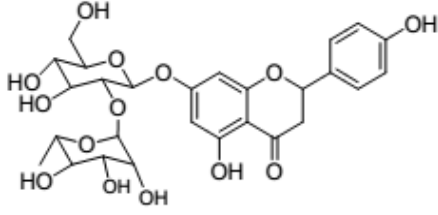
Şekil 3.67: Muz PPO enzimi üzerine Rutin'in inhibisyon etkisi.



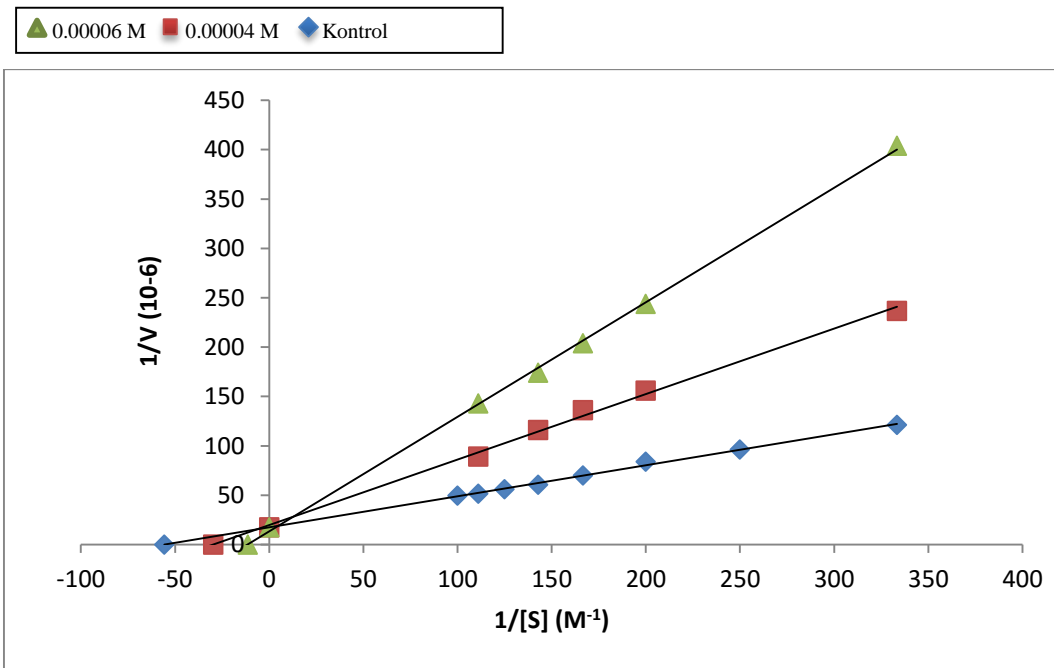
Şekil 3.68: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Hesperidin için % aktivite – [I] grafiği.



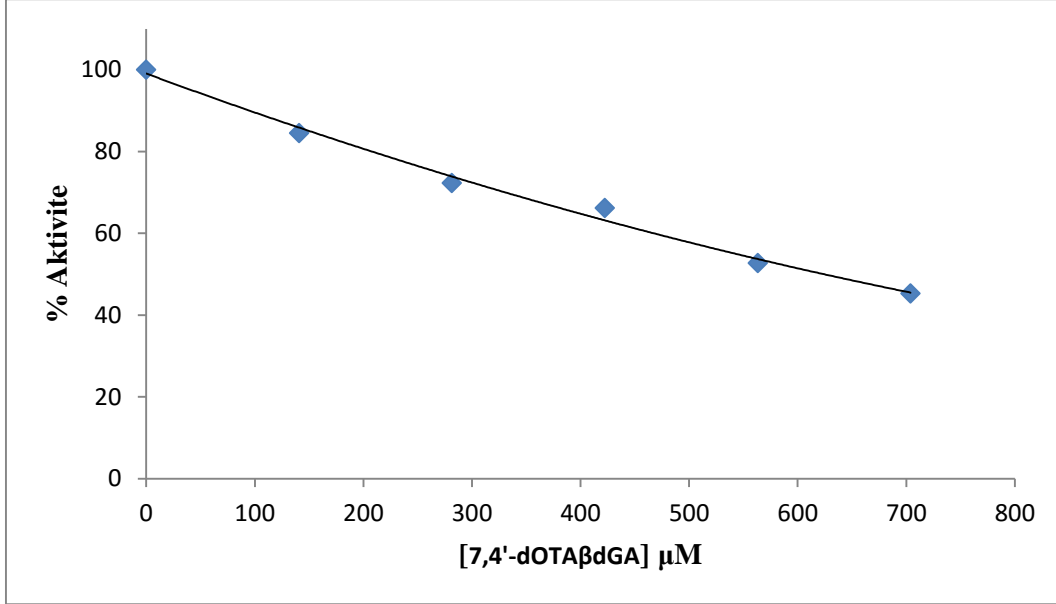
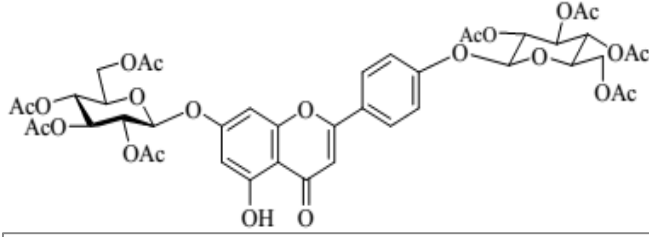
Şekil 3.69: Muz PPO enzimi üzerine Hesperidin'in inhibisyon etkisi.



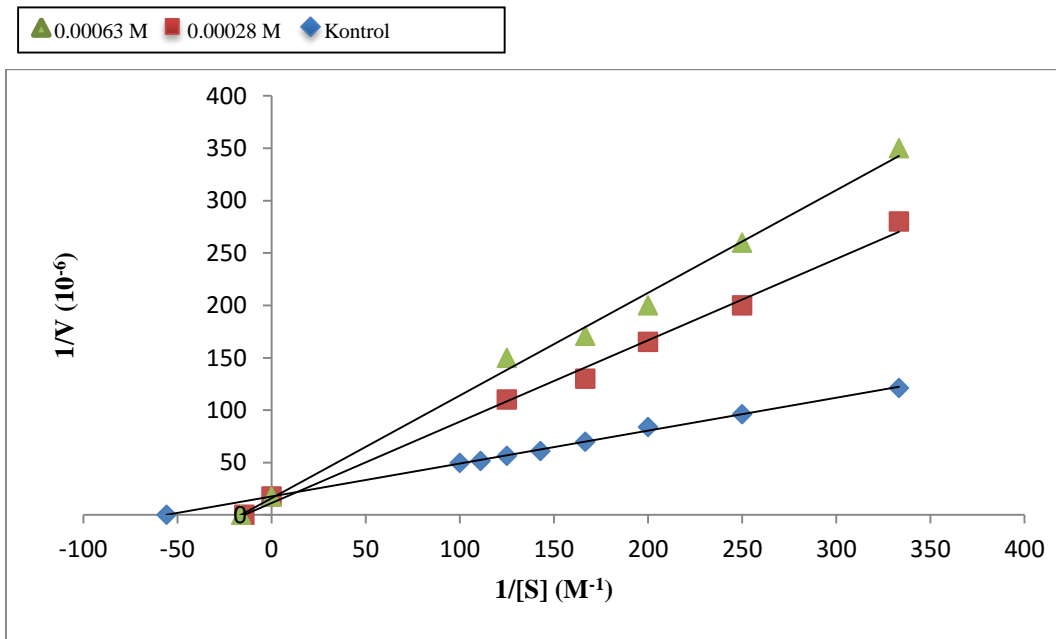
Şekil 3.70: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-rutinozil naringenin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.71: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-rutinozil naringenin'in inhibisyon etkisi.

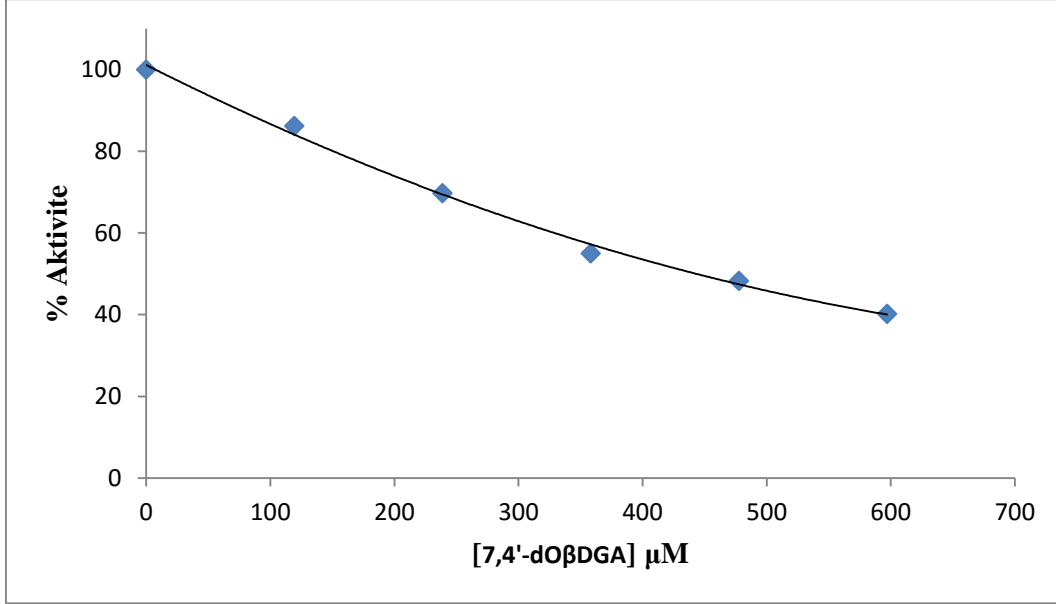
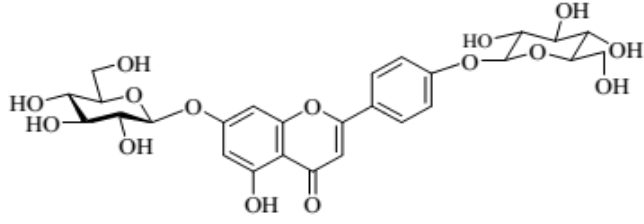


Şekil 3.72: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.

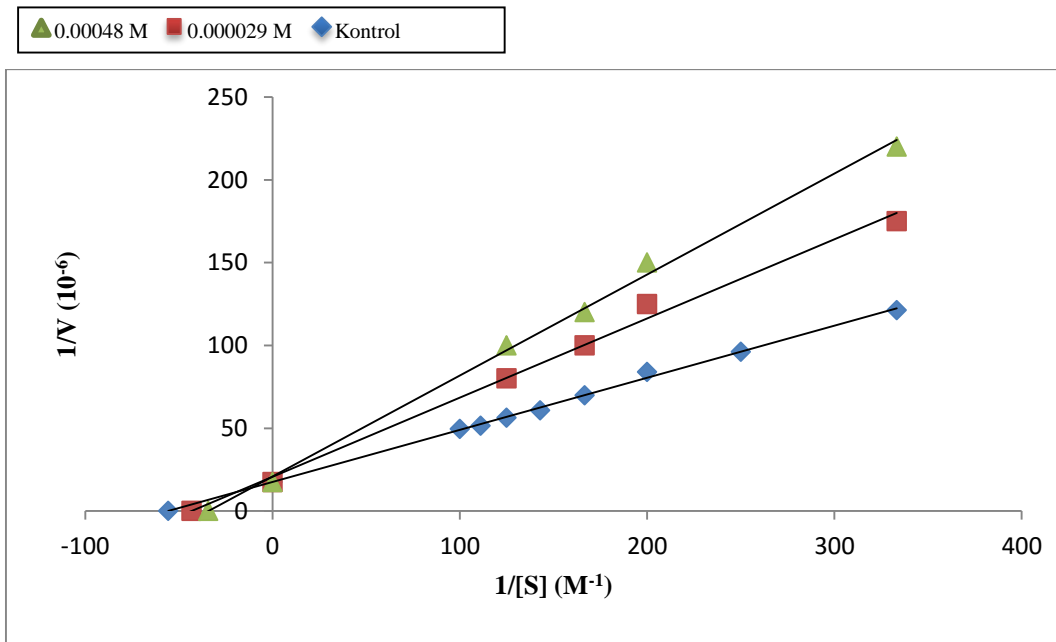


Şekil 3.73: Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.

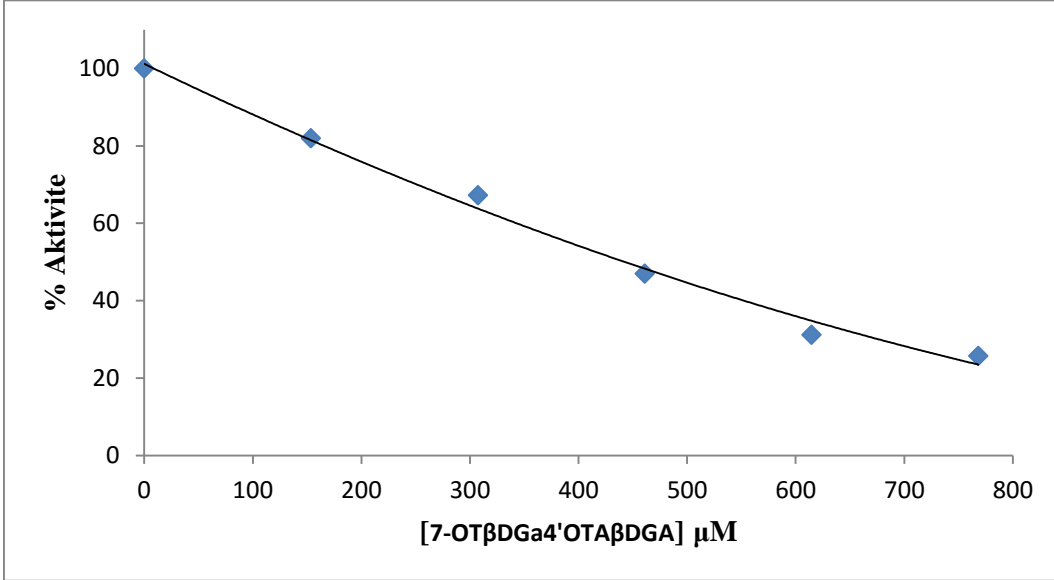
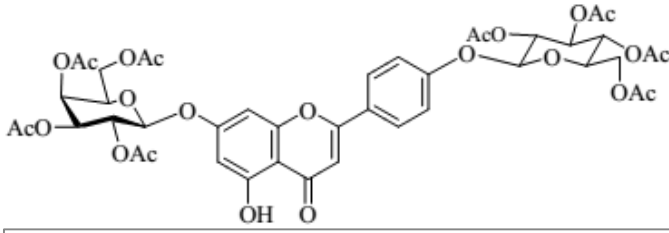




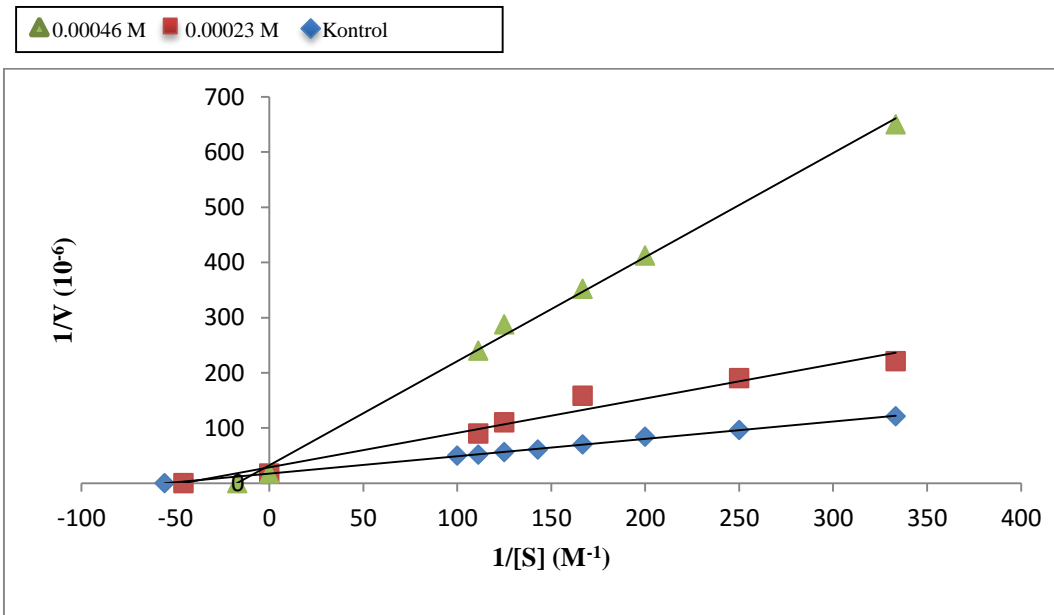
Şekil 3.74: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



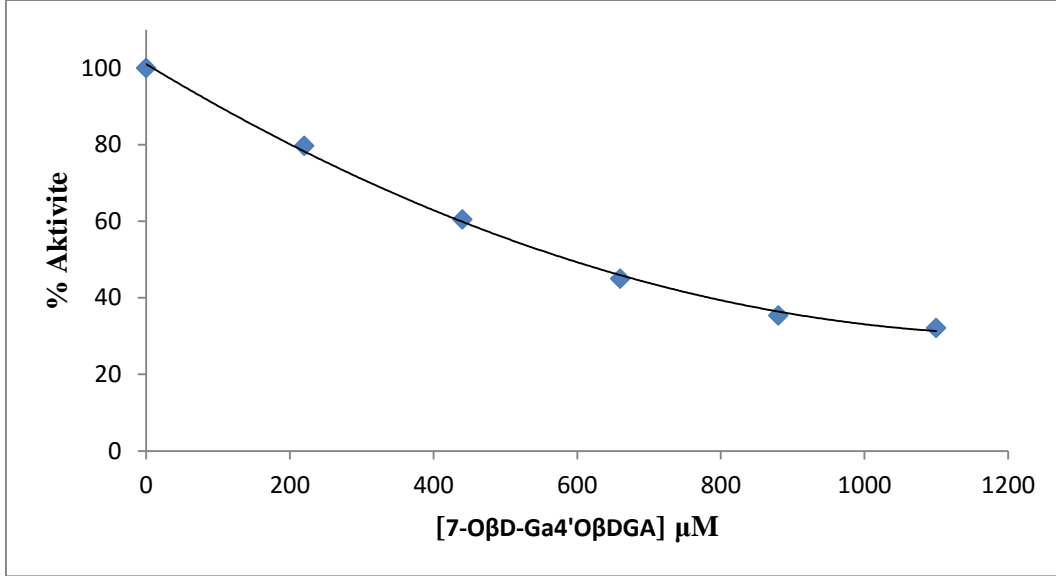
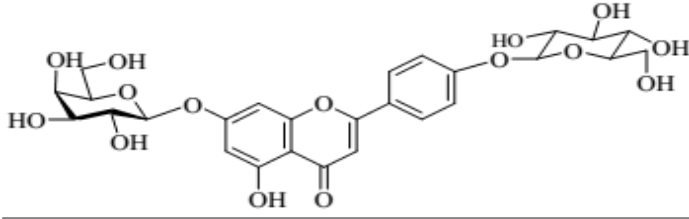
Şekil 3.75: Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin'nin inhibisyon etkisi.



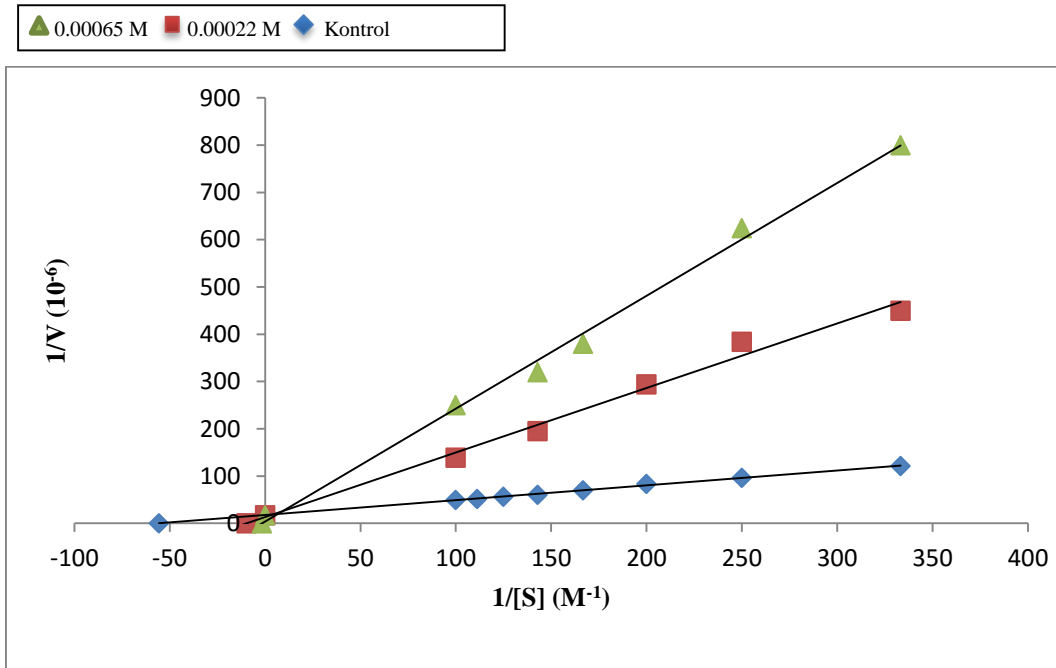
Şekil 3.76: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-Tetraasetil-β-D-galaktopiranozil-4'-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



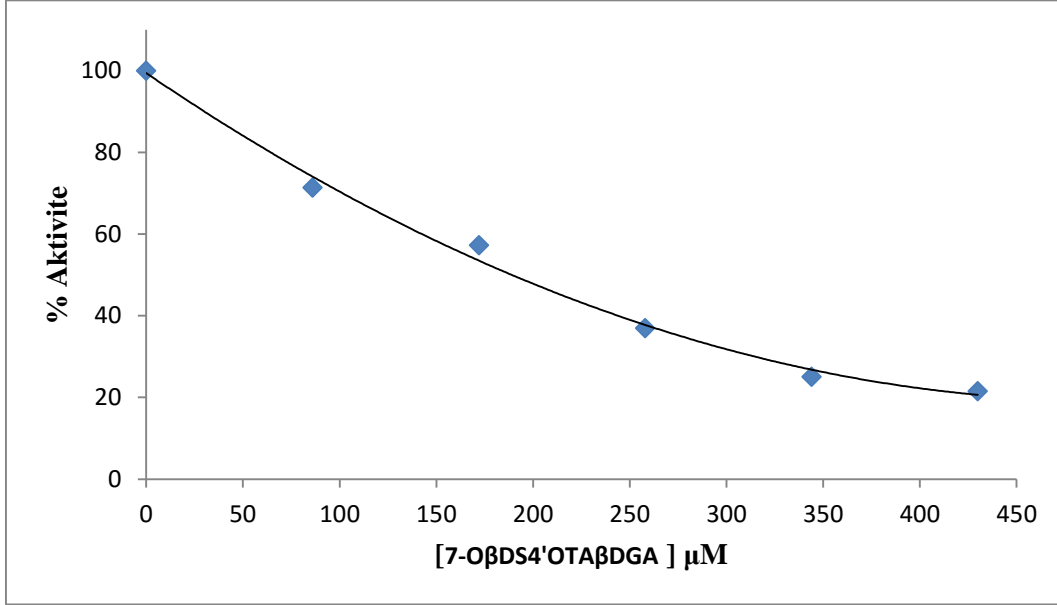
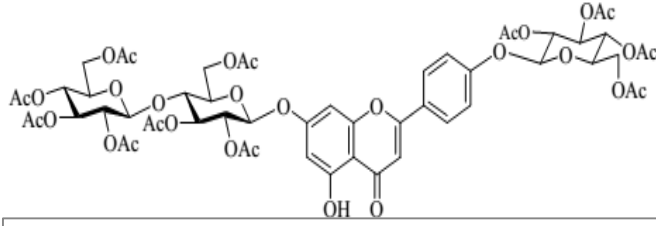
Şekil 3.77: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-Tetraasetil-β-D-galaktopiranozil-4'-O-(Tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin'ün inhibisyon etkisi.



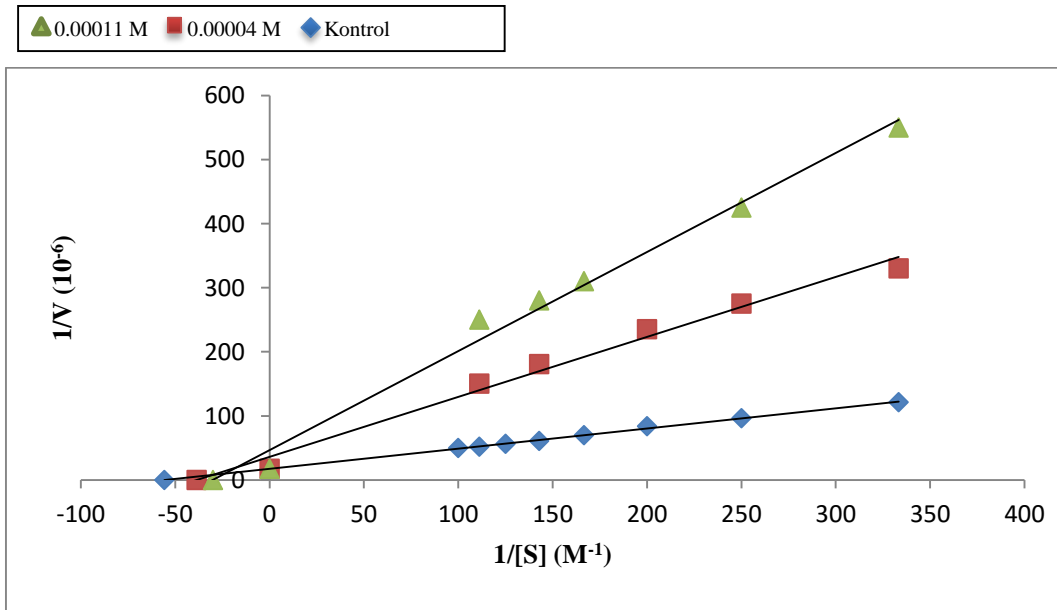
**Şekil 3.78:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-D-galaktopiranozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



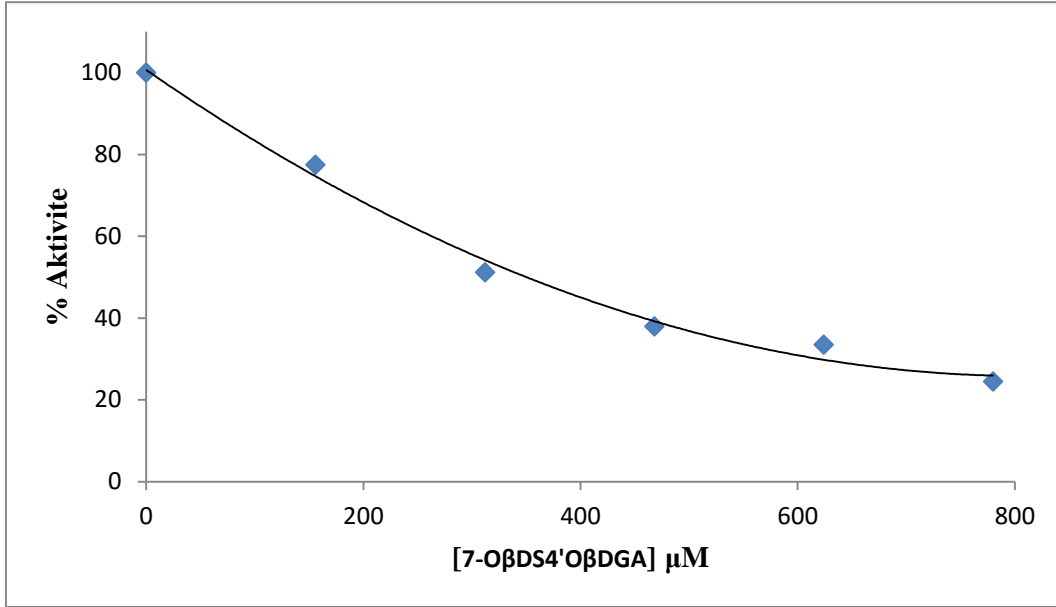
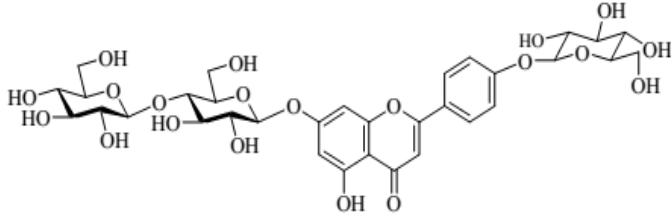
**Şekil 3.79:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-D-galaktopiranozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.



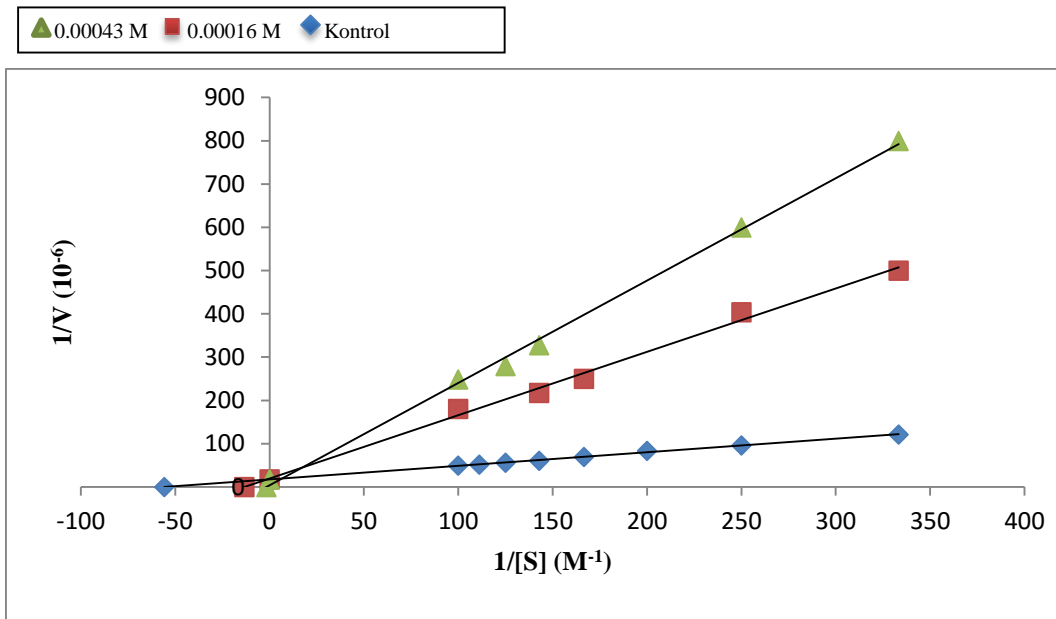
**Şekil 3.80:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-4'-O-(tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



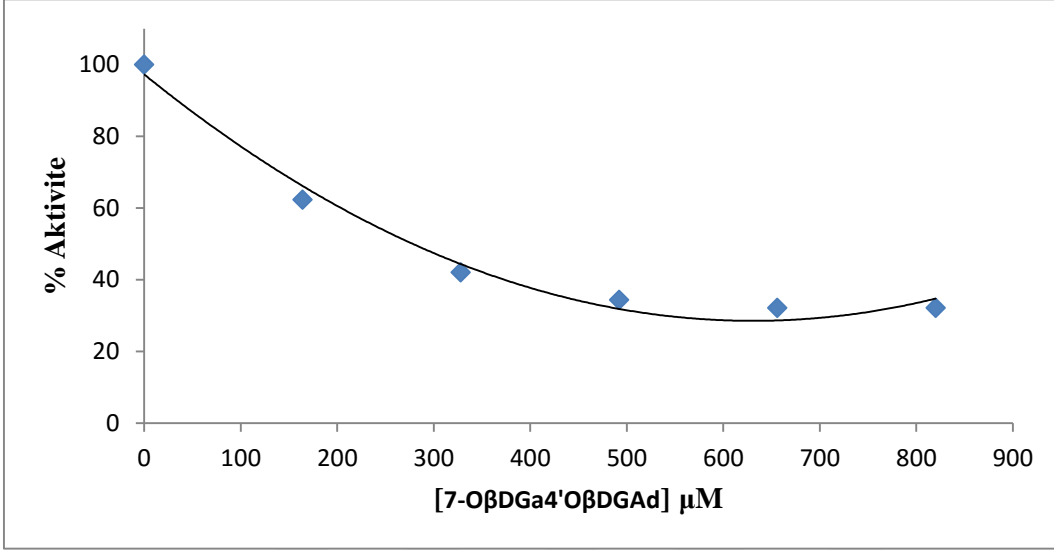
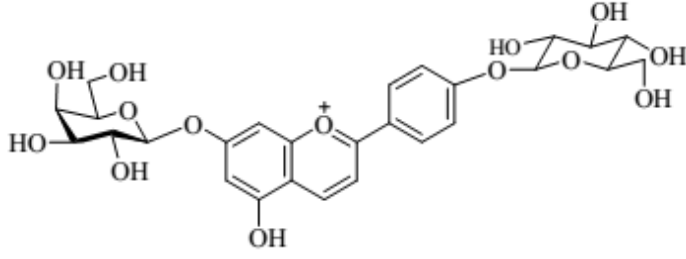
**Şekil 3.81:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-(Heptaasetil-β-D-sellobiyozil)-4'-O-(tetraasetil-β-D-glikopiranozil)-apigenin'in inhibisyon etkisi.



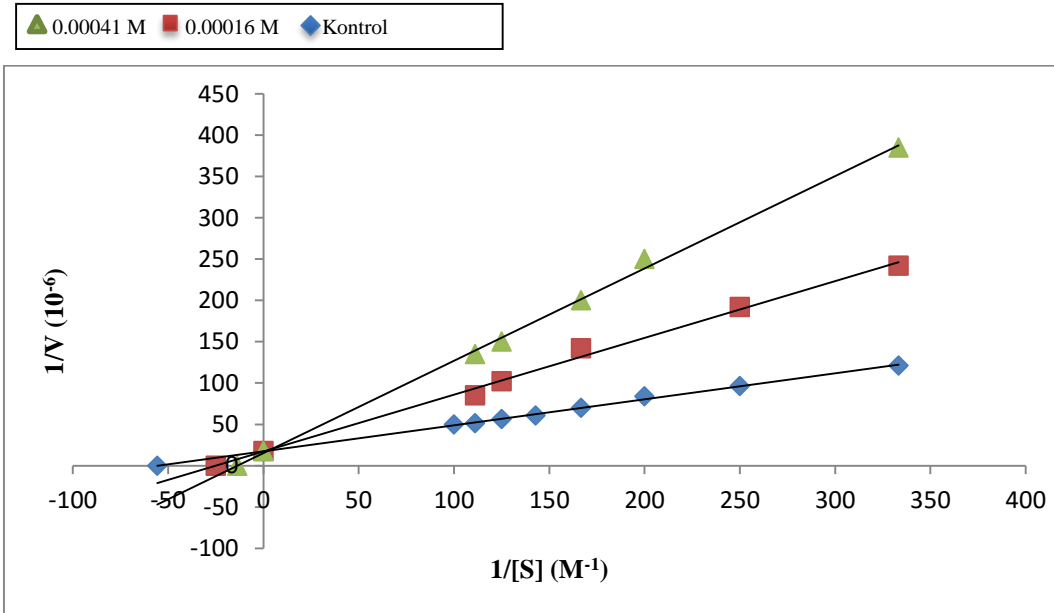
Şekil 3.82: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-D-sellobiyozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



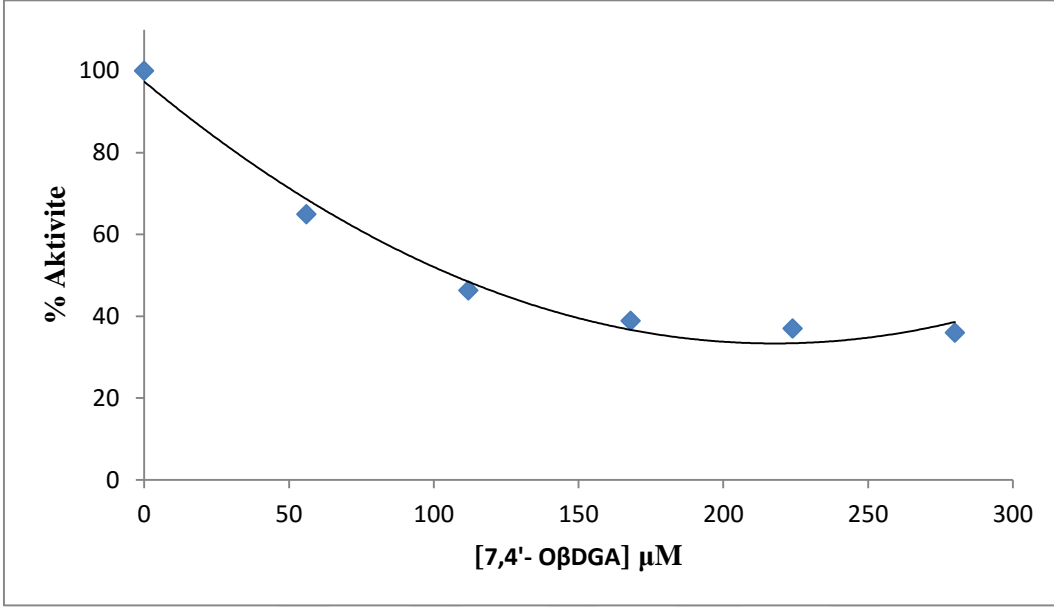
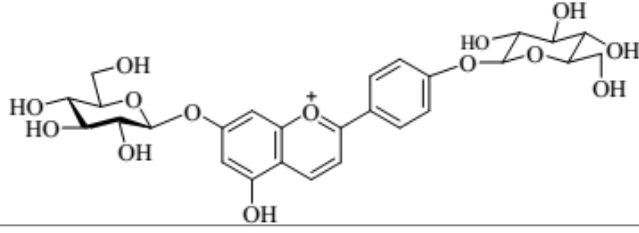
Şekil 3.83: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-D-sellobiyozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.



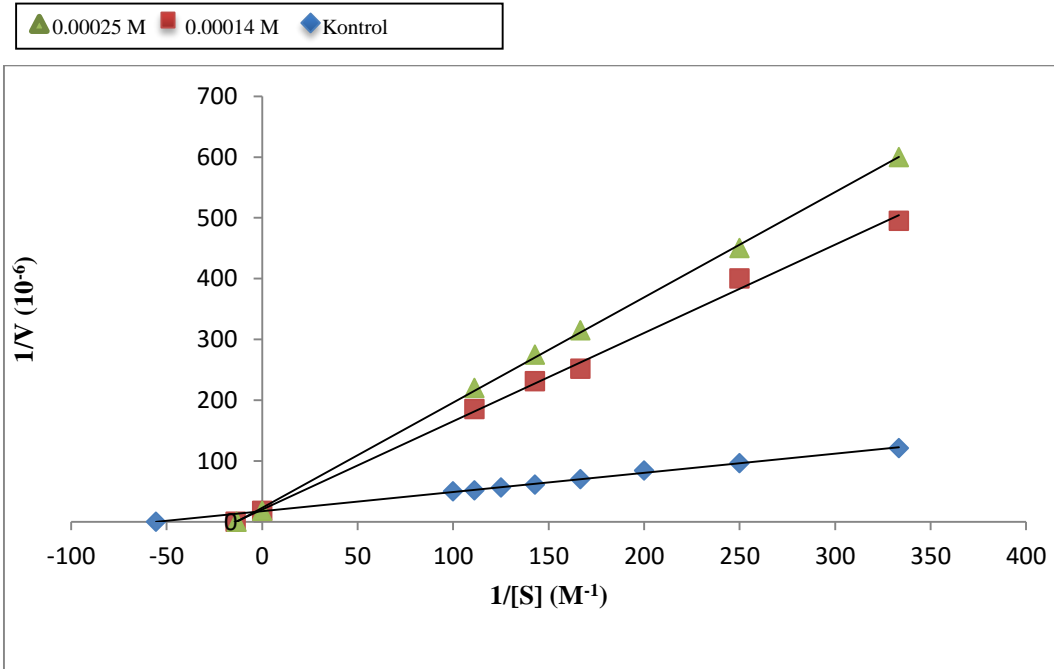
Şekil 3.84: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-D-galaktopiranozil-4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.



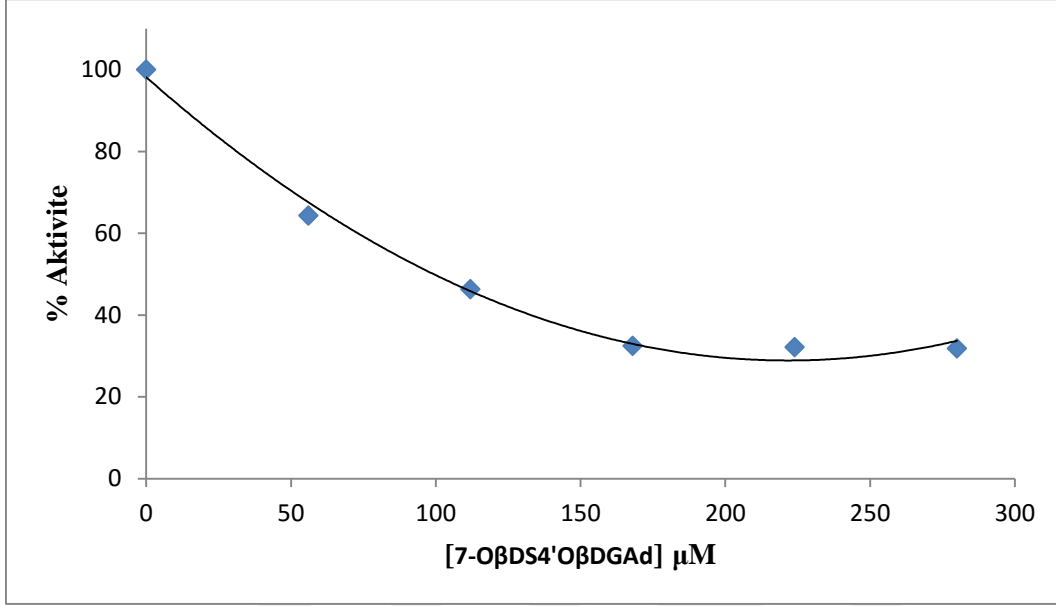
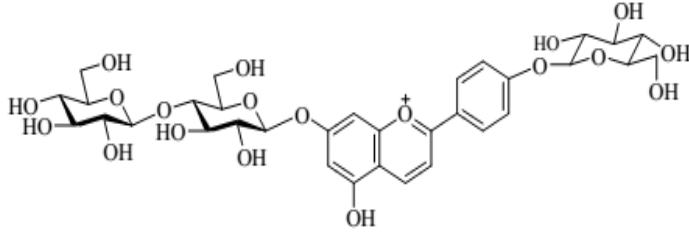
Şekil 3.85: Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-D-galaktopiranozil-4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenidin'in inhibisyon etkisi.



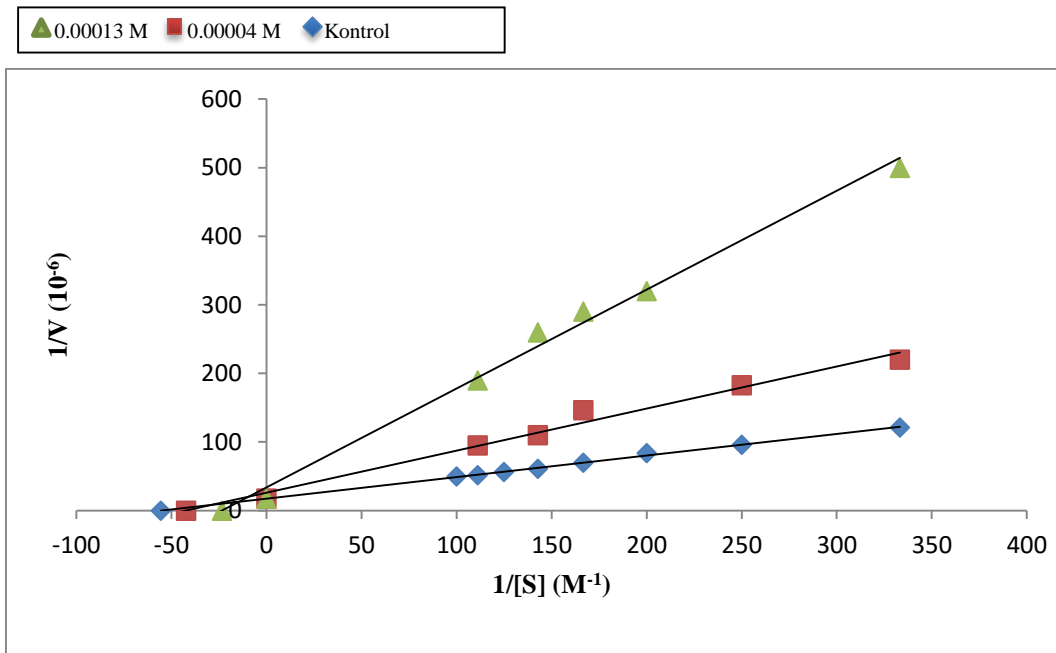
Şekil 3.86: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.87: Muz PPO enzimi üzerine 7,4'-di-O-β-D-glikopiranozil-apigenin'in inhibisyon etkisi.

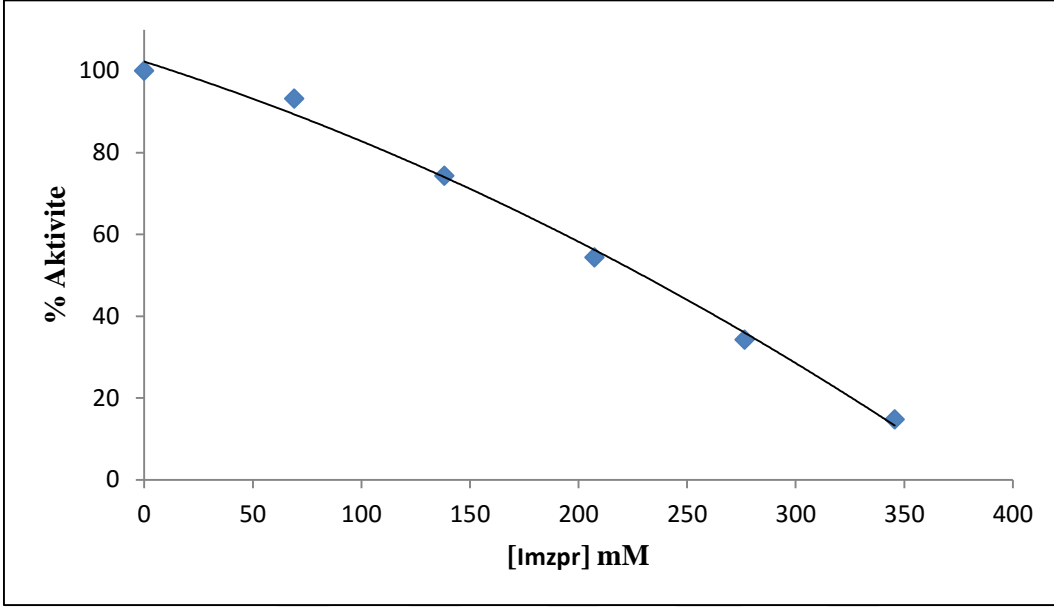
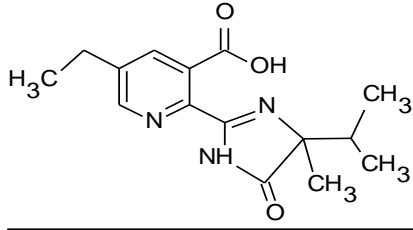


**Şekil 3.88:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 7-O-β-D-sellobiyozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenidin için % aktivite – [I] grafiği.

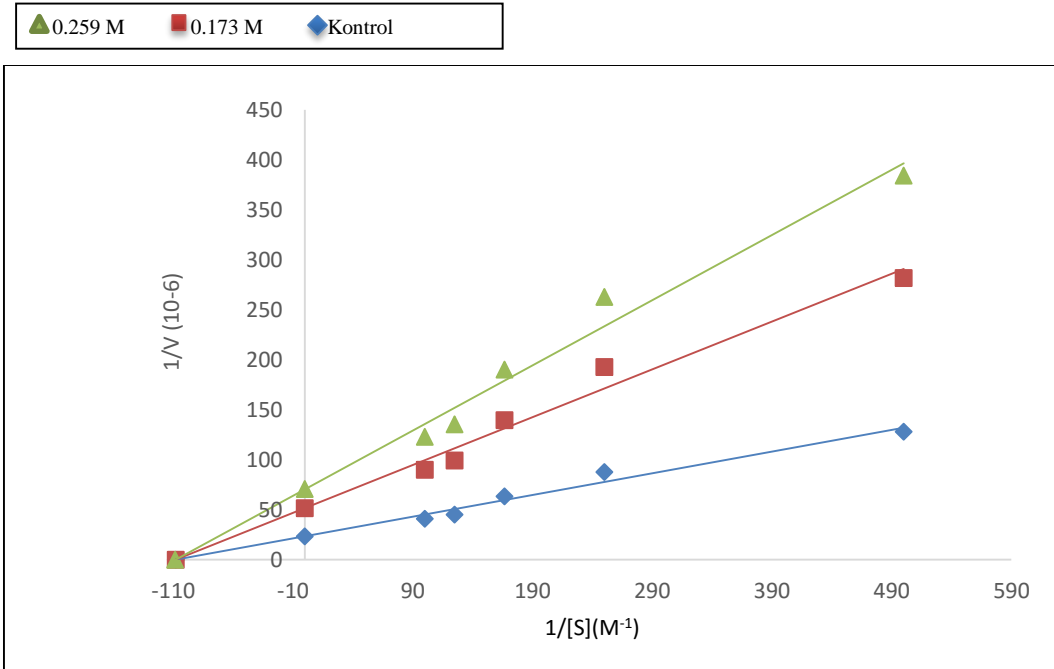


**Şekil 3.89:** Muz PPO enzimi üzerine 7-O-β-D-sellobiyozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigenidin'in inhibisyon etkisi.

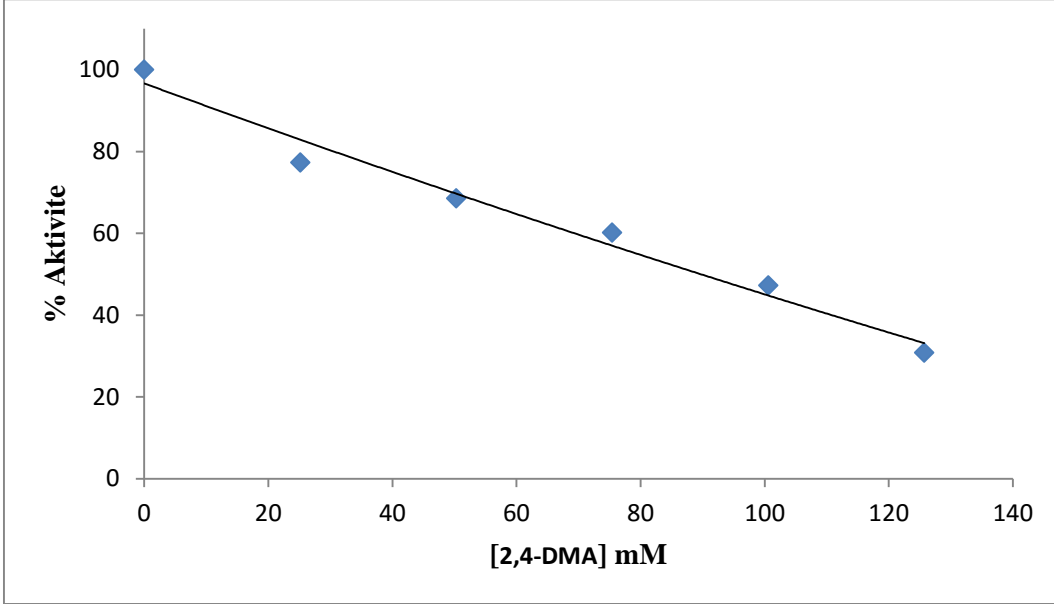
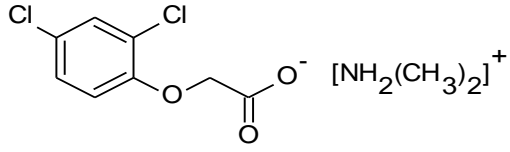




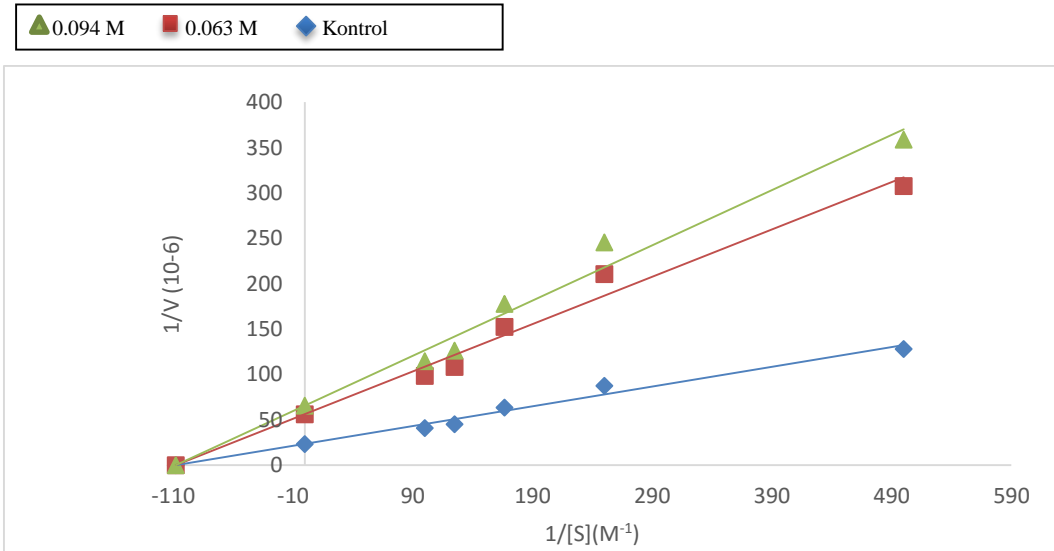
Şekil 3.90: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda İmzetapir için % aktivite – [I] grafiği.



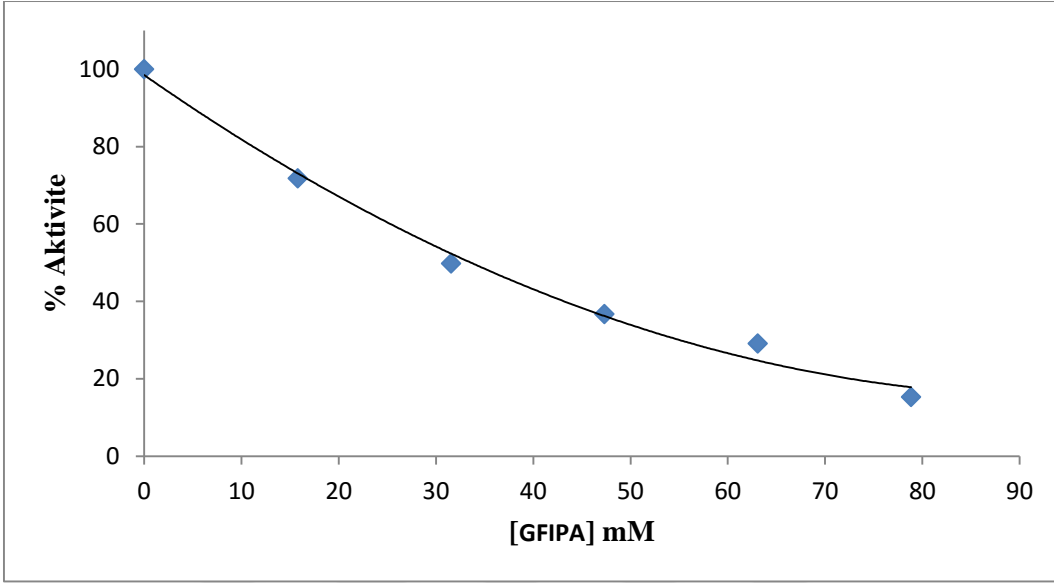
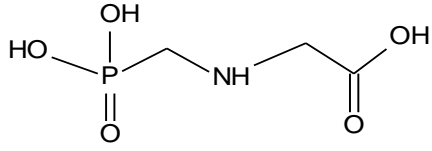
Şekil 3.91: Muz PPO enzimi üzerine İmzetapir'in inhibisyon etkisi.



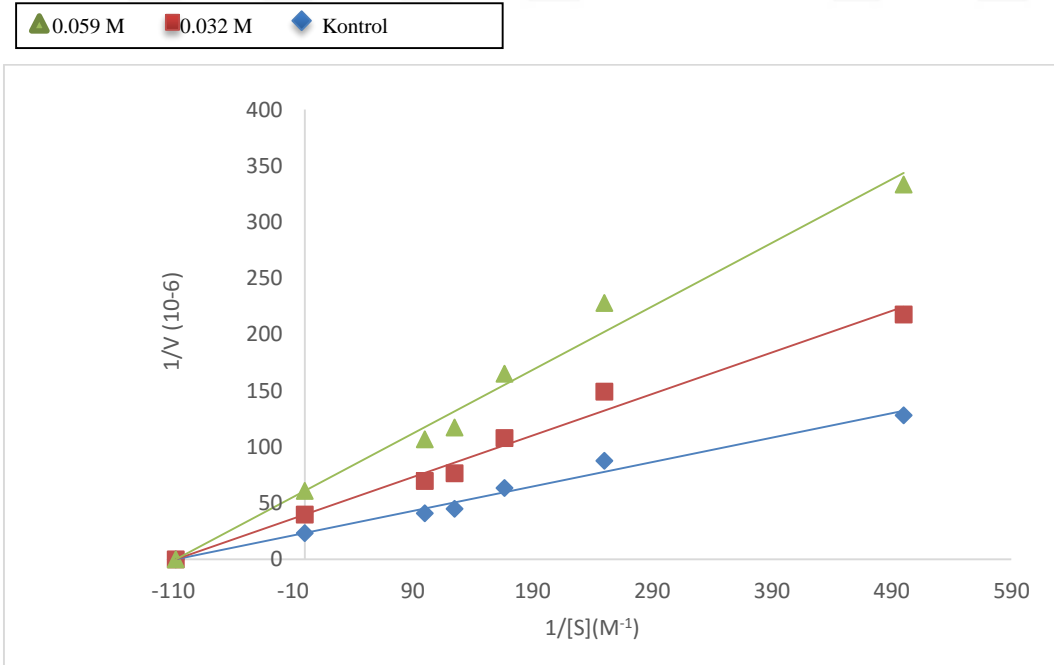
**Şekil 3.92:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda 2,4 dimetilamin için % aktivite – [I] grafiği.



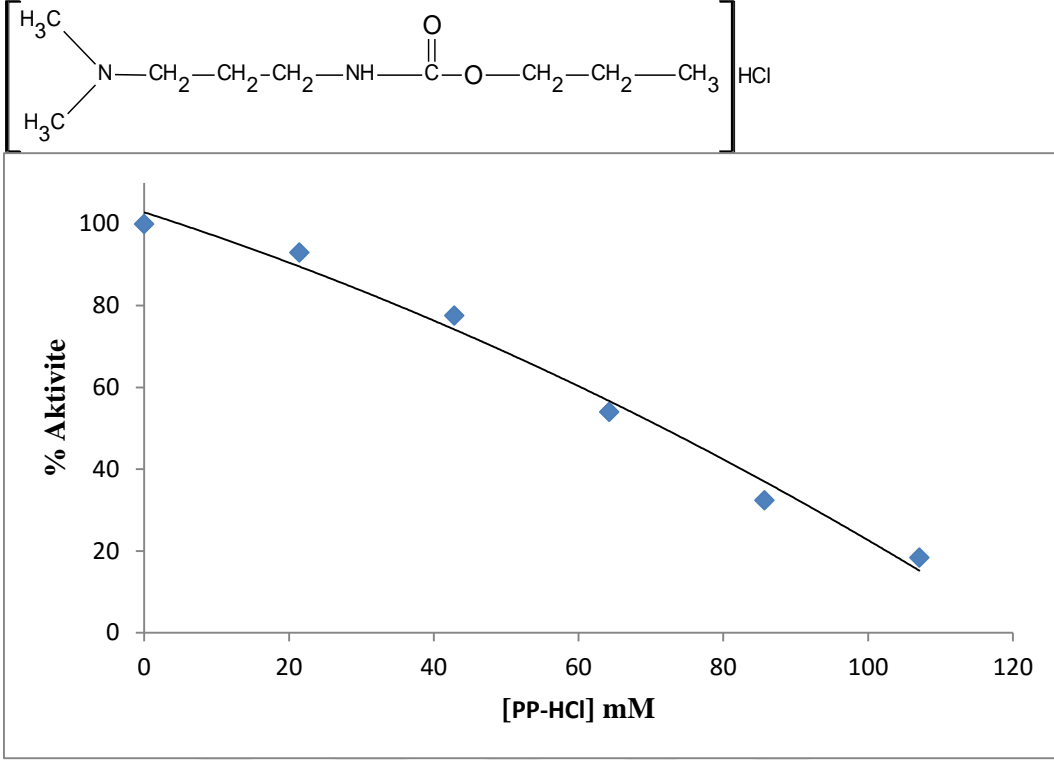
**Şekil 3.93:** Muz PPO enzimi üzerine 2,4 dimetilamin'in inhibisyon etkisi.



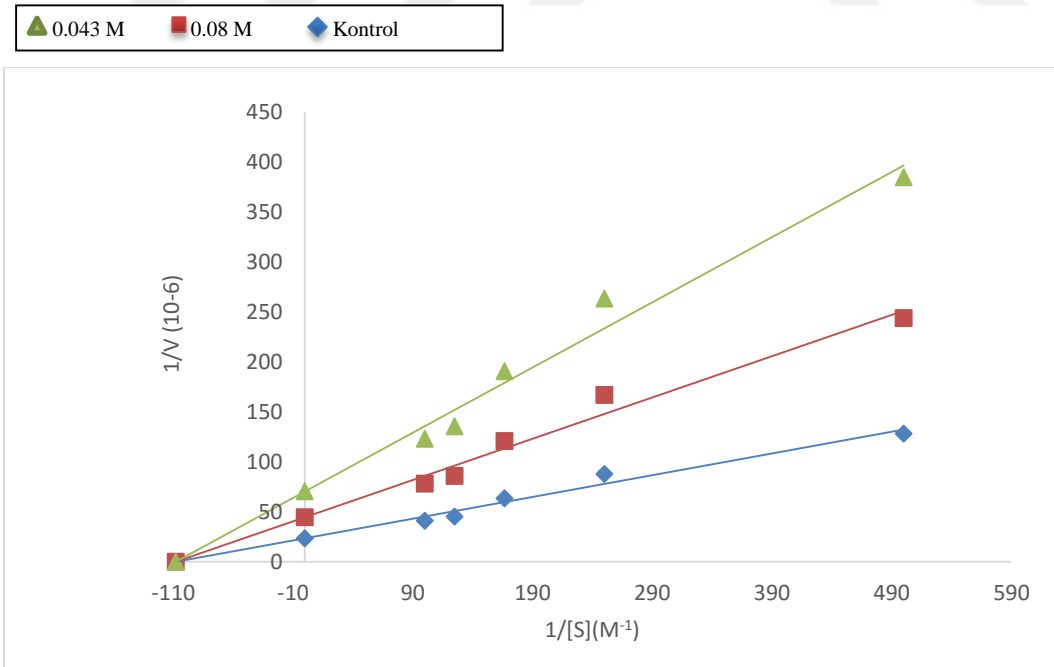
Şekil 3.94: Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Glyfosfat izopropilamin için % aktivite – [I] grafiği.



Şekil 3.95: Muz PPO enzimi üzerine Glyfosfat izopropilamin'in inhibisyon etkisi.



**Şekil 3.96:** Muz PPO enzimi üzerine 0,1 M Katekol substratı konsantrasyonunda Propamokarb HCl için % aktivite – [I] grafiği.



**Şekil 3.97:** Muz PPO enzimi üzerine Propamokarb HCl'in inhibisyon etkisi.

**Tablo 3.2:** Flavonoidler için, Muz PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan Ki, % aktivite grafiklerinden bulunan IC<sub>50</sub> değerleri ve İnhibisyon türleri.

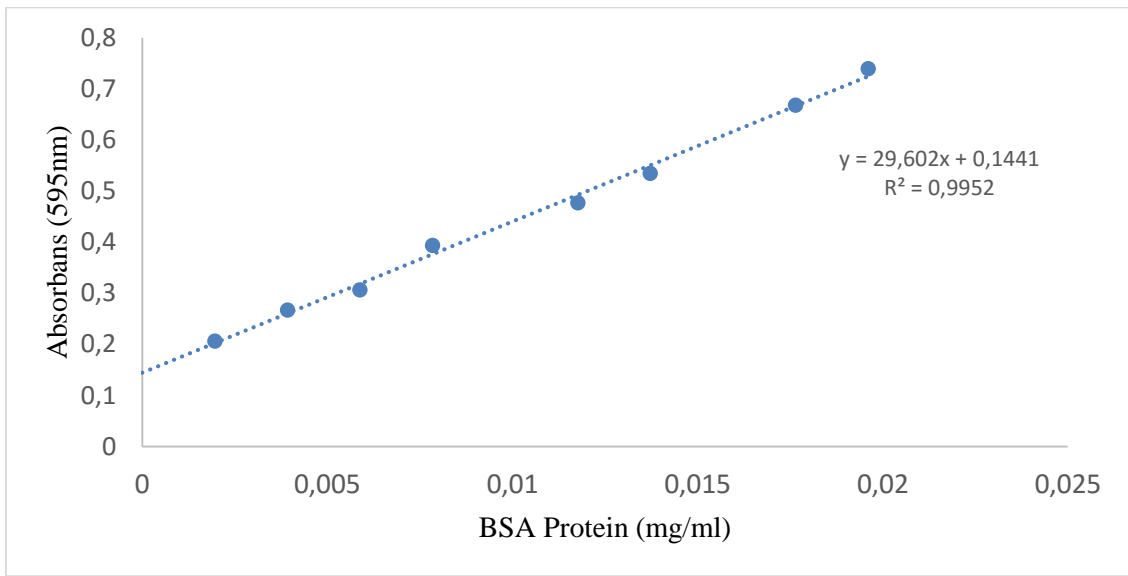
Maddeler	IC <sub>50</sub> (µM)	Ki (µM)	İnhibisyon Türü
4-FFÜAd	32.2	10.74	Yarışmalı
4-FFÜ6HAd	82.7	29.91	Yarışmalı
4-FFÜ7HAd	78	27.5	Yarışmalı
4-KFÜAd	53	16.52	Yarışmalı
4-KFÜ6HAd	118.5	19.99	Yarışmalı
4-KFÜ7HAd	62.5	6.01	Yarışmalı
4-NFÜAd	194	24.08	Yarışmalı
4-NFÜ6HAd	60.4	16.4	Yarışmalı
4-NFÜ7HAd	88	27.4	Yarışmalı
4-NFTÜAd	169	24.12	Yarışmalı
4-NFTÜ6HAd	121	29.23	Yarışmalı
4-NFTÜ7HAd	63.9	14.7	Yarışmalı
4-KFTÜAd	142.5	20.48	Yarışmalı
4-KFTÜ6HAd	57.5	7.94	Yarışmalı
4-KFTÜ7HAd	133	18.01	Yarışmalı
7-OGAd	87.5	84.72	Yarışmalı
7-OβdGPA	84.5	74.53	Yarışmalı
7-OGaAd	40.5	39.89	Yarışmalı
7-OβdGaPA	49.5	44.91	Yarışmalı
7-OTAβdGPA	61.6	59.77	Yarışmalı
7-OTAβdGPN	37.1	24.95	Yarışmalı
7-OTAβdGaPA	43.6	39.86	Yarışmalı
7-OTAβdGaPN	57.1	44.94	Yarışmalı
7-ORAd	18.1	14.98	Yarışmalı
7-ORA	39.9	34.80	Yarışmalı
Dsd	47.6	44.85	Yarışmalı
Ds	40.2	34.95	Yarışmalı
7-OSAd	10.7	7.45	Yarışmalı
7-OSA	32.7	29.93	Yarışmalı
7-OHβDSN	59.4	49.75	Yarışmalı
7-OHASA	36.7	34.95	Yarışmalı
3-ORK	61.2	59.82	Yarışmalı
Rt	32.9	24.96	Yarışmalı
Hsd	72.4	69.80	Yarışmalı
7-ORTN	53.2	49.82	Yarışmalı
7,4'-dOTAβdGA	491	457	Yarışmalı
7,4'-dOβDGA	432	358	Yarışmalı
7-OTβDGA4'OTAβDGA	433	345	Yarışmalı
7-OβD-Ga4'OβDGA	615	412	Yarışmalı
7-OβDS4'OTAβDGA	184	75.2	Yarışmalı
7-OβDS4'OβDGA	335	292	Yarışmalı
7-OβDGA4'OβDGAd	299	287	Yarışmalı
7,4'- OβDGA	311	196	Yarışmalı
7-OβDS4'OβDGAd	99	83.9	Yarışmalı

**Tablo 3.3:** Pestisitler için, Muz PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$ , % aktivite grafiklerinden bulunan  $IC_{50}$  değerleri ve İnhibisyon türleri.

<b>Maddeler</b>	<b><math>IC_{50}</math> (mM)</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Türü</b>
<b>Imzpr</b>	228	82.3	Yarışmasız
<b>2,4-DMA</b>	89.2	29.9	Yarışmasız
<b>GFIPA</b>	33.5	20.7	Yarışmasız
<b>PP-HCl</b>	71.7	24.7	Yarışmasız

### 3.3 Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Proteinin tayini bölüm 2.2.4.2’de anlatıldığı gibi Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg protein karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’ de gösterilmiştir.

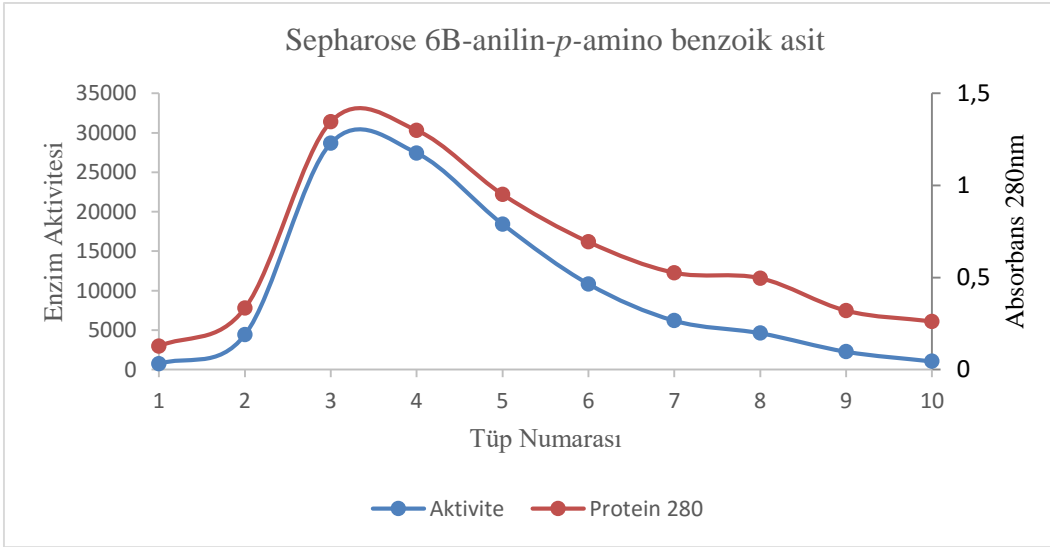


Şekil 3.98: Bradford yöntemine göre hazırlanan protein standart grafiği.

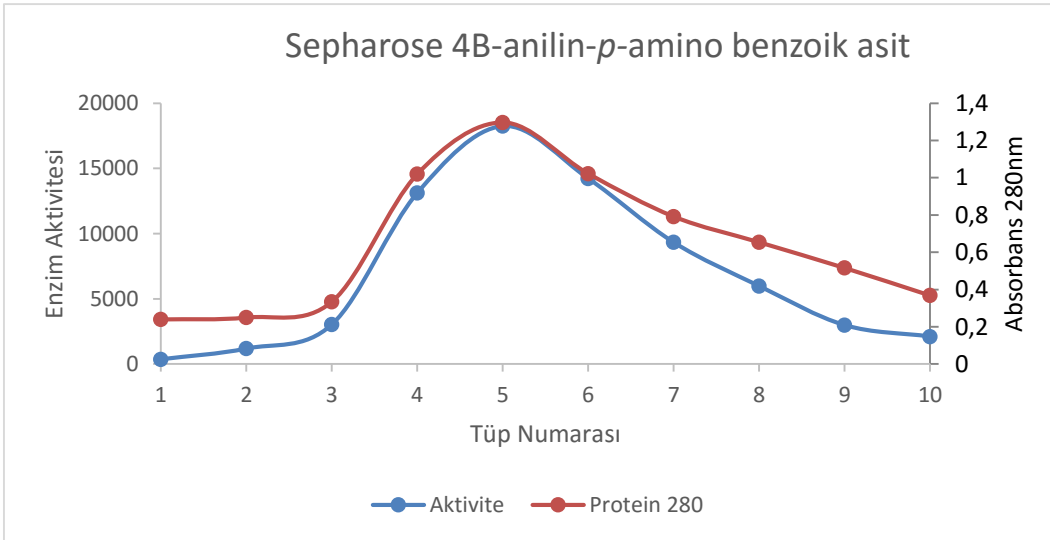
### 3.4 Yeni Sentezlenen Afinite Jelleriyle Muz Meyvesinden PPO Enziminin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan afinite jelleri 1x15 cm ebatındaki kolonlara paketlenen sonra kolonlar 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 5.00) ile dengelendi. Dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon seviyesi jel seviyesine kadar indirildi ve diyaliz işleminden sonra elde edilen muz enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 5.00) ile yıkandı. Kolonun tamamen yıkandığı 280 nm’de protein absorbansını kontrol ederek anlaşıldı. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve

elüsyon tamponu [0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 M NaCl (pH 7.00)] kolona yüklendi. 2'şer mL elüatlar alınmaya başlandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak, her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de aktivite tayini yapıldı. Her iki jel için de elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafikleri çizildi (Şekil 3.99 ve 3.100). Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve elüat çözeltileri için Bradford metodu ile kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Tablo 3.3'de verildi.



**Şekil 3.99:** Sepharose 6B-anilin-*p*-amino benzoik asit afinite jeline ait elüatların 280 nm'deki protein absorbanları ve 420 nm'deki aktiviteleri.



**Şekil 3.100:** Sepharose 4B-anilin-*p*-amino benzoik asit afinite jeline ait elüatların 280 nm'deki protein absorbanları ve 420 nm'deki aktiviteleri.

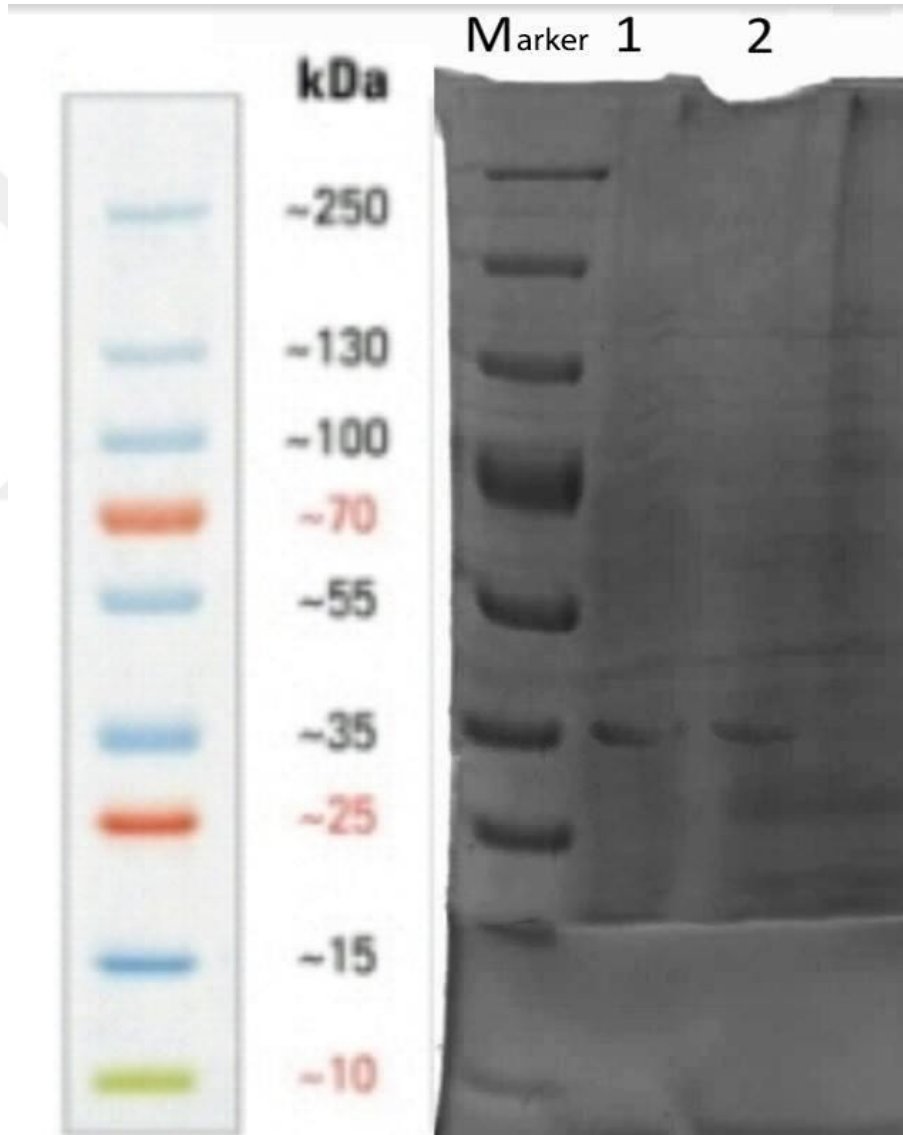


**Tablo 3.4:** MPPO enziminin saflaştırma tablosu.

<b>Saflaştırma Basamağı</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Aktivite (U/mLdak)</b>	<b>Toplam Aktivite</b>	<b>Protein (mg/mL)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg protein)</b>	<b>Verim (%)</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Ham Ekstrakt</b>	75	10850	813750	0.2186	16.365	49634	-	-
<b>Amonyum sülfat</b>	70	14425	1009750	0.1818	12.726	79345	124.1	1.6
<b>Sepharose 4B-anilin-<i>p</i>-amino benzoik asit Afinite jeli</b>	2	18250	36500	0.011	0.022	1659091	4.49	33.4
<b>Sepharose 6B-anilin-<i>p</i>-amino benzoik asit Afinite jeli</b>	2	28675	57350	0.0055	0.011	5213636	7.05	105.042

### 3.5 MPPO Enzimi için SDS-PAGE

Her iki afinite kolonundan da saflaştırılan MPPO enziminin saflığını ve molekül ağırlığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine muzdan saflaştırılan PPO enzimlerinin numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jelin fotoğrafı çekilip molekül ağırlığının yaklaşık olarak 35 kDa olduğu tespit edildi (Şekil 3.101).



**Şekil 3.101:** Sepharose 4B-anilin-p-amino benzoik asit (1) ve Sepharose 6B-anilin-p-amino benzoik asit (2) afinite kromatografisi jelleri ile saflaştırılan MPPO enzimleri için SDS poliakrilamid jel elektroforezi.

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Katekolaz, Lakkaz ve Tirozinaz olarak da bilinen polifenol oksidaz (PPO) aktif bölgesinden bakır bulunan bir metalo enzimdir. Mikroorganizmalarda, hayvanlarda ve bitkilerde oldukça yaygın bir şekilde bulunur. PPO, moleküler oksijen içeren monofenollerin o-difenollere (monofenolaz) ve o-difenollerin o-kinonlara (difenolaz) ve metoksi ile yer değiştirmiş polifenoller ve aromatik diaminler gibi bir çok bileşiğin oksitlendiği (lakkaz) reaksiyonları katalizleyen bir enzimdir. [99,100].

Küçükislahoğlu, Arslan ve grubu ile ortak yürüttüğümüz Tübitak Projesi kapsamında, Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Laboratuvarları'nda sentezlenen flavonoid türevlerinin, katekol substratı kullanarak, saflaştırdığımız MPPO enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri ilk defa tarafımızca incelenmiş ve tamamının söz konusu enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir.

20. yüzyılın ortalarına doğru flavonoidlerin önemli bir kısmını oluşturan apigenidin türevlerinin biyolojik aktiviteye sahip olduklarının anlaşılmasından dolayı flavonoidlere karşı ilgi artmıştır. Bu ilginin nedenlerinden biri 1936 yılında limon kabuğundaki flavonoidli bir preparatın eldesi ve bunun p-vitamin aktivitesi göstermesidir [74].

Flavonoid üzerine yapılan araştırmaların en yoğunlaştığı alan insan sağlığı üzerine sağladığı faydalardır. Flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antioksidant, antimikrobiyal, antibakteriyal ve antikanserojenik etkileri de başka araştırmacılar tarafından bulunmuştur [84-87].

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan pestisitler zirai ilaçlamada en sık kullanılan tarım ilaçlarıdır. Daha önce yine tarafımızca karbonik anhidraz enzimi üzerine etkileri araştırılmış ve söz konusu enzimi inhibe ettikleri tespit edilmiştir [121].

Söz konusu çalışmada kullanılan flavonoid türevlerinin ve pestisitlerin [IC<sub>50</sub>] değerleri inhibisyon grafiklerinden hesaplanmıştır. Elde edilen [IC<sub>50</sub>] değerleri tablo 3.2’de verilmiştir. Bu değerlere göre flavonoid türevleri içerisinde en güçlü inhibitörün 7-O-sellebiyozil apigenidin olduğu gözlenmektedir (10.7 µM). Bunu 7-O-rutinozil apigenidin ve 7-O-sellebiyozil apigenin izlemektedir. Tabloda görüldüğü gibi 7-O-β-D-galaktopiranozil-4'-O-β-D-glikopiranozil-apigeninin PPO’ya karşı afinitesi en düşüktür. Bu dört pestisit içerisinde en etkili inhibitörün ise Glyfosfat izopropilamin olduğu tespit edilmiştir (33.5 mM).

Çalışmada kullanılan flavonoid türevlerinin ve pestisitlerin inhibisyon türü, iki farklı inhibitör derişiminde Lineweaver-Burk yöntemine göre tespit edilmiştir. K<sub>i</sub> değerleri, Lineweaver-Burk grafiğinin eğrilerinin kesim noktalarından hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm flavonoid türevlerinin inhibisyon türü, kompetitif olarak bulunmuştur. Pestisitlerin inhibisyon türü ise nonkompetatif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, aktif bölgede bulunan çift çekirdekli bakır ile 3 tipi bakır merkezi içeren tirozinaz enziminin üç boyutlu yapısıyla açıklanabilir. Ortamda inhibitör miktarının artmasıyla enzim aktivitesi büyük ölçüde azalmıştır. Tüm inhibitörler için enzim aktivitesinin azalmasında benzer özellikler gözlenmiştir.

Sentezlenen flavanon türevlerinde (*naringenin*); 7-O- pozisyonunda asetilli monosakkarit içeren moleküller disakkarit içerenlere göre enzimi daha fazla inhibe ettiği bulunmuştur.

Sentezlenen flavon türevlerinde (*apigenin*); i) 7-O- pozisyonunda asetilli disakkarit içeren moleküller monosakkarit içerenlere göre enzimi daha fazla inhibe etmişlerdir. ii) Apigenin türevlerinde 4’-O- pozisyonuna glukozun bağlanması molekülün inhibisyon özelliğini oldukça fazla düşürmüştür. iii) Genellikle apigenine bağlı şeker gruplarının asetillenmesi ile moleküllerin inhibisyon özellikleri artmıştır. iv) Apigenin türevlerinde 7-O- pozisyonunda bulunan şekerlerden sellobiyoz galaktoza, galaktoz da glukozu göre molekülün inhibitör özelliğini arttırdığı söylenebilir.

Sentezlenen *antosiyenin* türevlerinde; i) 4’-O- pozisyonuna glukozun bağlanması molekülün inhibisyon özelliğini oldukça fazla düşürmüştür. ii) 7-O- pozisyonunda bulunan şekerlerden sellobiyoz galaktoza, galaktoz da glukozu göre

molekülün inhibitör özelliğini arttırmıştır. iii) Disakkarit içeren moleküllerde şekerin bağlanma pozisyonu 7-O- pozisyonundan 3-O- pozisyonuna değiştiği zaman molekülün inhibitör özelliği azaldığı söylenebilir.

Genel olarak aynı şeker gruplarını içeren moleküllerden antosiyanin türevleri apigenin türevlerine, apigenin türevleri de naringenin türevlerine göre daha iyi inhibisyon özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Yüksek aktivitelerinden dolayı kinonlar, molekül ağırlığı büyük melanin pigmentlerinin oluşmasına ve oluşan melanin pigmentleri polimerize olmalarına sebep olur. [101,102]. Yapılan araştırmalarda meyve ve sebzelerdeki melaninlenmenin nedeninin PPO enzimi olduğu anlaşılmıştır [103]. Yapılan bazı çalışmalar, çil gibi cildiye hastalıklarının altında yatan nedenin de epidermik pigmentasyonun çok miktarda deri altında birikmesini göstermiştir [104,105]. Parkinson gibi diğer nörolojik bazı hastalıkların Tirozinaz ile ilgili olduğu anlaşılmıştır [106]. Tirozinaz, böceklerde savunma ve yaraların iyileşmesi gibi biyokimyasal işlevlere de sahiptir [107]. Bu işlevler tirozinaz enziminin inhibitörlerinin etkisi ve korunmasının gelişmesi için olası hedefler sağlar. Kozmetikte ve tedavi amaçlı kullanımda kojik asit, arbutin, tropolonlar ve 1-fenil-2-tiyöre gibi birkaç tane madde inhibitör olarak kullanılmaktadır [105].

PPO inhibitörü olarak tespit edilelen bazı bileşikler, muz PPO enzimini de inhibe etmiştir. İnhibisyon çalışmalarındaki sonuçlar tiyol reaktiflerin PPO enzimleri için çok etkili inhibitör olduklarını göstermiştir [108,109]. İndirgen maddeler, antioksidanlar ve enzimatik inhibitörler o-kinonların kimyasal indirgemesi ile esmerleşmelerini engeller. Bu indirgen maddelerin etkisi geçici olarak göz ardı edilebilir çünkü bu bileşikler reaksiyon ile boyar madde ara ürünleri, endojen enzimler ve bakır gibi metaller ile geri dönüşümsüz olarak yükseltgenmişlerdir. Sülfür içeren etkin maddeler arasında, L-sistein enzimatik esmerleşmeyi önlemek için etkili bir bileşiktir. Bakır ile kararlı kompleks oluşumu yoluyla sisteinle polifenol oksidazın doğrudan inhibisyonu da ileri sürülmektedir [110]. Konsantre armut meyve suyunda enzimatik esmerleşmeyi sisteinin sülfitten çok daha fazla etkili bir şekilde inhibe ettiğini gözlenmiştir [111]. Avokadoların ve muzların kesilmesi ve saflaştırılmasında enzimatik esmerleşmeyi inhibe etmek için sistein kullanılmıştır [112]. Esmerleşmeyi önleyici test edilmiş maddeler arasında çok etkili

olanları dithiotreitol ve sodyum metabisülfittir [109]. Sülfitin enzimatik esmerleşmeyi önleme mekanizması genellikle bir takım işlemle açıklanabilir. Mekanizmadan biri o-kinonlarla ilgilidir. Kinon-sülfür komplekslerinin oluşumu kinonların polimerizasyonlarını önler [113]. Bundan başka metabisülfürün PPO'nun inaktivasyonuna yol açan PPO üzerine mekanizması doğrudan enzim yapısı üzerinedir. Golan-Goldhirsch, Whitaker, Embs ve Markasis PPO'nun sülfid (ditiyotireitol, glutatyon) ile ön-inkübasyonu boyunca enzimin esmerleşme yeteneğinde dereceli bir kayıp olduğunu bulmuşlardır [113,114]. PPO ile sülfidin disülfid bağlarıyla reaksiyon verdiği önerilmiştir. Bu, enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesine ve inaktivasyonuna neden olur. PPO'nun bisülfid ile inhibisyonuna sebep olan üçüncü işlem askorbik asit için tanımlandığı gibi, ortadaki kinonların indirgenme yoluyla [113]. Enzimin PPO kofaktör olarak bakır içerdiğinden dolayı tiyo ürelere sensitif oldukları görülmektedir. Enzimin geri dönüşümsüz inaktivasyonu bakırı enzimin aktif merkezinden uzaklaştıran tiyol bileşikler, tiyoüre, hidroksikinolin vs. gibi maddelerle gerçekleştirilebilir [115]. Sülfür oksijenden daha çok polarize olduğu için, söylenmiş olduğu üzere, eşleşmemiş elektron çiftlerinden birini bakırın boş 4s orbitaline vererek bir kovalent bağ oluşur. Sülfür oksijenden daha yumuşak olduğundan dolayı metal katyonlarından kaynaklanan polarizasyon etkilerini koruyucu olarak davranır ve bu etkiler geri kalan moleküllerin önemli bir miktarına iletilmez. Dolayısıyla, bu durumda, yakın amino gruplarının konjugasyonu üredekinden daha küçüktür ve her iki C-N bağı da neredeyse eşittir [115].

Tropolon-Cu<sup>+2</sup>'nin PPO enziminin iyi bir inhibitörü olduğu belirlenmiştir. Tropolon mono- ve o-dihidroksifenolaz aktivitelerinin ikisini de gösterir. Tropolonun % 50 inhibisyonu 0,4x10<sup>-6</sup>M gözlenmiştir [116]. β-merkaptolanın mantar PPO enziminin potansiyel inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Ki: 0,31x10<sup>-2</sup> mM) [117]. Demir ise MPPO için 4-(4"-metil-fenilürenil)-4'-metoksi-kalkonun güçlü bir inhibitör olduğunu belirlemiştir [67].

Moleküler oksijen ve metal olarak bakır bulunduğu için oksitleyici enzimler içerisinde PPO enzimi örnek olarak çalışılmaktadır [118]. Özellikle büteine benzeyen kalkonların, bakır şelatlama aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [119]. PPO enziminin inhibisyonu da üç boyutlu enzimin aktif bölgesindeki bakırın şelatlanması olabilir. Bakır ile kararlı kompleks oluşturabilmesinden dolayı L-sistein PPO

enzimini inhibe edebilir [120]. Bakırın tiyoürelere gibi kükürt içeren maddelere duyarlı olduğu için bu maddeler PPO enzimini inhibe edebilir [116].

Söz konusu çalışmanın bir sonraki basamağında, gıda endüstrisinde çoğu zaman istenmeyen enzimatik reaksiyonla esmerleşmeye neden olan PPO enziminin saflaştırılması için iki farklı afinite jeli sentezlenmiştir. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç basamaklı reaksiyon sonucu sentezlenmiştir. İlk aşamada, matriks olarak seçilen Sepharose 4B ve Sepharose 6B, CNBr ile aktifleştirilmiştir. Daha sonra uzantı kolu olarak anilin söz konusu jellere bağlanmış ve son aşamada ise diazolanmış p-amino benzoik asit katılmıştır.

Meyve dokularından PPO ekstraksiyonu için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir. Araştırmamızda bir çok literatürde belirtildiği gibi 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.30) kullanılmıştır [1,112,113].

Sepharose-4B ve Sepharose-6B'nin matriks olarak seçilmelerinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olmaları ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmeleridir. Birçok enzimdeki gibi PPO enziminin de aktif bölgesi de üç boyutlu yapının derinliklerindedir. Bu nedenle, enzimle matriksin streik etkileşmesini en aza indirmek için uzantı kolu kullanılır. Böylece enzimin jele bağlanma verimi de artırılmış olur [108]. Bunun için değişik moleküller uzantı kolu olarak kullanılmaktadır. Erzengin ve Demir tarafından PPO enziminin saflaştırılması için sentezlenen jellerde uzantı kolu olarak L-tirozin kullanılmıştır [1,67]. Anilin, Şentürk tarafından hazırlanan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için hazırlanan jellerde uzantı kolu olarak kullanılmış ve son derece yüksek bir verim elde edilmiştir [122]. Bu nedenle çalışmamızda, afinite jelinin sentezinde uzantı kolu olarak anilin tercih edilmiştir.

Literatürde, PPO enziminin saflaştırılması için sentezlenen afinite jellerinde ligand olarak tropolen, metimazol, L-mimozin, 2-merkaptobenzimidazol, 2-merkaptobenzotiyazol, p-aminobenzoik asit, p-aminobenzoik asit ve m-aminobenzoik asit türevleri kullanılmıştır [1,67,110,111]. P-aminobenzoik asit,

polifenol oksidaz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Bu nedenle söz konusu molekül afinite jel sentezinde ligand olarak tercih edilmiştir. Sentezlenen afinite jelleri kullanılarak PPO enzimini farklı kaynaklardan yüksek oranda saflaştırılmıştır [1,67]. Bu nedenle, Araştırmamızda da ligand olarak p-aminobenzoik asit kullanılmıştır.

Demir tarafından daha önceden bilinen Sepharose-4B-L-Tirozin-p-Amino Benzoik Asit afinite jeli kullanılarak MPPO enzimi saflaştırılmıştır [1]. Enzimin kinetik sabitleri  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Muzdan saflaştırılan PPO enziminin katekol substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 17.97 mM ve 57146.12 U/mL olarak bulunmuştur. Demir tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-Tirozin-m-Amino Benzoik Asit afinite jeli ile % 6.13 verim ve 70.17 saflaştırma derecesiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan MPPO enziminin molekül ağırlığı da yaklaşık olarak 35 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir [67].

Söz konusu çalışmada sentezlenen Sepharose 4B-anilin-p-amino benzoik asit ve Sepharose 6B-anilin-p-amino benzoik asit afinite kromatografisi jelleri ile MPPO enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Şekil 3.101 de görüldüğü gibi, yeni sentezlenen her iki jel ile saflaştırılan MPPO enzimi, yaklaşık 35 kDa ağırlığında uygun bant vermiştir. Bu durum literatürdeki verilere uygun olduğu tespit edilmiştir [67].

PPO'nun kinetik sabitleri  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1). Muzdan saflaştırılan PPO enziminin katekol substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 9,27 mM ve 42628 U/mL olarak bulunmuştur (Tablo 3.1). Sepharose 4B-anilin-p-amino benzoik asit afinite jeli ile enzim, % 4.49 verim ve 33.4 saflaştırma derecesiyle elde edilmiştir. Sepharose 6B-anilin-p-amino benzoik asit afinite jeli ile enzim, %7.08 verim ve 105.042 saflaştırma derecesiyle saflaştırılmıştır. Bu sonuçlar, literatürdeki diğer saflaştırma derecelerine ve verimlerine yakın değerlere sahiptir [1,67].



Söz konusu tez kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıdaki şekilde özetlemiştir:

- 1) Araştırma grubumuz tarafından daha önce sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit yapısına sahip jel kullanılarak *Musa sapientum var. Cavendishii* (Muz) meyvesinden PPO enzimi saflaştırılmıştır.
- 2) Saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine flavonoid türevlerinin etkileri araştırılmıştır.
- 3) PPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi ilk defa tarafımızca belirlenmiştir. Ayrıca incelenen bu maddelerin, inhibisyon türü tespit edilmiş ve  $K_i$  sabitleri ile  $IC_{50}$  değerleri bulunmuştur (Tablo 3.2).
- 4) Elde edilen sonuçlardan, flavonoid türevleri enzimatik kararmanın önlenmesinde aday bileşikler olduğu söylenebilir.
- 5) PPO enzimini saflaştırmak için iki farklı afinite jeli sentezlenmiştir. Söz konusu jeller ile *Musa sapientum var. Cavendishii* (Muz) meyvesinden PPO enzimi saflaştırılmıştır.
- 6) Enzimin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 101).
- 7) Bu jellerden saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine 4 farklı pestisitlerin etkileri araştırılmıştır. Bu pestisitlerin tamamının söz konusu enzimi inhibe ettiği saptanmış, inhibisyon türü tespit edilmiş ve  $K_i$  sabitleri ile  $IC_{50}$  değerleri bulunmuştur (Tablo 3.3).
- 8) PPO enzimi, bitkilerin savunma mekanizmasında önemli rol oynadığı için, bitkilerin gelişim döneminde bu tip pestisitlere maruz kalmalarının önemli olduğunu elde edilen sonuçlardan çıkarmak mümkündür.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties”, *Food Chemistry*, 88, 479-484, (2004).
- [2] Mayer, A. M., and HAREL, E., “Polyphenol Oxidases in Plants”, *Phytochemistry*, 18 (2), 193-215, (1979).
- [3] Friedman, M., “Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1 523-1540, (1997).
- [4] Sekme, S., Çeşitli Mantarlarda Polifenol Oksidaz İndüksiyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2011).
- [5] Gedikli, S., Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, (2008).
- [6] Whitaker. J. R., *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel 201, New York, Dekker, 22-24, (1972).
- [7] Sarkar, J. M., Leonowicz, A. and Bollog. J. M., “Immobilization of enzymes on clays and soils”, *Soil Biol. Biochem*, 21 (2), 223-230, (1989).
- [8] Harel, E., Mayer, A. M. and Shain, Y., “Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition”, *Plant Physiology*, 17, 921, (1964).
- [9] Tolbert, N. E., “Activation of polyphenol oxidase of kloroplasts”, *Plant Pathology*, 51, 234, (1973).
- [10] Stephens, G. J. and Wood, R. K. S., “Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase”, *Nature*, 251, 358, (1974).
- [11] Padron, M. P., Lorano, J. A. and Gonsales, A. G., “Properties of *o*- diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*”, *Phytochemistry*, 14, 1959, (1975).
- [12] Spille, G. A., *The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage*, Chapter 3., CRC Press, 1-38, (1997).
- [13] Yue-Ming, J., Zauberman, G. and Fuchs, Y., “Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp”, *Postharvest Biology and Technology*, 10, 221-228, (1997).

- [14] Mazzafera, P. and Robinson, S. P., “Characterization of polyphenol oxidase in coffee”, *Phytochemistry*, 55, 285-296, (2000).
- [15] Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y. And Liu, Q., “The Purification of Polyphenol Oxidase from Tobacco”, *Protein Expression and Purification*, 24, 51-55, (2002).
- [16] Aydemir, T., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus L.*) heads”, *Food Chemistry*, 87, 59–67, (2004).
- [17] Vaidya, B. K., Suthar, H. K., Kasture, S. and Nene, S., “Purification of potatopolyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueoustwo-phasesystem”, *Biochemical Engineering Journal*, 28, 161–166, (2006).
- [18] Waliszewski, K. N., Márquez, O. and Pardio, V. T., “Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean”, *Food Chemistry*, 117, 196–203, (2009).
- [19] Guo, L., Ma, Y., Shi, J. andXue, S., “The purification and characterisation of polyphenoloxidase from gren bean (*Phaseolusvulgaris L.*)”, *Food Chemistry*, 117, 143–151, (2009).
- [20] Franck C., Lammertyn, J., Ho, Q. T., Verbohen, P., Verlinden, B. and Nicolai, B. M., “Browning disorders in pear fruit”, *Postharvest Biology and Technology*, 43, 1–13, (2007).
- [21] Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., Rodrigo-Garcia, J., Escobedo-Gonzalez, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vazquez-Flores, A. and Gonzalez-Aguilar, G. A., “Dual effect of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) on theinhibition of apple polyphenoloxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ)”, *Food Chemistry*, 101, 1346–1356, (2007).
- [22] Ünal, M. Ü., Şener A., “Two-year comparison of the biochemical properties of polyphenol oxidase from Turkish Alyanak apricot (*Prunus armenica L.*)”, *Food Chemistry*, 190, 741-747, (2016).
- [23] Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I., “Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca L.*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1239–1241, (1998).
- [24] Vamos-Vigyazo, L., “Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegeatables”, *CRC Critcal Rewievs in Food Science and Nutrition*, 14, 44- 129, (1981).
- [25] Matheis, G. and Belitz, H. D., “Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanumtuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1,14,18, 1mono phenol, dihidroksiphenylalanine: oxygen-oxidoreductase”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163, 191, (1977).
- [26] Schill, L., and Grisebach. H., *Z. Physiol. Chem.*, 354, 1555, (1973), as cited in Zaprometov, M. N., “Metabolism of phenolic compounds in plants”, *Biokhimiya.*, 42, 3, (1977).

- [27] Bendall, D. S. and Gregory, R. P. F., *Purification of phenol oxidases in Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, (ed: Pridham. J. B.), Oxford: Pergamon Press, 7, (1966).
- [28] Czerkaskij, A., "Pink discoloration in canned Williams Bon Chretien pears", *J. Food Sci.*, 35, 608, (1970).
- [29] Hughes, J. C. and Swain, T., "After-cooking blackening in potatoes. Examination of the interaction of factors by in vitro experiments", *J. Sci. Food Agric.*, 13, 358, (1962).
- [30] Erdüss, T. and Fodor, L., "Removal of phenolic substances from wine", *Kerteszeti Egyetem Kozl.*, 40, 283, (1976).
- [31] Negoro, H., "Effect of polyphenolic compounds on pectinase action", *Eiyo To Shokuryo.*, 25, 1, (1972).
- [32] Burckhardt, R., "Verlust des fruchtigen Wohlgeschmackes bei verarbeiteten Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, der im Zusammenhang mit der Spaltung von Hydroxizimtsäureestern (Deposiden) steht", *Disch. Lebensm. Rdsch.*, 74, 205, (1978).
- [33] Herrmann, K., "Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydanten", *Fete. Scifen. Anstrichm.*, 75, 499, (1973).
- [34] Şakiroğlu, H. (1994). Kuşburnu Meyvesinden İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- [35] Sato, M., "The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid", *Phytochemistry*, 8, 353, (1962).
- [36] (08.12.2015), <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2P3X&opt=3>.
- [37] Vaughn, K. C., and Duke, S. O., "Function of polyphenol oxidase in higher plants", *Physiol. Plant.*, 60, 106–112, (1984).
- [38] Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P. A., Varon R., and Garcia-Canovas, F., "Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968-2975, (1998).
- [39] Laurila, E., Kervinen R., and Ahvenainen, R., "The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits", *Postharvest News and Information*, 9 (4), 53-66, (1998).
- [40] Pekyardımcı, Ş., "Polifenoloksidaz enzimi ve esmerleme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları", *Gıda*, 17 (3), 181-186, (1992).
- [41] Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., and Hayashi, N., "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1446-1449, (2001).

- [42] Mathewson, P. R., *Enzymes*, Eagen Press Handbook Series, 37-38, (2000).
- [43] Ferrar, P. H. and Walker, J. R. L., “Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study”, *Journal of Food Biochemistry*, 20, 15-30, (1996).
- [44] FDA., “Chemical preservatives”, *Food and Drug Administration*, The Office of Federal Register, USA: Washington DC, (1996).
- [45] Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C., “Enzymatic Browning in Fruits, *Vegetables and Seafoods*”, (2000).
- [46] Cilliers, J. J. L. and Singleton, V. L., “Caffeic acid auto oxidation and the effects of thiols”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1789-1796, (1990).
- [47] Laurila, E., Kervinen, R. and Ahvenainen, R., “The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits”, *Postharvest News and Information*, 9, 53, (1998).
- [48] Kubo, I. and Yokokawa, Y., “Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from Buddleriaceae”, *Phytochemistry*, 31, 1075-1077, (1992).
- [49] Kubo, I. and Kinst-Hori, I., “Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4121-4125, (1999).
- [50] Ha, T. J., Yang, M. S., Jang, D. S., Choi, S. U. and Park, K. H., “Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophoreflaescens* for melanogenesis”, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 22, 97-99, (2001).
- [51] Chen, Q. X. and Kubo, I., “Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4108-4112, (2002).
- [52] Andrawis, A. and Kahn, V., “Effect of methimazole in the activity of mushroom tyrosinase”, *Biochemical Journal*, 235, 91-96, (1996).
- [53] Espin, J. C. and Wichers, H. J., “Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, 289-300, (2001).
- [54] Bajwa, V., S., Shukla, M., R., Sherif, S., M., Murch, S., J., Saxena, P., K., “Identification and characterization of serotonin as an anti-browning compound of apple and pear”, *Postharvest Biology and Technology*, 110, 183-189, (2015).
- [55] Dong, T., Shi, J., Jiang, C., Z., Feng, Y., Cao, Y., Wang., Q., “A short-term carbon dioxide treatment inhibits the browning of fresh-cut burdock”, *Postharvest Biology and Technology*, 110, 96-102, (2015).
- [56] Sukhonthara, S., Kaewka, K., Theerakulkait C., “Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree”, *Food Chemistry*, 190, 922-927, (2016).

- [57] Chen, B., N., Xing, R., Wang, F., Zheng, A., P., Wang, Li., “Inhibitory effects of a- $\text{Na}_8\text{SiW}_{11}\text{CoO}_{40}$  on tyrosinase and its application in controlling browning of fresh-cut apples”, *Food Chemistry*, 188, 177–183, (2015).
- [58] Fattouch, S., Raboudi-Fattouch, F., Ponce, J.V.G., Forment, J.V., Lukovic, D., Marzouki, N., Vidal, D.R., “Concentration dependent effects of commonly used pesticides on activation versus inhibition of the quince (*Cydonia Oblonga*) polyphenol oxidase”, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 957-963, (2010).
- [59] Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F., “Partial purification of a thylakoid bound enzyme using temperature-induced phase partitioning”, *Analytical Biochemistry*, 184, 279-282, (1990).
- [60] Jimenez-Atienzar, M. and Garcia-Carmona, F., “Kinetics of the slow pH-mediated transition of polyphenol oxidase”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331, 15-22, (1996).
- [61] Friedman, M., “Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540, (1997).
- [62] Mayer, A. M., “Polyphenol oxidases in plants-Recent progress”, *Phytochemistry*, 26, 11-20, (1987).
- [63] Lerman, L. S., “Biochemically specific method for enzyme isolation”, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, 232-236, (1953).
- [64] Gutteridge, S. and Robb, D., “Purification of Mushroom Tyrosinase by Affinity Chromatography”, *Biochemical Society Transactions*, 1, 519, (1973).
- [65] O’Neill, S. P., Graves, D. J. and Ferguson, J. E., “Affinity chromatography of mushroom tyrosinase”, *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 7, 1159-1166, (1973).
- [66] Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S. and Hegade, M. V. J., “Effect of activation methods on affinity chromatography of potato polyphenol oxidase”, *Phytochemistry*, 31, 1481, (1992).
- [67] Demir, D. (2011). Bazı Üre Türevlerinin Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- [68] Mayer, A. M., Harel, E., and Ben Shaul, R., “Assay of catechol oxidase-a critical comparison of methods”, *Phytochemistry*, 5, 783, (1966).
- [69] Mihalyi, K. and Vamos-Vigyazo, L., “A method for determining polyphenol oxidase activity in fruits and vegetables applying a natural substrate”, *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 5, 69, (1976).

- [70] Heimann, W. and Andler, St., “Zur Aktivitätsbestimmung der Polyphenoloxidase. III. Eine polarometrische Methode zur Bestimmung der Phenolaseaktivität”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 117, 203, (1962).
- [71] Vámos-Vigyazo, L., “Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and 168 vegetables”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14, 44-129, (1981).
- [72] Mazzocco, F. and Pifferi, P. G., “An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn’s hydrazone”, *Anal. Biochem.*, 72, 643, (1976).
- [73] Esterbauer, H., Schwarzl, E., and Hayn, M., “A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid”, *Anal. Biochem.*, 77, 486, (1977).
- [74] Bilaloğlu, G. V., Harmandar, M., “Flavonoidler”, *Aktif Yayınevi*, İstanbul, (1997).
- [75] Harborne, J. B., “The Flavonoids: Advances In Research Since 1980”, *Chapman And Hall, London*, (1988).
- [76] Hertog, M. G. L., Fesken, E. J. M., Holman, P. C. H., Kafan, M. B., Kromhout, D., L., *The Lancet*, 342, 1007-1011, (1993).
- [77] Kren U., Minghetti, A., Sedmera, P., Havlicek, V., Prikrilova, H., Crespi-Perellino, N., *Phytochemistry*, 47, 217, (1998).
- [78] Markham, K. R., Taner, G. J., Caosi-Zit, M., Whitecross, M. I., Nayudu, M., Mitchell, K. A., *Phytochemistry*, 49, 1913, (1998).
- [79] Harborne, J. B., Baxter, H., “The Handbook Of Natural Flavonoids”, John Wiley And Sons, *Chichester*, Vol 1, (1999).
- [80] Harborne, J. B., “Comparative Biochemistry Of The Flavonoids”, *Academic Press, London*, (1967).
- [81] Markham, K. R., “Techniques of Flavonoid Identification”, *Academic Press, London*, (1982).
- [82] Gould, K., Davies, K., Winefield, C., “Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications” (2008).
- [83] Murkovic M., Mülleder U., Adam U., Ptanahouser W., “Detection of From Elderberry Juice In Human Urine”, *Jsci Food Agric*, 8:934-937, (2001).
- [84] Çelik, F. (2012). Antisiyanin Glikozitlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu. Y. Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya.
- [85] Harborne, J. B., Williams, C. A., “Advances In Flavonoid Research Since 1992 –A Review”, *Phytochemistry*, 55, 481-504, (2000).

- [86] Hsieh, H. K., Lee, T. H., Wang, J. P., Wang, J. J., Lin, C. N., "Synthesis And Anti inflammatory Effect Of Chalcones and Related Compounds", *Pharmaceutical Research*, 15, 39-46, (1998).
- [87] Le Marchand, L., "Cancer Preventive Effects Of Flavonoids- A Review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 296-301, (2002).
- [88] Shirley, B. W., "Flavonoid Biosynthesis: "New functions for an 'Old' Payhway", *Trends Plant Sci.*, 1, 377-382, (1996).
- [89] Zeback, R., Dressler, K., Hess, D., "Flavonoid Compounds from Polen and Stigma of *Petunia hybridia*: Inducers of the vir region of *Agrobacterium tumafacions Ti Plasmid*", *Plant Sci.*, 62, 83-91, (1989).
- [90] Kaya, S., "Pestisitler ve yol açabileceği başlıca sorunlar", *Çevre ve sağlık birimleri paneli notları*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Konferans Salonu, Ankara, (1996).
- [91] Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A., "Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji", *Medisan Yayın*, 385-402, (2002).
- [92] Nafiz, D., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., "Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları", *6. Türkiye Ziraat fakültesi Kongresi Yayınları*, s.18, (2005).
- [93] Başkol, G., Köse, K., "Paraoksonaz: biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi", *Erciyes Tıp Dergisi*, 26 (2), 75-80, (2004).
- [94] Suchocka, Z., Swatowska, J., Pachecka, J., Suchocka, P., "RP-HPLC determination of Paraoxonase activity in human blood serum", *J of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 42, 113-119, 2006.
- [95] Cuatrecasas, P., "Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads", *J. Biol. Chem.*, 245, 3059, (1970).
- [96] Laemelli, D. K., "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage", *Nature*, 227-680, (1970).
- [97] Jaenicke, L., "Protein Bestimmung", *Einführung in the Praxis des Biochemikers*, Köln: 27, (1984).
- [98] Bradford, M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).
- [99] Chen, Q. X., Liu, X. D. and Huang, H. "Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution", *Biochemistry-Moscow*, 68 (6), 644-649, (2003).
- [100] Schwimmer, S., Schwimmer, S., (Ed.), *Source Book of Food Enzymology*, Westport: AVI Publishing, 274-267, (1981).



- [101] Kubo, I., Nihei, K. I. and Shimizu, K., "Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 5343-5347, (2004).
- [102] Matsuura, R., Ukeda, H. and Sawamura, M. J., "Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils", *Agric. Food. Chem.*, 54, 2309-2313, (2006).
- [103] Yi, W., Cao, R. and Eur, J., "Synthesis and biological evaluation of novel 4-hidroksi benzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors", *Med. Chem.*, 45 (2), 639-646, (2010).
- [104] Gupta, A. K., Gover, M. D., Nouri, K. N. and Taylor, S., "The treatment of melasma: a review of clinical trials", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 55 (6), 1048-1065, (2006).
- [105] Thanigaimalai, P. and Hoang, T. A. L., "Structural requirement(s) of N-phenyl thioureas and benzaldehyde thio semicarbazones as inhibitors of melanogenesis in melanoma B 16 cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 2991-2993, (2010).
- [106] Zhu, Y. J., Zhou, H. T. and Hu, Y. H., "Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid", *Food Chem.*, 124, 298-302, (2011).
- [107] Ashida, M. and Brey, P., "Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 10698-10702, (1995).
- [108] Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J.L., "Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds", *Phytochemistry*, 34, 927-931, (1993).
- [109] Sayaverde-Soto L. A. and Montgomery M. W., "Inhibition of polyphenol oxidase by sulfite", *Journal of Food Science*, 51, 1531-1535, (1986).
- [110] Nicholas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J. and Aubert, S. Y., "Enzymatic browning reactions in apple and apple products", *C. R. C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 109-157, (1994).
- [111] Halim, D. and Montgomery, M. W., "Polyphenol oxidase of d'Anjou pears", *Journal of the Science*, 43, 603-610, (1978).
- [112] Kahn, V., "Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihidroksiphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana", *Journal of the Science*, 50, 111-115, (1985).
- [113] Embs, R. J. and Markakis, P., "The mechanism of sulphite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase", *Journal of the Science*, 30, 753-758, (1965).
- [114] Golan-Goldhirsh, A. and Whitaker, J. R., "Effect of ascorbic acid, sodium bisulfate and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 1003-1008, (1984).

- [115] Trujillo, C., Lamsabhi, A. M., Mo'O. and Yanez, M., "The importance of the oxidative character of doubly charged metal cations in binding neutral bases. [Urea-M]<sup>2+</sup> and [thiourea-M]<sup>2+</sup> (M=Mg, Ca, Cu) complexes", *Chem. Phs.*, 10, 3229-3235, (2008).
- [116] Khan, V. and Andrawis, A., "Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone", *Phytochemistry*, 24 (5), 905-908, (1985).
- [117] Dedeoğlu, N. and Guler, O.O., "Differential in vitro inhibition of polyphenoloxidase from a wild edible mushroom *Lactarius salmonicolor*", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24 (2), 464-470, (2009).
- [118] Song, K. K., Huang, H., Han, P., Zhang, C. L., Shi, Y. and Chen, Q. X., "Inhibitory effects of cis- and trans-isomers of 3,5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 1147-1151, (2006).
- [119] Cheng, Z.J., Kuo, S.C, Chan, S.C., Ko, F.N. and Teng, C.M., "Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1392 (2-3), 291-299, (1998).
- [120] Nicholas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. and Aubert, S.Y., "Enzymatic browning reactions in apple and apple products", *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nut.*, 34, 109-157, (1994).
- [121] Gencer N., Ergun A., Demir D., "In Vitro Effects of Some Herbicides and Fungicides on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity" *Fresenius Environmental Bulletin*, 21, 549 – 552, (2012).
- [122] Senturk, M. (2009). İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz I ve II İzoenimlerinin Saflaştırılması için Yeni Afinite Jellerinin Hazırlanması ve Yeni Sentezlenen Bazı Sülfonamid Türevlerinin Bu İzoenzimler Üzerindeki İnhibisyon Kinetiklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.