



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



MİKROALGAL PROTEİNLERDEN PEPTİD YAPILI TİROZİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE POTANSİYEL İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Ayşe KÖSE

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**MİKROALGAL PROTEİNLERDEN PEPTİD
YAPILI TİROZİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ELDE
EDİLMESİ VE POTANSİYEL İNHİBİTÖR
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Ayşe KÖSE

Danışman: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir
2020

Ayşe KÖSE tarafından Doktora tezi olarak sunulan “MİKROALGAL PROTEİNLERDEN PEPTİD YAPILI TİROZİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE POTANSİYEL İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/04/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

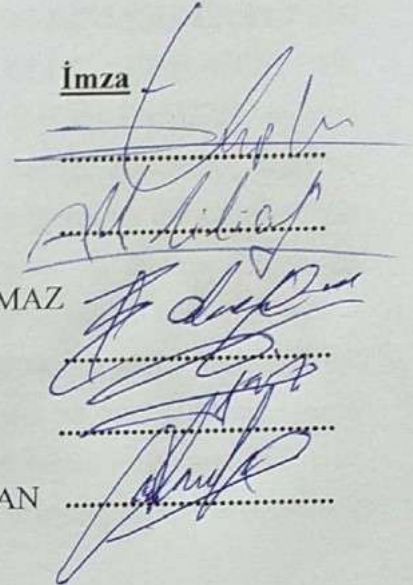
Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bahar SOĞUTMAZ
ÖZDEMİR

Üye : Doç. Dr. Sait SARGIN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ozan KARAMAN

İmza



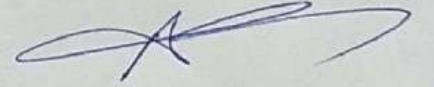
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**MİKROALGAL PROTEİNLERDEN PEPTİD YAPILI TİROZİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE POTANSİYEL İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06/04/2020

İmzası



Ayşe KÖSE

ÖZET**MİKROALGAL PROTEİNLERDEN PEPTİD YAPILI TİROZİNAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE POTANSİYEL İNHİBİTÖR
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Köse, Ayşe

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Nisan 2020, 217 sayfa

Tirozinaz inhibitörleri günümüzde özellikle kozmetik alanda tercih edilen deri beyazlatıcı ürünlerde bulunan hammaddelerdir. Hücresel tirozinaz enziminin inhibisyonu sayesinde melanin üretiminde azalmaya neden olmakta ve agresif pigmentasyon problemlerinin eliminasyonlarında kullanılmaktadır. Tez çalışması ilk defa mikroalgal protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibitörleri olarak kullanılabileceğini gösteren bir referans çalışma olmuştur. Tez çalışması kapsamında öncelikle mikroalg türleri protein üretim değerleri açısından incelenmiş ve *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in %50 değeri üzerinde protein içerdiği bulunmuştur. Tirozinaz inhibisyonu için; (i) *S. platensis* ve *C. vulgaris* biyokütlesinden, (ii) ticari fikosiyaninden tripsin, pankreatin ve alkalaz enzimleri kullanılarak elde edilen hidrolizatlardan, (iii) *S. platensis* fikosiyaninden *in silico* hidroliz sonucu elde edilen sentetik peptidlerden hem mantar (*Agaricus bisporus*) hem de B16-F10 fare melanoma hücrelerinden tirozinaz enzimi aktivitesi ve melanin üretimleri incelenmiştir.

Enzimatik hidrolizatlarda mantar tirozinaz inhibisyon aktivitesi bulunmamıştır. Ancak özellikle *S. platensis* başta olmak üzere mikroalgal hidrolizatlardan farklı enzimler ile elde edilen hidrolizatlar doza bağlı %40-70 arasında enzim inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Mikroalgal hidrolizatlarda antioksidan aktivite değerleri %40'ın üzerinde iken, *C. vulgaris*, *S. platensis*'e göre daha yaklaşık 2 kat antioksidan aktivite göstermesine rağmen tirozinaz inhibisyonu ve melanin üretimleri antioksidan aktivite ile orantılı olarak gerçekleşmemiştir.

Fikosiyanın ve enzimatik hidroliz ürünleri de mantar tirozinaz enziminde etkin bir inhibisyon sağlamamış ancak hücresel tirozinaz enzimi aktivitesi ve melanin sentezinde düşüslere neden olmuştur.

Fikosiyenin dizisinden elde edilen peptidlerden P2 ve P3 hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesi üzerinden mantar tirozinaz enzim inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Peptidlerden P5 en düşük IC_{50} değerine sahiptir (12,12 μ M). Bu değer kojik asitten 7 kat, ticari peptitten, decapeptide 12, 10 kat daha etkindir. İlginç olan sonuç ise her iki peptidin son üç amino asit dizisi, SWY, ortaktır. Bu da bu dizilerin tirozinaz enzim inhibisyonunda önemli olduğunu göstermektedir. P5 ve P2 literatürde bulunan en etkili tirozinaz enzimi inhibisyonu yapan peptidler arasında yer alacak niteliktedir. P4 ise mantar tirozinaz inhibisyonunun aksine tirozinaz enzimini aktive etmiştir. P4 bilinen ilk mikroalgal tirozinaz aktivatör peptid olma niteliğini taşımaktadır.

Sonuçlar göstermiştir ki mikroalgal protein hidrolizatları ve elde edilen peptidler gelecekte tirozinaz inhibisyonu sağlayan ürünler formülasyonunda potansiyel teşkil etmektedir. Elde edilen maddelerin kojik aside göre sitotoksik etki göstermemesi, ayrıca yüksek inhibitör etki göstermeleri mikroalgal protein hidrolizatlarının kozmetik ürünlerde topikal tirozinaz inhibitörleri olarak kullanılmasının uygun olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Mikroalg, Protein, Biyoaktif peptid, Tirozinaz, Enzim, Melanin, B16-F10, Melanoma.

ABSTRACT**PEPTIDE BASED TYROSINASE INHIBITORS FROM
MICROALGAL PROTEINS AND DETERMINATION OF
POSSIBLE INHIBITORY ACTIVITIES**

Köse, Ayşe

PhD in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

April 2020, 217 pages

Tyrosinase inhibitors are preferred in cosmetic formulations as topical hypopigmentation agents. Due to cellular tyrosinase inhibition, cells decrease melanin production and these compounds are used to eliminate aggressive pigmentation problems. In this thesis, for the first time, the effect of microalgal protein hydrolysates on tyrosinase enzyme activity has been studied. Firstly, various microalgal species were screened based on their overall protein content. Among them, *S. platensis* and *C. vulgaris* producing more than 50% of protein of their biomasses were selected for further studies on tyrosinase inhibition. The tyrosinase inhibition activities were screened using samples based on; (i) trypsin, pancreatin and alcalase hydrolyzed *S. platensis* and *C. vulgaris* biomass, (ii) commercial phycocyanin, and (iii) in silico peptide hydrolysis of *S. platensis* phycocyanin products. Tyrosinase inhibitory activity was tested on mushroom (*Agaricus bisporus*) and B16-F10 murine melanoma cells tyrosinases and melanin production.

None of the enzymatic hydrolysates gave a good mushroom tyrosinase inhibitory activity. However, especially *S. platensis* showed 40-70 tyrosinase inhibitory effect on melanoma cells with respect to various enzymes. Microalgal hydrolysates showed antioxidant activities around 40%; however, *C. vulgaris* has almost 2 times more antioxidant capacity when compared to *S. platensis*. The results showed that, there was no a significant correlation with antioxidant activity and tyrosinase inhibition.

Phycocyanin and enzymatic hydrolysis products didn't give a significant decrease in mushroom tyrosinase enzyme activity. However, they effectively inhibited enzyme activity and melanin synthesis in B16-F10 cells.

The peptides designed from phycocyanin showed great inhibition values for mushroom tyrosinase enzyme activity. Among them P2 and P3 inhibit both monophenolase and diphenolase activity. However, P5 was the most potential peptide (IC_{50} 12.12 μ M). P5, interestingly, share sequence similarity with commercial peptide, decapeptide 12; their last 3 amino acids on C terminal site is composed from SWY, which is considered to be significant for tyrosinase inhibitory effect. P5 showed 7 times more inhibitory effect than kojic acid and 10 times more than decapeptide 12. With regards to these results obtained, P5 and P2 is the most potent tyrosinase inhibitory peptides described in the literature so far. Apart from mushroom tyrosinase inhibitory activity, all the peptides (P1-P7) inhibit cellular tyrosinase activity up to 70%. However, P4 increase tyrosinase activity and melanin synthesis. P4 is the first tyrosinase inhibitory peptide obtained from microalgal sources.

The results indicated that microalgal protein hydrolysates could be considered as a novel, stable, reliable and sustainable protein based tyrosinase inhibitors when cytotoxic effect of kojic acid also considered.

Keywords: Microalgae, Protein, Bioactive peptides, Tyrosinase, Enzyme, Melanin, B16-F10, Melanoma.

ÖNSÖZ

Tirozinaz inhibitörleri günümüzde özellikle kozmetik alanında sıklıkla kullanılan cilt beyazlatıcı maddelerdir. Aktif tirozinaz enzimini ya da enzimin gen ekspresyonlarını inhibe ederek melanin üretimini azaltırlar; böylece ciltte meydana gelen estetik ya da klinik pigmentasyon sorunlarının giderilmesinde kullanılırlar.

Pigmentasyon bozuklukları pek çok nedenle ortaya çıkabilir. Bunlar genetik etkenler ve etnik kökenden kaynaklanabileceği gibi çoğunlukla toksik kimyasallar, UV radyasyon, kronik hastalıklar gibi çevresel ve diğer etkenler ile de oluşabilmektedir. Tirozinaz inhibitörlerinin biyoteknolojiye kazandırılması sadece kozmetik alanında önem teşkil etmez. Ayrıca tarım ürünlerinin korunması ve uzun süreli saklanması, kimyasal pestisit kullanımının önüne geçilmesinde, nörodejeneratif hastalıkların metabolizmasının anlaşılmasında ve yeni terapötiklerin oluşturulmasında katkı sağlayacak niteliktedirler.

Tirozinaz inhibitörleri doğal ya da sentetik kaynaklardan elde edilmektedir. Formülasyonlarda en sık kullanılan kojik asit, hidrokinon, vitamin C, arbutin, azelaik asit gibi maddelerdir. Ancak bahsedilen inhibitörlerin toksisite, stabilite ve güvenilirlik sorunları bulunmakta; bu nedenle yeni, güvenilir ve stabil ürünlerin ortaya konulması gerekmektedir.

Mikroalgler yaşam bilimlerinde kullanılan çok yönlü organizmalardır. Yakıt, gıda, kozmetik, farmasötik, moleküler tanı, nütrisötik gibi pek çok alanda yenilikçi ve yaratıcı ürünlerin ortaya konulmasında kullanılan büyük bir araçtır. Dünyanın belki de bilinen en eski canlılarından ve hala üzerinden geçen binlerce yıla rağmen keşfedilmeyi ve uygulamaya konulmayı bekleyen pek çok konu mevcuttur. Mikroalgal biyoproseslerin çok yönlülüğü doktora tez konusunun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Çünkü mikroalglerin kullanıldığı şaşırtıcı alanlar bulunmasına rağmen henüz tirozinaz enzim aktivitesine ve melanin sentezine etkisi pek araştırılmamıştır ve bu alan biraz karanlıkta kalmaktadır.

Mikroalglerden tirozinaz inhibisyonu gösteren peptidlerin ve protein hidrolizatlarının oluşturulması fikri 2015 yılında Kore Daegu Hanny Üniversitesi ile başlayan ortaklık ile gündeme gelmiştir. Bahsedilen konu karşılıklı ziyaret ve fikir alışverişinde ortaya atılmış ve tez konusu böylece şekillenmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışması göstermiştir ki, mikroalglerden elde edilen proteinler sadece gıda ve yem alanında değil, tirozinaz inhibisyonu çalışmalarında da kullanılabilecektir. Sonuçlar hem ulusal hem de uluslararası platformda yaygın etkisi yüksek ve özgün bir çalışma niteliğindedir ve alanında yapılan öncü çalışmalardan birisi olma özelliği taşımaktadır. Tirozinaz inhibitörlerinin önce kozmetik etkisi ardından ise belki de nörodejeneratif hastalık modellerine etkisi gözlenebilecektir. Bu açıdan da mikroalglerin bir köprü olarak kullanıldığı öncü ve umut verici bir çalışma olmuştur.

Tez çalışması Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikroalgal Biyoproses Laboratuvarı'nda, finansal olarak ise 119Z039 numaralı ***Mikroalglerden Tirozinaz İnhibitörlerinin Eldesi*** başlıklı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İZMİR

06/04/2020

Ayşe KÖSE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Melanin ve Tarihçesi	4
2.2. Melanin Pigmenti, Yapısı ve Üretimi: Pigmentleşmeye Moleküler Bakış	7
2.2.1. Eumelanin	9
2.2.2. Pheomelanin	11

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.2.3. Neuromelanin	11
2.2.4. Melanin Pigmentlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve Fonksiyonları	13
2.2.5. Melanin Sentezinin Moleküler Biyolojisi	14
2.3. Tirozinaz Enzimi	20
2.3.1. Tirozinaz Enzimi Substratları	23
2.4. Tirozinaz Enzimi Kaynaklı Metabolizma Bozuklukları	23
2.4.1 Tirozinaz İnhibitörleri	27
2.5. Tirozinaz İnhibitör Peptidler.....	34
2.6. Mikroalgler	40
2.6.1. Mikroalgal Kozmetikler.....	45
2.7. Mikroalgal Proteinler	47
2.7.1. Fikobiliproteinler	50
2.8. Biyoaktif Peptidler.....	51
2.9 Algal Tirozinaz ve Melananogenez İnhibitörleri	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM	58
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	58
3.2. Kullanılan Cihazlar	59

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3. Mikroalg Türlerinin Seçimi	60
3.4. Kullanılan Mikroalg Türleri	60
3.5. Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Solüsyonlar	60
3.6. Yöntem	62
3.6.1. Mikroalg Kültivasyonu	62
3.6.2. Mikroalg Biyokütleden Etanol ile Pigment Ekstraksiyonu	62
3.6.3. Enzimatik Hidroliz İşlemleri	63
3.6.3.1. Enzimatik Hidroliz Optimizasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi.....	63
3.6.3.2. Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi (%DH)	64
3.6.4. <i>S. platensis</i> Fikosiyanin Proteininden <i>in silico</i> Peptid Tasarımı	64
3.6.4.1. P1-P7 Fikosiyanin Peptidlerinin <i>in silico</i> Biyoaktivitelerinin Taranması.....	66
3.6.5. Fikosiyaninden Enzimatik Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi	67
3.6.6. Liyofilizasyon İşlemi	67
3.6.7. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu Tayini	67
3.6.8. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	68
3.6.8.1. B16-F10 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	68
3.6.8.2. MTT ile Sitotoksikite ve Hücre Canlılığı Tayini.....	68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.6.8.3. Hücresel Tirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	69
3.6.9. Lowry Protein Tayin Yöntemi	69
3.6.10. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	70
3.6.11. DPPH Radikali süpürme Aktivitesi (%RSA) Tayini	71
3.6.12. B16-F10 Hücre Lizisi	71
3.6.13. Hücresel Tirozinaz Enzim Aktivite Tayini	72
3.6.14. Melanin Miktarının Tayini	72
3.6.15. Melanin Standart Doğru Denkleminin Oluşturulması	72
3.6.16. Enzim Kinetiği ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi	72
3.6.17. İstatistiksel Analiz.....	73
4. BULGULAR.....	74
4.1. Mikroalg Türlerinin Seçilmesi ve Ön Eleme Çalışmaları.....	74
4.1.1. Alkalaz Enzimi İçin Hidroliz Süresinin Belirlenmesi.....	79
4.2. Mikroalgal Proteinlerden Enzimatik Hidrolizat Eldesi.....	82
4.2.1. Enzimatik Hidroliz Sonuçları.....	84
4.2.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi (%RSA) Değerlerinin Belirlenmesi.....	86
4.3. Mikroalgal Enzimatik Hidrolizatlardan Tirozinaz Aktivite Tayini.....	91

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.1. Mantar Tirozinaz Aktivitesi.....	92
4.3.2. Mikroalgal Hidrolizatların B16-F10 Hücre Canlılığına Etkisi.....	96
4.3.2.1. <i>S. platensis</i> enzimatik hidrolizatlarının hücre canlılığına etkisi.....	98
4.3.2.2. <i>C. vulgaris</i> enzimatik hidrolizatlarının hücre canlılığına etkisi.....	100
4.3.2.3. Kojik asidin hücre canlılığına etkisi.....	101
4.3.3. B16-F10 Hücrel Tirozinaz Aktivitesi.....	102
4.3.4. Melanin üretimi.....	109
4.4. Fikosiyanin Peptidleri.....	114
4.4.1. Ticari Fikosiyanin ile Enzimatik Hidroliz İşlemleri.....	115
4.4.2 Fikosiyaninden Enzimatik Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi.....	117
4.4.3. DPPH radikali süpürme aktivitesi (%RSA) değerlerinin belirlenmesi.....	119
4.4.4. Fikosiyanin Enzimatik Hidrolizatlarının Mantar Tirozinaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	121
4.4.5.B16-F10 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	123
4.4.5.1. Fikosiyanin Enzimatik Hidrolizatlarının Hücre Canlılığına Etkisi.....	123
4.4.5.2. B16-F10 hücrel tirozinaz aktivitesi.....	125

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.5.3. Melanin Üretim Miktarları.....	128
4.5. <i>In silico</i> Fikosiyanin Peptidlerinin Tasarlanması.....	130
4.5.1. <i>In silico</i> Protein Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi.....	130
4.5.2. P1-P7'nin DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi (%RSA) Değerlerinin Belirlenmesi.....	135
4.5.3 P1-P7'nin Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	136
4.5.4. P1-P7 B16-F10 Hücre Canlılığına Etkisi.....	138
4.5.5. P1-P7 Peptidlerinin B16-F10 Hücrelerinde Hücrel Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	139
4.5.6. P1-P7 Peptidlerinin B16-F10 Hücrelerinde Melanin Üretimine Etkisi.....	140
4.5.7. Lineweaver-Burk Kinetiklerinin Belirlenmesi.....	143
4.5.8 <i>In silico</i> Biyoaktivite Tahminlerinin Gerçekleştirilmesi.....	146
5. TARTIŞMA.....	149
5.1. Enzimatik Hidroliz İşlemleri.....	149
5.1.1. Mikroalgal Proteinler.....	149
5.2. Mantar Tirozinaz Aktivitesi.....	158
5.2.1. Protein Hidrolizatlarından Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	158

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

5.2.2. Sentetik Peptidlerden Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	161
5.3. Protein Hidrolizatlarının ve Peptidlerin B16-F10 Hücrelerinin Canlılığına Etkisi.....	162
5.4. B16-F10 Hücre Hatlarında Hücresel Tirozinaz Aktivitesi ve Melanin Üretimi.....	163
5.4.1. Mikroagal Protein Hidrolizatlar ve Fikosiyanin hidrolizatları.....	163
5.4.2. P1-P7 Fikosiyanin Peptidleri.....	166
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	168
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	172
TEŞEKKÜR.....	201
ÖZGEÇMİŞ.....	203
EKLER.....	209



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Melanin pigmentlerinin üretim yolları.....	9
Şekil 2.2 Eumelanin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.3 Pheomelanin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.4 Neuromelanin sentez yolağı	12
Şekil 2.5 Melanosit çizimleri ve fotoğrafları; a) M. Seiji ve T.B. Fitzpatrick'in ilk melanosit ve melanozom tanımları (Medical News gazete küpürü, 5 Temmuz 1960), b) Melanosit dentritleri çizimleri (Seiji ve Fitzpatrick, 1961), c) B16-F10 melanoma hücrelerini 40x büyütmede görselleri.	15
Şekil 2.6 Melanositler, melanozomlar ve deri içerisinde konumları	16
Şekil 2.7 Melanogenez yolları	17
Şekil 2.8 Tirozinaz enziminin katalitik yolları	21
Şekil 2.9 Tirozinaz enziminin met, oxy ve deoxy formları	22
Şekil 2.10 Çeşitli pigmentasyon bozuklukları; a) UV ışık maruziyeti sonucu oluşan çiller, b) Göz çevresinde hafif derecede seyreden vitiligo ve UV maruziyeti nedeniyle oluşsn çiller, c) cafe au lait hiperpigmentasyon bozukluğu, d) travma sonrası oluşan yara izine bağlı hipopigmentasyon, e) yaşa bağlı pigmentasyon artışı (Karaciğer noktaları), f) nevüs tipi hiperpigmentasyon.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.11 Tirozinaz enzim inhibisyonu için kullanılan farklı yollar ve yaklaşımlar.....	28
Şekil 2.12 YRSRKYSSWY Yapısı ve kozmetik formülasyonları a) Decapeptide-12 peptid yapısı, b) Decapeptide-12 Lumixyl deri beyazlatıcı topikal ürünler, c) Decapeptide-12 ENVY Medical deri beyazlatıcı ürün serisi	39
Şekil 2.13 Mikroalgal ürünler.....	42
Şekil 2.14 Biyoaktif peptidlerin biyoaktiviteleri	52
Şekil 4.1 Mikroalg türlerinin % protein değerleri	77
Şekil 4.2 Mikroalglerden etanol ekstraksiyon verim değerleri (%).....	79
Şekil 4.3 Alkalaz enzimi için optimum pH değerinin belirlenmesi (siyah; pH 7, gri pH 8).....	80
Şekil 4.4 <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> 'in alkalaz enzimi ile hidroliz süresi optimizasyonu, (yeşil; <i>C. vulgaris</i> , Mavi <i>S. platensis</i>).....	81
Şekil 4.5 <i>S. platensis</i> (SP) ve <i>C. vulgaris</i> (CV) biyokütlesinin Tripsin (T), Alkalaz (A), ve Pankreatin (P) enzimleri ile hidrolizi sonucu elde edilen %DH değerleri	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- Şekil 4.6 *S. platensis* ve *C. vulgaris* protein hidrolizatları ultrafiltrasyon fraksiyonları protein (g/L) miktarları; a) *S. platensis* pankreatin hidrolizati, b) *C. vulgaris* pankreatin hidrolizati, c) *S. platensis* tripsin hidrolizati, d) *C. vulgaris* tripsin hidrolizati, e) *S. platensis* alkalaz hidrolizati, f) *C. vulgaris* alkalaz hidrolizati 84
- Şekil 4.7 *S. platensis* ve *C. vulgaris* biyokütlesinden elde edilen enzimatik hidrolizatlar, a) *S. platensis* pankreatin, b) *C. vulgaris* pankreatin, c) *S. platensis* tripsin, d) *C. vulgaris* tripsin, e) *S. platensis* alkalaz, f) *C. vulgaris* alkalaz (Her birisi için soldan sağa ham, > 10 kDa, 5-10 kDa, 3-5 kDa, <3 kDa..... 85
- Şekil 4.8 DPPH Radikali süpürme aktivitesi (%RSA); a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris* 91
- Şekil 4.9 Kojik asidin mantar tirozinaz enziminf monofenolaz ve difenolaz aktivitesine etkisi a) doza bağlı inhibisyon değerleri (%), b) doza bağlı tirozinaz enzim aktivitesi (%)..... 93
- Şekil 4.10 *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi a) pankreatin, b) tripsin, c) alkalaz 94
- Şekil 4.11 *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi a) pankreatin, b) tripsin, c) alkalaz 95
- Şekil 4.12 B16-F10 hücrelerinin görüntüleri a) p/68 santrifüj sonrası görüntüsü, b) p/69 hücre lizisi sonrası melanince zengin hücre kalıntısı, c) p/69 madde uygulaması 72. saat sonunda plaka yüzeyinde B16-F10 hücreleri..... 97

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.13 B16-F10 melanoma hücrelerinin mikroskop görüntüleri, a) 10x büyütmede 24 saat kültür sonrası görüntü (p/67), b) 10x büyütmede 48 saat kültür sonrası görüntü (p/67), c) 10x büyütmede 72 saat kültür sonrası görüntü (p/67), d) p/69 72 saat sonra oluşan melanin depoları, e) p/69 24 saat içerisinde hücrelerin dendritik yapıları, f) p/69 48 saat sonra hücrelerin görüntüsü..... 98

Şekil 4.14 *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h 99

Şekil 4.15 *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h 101

Şekil 4.16 Kojik asidin B16-F10 hücre canlılığına etkisi a) 48 saat, b) 72 saat.. 102

Şekil 4.17 Alkalaz hidrolizatlarının B16-F10 tirozinaz aktivitesine etkisi; a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris* 104

Şekil 4. 18 Pankreatin hidrolizatlarının B16-F10 hücre tirozinaz aktivitesine etkisi a) *S.platensis*, b) *C. vulgaris* 106

Şekil 4. 19 Tripsin hidrolizatlarının B16-F10 hücre tirozinaz aktivitesine etkisi a) *S.platensis*, b) *C. vulgaris* 107

Şekil 4.20 Kojik asit için B16-F10 hücre hatlarında tirozinaz inhibisyon değerleri 109

Şekil 4.21 *S. platensis* alkalaz hidrolizatlarının melanin üretimine etkisi; a) Ham, b) >10 kDa, c) 5-10 kDa, d) 3-5 kDa, 3) <3 kDa, f) doza bağlı melanin miktarları (µg/ml), g) 800 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%) 110

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.22 <i>C. vulgaris</i> alkalaz hidrolizatlarının melanin üretimine etkisi; a) Ham, b) >10 kDa, c) 5-10 kDa, d) 3-5 kDa, 3) <3 kDa, f) doza bağlı melanin miktarları (µg/ml), g) 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%)	111
Şekil 4. 23 Pankreatin hidrolizatlarının hücrel melanin üretimine etkisi a) <i>S. platensis</i> , b) <i>C. vulgaris</i> , c) <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> için 200 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%).....	112
Şekil 4. 24 25 Tripsin hidrolizatlarının hücrel melanin üretimine etkisi a) <i>S. platensis</i> , b) <i>C. vulgaris</i> , c) <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> için 200 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%).....	113
Şekil 4.26 Kojik asidin melanin üretimine etkisi a) melanin görselleri, b) doza bağlı melanin miktarı (µg/ml).....	114
Şekil 4.27 Ticari olarak kullanılan fikosiyanin; a) Kyanos Blue fikosiyanin Spirulina extract ambalajı, b) Kyanos Blue fikosiyanin Spirulina extract toz hali	116
Şekil 4.28 Fikosiyanin pigmentinin absorbsiyon spektrumu, a) Referans sprektrum (Glazer vd., 1973), b) Kyanos Blue fikosiyanin spektrum bilgisi	117
Şekil 4.29 Fikosiyanin, alkalaz, tripsin ve pankreatin hidrolizatları ve boyut fraksiyonları görüntüleri	117
Şekil 4.30 Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarından %DH değerlerinin belirlenmesi	118
Şekil 4.31 Fikosiyanin pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatlarında boyuta bağlı hidrolizat miktarlarının belirlenmesi	119
Şekil 4.32 Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatlarda (1 mg/ml) %RSA değerleri, alkalaz (kırmızı), tripsin (mavi), pankreatin (mor)	121

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.33 PC ve enzimatik hidrolizatların mantar tirozinaz enzimi aktivitesine etkisi (%), a)Fikosiyanin, b) Pankreatin, c)Tripsin, d) Alkalaz.....	122
Şekil 4.34 Fikosiyaninin B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) 48 saat, b) 72 saat	123
Şekil 4.35Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h	125
Şekil 4. 36 Fikosiyanin alkalaz hidrolizatlarında Tirozinaz enzim aktivitesi (%)	126
Şekil 4. 37 Fikosiyanin Tripsin hidrolizatlarında Tirozinaz enzim aktivitesi (%)	127
Şekil 4. 38 Fikosiyanin (a) ve pankreatin hidrolizatlarında tirozinaz enzim aktivitesi (%)	127
Şekil 4. 39 Fikosiyanin ve hidrolizatlarının melanin üretim değerleri a) Fikosiyanin, b) Alkalaz, c)Tripsin, d) Pankreatin	129
Şekil 4. 40 Fikosiyanin ve hidrolizatlarında melanin üretim değerleri (%)	129
Şekil 4. 41 Fikosiyanin ve hidrolizatlarından melanni üretim görselleri a) Alkalaz ham, b) Alkalaz >5 kDa, c) Alkalaz <5 kDa, d) Tripsin ham, e) Tripsin >5kDa, f) Tripsin <5 kDa, g) Pankreatin ham, h) Pankreatin >5 kDa, i)Pankreatin <5 kDa, j) Fikosiyanin	130
Şekil 4.42 PC alfa ve beta zincirleri amino asit dizisi ve %amino asit dağılımları	131
Şekil 4.43 Fikosiyanin peptidlerinin amino asit dizleri	135

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 44 P1-P7 peptidlerinin mantar tirozinaz enzimi monofenolaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	136
Şekil 4. 45 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) 48 saat, b)72 saat	138
Şekil 4. 46 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücrelerinde hücre sel tirozinaz aktivitesine etkisi.....	140
Şekil 4. 47 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre sel melanin üretimine etkisi a) doza bağlı melanin miktarları, b) 200 µg/ml konsantrasyonda %melanin üretimi	141
Şekil 4. 48 P1-P7 peptidlerinin doza bağlı melanini üretimlerinin ependorf görüntüleri.....	142
Şekil 4. 49 P2(a) ve P3(b) peptidinin L-DOPA substratında difenolaz aktivitesine bağlı Lineweaver-Burk kinetikleri.....	143
Şekil 4. 50 P2(a), P3(b), P4(c), P5(d) P7(e) peptidlerinin L-tirozin substratında monofenolaz aktivitesi üzerinden Lineweaver-Burk enzim kinetikleri.....	144

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Farklı tirozinaz enzimlerinin özellikleri	21
Çizelge 2.2 Yaygın hiperpigmentasyon ve hipopigmentasyon bozuklukları	24
Çizelge 2.3 Sıklıkla kullanılan tirozinaz inhibitörleri.....	31
Çizelge 2 4 Melanogenez/tirozinaz inhibitörleri ve mekanizmaları.....	33
Çizelge 2.5 Peptid/protein bazlı tirozinaz inhibitörleri.....	37
Çizelge 2.6 Çeşitli mikroalg türleri ve ürettikleri biyoaktif moleküller	44
Çizelge 2.7 Farklı mikroalg türleri ve konvansiyonel gıda kaynaklarının % protein içerikleri.....	47
Çizelge 2.8 Konvansiyonel protein kaynakları ile mikroalgal proteinlerinin amino asit değerlerinin karşılaştırılması (g/100 g)	49
Çizelge 3.1 Çalışma boyunca kullanılan kimyasal sarflar ve markaları.....	58
Çizelge 3.2 Çalışma boyunca kullanılan cihazlar.....	59
Çizelge 3.3 Mikroalg türleri ve besin ortamları	60
Çizelge 3.4 Tez çalışması boyunca kullanılan çözeltiler, tamponlar ve solüsyonlar	61
Çizelge 3.5 Enzimlerin inkübasyon koşulları.....	63
Çizelge 3.6 BIOPEP veritabanında bulunan proteolitik enzimlerin listesi.....	65
Çizelge 3.7 <i>S. platensis</i> PC'den seçilen peptidler	66
Çizelge 3.8 Toplam protein tayini yöntemi standart grafik ve örnek hazırlanması	70

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1 Mikroalg türlerinin ikilenme süreleri	74
Çizelge 4.2 <i>S. platensis</i> enzimatik hidrolizatlarının doza bağlı %RSA değerleri (%RSA±SS).....	87
Çizelge 4.3 <i>C. vulgaris</i> enzimatik hidrolizatlarının %RSA değerleri (%RSA±SS)	88
Çizelge 4.4 Kojik asit ve BHT için konsantrasyona bağlı %RSA değerleri	89
Çizelge 4.5 <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> enzimatik hidrolizatlarının 800 µg/ml konsantrasyonda mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi	96
Çizelge 4.6 <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> mikroalglerinden alkalaz hidrolizi sonucu elde edilen IC ₅₀ ve %tirozinaz inhibisyon değerleri	105
Çizelge 4. 7 <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> pankreatin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda %tirozinaz inhibisyon değerleri	106
Çizelge 4. 8 <i>S. platensis</i> ve <i>C. vulgaris</i> tripsin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda %tirozinaz inhibisyon değerleri	108
Çizelge 4.9 Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatların doza bağlı %RSA değerleri	120
Çizelge 4.10 Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatların %RSA bağlı IC ₅₀ değerleri	121
Çizelge 4.11 Çizelge 4.11 Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarının 800 ug/ml mantar tirozinaz enzimi inhibisyon değerleri	122

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4. 12 Fikosiyanin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz inhibisyonu (%)	128
Çizelge 4.13 Fikosiyaninden elde edilen BIOPEP <i>in silico</i> hidroliz sonucu oluşan peptid listesi.....	132
Çizelge 4. 14 P2 ve P3 peptidlerinin doza bağlı %RSA değerleri.....	136
Çizelge 4. 15 P1-P7 peptidlerinin monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri	137
Çizelge 4. 16 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre hatlarında canlılık için IC ₅₀ konsantrasyonları.....	139
Çizelge 4. 17 Fikosiyanin peptidlerinin Lineweaver-Burk kinetiklerine göre inhibisyon/aktivasyon türleri ve K _m , V _{max} değerleri	144
Çizelge 4. 18 BIOEP veritabanına göre P1-P7 peptidlerinin <i>in silico</i> biyoaktivite tahminleri.....	146
Çizelge 4. 19 ToxinPred veri tabanına göre peptidlerin toksik aktiviteleri.....	147

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
K ₂ PO ₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
TCA	Trichloroacetic acid
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
PTFE	Polytetrafloretilen
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimetilsülfoksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
HCl	Hidroklorik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
BHT	Buthylated hydroxytoluene
H ₂ O	Su
%	Yüzde
ml	Mililitre
U	Unit
v/w	Hacim/Ağırlık
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
L	Litre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
v/v	Hacim/Hacim
E/S	Enzim/Substrat
M	Molar
µmol	Mikromol
h	Saat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
vvm	Hacim/hacim/dk
w/w	Ağırlık/Ağırlık
mM	Milimolar
<u>Kısaltmalar</u>	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fötal Bovin Serum
BSA	Bovin Serum Albumin
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
PKA	cAMP bağımlı protein kinaz (protein kinaz A)
MC1R	Melanokortin 1 reseptörü
α -MSH	α -melanin stimüle edici hormon
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
GSK β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
MAPK	Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
NF- κ B	Nükleer faktör kappa beta
iNOS	Nitrik oksit sentaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
COX-2	Siklo-oksijenaz 2
SCF	Kök hücre faktörü
MIF	Mikrofaj migrasyon inhibitör faktörü
PAR-2	Proteaz ile aktive edilmiş reseptör-2
POMC	Pro-opiomelanokortin
ACTH	Adrenokortikotropin
DHI	5,6-dihydroxyindole
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine
UV	Ultraviyole
TRP-1	Tirozinaz ilintili protein-1
TRP-2	DOPA tatumeraz
TYR	Tirozinaz
PPO	Polifenol oksidaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
MITF	Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü
DH	Hidroliz derecesi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EPA	Eikozapentanoik asit
DHA	Dokzahegzanoik asit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
GRAS	Generally Regarded as Safe
DQ	Dopakinon
PC	Fikosiyanin
RSA	Radical Scavenging Activity



1. GİRİŞ

Melanin pigmenti doğada en sık bulunan ve yapısını günümüze kadar koruyup gelebilmiş nadir pigmentlerden birisidir. Bakteri, fungus gibi tek hücreliler ile bitki ve hayvanlarda renklemeyi sağlayan temel pigmenttir. Melanin pigmenti ultraviyole (UV) koruyucu, ağır metal bağlayıcı, termal izolasyon ve termoregülasyon gibi özellikleri neticesinde deri homeostasisini düzenleyerek yaşamsal önem arz eden bir pigment olmakla beraber; yapı ve fonksiyonunun ortaya çıkmasıyla biyoteknolojinin biyomedikal, kozmetik, farmasötik, biyoelektronik, katı madde fiziği gibi pek çok farklı alanlarında kullanılmaya da başlanmıştır.

Melanin; insan saç, deri ve göz rengini oluşturması, meyve ve sebzelerin enzimatik olarak kararması gibi insan sağlığından tarım ürünlerine varan geniş yelpazede ekonomik önemi olan bir pigmenttir. Tüm bu pigmentleşmenin oluşmasının arkasında yatan kilit rol ise tirozinaz adı verilen polifenol oksidaz (PPO) grubuna dahil bir enzim tarafından sağlanmaktadır. Tirozinaz enzimi L-tirozin ya da dopakinonun L-DOPA'ya oksidasyonu ile melanin üretimi zincirinin başlatılmasını sağlar. İnsan metabolizmasında ise melanin üretimi sadece enzime bağlı değildir. cAMP, ScF/Kit, iNOS, CREB, MITF, p38 gibi pek çok hassas sinyal yollarının yanı sıra transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ya da inhibisyonu da tirozinaz enzim aktivitesine etki etmektedir, doğal olarak melanin üretim miktarını da değiştirmektedir.

İnsan fizyolojisinde melanin pigmentinin fazla ya da az üretilmesi yani herhangi bir çevresel ya da genetik etki neticesinde üretim metabolizmasının bozulması sonucunda ciltte pigmentasyon problemleri meydana gelmektedir. Pigmentasyon problemleri renk kaybı olarak sınıflandırılan hipopigmentasyon sorunları ya da melaninin anormal üretimi ile artan pigmentasyon, hiperpigmentasyon, olarak sınıflandırılmaktadır. Pigmentasyon problemleri bireyin cinsiyetine, sahip olduğu etnik kökene, yaşadığı çevreye, maruz kaldığı UV radyasyona, toksik kimyasallara, ağır metallere ya da geçirmiş olduğu hastalık/travma geçmişine bağlı olarak değişmektedir. Çoğunlukla ciltte çiller, güneş yanıkları olarak bilinen lekeler, vitiligo, *cafe au lait* gibi izler ile kendini göstermekte ve sonuç olarak bireylerin sadece sağlığını değil ayrıca psikolojisini ve sosyal yaşantısını da negatif olarak etkilemektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki, melanin üretimi ve tirozinaz enzimi Parkinson, Alzheimer gibi toplumun büyük bir kesimini etkilemeye başlamış olan

nörodejeneratif hastalıkların da oluşmasında rol oynamaktadır. Hem kozmetik hem estetik hem de farmasötik anlamda tirozinaz enzim aktivitesinin düzenlenmesi hususu önem arz etmektedir.

Tirozinaz enzimi ile alakalı ürünler genel olarak kozmetik ürünlerdir ve tirozinaz inhibisyonu ile antimelanojenik özellikler taşımaktadırlar. Bu maddeler genellikle direkt enzimin aktif bölgesine ya da enzim-substrat kompleksine bağlanarak, melanozom oluşumunu ve transferini engelleyerek, sinyalizasyon yolları üzerinden tirozinaz enzim aktivitesini durdurarak ya da azaltarak çalışmaktadırlar ve sonuç olarak melanin üretimini inhibe etmektedirler. Genellikle polifenoller, serbest fenoller, kinon türevleri, resveretrol ve analogları, bazı yağ asitleri gibi sentetik ya da doğal moleküller bilinen ve formülasyonlarda kullanılan tirozinaz/melanogenez inhibitörleridir. Bunlar arasında kojik asit, hidrokinon, arbutin, vitamin C ise ticari olarak sıklıkla kullanılan moleküllerdir. Ancak hidrokinonun neden olduğu sitotoksikite ve stabilite sorunları neticesinde Avrupa Birliği tarafından kozmetik ürünlerde kullanımı kısıtlanmıştır. Kojik asidin ise hücrelere uzun süre kullanımda kanserojen etki yaptığı bilinmektedir. Arbutin ve Vitamin C ise stabilizasyon problemleri nedeniyle formülasyon işlemlerini zorlaştırmaktadır. Bu neden yeni, doğal, güvenilir ve stabil tirozinaz inhibitörlerinin aranması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Peptidler yüksek stabilite, düşük sitotoksikite, düşük moleküler ağırlık gibi özellikleri neticesinde yeni nesil tirozinaz inhibitör ürünleri olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır. Peptidler; amino asit kombinasyonlarında oluşturulabilecek çeşitlilik nedeniyle geniş bir biyoaktivite havuzu sunmaktadır ve henüz peptid tirozinaz inhibitörleri ile alakalı çalışma sayısı oldukça azdır. Bilinen peptidlerin yapısal analizleri gerçekleştirildiğinde; C terminal tirozin amino asit varlığı, yapıya arjinin amino asidinin dahil olması, valin, lizin, alanin ve fenil alanin gibi amino asitler ile arjinin kombinasyonları tirozinaz inhibisyonu ve melanin sentezinin düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur. Bazı amino asit kombinasyonları peptidin tirozinaz enziminin aktif bölgesine bağlanmasını artırırken bazı kombinasyonlar hem bağlanma hem inhibisyon sağlamaktadır.

Mikroalgler tek hücreli ya da koloni oluşturabilen, fotosentetik organizmalardır. Doğada üretilen oksijenin yaklaşık %70'i mikroalgler tarafından sağlanmaktadır. Biyoteknolojiye girişleri 1950'li yıllarda olsa da mikroalgal ürünler özellikle tek hücre proteini, fonksiyonel yağ asitleri, antioksidan pigmentler ve diğer pek çok biyoaktif bileşikleri sayesinde gıda, kozmetik, farmasötik gibi

alanlarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Mikroalglerin biyoteknolojiye girişı gıda ve yem endüstrisiyle olmuş, bu akım giderek biyoyakıt üretimine kaymış ve son çalışmalar ise terapötik protein üretimleri, biyomalzememeler, moleküler biyoloji, doku mühendisliği, kozmetik ve farmasötik hammadde üretimleri gibi alanlarda artış göstermiştir. Bilinen algal tirozinaz inhibitörleri genellikle makroalg türlerinden elde edilen fenolik bileşikler ve pigmentlerdir. Henüz mikroalglerin tirozinaz enzim aktivitesine ve melanin sentezine katkısı tam olarak bilinmemekle birlikte; tirozinaz enzim aktivitesine etkisi araştırılmaya muhtaç bir alandır ve bu alanda umut vaat edici pek çok biyoaktif protein yapılı ürünlerin olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında farklı, endüstriyel olarak da önem teşkil eden mikroalg türlerinden elde edilen enzimatik protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibisyonu ve melanin üretimine etkisi incelenmiştir. Öncelikle mantar tirozinaz enzimi üzerinde direkt inhibitör etkileri araştırılmış; ardından B16-F10 fare melanoma hücre hatlarında inhibisyon etkisi incelenmiştir. Siyanobakterilerde bulunan ve fotosentetik pigment olan, mavi renkli fikosiyaninin tirozinaz enzimine sinyal yolları üzerinden inhibitör etki gösterdiği daha önceki çalışmalarda ifade edilmiştir (Wu et al., 2011). Tez kapsamında ise fikosiyaninden enzimatik olarak elde edilen protein hidrolizatların ve fikosiyanin peptidlerinin *in silico* tasarlanması ve kimyasal sentez yöntemiyle üretilmesi sonucu elde edilen saf peptidlerin de tirozinaz inhibisyonuna etkisi hem mantar hem de B16-F10 melanoma hücre hatlarında incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Melanin ve Tarihçesi

Melanin doğada en yaygın bulunan pigmentlerden bir tanesidir (Rescigno et al., 2002). Özellikle meyve ve sebzelerin kararmasında, insan ve hayvanlarda deri, saç ve göz renginin belirlenmesinde rol oynayan temel pigmenttir (Loizzo et al., 2012; Rózanowska et al., 1999). Sadece yüksek yapılı organizmalarda değil; bakteri ve funguslarda da melanin pigmentine rastlanmaktadır (Fernandes and Kerker, 2017). Pigmentleşme derecesi melaninin tipine, miktarına ve kalitesine göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların nedeni ise genetik ve çevresel unsurlardır (Pillaiyar et al., 2017b). Çok eski fosillere ait yapısal çalışmalar göstermiştir ki; dinozorlarda, ilkel kuşlarda, primitif canlılarda ve yumuşakçalarda melanin pigmenti yapısını koruyarak günümüze kadar gelmiştir (Zhang et al., 2010). Canlıların evrimsel gelişimine ışık tutma potansiyeli olan bu gibi keşifler, melanin pigmentinin sadece günümüz için değil canlıların evriminin anlaşılmasına da katkı sağlayacak çok değerli bir madde olduğunu ortaya koymuştur.

“Melanin” kelimesi eski Yunanca ’da “koyu”, “siyah” anlamına gelen *melanos* sözcüğünden gelmektedir. Ayrıca, literatüre ise ilk olarak 1840 yılında İsveçli kimyager Jöns Jacop Berzelius’un gözün koroid tabakasından ekstrakte ettiği koyu bir pigmenti “*melanin*” olarak adlandırması ile kazandırılmıştır (Westerhof, 2006; Zhang et al., 2010).

Deri hastalıkları ile alakalı ilk yazılı referansa milattan önce 2200 yıllarında Asuryan medeniyetinde rastlanmaktadır (Westerhof, 2006). Yazıtlar vitiligodan bahsetmektedir ve insan derisindeki farklı desenlerde beyaz ve koyu renk varlığına dikkat çekmiştir. Ardından milattan önce 1550 yılında Mısırın Ebers Papirüsleri’nde cüzzam ve vitiligodan bahsedilmiş ve her iki hastalığın da iyileştirilebileceğine değinilmiştir (Ebbel, 1937). Milattan önce 1400’lü yıllarda Hindistanlıların kutsal Atharva Veda kitabında da vitiligo bulgularına atıfta bulunulmuştur. Ancak tüm bunlardan 1000 yıl sonra Herodot’un yazılarında vitiligo terimine değinilmiştir. Bu kaynakta Persli, Etiyopyalı, Hindistanlı ve Yunanlı bireyler arasındaki deri rengi farkından bahsedilmiştir (Westerhof, 2006). Ülkeler arası yapılan seyahatlerde farklı etnik gruplara ait bireylerdeki deri, göz ve saç rengi dikkat çekici temel unsurlar arasında yer almış ve nedenleri merak edilmeye başlanmıştır. Onesicritus, Büyük İskender’in Hindistan’a yapmış olduğu yolculuğunda da koyu deri rengi üzerinden etnik köken farklılıklarıyla ilgili birtakım

notlar paylaşmıştır. Yine, eski Yunan kaynaklarına göre Aristoteles güneş ışığına bağlı olarak deride renk değiştirme ve koyulaşma ile ilgili ilk ifadeler yer vermiştir. Böylece güneş ışığına yani aslında dolaylı olarak UV ışınlarının deride pigmentleşme üzerine etkisine ve melanin sentezine dair ilk bulgular da ortaya atılmıştır (D'Mello et al., 2016). Görüldüğü üzere eski insanlar derinin renk oluşumu, renk kaybı gibi fenotipik olguların farkına varmış ve farklı etnik kökenlere sahip insanlar arasında pigmentleşmeye bağlı renk farklılıklarını da anlamaya başlamışlardır. Aristoteles sadece insanlarda renk değişiklikleri üzerinde değil aynı zamanda meyve ve sebzelerde meydana gelen kararma ve renk değişimlerini de fark etmiş ve nedenlerini incelemek istemiştir.

Pigmentleşme ile alakalı çalışmalar orta çağdan sonra Avrupa'da 15 ve 16. yüzyılda Afrika halkları ile Avrupa halkları arasındaki etkileşim ile yeniden başlamıştır. Farklı deri renklerinin varlığı bilim insanlarının altında yatan nedenleri merak etmesini sağlamış ve yeniden deriye rengini veren fizyolojik ve çevresel etkileri incelemeye başlamışlardır. Bu çalışmaların öncüsü Jean Riolan (1580-1657) isimli bir Parisli anatomi bilimcisidir (Westerhof, 2006). Çalışmalarında siyah deri rengine sahip bir bireyden aldığı örneklerde deriyi iki tabakaya ayırmıştır. “*Petite peau*” adını vermiş olduğu üst tabaka siyah iken, “*dermis*” adını verdiği alt tabakanın kendi tabiri ile “*kar kadar beyaz*” olduğunu ifade etmiştir. Bulgularını eski Yunan bulgularıyla karşılaştırmış; sonuç olarak sıcaklık ve güneş gibi çevresel faktörlerin deri rengine katkısı olduğu savını desteklemiştir.

Takip eden çalışmalarda Malpighi (1628-1694) beyaz ve koyu tenli bireylerin dermis tabakasının renksiz olduğunu gözlemlemiş ve renk oluşumunun üst deri tabakasıyla ilintili olduğunu savunmuştur. Çalışmalarında üst tabakanın dolaşım sistemiyle bağlantılı olduğunu düşünmüş ve kan dolaşımının renk oluşumuna neden olduğunu iddia etmiştir. 1766 yılında Alman anatomist Johann Pechlin Etiyopyalı bireyden aldığı deri örneklerini Malpighi yöntemi ile tabakalarına ayırmış ve aynı sonuca ulaşmış, Malpighi'nin bulgularını desteklemiştir. Elde edilen bulgular ilerleyen dönemlerdeki çalışmaları hızlandırmıştır. Avrupalı bilim insanları açısından Afrikalı bireyler ile Avrupalı bireyler arasındaki renk farklılıkları ilgi çekici olmaya devam etmiş, doku ve organların dondurulmaya başlanmasıyla çalışmalar giderek hızlanmış ve yeni bulgular ortaya konulabilmiştir (Zimmerman and Becker, 1959). Uzun yıllarca elde edilen bulguların hepsi derinin farklı katmanları olduğu, etnik kökenlerin deri rengindeki farklılıkları yarattığı, güneş ve sıcaklığın renk oluşumuna etkili olduğu ve deri hasarlarının renk değişikliklerine

yol açtığını savunmuş ancak renk oluşumunun altında yatan gerçek mekanizmanın keşfine yaklaşamamıştır.

1823 yılında Heusinger deride bulunan pigmentlerin kaynağını açıklamaya çalışmıştır. Heusinger'in bulgularına göre kan pigmentinden türevlenmiş *bir tür karbon*, koyu tenli bireylerin derilerinin üst tabakasında birikerek deriye siyah/kahverengi rengini vermektedir. Burdach'a (1835) göre ise deriye rengini vermekten sorumlu pigment çevresel kan damarları tarafından kanın pıhtılaşmasına bağlı olarak meydana gelen küçük partiküllü kahverengi bir tabakadan ibarettir. Tüm bu keşifler devam ederken, 19. yy. da mikroskopik görüntülemenin de arttığı zamanlarda pigmentleşmenin gerçek kaynağına doğru yaklaşılmaya başlanmıştır (Westerhof, 2006).

1819 yılında Sangiovanni mürekkep balığının pigmentlerini mikroskop altında incelemiş ve "*kromatofor*" adını verdiği pigment hücrelerini bulmuştur. 1837 yılında patalog Henle, insan epidermis tabakasında pigment üreten hücrelerin varlığından söz etmiştir. Berzelius'un çalışmalarında melanin sözcüğüne yer vermesiyle literatüre giren melanin pigmentleri için o zamanlar tür ayrımı yapılmaksızın tüm renkli cisimcikler melanin olarak adlandırılmıştır. Melanositlerin keşfi ile hücresel organizasyonu ve derinin tabakaları ile ilişkisi anlaşılabilmektedir. Melanosit, epidermis, keratinosit, Langerhans hücreleri, *stratum corneum* gibi deri tabakalarının anlaşılması, mikroskopik olarak da melanositlerin gözlemlenmesi, anatomik kesitlerinin yapılması ve histolojik incelemelerinin başlamasına rağmen, melanin pigmentinin üretim mekanizmasının aydınlatılması uzun zaman almıştır (Vachtenheim and Borovanský, 2010).

Burdack ve Heusinger'in savunduğu hipoteze göre, melanin pigmenti hemoglobinden türemiştir. Ancak yapılan çalışmalarda Spiegler (1903) göz ve saçtan aldığı örneklerin hemopirol reaksiyonuna tepki vermemesi üzerine demir varlığına rastlamamış ve bu hipotez çürütülmüştür. Melaninin keratinositlerde mi başka yapısal oluşumlarda mı üretildiği uzunca bir süre gizemini korumaya devam etmiştir (Vachtenheim and Borovanský, 2010).

1880'lerin ortasında yapılan bir çalışmada, Yoshida (1883), Bertrand ve Bourquelet (1895) Urushi ağacında (*Toxicodendron vernicifluum*) lakkaz adı verilen enzim varlığında oksidatif reaksiyon ile siyah renk oluşumunu sağlamış ve renk değişimlerinde enzimlerin etkisini açıkça göstermiştir (Westerhof, 2006). Bertrand 1895 yılında tirozin gibi aromatik grupların varlığında mantarda renk

değişimi ve kararmanın başladığını ve bunun da bir enzim varlığında gerçekleşebileceğini ortaya koymuştur. Bourquelet 1896 yılında bu enzime *tirozinaz* adını vermiş ve daha sonra bu fenomen pek çok bağımsız bilim insanı tarafından da doğrulanmıştır. Örneğin; hidrojen peroksit varlığında tirozin, tirozinaz enzimi sayesinde sarı, kırmızı-kahverengi ve sonunda siyah bir renk dönüşümü sağlamış ancak fazla hidrojen peroksit varlığı ise inhibisyon etkisi göstermiştir (Westerhof, 2006). Durham 1904 yılında vertebraların derisinde tirozinaz enzimine rastlamıştır. Devam eden çalışmalarda melanin pigmentinin kaynatılmasıyla indol bileşiklerinin ortaya çıktığı bulunmuştur.

Melanin pigmentinin bir takım özel organeller içerisinde üretildiği fikri 19. yy. başlarında Todd ve Bowman tarafından ortaya atılmıştır. 1894 yılında Reinke renkli dokuları hidrojen peroksit varlığında renksizleştirmiş ve mikroskopik gözlemlerde renksiz yapıların kendine has bir dizilimi ve hücre morfolojisine sahip olduğunu bulgulamıştır. 1885 yılında Aeby'nin hipotezine göre pigment hücreleri, epitel hücrelerine pigmentleri özel bir yapılaşma ile transfer etmektedir. Karg (1888) pigmentlerin özelleşmiş dentritler vasıtasıyla transfer edildiğini bulmuştur. Karg çalışmasında pigment hücrelerinin epiteller tarafından fagositoz ile asimile edildiğini ifade etmiştir. 20. yy. da özellikle reaksiyon kinetikleri, enzimatik yollar üzerinde durulmaya başlanmış ve melanin üretim yolları ortaya konmuştur.

Görüldüğü üzere milattan önce 2000'li yıllarda bireylerin derilerinde meydana gelen renk farklılıkları üzerinden oluşan merak ile melanin pigmentinin varlığı ve mekanizması anlaşılmaya çalışılmış; ancak yaklaşık 4000 yılın ardından tirozinaz enziminin varlığının bulunması sonrasında bu mekanizma aydınlatılmaya başlanabilmiştir. Günümüzde melanin pigmenti ve tirozinaz enzimi sadece insan ve hayvanlar için önemli olmamakla beraber tarım ürünlerinin kararmasında, raf ömrünün uzatılmasında, biyoelektronik araçlarda, kozmetik ürünlerde ve dermokozmetik olarak deri kusurlarının tedavisinde kullanılan öncü bir araç haline gelmiştir.

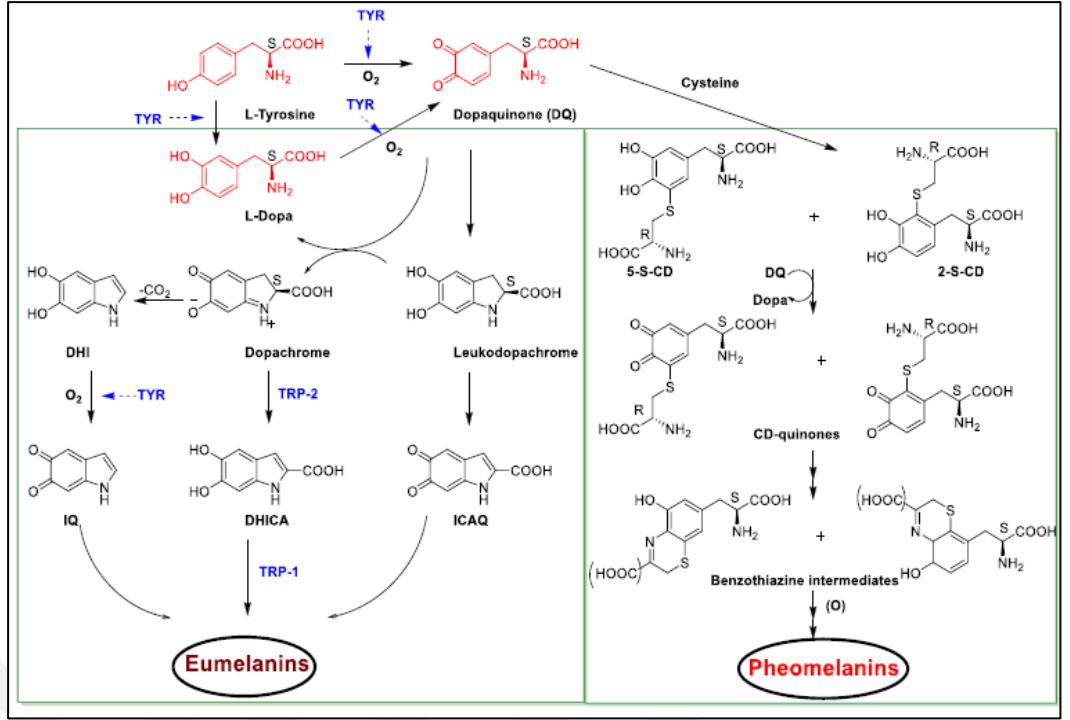
2.2. Melanin Pigmenti, Yapısı ve Üretimi: Pigmentleşmeye Moleküler Bakış

Melanin ($C_{18}H_{10}N_2O_4$) L-tirozin amino asidinden enzimatik reaksiyonlar sonucu sentezlenen çözünmez, yüksek moleküler ağırlıklı 5,6-hidroksi indol polimeridir (Ubeid et al., 2012). Melanin pigmenti sarı-siyah arasında farklılık gösteren ve türlerine, bulunduğu organizmaya ve çevresel koşullara göre geniş renk

spektrumunda bulunabilen bir pigmenttir (Ischia et al., 2013). İnsanlarda ten rengi, göz ve saç rengi gibi fenotipik karakterlerden sorumludur. Ayrıca sinir sisteminde de bulunmaktadır ve pek çok nörolojik aktivitede rol oynamaktadır (Bagherzadeh et al., 2015; Pillaiyar et al., 2018). Melaninin heteropolimer yapısı hala enigmatik bir pigment olarak sınıflandırılmasına neden olmaktadır.

Melanin pigmentlerinin sınıflandırılması ilk olarak 1969 yılında Nicholas tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırmada melanin pigmentleri; (a) eumelanin, (b) pheomelanin ve (c) allomelanin olarak üç gruba ayrılmıştır. Buna ek olarak, sinir sisteminde yer alan neuromelanin adı verilen melanin yapıları kompleksler de bulunmaktadır (Ischia et al., 2015). Eumelanin ve pheomelanin genelde hayvanlarda bulunan melanin türleridir (Meredith and Sarna, 2006). Allomelanin ise bitki, fungus ve bakteri kökenli melanin benzeri pigment yapılarının isimlendirildiği genel bir kategori olarak yer almaktadır. Örneğin *Pseudomonas* ve *Aspergillus* fungusları ortamda tirozin varlığında pyomelanin adı verilen ve yapısal olarak da eumelanine benzer bir pigment sentezlemektedir (Schmaler-Ripcke et al., 2009). Pek çok patojenik bakteri ve fungus benzer yollar kullanarak melanin tipli pigmentleri sıklıkla üretmektedirler. Bitkiler kateşol adı verilen koyu renkli fenolik pigmentler üretmektedirler. Pek çok canlı türünün farklı melanin benzeri pigmentler sentezlediği anlaşıldıktan sonra sınıflandırma değiştirilmiştir. Yeni düzenlemede ise (diğer türlerin öncü molekülleri çeşitlilik gösterebildiği için) tirozin ve benzeri moleküllerin hücre içerisinde oksidasyonu sonucu oluşan pigmentlere melanin denilmesi konusunda mutabık olunmuştur. Bu da melanositler tarafından üretilen pigmentleri melanin olarak adlandırılmasına neden olmuştur (Liu and Simon, 2003).

Melanin biyosentezi; L-fenil alaninin L-tirozine hidroksilasyonu ya da doğrudan L-tirozinin başlangıç substratı olarak kullanılmasıyla başlar. Melanin biyosentezinde en kritik adım, tirozinaz enziminin L-tirozini DOPA-kinona (DQ) ya da L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ara bileşiğine dönüştürmesidir (D'Mello et al., 2016; Ochiai et al., 2016a). L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu ardından L-DOPA, melanin ve kateşolaminlerin üretiminde kullanılacak öncül bileşik olarak üretilmiş olur. Bu basamak hem enzim aktivitesi hem de tirozinin dönüşüm kinetikleri açısından kritiktir (Park et al., 2010). L-DOPA ardından DQ'na okside olur ve eumelanin ya da pheomelanin üretim yolları çalışmaya başlar (Kubo et al., 2000; Meredith and Sarna, 2006; Tseng et al., 2015). Her iki pigment arasında yapısal farklılık sağlayan adım ise DQ'nun L-sistein amino asidi ile reaksiyon vermesidir (Şekil 2.1).

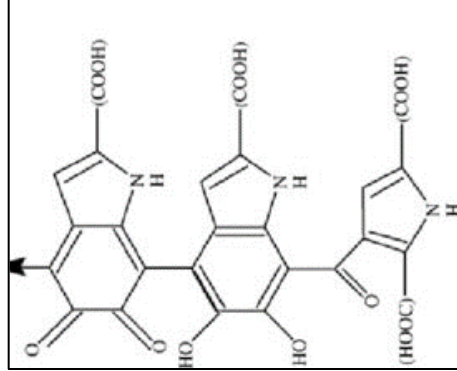


Şekil 2.1 Melanin pigmentlerinin üretim yolları (Pillaiyar et al., 2017b)

2.2.1. Eumelanin

5,6-dihidroksi indol (DHI) ve 5,6-dihidroksi indol-2-karboksilik asit (DHICA)'ten oluşan kahverengi-siyah, heterojenik bir makromoleküldür (Ischia et al., 2015; Meredith and Sarna, 2006; Pillaiyar et al., 2017c) (Şekil 2.2). Eumelanin deriye asıl rengini veren ve en çok bulunan türdür. Özellikle de göz dokusunda oran olarak fazladır. Eumelaninin DHI ve DHICA yüzdeleri sentetik ya da doğal olarak üretilmesine göre değişiklik göstermektedir. Doğal yollarla üretilen eumelaninler %50 oranında DHICA içerirken; sentetik eumelaninde bu oran %10 civarındadır (Ito, 1986). Bileşiğin sekonder yapısı tam olarak aydınlatılamadığı için hala yapısal ve konformasyonel bilinmezlikler mevcut olsa da özellikle fotobiyolojik ve fotokimyasal çalışmalar sayesinde bu boşluk doldurulmaya başlanmıştır. Eumelanin cildi renklendirmekle kalmaz, foto-koruyucu bir özelliğe de sahiptir (Rózanowska et al., 1999). UV ve görünür bölge dalga boylarında biyolojik bir molekülden ziyade inorganik bir materyal olarak davranış sergilemektedir. Bu nedenle yarı iletken fiziği için de farklı bir biyolojik model oluşturmuş, biyo-sensör ve biyo-iletken çalışmalarında da yer almaya başlamıştır (Lee et al., 2007). Eumelaninin optik özellikleri ve makromoleküler yapısı neticesinde katı madde fiziği, kuantum fiziği, biyomateryal, kuantum kimyası gibi alanlarda çalışılmıştır (Meredith and Sarna, 2006; Mostert et al., 2012a). Floresans aktivitesi, optik davranışları, para-manyetik aktivitesi, elektron transfer

mekanizmaları gibi karakteristik özellikleri nedeniyle ilgi çekici bir moleküldür (Ischia et al., 2015, Mostert et al., 2012b).



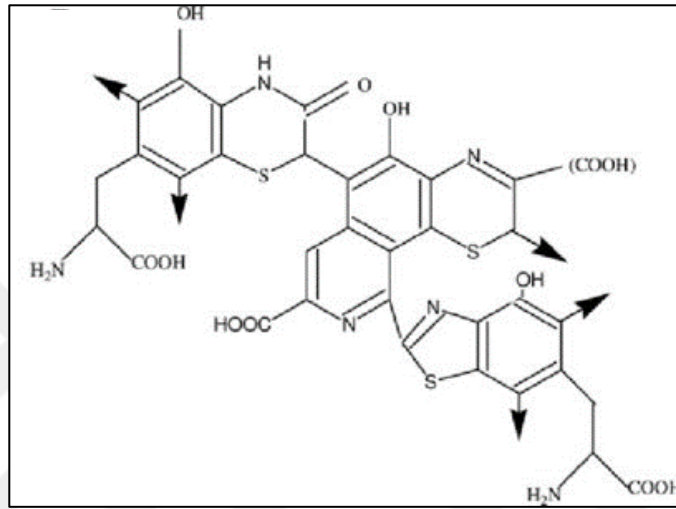
Şekil 2.2 Eumelanin kimyasal yapısı (Revskeya et al., 2012)

Göz dokusunda bulunan eumelaninlerin ışığı kırma/yansıtma özelliği nedeniyle retina hasarının önlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Kaczara et al., 2012). Bu sayede yaşa bağlı maküler dejenerasyonun önlenmesinde görev yaptığı düşünülen teoriler arasında olsa da henüz net olarak aydınlatılmış değildir. Göz direkt olarak ışığa maruz kaldığı için yine deride olduğu gibi oksidatif stresin azaltılmasında antioksidan aktivite sağladığı da düşünülmektedir (Pillaiyar et al., 2017b).

Eumelaninlerin en dikkat çekici özelliği; sahip oldukları redoks karakteristikleridir. Oksidasyon gücü sayesinde Fe (III), Cu (II), Sr (II), Cd (II), La (III) Gd (III) ve Pb (II) gibi ağır metalleri şelatlama ve bağlama kapasitelerine sahiplerdir (Chen et al., 2009; Hong and Simon, 2007; Sono et al., 2012; Rózanowska et al., 1999). Oksidasyon karakteristikleri ve metal şelatlama özellikleri hem biyokimyasal hem de fizikokimyasal birçok faydalı teknik sonuçlara sebep olmuştur (Rózanowska et al., 1999). Hafif metalleri bağlamaması ve ağır metallerle yüksek afinite göstermeleri neticesinde deride toksik metallerin yarattığı hasarların önlenmesinde filtre görevi görmektedirler. Eumelanin yapısı içerisindeki DHICA, H atom transferi sağlayarak antioksidan aktivite göstermektedir. Yapılan çalışmalarda DPPH, ABTS ve NO radikallerinin süpürülmesinde oldukça kuvvetli olduğu da bulunmuştur (Panzella et al., 2013). Doğada DHICA'nın DHI'ya göre yüksek oranda olması DHICA'nın DHI'ya göre göstermiş olduğu yüksek antioksidan ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyledir. DHI'nın renklenmeye katkısı daha yüksek olsa da fonksiyon olarak bakıldığında DHICA'nın oranının yüksek olması da yine bir tür çevresel adaptasyon ürünüdür.

2.2.2. Pheomelanin

Melanin üretim yolağında DQ ile L-sisteinin reaksiyona girmesi sonucu oluşan sisteinil-dopa öncüsü sonrasında sentezlenen, sarı-kırmızı-turuncu renk aralığında, heterolog bir makromoleküler pigmenttir (Meredith and Sarna, 2006) (Şekil 2.3). Canlılarda deri ve saç renklenmesinde rol oynar (Ischia et al., 2013; 2015). Özellikle kızıl turuncu renkli saçlarda baskın pigmenttir. Ancak siyah, sarı veya kahverengi saçlı bireylerin saçlarında da renk oluşumuna katkı sağlamaktadır.



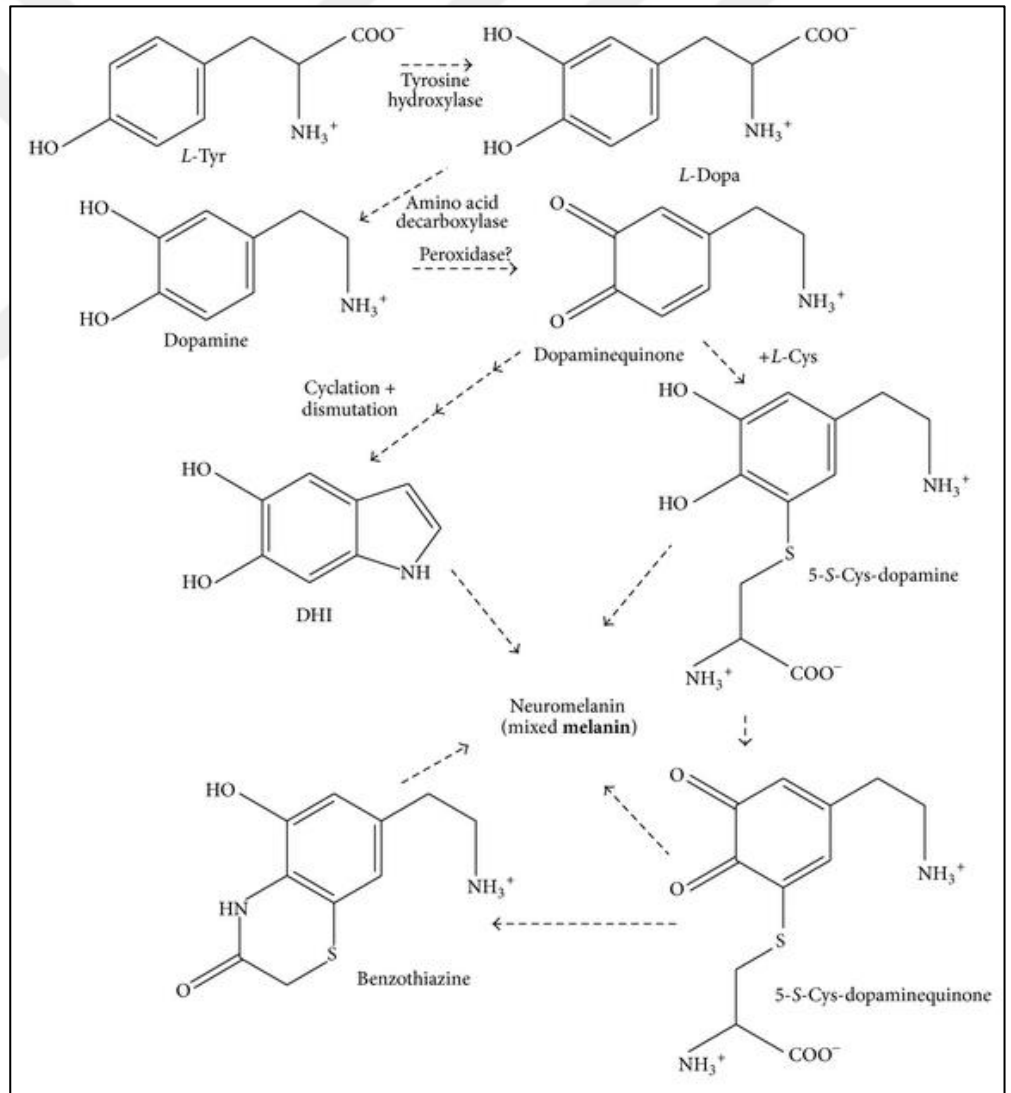
Şekil 2.3 Pheomelanin kimyasal yapısı (Revskaia et al., 2012)

Pheomelaninler özellikle UV radyasyona maruz kaldıklarında toksik özelliklere sahip kimyasallara dönüşebilmektedirler. UV radyasyona maruz kalma derecesi ve süresine göre oluşturdıkları hidrojen peroksit ve superoksit anyonları nedeniyle melanositlerde DNA hasarına ve böylece mutasyonlara sebebiyet vermektedirler (Panzella et al, 2014).

2.2.3. Neuromelanin

Neuromelanin; nöronlar tarafından dopamin ve diğer kateşol öncül moleküllerinin oksidasyonu sonucu üretilen koyu renkli pigmentlerdir (Bagherzadeh et al., 2015) (Şekil 2.4). Neuromelanin, Parkinson hastalığının oluşmasında etkili olduğu düşünülen beynin koyu madde (*Substantia nigra*) ve *locus coeruleus* bölgelerinde miktarca oldukça yüksektir (Pillaiyar et al., 2015). Son yapılan araştırmalarda neuromelanin içeren hücre ve organellerin lizozom benzeri otofajik vakuoller olduğu anlaşılmıştır (Sulzer et al., 2008). Neuromelanin pheomelanince zengin çekirdek bölge üzerine dağılan eumelaninlerden

oluşmaktadır. Boyutları yaklaşık 30-40 nm olan neuromelanin agregatları, elektrik yüklü küreciklerdir ve bu nedenle güçlü bir oksidasyon kapasitesine sahiptirler (Bush et al., 2006). Neuromelanin sentezi sitozolde bulunan kateşol miktarına bağlıdır (Wakamatsu et al., 2003; Sulzer et al., 2000). Neuromelanin agregatları demir iyonları varlığında proteinlere bağlanmaktadır. Demir başta olmakla beraber, diğer metaller ve proteinler ile kompleks oluşturup otofajik veziküller içerisinde taşınmaktadır (Sulzer et al., 2008). Neuromelanin sentezi sinir sistemi içerisinde, sitozelde serbest bulunan kateşoller ve kinonlardan kaynaklı toksik yükü elimine etmekle görevlidirler (Tse et al., 1976). Ayrıca yine yapıdaki eumelaninler sayesinde metal bağlama kapasiteleri de serbest metal iyonlardan kaynaklı toksik etkileri ve oksidatif strese bağlı hasarların azaltılmasında oldukça etkin bir rol oynamaktadır (Wakamatsu et al., 2012).



Şekil 2.4 Neuromelanin sentez yolu (Solano, 2014).

2.2.4. Melanin Pigmentlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve Fonksiyonları

Melanin pigmenti çok çeşitli biyolojik ve biyoteknolojik fonksiyona sahiptir. Bunlar arasında en çok çalışılanlar, antioksidan, antitümör, antiviral aktiviteleridir. Güçlü bir heparprotektif ajandır. Radyoprotektif özellikleri nedeniyle kuvvetli bir UV filtresi görevi görmektedirler (Swalwell et al., 2012).

Epidermal melanin evrimsel olarak çıplak tenli insanların cildini güçlü UV radyasyondan korumak amacıyla geliştirilmiş bir savunma sistemi olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle yüksek melanin içeriği UV nedenli deri hasarlarının önlenmesinde derinin üst tabakasında kalkan görevi görmektedir. UV absorblama ve kimyasal filtreleme gibi özellikleri sayesinde dış etkenlerden vücudu ve fizyolojiyi koruyan bir bariyerdir (Ishikawa et al., 2007; Pillaiyar et al., 2018). Yüksek UV yoğunluğu olan bölgelerle düşük UV yoğunluğu olan bölgelerde yaşayan insanların pigmentleşme dereceleri kıyaslandığında; antropolojik köken ile derideki pigment miktarı, içeriği ve kompozisyonu açısından güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Swalwell et al., 2012). Benzer şekilde yoğun pigmentleşmeye sahip olan bireylere göre açık tenli bireylerde kanser görülme riski daha yüksektir. Bu da deride bulunan pigmentleşme düzeyi ve UV radyasyonun doğrudan karsinogenik metabolizma ile ilintili olduğunu göstermektedir (Solano, 2014).

Çoğu melanin türü geniş aralıkta elektromanyetik dalgalar ile etkileşime giren benzersiz bir kapasiteye sahiptir (Meredith and Sarna, 2006). Bu nedenle koruyucu ve enerji toplayıcı bir pigment olarak bilinmektedir. Melanin pigmenti fotonların inelastik olarak yansıtılmasını sağlar. Radyoaktif olmayan fotonların dağılımı ve bu sayede de serbest radikallerin süpürülmesinde etkilidir. Metalleri güçlü bir şekilde şelatlar. Bu da hücrelerin toksik metal iyonlarının etkisinden korunmasını sağlar (Chen et al., 2009; Hong and Simon, 2007; Sono et al., 2012; Rózanowska et al., 1999). Çıplak cilt direkt olarak güneş ışınları ile temas halindedir. Deriye ulaşan güneş ışınlarında saklı radyasyon enerjisi çoğunlukla ısı enerjisine dönüşür (D'Mello et al., 2016) ve melanin cildin üst katmanında yüksek ısı enerjilerden organizmayı koruyan termoregülatör bir aktivite gösterir (Jastrzebska and Wilczok, 1987).

Sentetik eumelanin göstermiş olduğu yarı iletken madde karakteristiği nedeniyle özellikle biyo-elektronik ve biyosensör çalışmalarında kullanılmaktadır (Jastrzebska et al., 1996; Meredith and Sarna, 2006). Geçmiş çalışmalarda

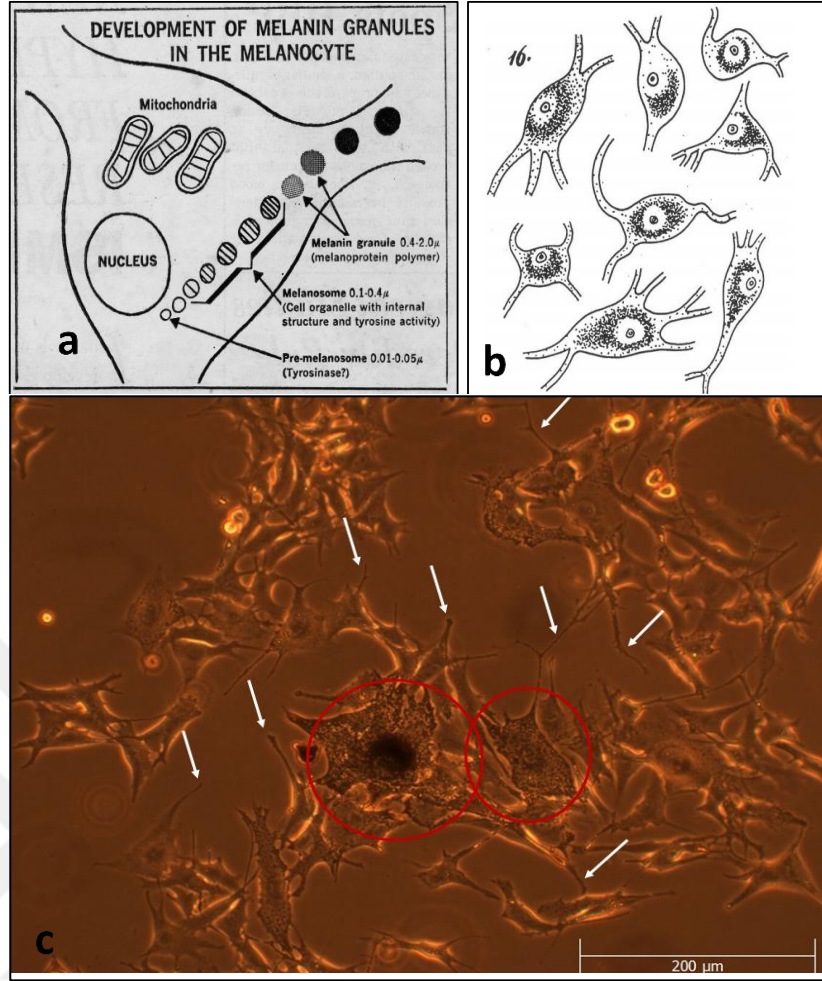
biyomimetik ara yüzey (Arzillo et al., 2012), batarya, eumelanin kaplı piezoelektrik sensör, hidrofobik yüzey kaplayıcı biyopolimerler, ince film fabrikasyonu ve işleme (da Silva et al., 2004) gibi çeşitli uygulama alanlarında yer almaktadır (Ischia et al., 2015).

Fe (III) metalleriyle şelatlanan eumelanin nanopartikülleri özellikle manyetik rezonans görüntüleme sistemlerinde kontrast ajanı olarak uygulama alanı bulmuştur (Ju et al., 2013). pH yanıtı ilaç taşıyıcı sistemlerde melanin nanopartikülleri kullanılmaya başlanmıştır. Biyo-uyumlu olması ve hücrel sitotoksosite göstermemesi nedeniyle biyomedikal uygulamalarda da sıklıkla kullanım alanı bulmaktadır. Silika yüzeyine enzimatik polimerizasyon yolu ile tutturulan melanin kaplı nanopartiküller, özellikle kemik iliği kanseri tedavisinde radyoimmünoterapi alanında kullanıma potansiyeli yüksek, koruyucu bir ajan olduğunu göstermiştir. Ayrıca fotokimyasal ve fotodegradasyon özelliklerine sahip melanin içeren hidrojellerin de ilaç taşıyıcı sistemlerden, çip üstü organ, doku çalışmalarında, kozmetik ve farmasötik alanında da yer edeceği düşünülmektedir (Ischia et al., 2015).

Melanin özellikle dermokozmetik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir pigmenttir. Cilt tonlarının eşitlenmesinde, deri kusurlarının ve özellikle saç beyazlamasının giderilmesinde melanin ve melanin öncüllerini içeren çeşitli formülasyonlar bulunmaktadır (D'Mello et al., 2016; Dv, 2018). Yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle de oksidatif strese koruyan biyomakromolekül olması neticesinde kozmetik ve farmasötik alanında sıklıkla kullanılan bir biyopolimerdir (Ju et al., 2011).

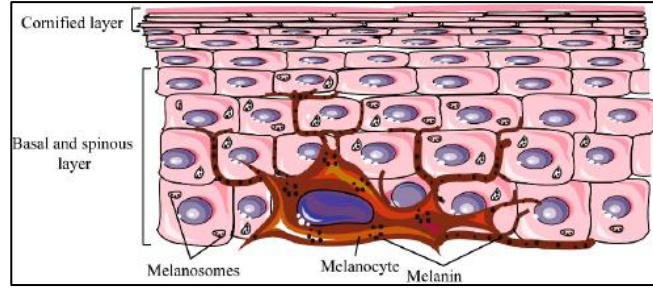
2.2.5. Melanin Sentezinin Moleküler Biyolojisi

Melanazomların pigment üreten özelleşmiş yapılar olarak kabul edilmesi Society for Investigative Dermatology'nin 21. olağan toplantısında, 1960 yılında M. Seiji ve T.B. Fitzpatrick'in çalışmalarının sonuçlarını yayınlamasının ardından gerçekleşmiştir. Bu çalışmada melanozomlarda bulunan enzim aktivitesi ve kimyasal kompozisyonun mitokondriden oldukça farklı olduğu ifade edilmiştir (Seiji et al., 1961). Böylece melanozomların mitokondriden bağımsız bir organel olduğu ve melanositlerin keratinositlerden ve fibroblastlardan farklı hücre grubunu temsil ettiği sonucuna varılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Melanosit çizimleri ve fotoğrafları; a) M. Seiji ve T.B. Fitzpatrick'in ilk melanosit ve melanozom tanımları (Medical News gazete küpürü, 5 Temmuz 1960), b) Melanosit dendritleri çizimleri (Seiji ve Fitzpatrick, 1961), c) B16-F10 melanoma hücrelerini 40x büyütmede görselleri (yazara aittir); Beyaz oklar denritleri ifade etmektedir. Kırmızı daire içerisinde bulunan hücrelerdeki siyah noktacıklar melanozom granülleridir.

Melanositler neuroektodermden kökenlenmiş, dendritik hücrelerdir (D'Mello et al., 2016). Melanositler, melanoblast adı verilen pigmentsiz, renksiz, embriyonik nöronal krest hücrelerinden evrilirler (Ali et al., 2015). Gelişim ile melanoblastlar vücudun farklı bölgelerine transfer edilmekte; çevresel sinir sistemi, kafatası, kemik ve kıkırdak tabakası ile gözün koroid tabakasına yerleşmektedirler (Pillaiyar et al., 2017c). Melanoblastlar melanositlere gelişmekte ve saç folikülleri ile derinin epidermis tabakasına konuşlanmaktadır (D'Mello et al., 2016; Farishian and Whittaker, 1980). Melanositler deride keratinosit tabaka içerisine gömülü şekildedir (D'Mello et al., 2016) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Melanositler, melanozomlar ve deri içerisinde konumları (D'Mello et al., 2016)

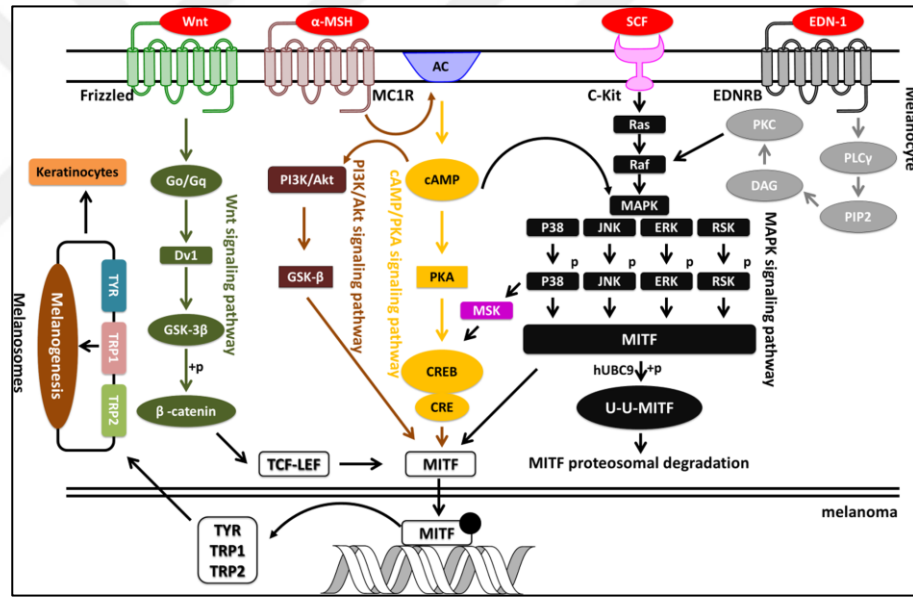
Melanin üretim süreci olarak adlandırılan melanogenez; melanositlerde meydana gelen kompleks enzimatik ve kimyasal reaksiyon serilerinden oluşmaktadır (Pillaiyar et al., 2017b). Bu süreci ise pek çok farklı hücre sinyalizasyon yolları regüle etmektedir. Temel olarak melanin üretiminde yer alan üç önemli yapıtaşı; tirozinaz enzimi (TYR), tirozin-ilintili protein-1 (TRP-1) ve dopakrom tatomeraz (TRP-2) enzimleridir (Lee et al., 2015). Ancak; tirozinaz melanin üretiminde kilit enzimdir ve tüm sürecinin hız sınırlayıcı basamağıdır (Bilodeau et al., 2001).

Melanin sentezi, daha önceki bölümlerde de ifade edildiği üzere, L-tirozin amino asidinin DQ'na veya L-DOPA'ya oksidasyonu ile başlamaktadır (Chen and Kubo, 2002). Bu dönüşüm aşaması enzimatik reaksiyon kinetikleri açısından kritiktir ve bu basamakta meydana gelen aksama, melanin üretiminde de aksamaya ve inhibisyona neden olmaktadır. Eğer bu dönüşüm ardından DQ sistein ile reaksiyona girerse 3 ya da 5-sisteinil DOPA sentezi ardından, pheomelanin üretim yolağı tetiklenmiş olur (Tseng et al., 2015). Ancak DQ kararsız bir yapıya sahiptir ve dopakrom adı verilen turuncu renkli bir ara forma siklizasyon gösterebilir (Newton et al., 2007). Bu reaksiyon neticesinde dopakrom dekarboksilasyonu ile DHI sentezlenir ve DHI hızlı bir şekilde okside ve polimerize olarak DHI-melanini oluşturur (Cheli et al., 2010; Pillaiyar et al., 2018, 2017b). Ancak eğer TRP-2 eksprese olmuş ise dopakrom tatomerize olarak karboksilik asidini kaybeder; DHICA oluşumu ve ardından DHICA-melanin üretimi sağlanmış olur. TRP-1 ve TRP-2'nin temel fonksiyonu TYR enziminin stabilizasyonudur. Tüm bu yolda hangi melanin türünün sentezleneceği ortamda bulunan substrat miktarına ve melanojenik enzimlerin varlığına bağlıdır.

Organizma içerisinde pigmentasyon ve melanogenez derecesi çevresel ve hücresel birtakım etkilerle düzenlenmektedir. Öncelikli olarak melanogenez yaş, etnik köken gibi kontrol edilemeyen genetik faktörlere bağlıdır (D'Mello et al., 2016). Bu gibi değiştirilemez faktörlerin ardından, çevresel faktörler de melanogenezin hücresel ve genetik kontrolünden sorumludur. Özellikle UV ışınlar,

toksik kimyasallar, çeşitli ilaç molekülleri melanogenez üzerinde direkt kontrolü olan çevresel etmenlerdir (Pillaiyar et al., 2017c; Vachtenheim and Borovanský, 2010). Melanositler etrafında bulunan fibroblast, keratinosit, enflamatuvar, nöronal ve endokrin sistem hücreleri tarafından salgılanan sinyal molekülleri de melanin üretimini etkilemektedir (Kono et al., 2006). Melanozomlar organizma içerisinde oldukça hareketlidir ve hareketlilik miktarları hormonal sinyallere bağlıdır.

Melanogenez cAMP/PKA yolu, MC1R/ α -MSH, PI3K/Akt, Wnt/ β -catenin, SCF/c-kit aracılı sinyalizasyon, nitrik oksit, sitokin, MAPK ve otofaji aracılı birçok sinyal yollarının birleşiminden oluşmaktadır (Abdel-Malek et al., 2009; D'Mello et al., 2016; Khaled et al., 2002; Kim et al., 2013; Tan et al., 2018) (Şekil 2.7). Genetik, biyokimyasal ve farmakolojik bulgulara göre melanin biyosentezinde kilit rol Melanokortin 1 reseptörü (MC1R) etrafında oluşan sinyalizasyondur (Abdel-Malek et al., 2009).



Şekil 2.7 Melanogenez yolları (Pillaiyar et al., 2018)

MC1R, G-protein reseptörlerine ait alt sınıfta yer almaktadır (Borovanský, 2011). Eumelanin sentezi α -melanin stimüle edici hormon (α -MSH) ve adrenokortikotropin (ACTH) ile alakalı iken; pheomelanin sentezi ise ASP ile stimüle edilmektedir (D'Mello et al., 2016). α -MSH eumelanin ve pheomelanin miktarlarını yine MC1R üzerinden regüle etmektedir. α -MSH, Pro-opiomelanokortin (POMC) adı verilen, keratinositler ve hipofiz bezi tarafından sentezlenen prekürsör proteinden meydana gelmektedir (Dv, 2018). POMC normal koşullarda fizyolojik saç uzaması, immün sitokin salınımı ve UV maruziyeti gibi durumlarda aktif olarak üretilmektedir. POMC, p53 konsensus sekansına sahiptir

ve bu gene bağlanarak ekspresyonunu kontrol etmektedir. UV maruziyeti tümör supresyon proteini olan p53 geninin ekspresyonunu kontrol ettiği için UV, p53 ve POMC sentezi ile MC1R ekspresyonu tirozinaz enzimi ekspresyonu üzerinde doğrudan etkilidir (Khlgtian vd., 2002). UV ile aktive olan p53 geni, POMC üretimini tetikler ve daha sonra POMC ACTH, α , β ve γ -MSH peptidlerine parçalanır. α -MSH melanositler üzerinde bulunan MC1R stimülasyonu ile eumelanin üretimini tetiklemiş olur. Ayrıca UV radyasyonun yarattığı reaktif oksijen türleri, keratinosit ve melanositlerde DNA hasarına neden olmaktadır. Oluşan bu DNA hasarı p53 geninin sentezini indükler ve bu sayede melanin sentezi yine tetiklenmiş olur (Kumari vd., 2018).

α -MSH hormonundaki artış ile tirozinaz enzimi ekspresyonu cAMP yolağı üzerinden sağlanmaktadır (Abdel-Malek et al., 2009). α -MSH hormonu hücre yüzeyinde MC1R'e bağlanarak hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) artışını indüklemektedir. cAMP artışı TRP-1 ve TRP-2 ile TYR genlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (Jung et al., 2012). cAMP'nin tirozinaz ekspresyonu üzerine etkisi çoğunlukla PKA yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. cAMP/PKA, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) fosforilasyonunu indükler ve bu sayede mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF) ekspresyonu aktive edilmiş olur. MITF tirozinaz enzimi genlerini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür ve MITF ekspresyonu melanogenezin indüklenmesini sağlar (Pillaiyar et al., 2017c; Vachtenheim and Borovanský, 2010).

PI3K/Akt yolağı üzerinden sağlanan melanogenezde hücre içi cAMP alternatif olarak MITF ekspresyonunu kontrol etmektedir. Hücre içi cAMP fosfatidilinositol 3- kinaz (PI3K) inhibisyonu ile glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK β) sitimülasyonu sağlar (Graells et al., 2004; Pillaiyar et al., 2017c). GSK β aktivasyonu MITF fosforilasyonunu indükler ve tirozinaz ile alakalı genlerin transkripsiyonla aktivasyonunun sağlanabilmesi için MITF'e bağlanma afinitesini arttırmış olur (Khaled vd., 2003). Böylece artan tirozinaz ekspresyonu melanin sentezinde artış ile sonuçlanır.

Wnt/ β -katenin yolağında bulunan Wnt proteinleri sisteince zengin glikoproteinlerdir ve melanin sentezinde rol oynayan bir diğer önemli sinyal yolağı bileşenleridir. G-protein bağlı reseptöre bağlanarak glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β)'ın inaktivasyonuna neden olur ve sitozelde β -katenin birikmeye başlar. Ardından β -katenin nükleusa transfer edilir (Bellei et al., 2008; Liu et al., 2017) ve MITF ekspresyonunu arttırmış olur. MITF ekspresyonunun artması tirozinaz

enziminin transkripsiyon kontrolünü sağlar ve melanin üretimi tetiklenmiş olur (D'Mello et al., 2016; Pillaiyar et al., 2017c).

Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz (MAPK) inhibitörler varlığında MITF ekspresyonunu inhibe eder (Kono et al., 2006) ve ERK/MAP sinyal yolağı MITF degradasyonuna neden olur. Ligand-reseptör interaksyonu ile Ras proteini aktive olur ve sırasıyla B-Raf kinaz ile ERK1/2'yi aktive eder (Kim, 2003). MAPK fosforilasyonu MITF ubikütilenmesiyle MITF degradasyonunu sağlar ve melanogenez ile ilintili gen ekspresyonlarını durdurur. Görüldüğü üzere ERK/MAP yolağının aktivasyonu tirozinaz enzimine ait genlerin ekspresyonunda negatif etkiye sahiptir (Smit et al., 2009).

UV-B radyasyon sonucunda üst deride meydana gelen melanin miktarındaki artış, enflamasyon artışı ile de sonuçlanabilmektedir. Nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) ise UV-B nedeniyle oluşan enflamatuvar yanıtta sorumlu faktör olarak çalışmaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklo oksijenaz 2 (COX-2) gibi proenflamatuvar yanıtlarda artış meydana getirir (Pillaiyar et al., 2017c; Thomas and Kim, 2013). Ancak NF- κ B da meydana gelen baskılama, melanogenez ve doğal olarak da melanin miktarında artış ile sonuçlanır (Pillaiyar et al., 2017b). Enflamatuvar yanıt olarak sentezlenen sitokinler genellikle direkt ya da JAK2-STAT6 sinyal yolağı üzerinden melanin inhibisyonunu ve melanogenez kontrolünü sağlamaktadır (Smit et al., 2009). Bu nedenle tirozinaz enzim regülasyonu sağlayan moleküller taranırken vermiş oldukları enflamatuvar yanıt da önem arz etmektedir.

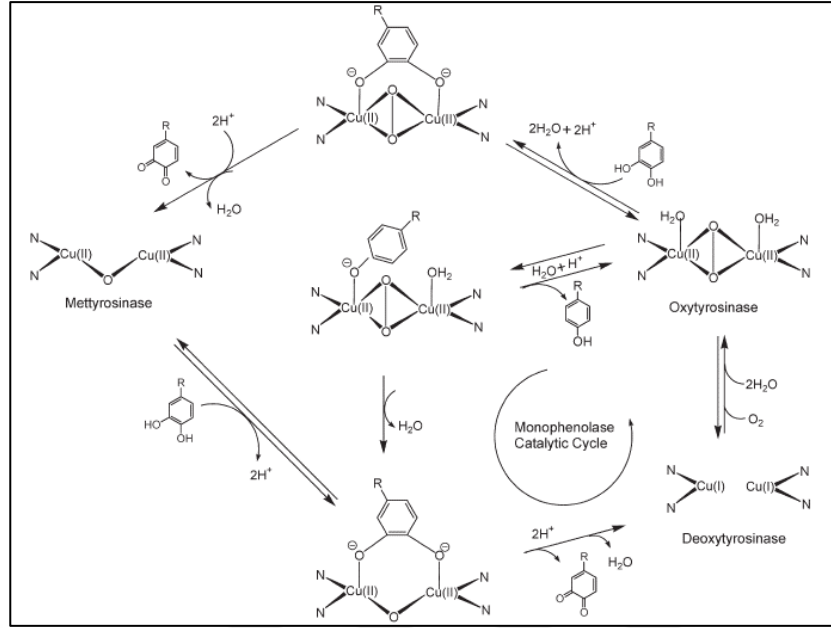
Keratinositler, kök hücre faktörü (SCF) adı verilen sitokinleri salgılamakla yükümlüdür. SCF melanogenez kontrolünde melanositlerin yaşam döngüleri üzerinden etki göstermektedir (D'Mello et al., 2016). Ayrıca SCF insan ve fare melanositlerinde hücre farklılaşmasının ve çoğalmasının hormonal kontrolünü sağlamaktadır. Mikrofaj migrasyon inhibitör faktörü (MIF), proteaz ile aktive edilmiş reseptör -2 (PAR-2) ve EDN'ler, SCF ekspresyonunda yer almaktadır (Schurink, 2007; Zolghadri et al., 2019a). UV-B ile temas sonrasında keratinositler MIF miktarında artış göstermektedir. MIF, ayrıca L-dopakrom izomeraz olarak da bilinmektedir ve dopakromun DHICA'ya dönüştürülmesinden sorumludur. Sadece epidermal melanositlerde değil sinir sisteminde de neuromelanin üretiminde aktif rol oynamaktadır. MIF keratinositlerde PAR-2 aktivasyonu ile melanogenez kontrolü sağlamaktadır. Ancak melanin ve tirozinaz sentezi üzerinde doğrudan etkisi yoktur. Ayrıca c-Jun N-terminal kinaz (JNK), strese bağlı protein kinaz (SAPK) ve p38 MAPK yolları da melanogenez regülasyonu sağlayan diğer

yolaklar arasındadır (Bellei et al., 2010; Pillaiyar et al., 2018, 2017c). p38, MAPK yolağı aktivasyonu MITF ekspresyonunu arttırmakta ve tirozinaz enziminin transkripsiyonel kontrolünü sağlayarak melanin sentezini indüklemektedir (Zhou et al., 2012).

2.3. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz enzimi bir tür polifenol oksidaz (PPO) sınıfına ait enzimdir. Hayvanlar, bitkiler, funguslar ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Kubglomsong and Theerakulkait, 2014). Mono-fenollerin di-fenollere oksidasyonu ya da oksijen varlığında di-fenollerin kinonlara oksidasyonundan sorumludurlar (Halaouli, 2006; Lind, 1999; Mayer, 1979; Mayer, 2006). Biyoteknolojik olarak çoğunlukla bilinen ve kullanılan PPOlar; kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve tirozinaz (EC 1.14.18.1) enzimleridir (Flurkey et al., 2008; Schurink, 2007).

Şimdiye kadar en iyi tanımlanmış ve yapısı karakterize edilmiş PPO enzimleri arasında tirozinaz enzimi ilk sırada yer almaktadır. Tirozinaz enzimi aktif bölgesinde iki tane bakır atomu bulundurmaktadır (Chen et al., 2006). Çift yönlü reaksiyon katalizleyen tirozinaz enzimi; mono-fenollerin o-hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) (Ochiai et al., 2016b) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (difenolaz aktivitesi) sağlamaktadır (Pongkai et al., 2017) (Şekil 2.8). o-difenollerin oksidasyonu daha hızlı gerçekleşmekte; bu nedenle de esas hız sınırlayıcı basamak olarak düşünülmektedir. Oksidasyon işleminde kullanılan oksijen genelde moleküler oksijendir ve substratlardan elde edilmektedir (Kim and Uyama, 2005).



Şekil 2.8 Tirozinaz enziminin katalitik yolları (Kim ve Uyama, 2005)

İleri yapısal karakterizasyonu sağlanmış tirozinaz enzimleri *Streptomyces glaucescens* ve fungus *Neurospora crassa* ile *Agaricus bisporus*'tan elde edilmiştir (Çizelge 2.1). İlk iki enzim monomerik iken *Agaricus bisporus* tirozinaz enzimi tetramer yapıdadır; iki tane ağır ve iki tane hafif alt üiteden oluşmaktadır. Farklı hayvan türlerinden ve insanlardan da tirozinaz enziminin kısmi karakterizasyonu sağlanabilmiştir. Fungal tirozinazların aksine (fungal tirozinazlar sitozolde serbest haldedir) insan tirozinaz enzimi, yaklaşık %13'ü karbonhidrattan oluşan membrana bağlı glikoprotein yapıdadır. Örneğin; yapılan sekans çalışmalarında albino ile alakalı mutasyonun tirozinaz enzimini eksprese eden gen ile ilintili olduğu bulunmuştur (Vachtenheim and Borovanský, 2010).

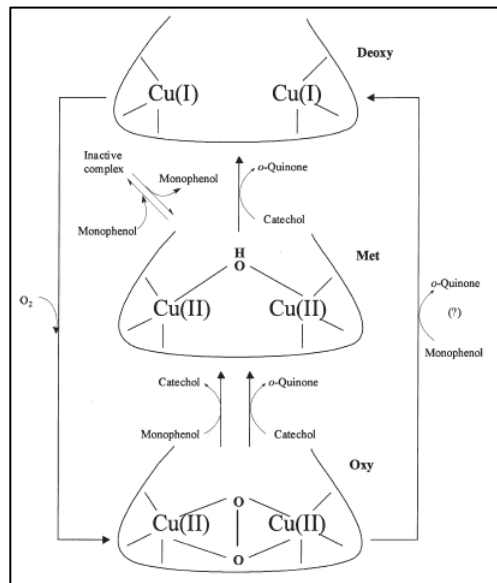
Çizelge 2.1 Farklı tirozinaz enzimlerinin özellikleri (Kim ve Uyama, 2015)

Organizma	Kökeni	Alt ünite sayısı	Moleküler Ağırlığı (kDa)
<i>Streptomyces glaucescens</i>	Bakteri	1	30,9
<i>Neurospora crassa</i>	Fungus	1	46
<i>Agaricus bisporus</i>	Fungus	2	13,4/43
<i>Beta vulgaris</i>	Bitki	1	40
<i>İnsan melanosit</i>	Memeli	1	66,7

Neredeyse tüm canlı yapılarda bulunan tirozinaz enzimi organizma türüne göre farklı fizyolojik görevler üstlenmektedir. Fungus ve omurgalı canlılarda melanin pigmentinin üretilmesinden sorumlu esas enzimdir. Bitkilerde herhangi bir yaralanma ve doku hasarı olduğunda fenolik bileşiklerin enzimatik kararması

sonucu kahverengileşmeye neden olmaktadır (Zolghadri et al., 2019a). Bitkilerde senesense bağlı hücre hasarının oluşması, yaralanma ve böcek/patojen saldırıları sonucunda melanin üretimini bir tür stres adaptasyonu görevi gördüğü bilinmektedir. Bu yanıt aynı zamanda bitkisel bağışıklık sistemi yanıtı olarak değerlendirilmektedir (Taranto et al., 2017). PPO enzimlerinin ekspresyonunun biyotik stres faktörlerine karşı bir savunma bariyeri yarattığı bulunmuştur. PPO enziminin yüksek miktarda sentezletildiği domates gibi bitkilerde patojen saldırısının negatif etkisinin azaltıldığı ifade edilmiştir (Li and Steffens, 2002). Sadece biyotik stresler için değil, ayrıca kuraklık ve aşırı sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerine karşı da bu enzimlerin koruma sağladığı bilinmektedir. Fizyolojik regülasyonda kritik bir öneme sahip olsalar da hasat işlemi sonrasında renk değişiklikleri, fenolik bileşiklerin oluşması gibi sonuçlar neticesinde hem tüketici ilgisini düşürmekte hem de bitkisel ürünlerin biyoyararlanımlarının azalmasına neden olmaktadır.

Kimyasal ve spektroskopik çalışmalarda gözlemlendiği üzere, tirozinaz enziminin aktif bölgesinde bulunan bakır atomlarının konformasyonel dizilimi ve elektronik yapısı hemosiyaninler ile benzerlik göstermektedir (Kim and Uyama, 2005). Bakır atomlarına ilaveten, aktif bölgede altı tane histidin ve bir tane de sistein amino asitleri yer almaktadır (Da Silva et al., 2017; Kuijpers, 2013). Hemosiyanin çoğunlukla yumuşakçalar ve arthropodlarda oksijen taşınımından sorumludur. Yapısal benzerlikleri ve oksijen ile verdikleri reaksiyonlar nedeniyle tirozinaz enziminin, hemosiyaninin atasal proteini olduğu düşünülmektedir (Kim and Uyama, 2005).



Şekil 2.9 Tirozinaz enziminin met, oxy ve deoxy formları (Rescigno et al., 2002)

Tirozinaz enziminin aktif bölgesi *met*, *deoxy* ve *oxy* adı verilen üç konumda bulunmaktadır (Rescigno et al., 2002). Aktif bölgenin bulunmuş olduğu konformasyonel dizilim, enzimin monofenolaz ya da difenolaz aktivitesi ile alakalıdır. *Met* formu genelde tirozinaz enzimi için dinlenme halidir ve monofenolaz aktivitesi göstermemektedir. Ancak *met* formunda kateşoller o-kinonlara okside ederek aktif bölge *deoxy* forma geçiş yapmaktadır. Bu aşamada oksijen varlığında difenollere oksidasyon ile aktif bölge *oxy* forma geçiş yaparak döngüsünü tamamlamış olur (Şekil 2.9).

2.3.1. Tirozinaz Enzimi Substratları

Tirozinaz enzimi adını tirozin amino asidinden almaktadır ve tirozin amino asidinin farklı biyokimyasal yollarda kullanılacak öncü maddelere dönüşmesini katalizlemektedir. Monofenolaz ve difenolaz aktivitesi gözetilmeksizin tirozinaz enzimi kiral moleküllerin L-izoformlarını tercih etmektedir. Mono-, di- ve tri-hidroksifenoller tirozinaz enzimi substratlarıdır. Ancak; tirozinaz di-hidroksifenollere daha yüksek afinite göstermektedir. Ayrıca mono-hidroksifenoller (tirozin, p-kreşol gibi), di-hidroksifenoller (kateşol, L-DOPA, D-DOPA, kateşin ve klorojenik asit gibi) ve tri-ihidroksifenoller (pirogallol) arasında kateşol maksimum aktiviteye sahiptir. Genel olarak herhangi basit bir monofenol ve kateşol tirozinaz enzimi substratı olarak davranabilmektedir. Genel olarak insan ve hayvan tirozinaz enzimleri L-tirozin ve L-DOPA'yı substrat olarak kullanırken; bitki ve fungal kökenli tirozinazlarda substrat kullanımı daha geniştir (Rescigno vd., 2002).

Mono- ve difenoller arasında ise elektron verme gücü yüksek olan moleküllerin aktivitesi daha yüksektir. Bu nedenle elektron çeken -NO₂, -COOH ve CHO gibi fonksiyonel gruplara sahip olan bileşikler aslında substrat olarak değil de aktif bölge için yarışan moleküller olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu bileşikler enzimin yarışmalı olarak inhibe olmasına neden olmaktadır (Prota, 1992).

2.4. Tirozinaz Enzimi Kaynaklı Metabolizma Bozuklukları

Melanin üretimi ve tirozinaz enziminin aktivitesi nedeniyle ciltte bir takım pigmentasyon anormallikleri gözlenebilmektedir (Gillbro and Olsson, 2011; Plensdorf et al., 2017). Bununla beraber sinir sisteminde bulunan neuromelanin sentezinde meydana gelen değişiklikler, sinir sistemi sağlığını etkilemekte; Parkinson ve Alzheimer gibi çağımızda sıklıkla sözü geçen nörodejeneratif

hastalıkların nedenleri arasında sayılmaktadır (Hsiao et al., 2014; Pillaiyar et al., 2015; Schurink, 2007).

Ciltte meydana gelen pigmentasyon bozuklukları tirozinaz enziminin düşük aktivite göstermesi ve melanin sentezinde meydana gelen azalmalar neticesinde hipopigmentasyon problemlerine neden olmaktadır (Kim et al., 2012; Nicolaidou and Katsambas, 2014). Tirozinaz enziminin aşırı aktivite göstermesi melanin sentez miktarını arttırmakta, bu da hiperpigmentasyon problemleri olarak adlandırılmaktadır (Nicolaidou and Katsambas, 2014; Pillaiyar et al., 2017b). Her iki koşulda da cildin görülebilir ve sosyal çevre ile temas halinde olan kısımlarındaki farklılıklar bireylerde sosyal ve psikolojik problemler olarak seyredebilmektedir.

Enflamatuvar hiperpigmentasyon problemleri; melazma, güneş yanıkları, efelitler, vücudun muhtelif yerlerinde çiller, *café au lait* izleri olarak sınıflandırılmaktadır (Park et al., 2010)(Gillbro and Olsson, 2011; Pillaiyar et al., 2017a). Postenflamatuvar hiperpigmentasyon kriyoterapi ve lazer tedavisi gören bireylerde ya da herhangi bir yaralanma sonucunda enflamatuvar yanıt oluşmuş bölgelerde düzensiz, koyu renkli pigment oluşumları şeklinde ortaya çıkmaktadır. Enflamasyon prostaglandin, lökotrin ve tromboksin üretimini indüklemekte ve bu nedenle melanin sentezi artış göstermektedir. Hipopigmentasyon ise melanin sentezinin azalması ya da melanozomlarda transfer kısıtları ile ortaya çıkmaktadır. Genellikle vitiligo, *pityriasis alba*, *tinea versicolor*, saç beyazlaşması gibi problemler hipopigmentasyon belirtileridir (Hacker, 2017; Plensdorf et al., 2017) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Yaygın hiperpigmentasyon ve hipopigmentasyon bozuklukları (Plensdorf et al., 2017)

Hiperpigmentasyon bozuklukları			
Problem	Bulgu	Bölge	Neden
Postenflamatuvar hiperpigmentasyon	Düzensiz koyu renkli kütleler ve desenler	Yaralanma bölgesi	Fiziksel travma, enflamasyon
Melasma	Açık kahverengi, kahverengi ya da gri pigmentli	Yüz ya da kolun ön kısımları	Hamilelik, oral gebelik önleyici ilaçlar
Güneş yanıkları	Açık sarıdan koyu kahverengiye kadar değişken 1-3 cm çığında düzenli küresel yapılar	Yüz, eller, kolun ön kısımları, göğüs, sırt	Akut ya da kronik UV maruziyeti
Çiller	Keskin 2 mm boyutunda kırmızı, koyu ya da açık kahverengi yapılar	Yüz, boyun, kollar, göğüs, bacaklar	Özellikle çocukluk çağında maruz kalınan UV etkiler

Çizelge 2.2 (Devamı)

Café au lait	1-20 cm boyutunda siyah ya da açık kahverengi yapılar	Epidermal, doğuştan ya da çocukluk döneminde oluşan lekeler	Bazal keratinositlerde ya da melanositlerde artan melanin
Hipopigmentasyon problemleri			
Vitiligo	Pigment kaybı gösteren 5-50 mm boyutundaki beyaz bölgeler	Yüz, eller, kolun ön kısımları, boyun, genital bölge	Bilinmiyor Muhtemelen otoimmün
<i>Pityriasis alba</i>	Hipopigmentasyon gösteren düzensiz kaşıntı ile ortaya çıkan yapılar	Yüz, baş, boyun, kolun ön kısımları	UV maruziyeti sonucu hassasiyeti artan atopik dermatit
<i>Tinea versicolor</i>	Hipopigmentasyon gösteren düzensiz yapılar, pembe plaklar ya da hiperpigmentasyon gösteren alanlar	Boyun, göğüs, sırt, karın, proksimal uzuvlar ve nemli kalan diğer vücut bölgeleri	<i>Malassezia</i> spp. Fungal enfeksiyonu

Toplumumuzda en yaygın görülen pigmentasyon bozuklukları saç beyazlaşması, yaşa bağlı koyu pigmentleşme lezyonlarının oluşumu, UV radyasyona bağlı çil ve güneş yanıkları oluşumudur. Hiperpigmentasyon ve hipopigmentasyon problemleri yaşa, çevresel etkilere, etnik kökene, cinsiyete ve genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Hiperpigmentasyon bozuklukları otoimmün hastalıklar ve güneş ışınları nedeniyle oluşan radyasyon ve UV maruziyeti, kimyasallar, hormonal bozukluklar, doğum kontrol hapları ile ilişkili olduğu düşünülse de otoimmün etki sonucu ortaya çıkış nedeni tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Çeşitli pigmentasyon bozuklukları; a) UV ışık maruziyeti sonucu oluşan çiller, b) Göz çevresinde hafif derecede seyreden vitiligo ve UV maruziyeti nedeniyle oluşan çiller, c) *café au lait* hiperpigmentasyon bozukluğu, d) Travma sonrası oluşan yara izine bağlı hipopigmentasyon, e) Yaşa bağlı pigmentasyon artışı (Karaciğer noktaları), f) Nevüs tipi hiperpigmentasyon

Örneğin *Tinea versicolor*'da olduğu gibi *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia*) enfeksiyonları sonrasında ortaya çıkabilmektedir. Diyabet, immunospresör etki gösteren ilaç tedavileri ve nemli bölgelerde bulunma gibi durumlarda yine gözlenme sıklığı daha fazladır ve kronik olarak seyredebilmektedir (Plensdorf et al., 2017). Yüzde bulunan çiller, güneş yanıkları ve melazma gibi asemptomatik olmayan pigmentasyon bozuklukluları toplumun çoğunda gözlenmekte ve uygun kozmetik/ dermokozmetik ürünlerce eliminasyonu sağlanmaktadır. Yine de bireylerin psikolojik rehabeti açısından süreç ve uygulamanın etkinliği önemlidir.

Deride gözlenen pigmentasyon bozuklukları ne olursa olsun estetik olarak istenmemektedir ve pigmentasyon seviyelerini normalleştirmek adına kozmetik, kozmesötik ve farmasötik terapiler bir arada kullanılabilmektedir. Terapi, tedavi ve önleyici ürünler açısından her ne kadar gelişmişlik gösterilse de tam olarak tatmin edici sonuçlar elde edilememekte, bu nedenle sürekli olarak yeni ürünler, aktif maddeler ile sinetjistik tedavi yöntemleri de geliştirilmeye devam etmektedir.

2.4.1. Tirozinaz İnhibitörleri

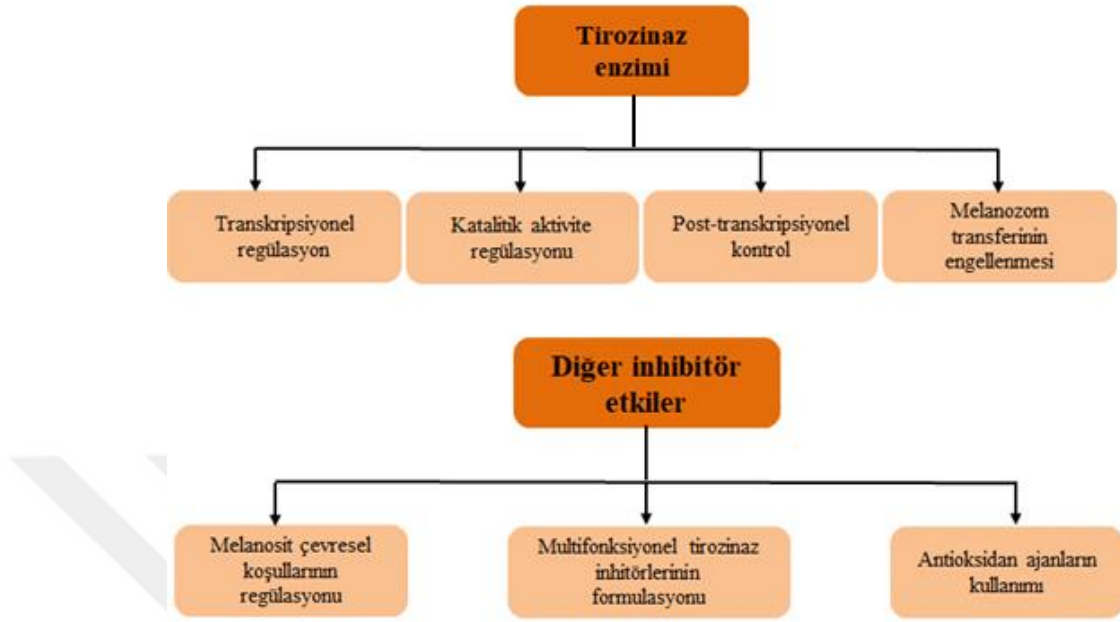
Gıda endüstrisinde tirozinaz enzimi sebze ve meyvelerin kalitesinin ve tazeliğinin korunmasından sorumludur ve bu nedenle tarım ürünlerinin ekonomisinde büyük bir önem arz etmektedir (Kubo et al., 2000). Hasat işlemi sonrasında zaman ve çevresel koşullara bağlı olarak, oksijen varlığında enzimatik kararma meydana gelmektedir. Tirozinaz enzimi bu proseste fenolik bileşikler kinonlara okside etmekten sorumludur. Fenotipik olarak kararmanın yanı sıra, kinonlar geri dönüşümsüz olarak proteinlerdeki amino ve sülfidril gruplarıyla etkileşirler ve bu durum tat olarak da bozulmalara neden olur (Flurkey et al., 2008; Rescigno et al., 2002). Bu reaksiyonlar, lizin ve sistein gibi esansiyel amino asitler başta olmak üzere, kinonlara bağlanır ve protein biyoyararlanımı ve sindirilebilirliği de önemli ölçüde azalmış olur.

Tirozinaz enzimi böceklerde savunma mekanizmasının gelişmesinde rol oynar (Kim et al., 2002). Melanogenez yolağında kilit rolü ile böceklerde yara iyileşmesi ve parazit enkapsülasyonu ile savunma sisteminin aktivasyonunu sağlar. Tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi doğal biyolojik pest kontrolü sağlamaktadır.

Tirozinaz enzimi memelilerde, *tez konusuna özel olarak insanlarda*, pigmentleşme sürecinde renk oluşumu sağlarken aynı zamanda UV hasarın önlenmesinde homeostatik bir etki göstermektedir (Bagherzadeh et al., 2015). Ancak tirozinaz enziminin herhangi bir neden ile üretim yolağının bozulması özellikle hiperpigmentasyon problemlerinin sıklıkla karşılaşılmaya neden olmaktadır. Hipopigmentasyon ajanları ya da tirozinaz inhibitörleri olarak adlandırılan bu maddeler, kimyasal ya da biyolojik yollarla elde edilebilmektedirler. Kimyasal olarak elde edilen sentetik inhibitörler ya da pigmentasyon regülatörleri dışında, doğal yolla elde edilenler bitkiler, funguslar bakteri ve alglerden sağlanmaktadır (Smit et al., 2009). Bazı durumlarda biyolojik kaynaklardan elde edilen bir inhibitör madde sentetik olarak üretilmeye başlanabilmektedir (*örneğin* kojik asit) (Kwak et al., 2011).

Tirozinaz enzimi melanin üretiminin hız sınırlayıcı basamağını katalizlediği için anormal melanin üretiminin kontrol edilmesinde tirozinaz enzim aktivitesi kritiktir. Bu kapsamda melanogenezi kontrol altına almak amacıyla pek çok yaklaşım öne sürülmüştür (Park et al., 2010). Bunlar; (i) tirozinaz enzim ekspresyonu, (ii) tirozinaz enziminin final katalitik konformasyonu, (iii) enzim

degradasyonu ve (iv) katalitik inhibisyonu gibi çeşitli şekiller ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Tirozinaz enzim inhibisyonu için kullanılan farklı yollar ve yaklaşımlar

Tirozinaz enziminin kontrol altına alınması tarımsal ürünlerin de uzun süre saklanması, zirai böceklerle mücadele gibi konularda da dikkat çekici boyutlarda olsa da özellikle kozmetik, dermokozmetik ve fonksiyonel kozmetik gibi alanlarda estetik ve tedavi edici deri beyazlatıcı ürün ve formülasyonların geliştirilmesinde daha çok ortaya çıkmakta ve ürün bazında kozmetik sektöründeki arayışlar diğer alanlara göre daha fazla olmaktadır. Dünya popülasyonunun %15'ine yakını deri beyazlatıcı (hipopigmentasyon ürünleri) ürünlere yatırım yapmaktadır (Pillaiyar et al., 2017a). Dermokozmetik endüstrisinde, özellikle Asya ülkelerinde, hipopigmentasyon etkisi gösteren ürünler sıklıkla tercih edilmektedir. Tirozinaz inhibitörleri sadece pigmentasyon bozukluklarını değil, aynı zamanda ciltteki diğer lekeleri de giderdiği için pazar giderek gelişmektedir. Renkli kozmetikten fonksiyonel kozmetiğe doğru artan bilinç ise bu sektörde yapılacak yatırımları arttırmaktadır. Bu gibi ürünlerin pazarının 23 milyar Amerikan doları civarlarına ulaşması 2020 yılı tahminleri arasında yer almaktadır (Pillaiyar et al., 2018).

Melanin sentezini azaltan her molekül/kimyasal tirozinaz inhibitörleri olarak adlandırılrsa da bazı maddeler direkt olarak tirozinaz enzimi ile etkileşime girmezler. Bu nedenle tirozinaz enzim inhibitörleri ile melanogenez inhibitörleri arasında birtakım farklar bulunmaktadır. Bir molekülün tirozinaz inhibitörü olabilmesi için tirozin ya da DOPA varlığında dopakrom oluşumunun inhibe olması gerekmektedir.

Bundan ötürü tirozinaz inhibitörleri olarak adlandırılan maddelerin aktivitesine göre yöneltici sınıflandırmalar yapılması daha doğru olacaktır (Chang, 2009).

- (i) Askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar dopakinonun kimyasal olarak indirgenmesini sağlar. o-dopakinonun DOPA'ya indirgenmesi ile dopakrom ve melanin oluşumunu engeller.
- (ii) Çoğu tiyol içeren moleküller o-dopakinon süpürücüler olarak da bilinmektedirler. Bu maddeler dopakinon ile reaksiyona girerek renksiz bir bileşik meydana getirir, ortamda serbest bulunan dopakinon varlığını azaltırlar. Bu gibi maddeler melanogenez inhibitörleri olarak sınıflandırılmalıdır. Tiyol içeren maddelerin ortamda tükenmesine kadar bu inhibisyon devam eder ancak tiyol bileşikleri tükendiğinde melanogenez süreci sürdürülür.
- (iii) Bazı fenolik maddeler tirozinaz enziminin alternatif substratlarıdır. Bu bileşikler enzime yüksek afinite göstererek dopakrom oluşumunu engellese de gerçek inhibitör değildirler.
- (iv) Asitler ya da bazlar gibi spesifik olmayan enzim inaktivatörleri tirozinaz enziminin seçici olmayan degradasyonuna neden olurlar. Bu gibi maddelerin varlığında tirozinaz enzimi inhibe olmaktadır.
- (v) Mekanizmaya bağlı tirozinaz inhibitörleri gibi spesifik inhibitörler *intihar substratları* olarak da adlandırılmaktadır. Bu substratlar tirozinaz enzimi ile kovalent bağlanma sonucunda katalitik reaksiyonlar esnasında enzimi geri dönüşümsüz olarak inaktive etmektedirler. Enzimin kendi reaksiyonu nedeniyle oluşan bu inhibitörlere *intihar inhibitörleri* adı da verilmektedir.
- (vi) Spesifik tirozinaz inhibitörleri ise geri dönüşümlü olarak tirozinaz enzimine bağlanarak katalitik kapasitesinde azalmalara neden olmaktadır.

Tüm bu inhibisyon tipleri arasında (v) ve (vi) kategorisindeki maddeler gerçek tirozinaz inhibitörleridir. Bu kategori dışındaki maddeler dolaylı yoldan enzimi inhibe ederler. Bu nedenle inhibisyon aktiviteleri gerçek inhibitörlere göre daha zayıftır. Ancak indirgeyici ajanlar, dopakinon süpürücü maddeler ve tirozinaz substratları multifonksiyonel etki göstermekte, yine de son ürün olan melanin üretimini bir şekilde azaltmaktadırlar (Chang, 2009).

Gerçek tirozinaz inhibitörleri kompetitif, un-kompetitif, karışık tipli (kompetitif/un-kompetitif) ve non-kompetitif inhibitörler olarak dört kategoride incelenmektedir (Chen and Kubo, 2002; Kubo et al., 2003). Kompetitif inhibitörler

enzimin serbest aktif bölgesi ile interaksyona girdiği için substrat bağlanmasını önler. Kompetitif inhibitörler bakır metali şelatlayıcılar, metabolize edilemeyen analoglar ya da substrat türevleridir.

Un-kompetitif inhibitörler sadece enzim substrat kompleksine bağlanabilme özelliğine sahiptirler. Karışık tip inhibitörler ise hem serbest enzimin aktif bölgesine hem de enzim-substrat kompleksine bağlanma özelliğine sahiptirler. Çoğu karışık tip inhibitörler denge bağlanma sabitleri her iki koşul için de farklılık göstermektedir. Ancak non-kompetitif inhibitörlerde inhibitörler hem serbest enzim bölgesine hem de aynı denge sabitine sahip enzim-substrat kompleksine bağlanabilmektedirler.

En yaygın kullanılan tirozinaz/melanogenez inhibitörleri direkt olarak tirozinaz enziminin katalitik aktivitesi üzerinden inhibisyon yapan maddelerdir. Klinik uygulamalar göz önüne alındığında bu tür tirozinaz inhibitörlerinin en yaygın olarak kullanılan hipopigmentasyon ajanları olduğu bilinmektedir. Tirozinaz enziminin sadece melanositlerde üretilmesi, tirozinaz enzimi üzerinde direkt inhibisyon yapan maddeler tarafında seçimli ve güdümlü bir inhibisyon gösterecektir. Bu sayede diğer sinyal yolları üzerinden spesifik olmayan hücre hedeflemesi gibi yan etkilerin de elimine edildiği de bilinmektedir (Chang, 2012).

Tirozinaz enzim inhibisyon çalışmalarında en çok kullanılan tirozinaz enzimi mantardan (*Agaricus bisporus*) izole edilen enzimdir ve çoğu tirozinaz enzim inhibitörleri ile alakalı başlangıç çalışmaları ile enzim kinetiği çalışmaları mantar tirozinaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir (Casañola-Martín et al., 2007; Kubo et al., 2000). Ancak mantar tirozinaz enzimi ile memeli tirozinaz enzimi arasında sekans ve yapısal farklılıklar neticesinde kozmetik ve farmasötik amaçla kullanılmak istenen maddelere ait aktivite çalışmalarında yanıltıcı sonuçlar da verebilmektedir (Bagherzadeh et al., 2015). Memeli tirozinaz enzimi membrana bağlı glikoprotein yapıdadır ve pek çok intraselüler sinyal yolları ile sıkı iletişim trafiğine sahiptir. Ancak mantar tirozinaz enzimi sitozolde serbest halde bulunmaktadır. Yapısal farklılıklar neticesinde mutlaka memeli hücre kültürlerinde *in vitro* tirozinaz enzim aktivitesi ve sitotoksite çalışmalarının yapılması yeni umut verici moleküllerin bulunmasında en güvenli yöntemlerden birisi olmaktadır (Chang, 2012).

Inhibisyon mekanizmasına ek olarak inhibisyon gücü olarak da belirtilen enzim aktivitesinin yarısını inhibe etmek için gereken madde konsantrasyonu (IC_{50})

da inhibisyon için kritik bir parametredir. Yapılan test yöntemi, tirozinaz enziminin farklı kaynaklardan ve üretimlerden olması nedeniyle sabit bir inhibisyon IC₅₀ değeri bulunmamakla beraber literatürde de kendini kanıtlamış olan kojik asit, hidrokinon, arbutin gibi moleküller evrensel referans olarak kullanılmaktadır (Boissy et al., 2005; Chang, 2009; Kim et al., 2012) ve çoğu inhibisyon gücü bu moleküllere göreceli olarak hesaplanmaktadır. Çizelge 2.3'te klinik olarak da kullanılan tirozinaz inhibitörleri ve inhibisyon türü ifade edilmiştir.

Çizelge 2.3 Sıklıkla kullanılan tirozinaz inhibitörleri (Kim and Uyama, 2005)

Bileşikler	İnhibisyon türü	IC ₅₀ (mM)	Bileşikler	İnhibisyon türü	IC ₅₀ (mM)
Flavanol			Isoflavan		
(-)-Epigallocatechin	Kompetitif	0.035	Glabridin	Non-kompetitif	0.004
(-)-Epicatechin gallate	Kompetitif	0.017	Gabrene	Karışık tip	7.600
(-)-Epigallocatechin gallate	Kompetitif	0.034	Isoliquiritigenin	Karışık tip	0.047
Flavanol			Diğer maddeler		
Quercetin	Kompetitif	0.070	Kojik acid	Karışık tip	0.014
Kaempferol	Kompetitif	0.230	Anisaldehyde	Non-kompetitif	0.320
Morin	Kompetitif	2.320	Cuminaldehyde	Non-kompetitif	0050
			Cinnameldehyde	Non-kompetitif	0.980
Flavanol					
Luteolin	Non-Kompetitif	0.190			
Luteolin 7-O- glucoside	Non-Kompetitif	0.500			

Tirozinaz inhibisyonu yapan moleküller/metabolitler sentetik, yarı sentetik ya da doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen tirozinaz inhibitörleri genellikle bitki, fungus ve bakteriler ile makroalg türlerinden sağlanmaktadır. *Asphodelus microcarpus*, *Morus nigra* L, *Greyia radlkoferi*, *Limonium tetragonum*, *Arctostaphylos uvaursi*, *Pleurotus ferulae*, *Artemisia aucheri*, *Cassia tora*, *S. brevibracteata*, *Rhodiola crenulata*, *Alpinia officinarum*, *Mangifera indica*, *Podocarpus falcatus*, *Momordica charantia*, *Cymbopogon citrates*, *Greyia flanaganii* gibi bitkilerden elde edilen pek çok tirozinaz inhibitörleri bulunmaktadır (Zolghadri et al., 2019b). Ekstraksiyon işlemleri ise genellikle çiçeklerden, kök ya da yapraklardan sağlanmaktadır. İnhibisyon yapan saf molekül ya da ham ekstre mantar ya da *in vitro* tirozinaz inhibisyon işlemleri için kullanılmaktadır. Fungus türlerinden ise *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces* sp., *Phellinus linteus*, *Daedalea dickinsii*, *Dictyophora indusiata* ve *Neolentinus lepideus*'dan elde edilen sıvı kültürden tirozinaz inhibisyonu gösteren maddeler bulunmuştur (Agrawal et al., 2018; Ishihara et al., 2018). Bakteri türlerinde ise *Streptomyces* sp., *S. hiroshimensis* TI-C3 (toprak izolatu), *Streptomyces swartbergensis* sp. Nov. *Streptomyces roseolilacinus* NBRC, *Thalassotalea* sp. türlerinden tirozinaz inhibisyonu yapan metabolitler elde edilmiştir (Zolghadri et al., 2019b). Tirozinaz inhibitörlerinin taranmasında ise metanol ya da etanol ekstraksiyonu sonrası sıvı-sıvı solvent ekstraksiyonu işlemleri ile molekül taramaları gerçekleştirilmektedir. Etil asetat fazında çözünen

moleküllerin ise diğerlerine kıyasla daha fazla tirozinaz inhibisyonu yaptığı görülmektedir (Chan et al., 2011a; Roh et al., 2004).

Kojik asit en çok çalışılmış tirozinaz inhibitörüdür. *Agaricus bisporus*'tan ekstrakte edilmiştir (Chang, 2009) ve kozmetik olarak da deri beyazlatıcı ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kojik asit tirozinaz enziminin monofenolaz aktivitesine kompetitif, difenolaz aktivitesine ise karışık inhibitör etki göstermektedir. İnhibisyon özelliği tirozinaz enziminin aktif bölgesindeki bakır atomlarına bağlanmasından kaynaklanmaktadır (Kim and Uyama, 2005).

Tirozinaz inhibisyonu yaptığı bilinen temel metabolit sınıfları; bitkisel ya da sentetik fenoller, polifenoller, flavonoidler, flavon ve dihidroksiflavonlar, flavanoller, isoflavonlar, antosiyaninler, curcuminoidler, kumarinler, kalşon ve dihidroksi kalşon türevleri, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar, terpenoid türevleri, kinon türevleri, fenil türevleri, piridin türevleri, tiyol türevleri, kojik asit analogları, azol türevleri, benzaldehit türevleri, karboksilik asitler, resveratrol türevleri ve analogları, bazı serbest amino asitler, doğal ve sentetik peptidler ve türevleri olarak sınıflandırılabilirler (Ali et al., 2016; Kim et al., 2012; Patil et al., 2016; Pillaiyar et al., 2018, 2015; Sae-leaw and Benjakul, 2019; Zolghadri et al., 2019b).

Tirozinaz inhibisyonu melanin sentezi öncesinde, tirozinaz enziminin konformasyonel aktivasyonu esnasında, tirozinaz enziminin direkt inhibisyonu ile, posttranskripsiyonel tirozinaz kontrolü, melanozom transferi gibi farklı noktalarda sağlanmaktadır (Çizelge 2-4).

Çizelge 2. 4 Melanogenez/tirozinaz inhibitörleri ve mekanizmaları (Kumari et al., 2018)

Maddeler	Kaynak	Uygulama	Durum
Tyrosinase inhibitors			
Hydroquinone	Benzen türevi	Tirozinin DOPA'ya dönüşümü inhibisyonu	Klinik
Retioids	Vitamin A türevi	Tirozinaz inhibitörü	Klinik
Arbutin	Hidrokinon türevi	Geri dönüşümlü tirozinaz inhibitörü	Klinik
Aloesin	<i>Aloe barbadensis miller</i>	Kompetitif tirozinaz inhibitörü	<i>in vitro</i>
Kojic asit	<i>Acetobacter</i> , <i>Aspergillus</i> ve <i>Penicillium</i>	Şelatlayıcı ajan	Klinik
Azelaik asit	<i>Pityrosporum ovale</i>	Kompetitif tirozinaz inhibitörü	Klinik
Resveratrol	Üzüm ve dutgiller	Tirozinaz gen ekspresyonunu azaltıcı	Klinik deneme
Cinnamic asit	<i>Cinnamomum cassia</i>	Geri dönüşümlü tirozinaz inhibitörü	<i>in vitro</i>
MITF transkripsiyon faktörü inhibitörü			
AP376	Adamantly benzyl benzamide	CAMP-PKA-CREB blokajı	<i>in vitro</i>
Pyridinyl-imidazole	Kimyasal sentez	Wnt sinyal yolağı blokajı	<i>in vitro</i>
Cardamonin	<i>Alpinia katsumadai</i>	GSK-3 β yolağı inhibisyonu	<i>in vitro</i>
Asetil salisilik asit	Ağrı ateş ve enflamasyon giderici farmasötik	MITF proteozomal degradasyonu	Klinik
Gallik asit	Sumak, yumrulu bitkiler, fıstık fındık	Wnt/ β -catenin yolak inhibisyonu	<i>in vitro</i>
Shogaol	Zencefil	ERK ekspresyonu ile MITF inhibisyonu	<i>in vitro</i>
MITF-siRNA	Kimyasal sentez	MITF RNA ile bağlanarak ekspresyon inhibisyonu	Klinik deneme
Diğer inhibitörler			
IFN- γ	Lökositler tarafından üretilen bir tür sitokin	Melanojenik enzim üretimi inhibisyonu	<i>in vitro</i>
İnterlökinler	Lökositler tarafından üretilen bir tür sitokin	JAK-STAT yolak aktivasyonu ile MITF ekspresyonunda azalma	<i>in vitro</i>
TLR	Makrofaj ve dendritic olmayan hücrelerde üretilen non-katalitik reseptörler	Bilinmiyor	<i>in vitro</i>
TNF- α	İmmün hücreler tarafından üretilen bir tür sitokin	Tirozinaz enzimi yarı ömrünü azaltıcı	<i>in vitro</i>
Fluorouracil	Antikanser bileşik	Epidermal yaralanma oluşturarak dermal yenilenme sağlayıcı	Klinik deneme
Proton pompası inhibitörleri	İlaç molekülük	H ⁺ /K ⁺ ATPase ekspresyonu blokajı	<i>in vitro</i>
Şeker bazlı bileşikler	İnsan ve diğer organizmalarda bulunan doğal moleküller	Melanozom ve tirozinaz enzimi olgunlaşmasını inhibe edici	<i>in vitro</i>

Bazı durumlarda ise tirozinaz inhibitörlerinin sinerjistik etkileri ile aktivite göstermesi sağlanmaktadır (Zolghadri et al., 2019b). Glabridin: resveratrol, glabridin: oksiresveratrol, resveratrol: oksiresveratrol, feniletresorkinol: resveratrol, aloesin: L-askorbik asit, arbutin ya da kojik asit kombinasyonları da tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

En sık kullanılan tirozinaz inhibitörlerinden kojik asidin hücrel toksisiteye neden olduğu ve uzun dönem kullanımlarında kanser oluşturma riski taşıdığı bulunmuştur (Lee et al., 2014). Kojik asit sonrasında en sık kullanılan ikinci inhibitör hidrokinon, oksidasyon ürünlerinin membran lipidlerini parçalaması nedeniyle hücrel hasara neden olmaktadır (Kim et al., 2012). Bu nedenle hidrokinonun kozmetik ürünlerde kullanımı yasaklanmış, kojik asidin ise kullanımı minimize edilmiştir. Sonuç olarak doğal, stabil ve güvenilir tirozinaz inhibitörleri

aranmaya başlanmıştır. Doğal ürünlerin tercih edilme sebepleri yüksek biyoyararlanım ve görece olarak düşük sitotoksik etkilerinin görülmesi ve kamuoyunda pozitif bir etkiye sahip olması gibi çok yönlü etkenlerden kaynaklanmaktadır.

2.5. Tirozinaz İnhibitör Peptidler

Protein ve peptid yapılı bileşiklerin direkt ya da indirekt yollarla tirozinaz enzim inhibisyonu yaptığı bilinmektedir (Schurink et al., 2007). Direkt olarak farklı enzim inhibisyon modelleri üzerinden aktif bölge ile etkileşim içinde bulunan peptid ya da proteinler olduğu gibi; melanin üretim şeması içerisinde farklı sinyal yolları üzerinden inhibisyon yapan ya da tirozinaz enzim aktivitesi sonucunda kinon bileşiklerine bağlanarak melanin sentezini durdurabilen ya da azaltabilen protein yapılı bileşikler de bulunmaktadır.

Genel olarak, amino asitler içerisinde bulunan sekonder amin grupları (alifatik amino grupları), N-terminal primer amino grupları, tiyol içeren amino asitler, o-benzokinonlar ve 4-metil-o-benzokinonlar ile reaksiyon vermektedir. Ancak sadece tiyol içeren bileşikler (aromatik aminler) L-DOPA'nın oksidasyon ürünleri ile etkileşim göstermektedirler (Schurink, 2007). o-kinonların farklı yapıdaki amino asit, peptid ve proteinler ile etkileşimi sonuç olarak tirozinaz enzim aktivitesinde değişimlere yol açmakta ve tirozinaz enziminin son ürünü olan melanin pigmentinin sentezi, miktarı ve rengini de etkilemektedir (Chen et al., 2006). Ek olarak protein ve peptid yapılarının tirozinaz enziminin aktif bölgesinde bulunan bakır atomları ile şelat oluşturmaları da aktif bölgenin blokajına neden olmakta ve enzim inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Kubglomsong et al., 2018).

o-kinonlar ile esansiyel amino asitlerden olan metionin, sistein, ve lizin arasında çeşitli kimyasal reaksiyonlar olduğu bilinmektedir (Kuijpers, 2013). Sistein yapısındaki tiyol grupları, metionin içerisindeki tiyo-eter grupları ve lizin içerisindeki amino grupları ile o-kinonlar kovalent bağlanmaktadır (Schurink et al., 2007). Bu bağlanma şekilleri farklı amino asitlerin ve proteinlerin de tirozinaz yolağında moleküler etkileşimlerin yaşanıp yaşanmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Yapılan çalışmalarda dopakinon serbest sistein ya da glutatyon içerisindeki sistein ile reaksiyona girerek 2-S-sisteinil-DOPA ya da 5-S-sisteinil DOPA molekülünü oluşturmaktadır (Hsiao et al., 2014; Udenigwe, 2016). Yapılan bir çalışma sonucunda; DOPA'nın geri dönüşümsüz olarak Bovin Serum Albumin (BSA) içerisinde bulunan sistein yapılarına bağlandığı bulunmuştur (Scheulen et

al.,1975). Proteinler, peptidler ve serbest L-amino asitler Cu^{+2} iyonları ile stabil kompleksler oluşturma özelliğine sahiptir (Patil et al., 2016). Histidin ve sisteinin Cu^{+2} iyonlarına daha yüksek afiniteleri vardır. Histidin yapısındaki imidazol halka ile sistein yapısındaki tiyol gruplarının metallerle bağlanma aktivitesi oldukça yüksektir. Amino asitlerin hem metal bağlama kapasiteleri hem de fenolik ve kinon bileşiklerine verdikleri reaksiyonların birleşiminde tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin bulunması da şaşırtıcı değildir (Ishikawa et al., 2007).

Kahn'ın yapmış olduğu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki amino asitlerin mantar tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir (Kahn et al., 1985). Serbest amino asitlerin bireysel etkileri gözlemlendiğinde; L-alanin (A) (330 mM), L-prolin (P) (330 mM), L-serin (S) (165 mM), L-izolösin (I) (165 mM), L-Lösin (L) (60 mM), L-asparajin (N) (60 mM), L-valin (V) (60 mM), L/D-aspartik asit (D) (15 mM), L-glutamik asit (E) (15 mM), L-triptofan (W) (15 mM) konsantrasyonlarında çalışıldığında listedeki bu amino asitlerden hiç birisinin o-dihidroksifenolaz aktivitesine etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ancak L-lizin (K), glisin (G), L-histidin (H) ve L-fenil alanin (F) amino asitlerinin artan konsantrasyonları DOPA oksidasyonu üzerinde inhibisyon göstermiştir ancak inhibisyon konsantrasyona bağlı olarak lineer bir seyir göstermemiştir. Maksimum %60 inhibisyon gözlenirken, tiriglisin, diglisin ve glisin sırasıyla melanin üretimini inhibe etmiştir. Bu çalışmada amino asitlerin toksisitesinin düşük olması nedeniyle gıdaların enzimatik kararmasının önüne geçmede kullanılabilecek yeni ürünler geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Serbest amino asitler arasında bulunan en etkili amino asit ise sistein (C) olmuştur. Sistein çok düşük konsantrasyonlarda (0,4 mM) enzimin tamamen inhibisyonuna neden olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda sisteinin direkt enzim inhibitörü olmadığı, enzimatik ürünler olan kinonlar ile konjugasyon sonrası inhibisyon gerçekleştiği bulunmuştur (Dudley, 2007). Sistein, DOPA-kinonu DOPA'ya geri dönüştürmekte, ayrıca DOPA-kinon ile de konjugasyon yaparak melanin sentez yolağını bloke etmektedir.

2007 yılında Ishikawa'nın yapmış olduğu öncü çalışmada amino asitlerin farklı dozlarının tirozinaz inhibisyonu yapıp yapmadığı hücresel tirozinaz enzim aktivitesi üzerinden incelenmiştir (Ishikawa et al., 2007). Bu çalışma sonucunda L-alanine, L-isolösin, L-lösin ve glisin B16-F10 fare melanoma hücrelerinde tirozinaz inhibisyonu göstermiştir. Yapılan ön tarama işleminin ardından bu dört amino asidin L ve D formlarının etkisinin anlaşabilmesi amacıyla 1-16 mM konsantrasyonlarda B16-F10 hücrelerinde 72 saat sonrasındaki tirozinaz inhibisyon değerlerine bakılmıştır. L-amino asitler doza bağlı olarak inhibitör etki

göstermektedir ancak D-formlarında herhangi bir inhibisyona rastlanamamıştır. Bu da amino asitlerdeki konformasyonel değişikliklerin enzim inhibisyonuna etkisinin olduğunu göstermektedir. 4 amino asidin de birlikte etkisinin incelenmesi sonucunda kojik asit ile anlamlı bir farka sahip olmayan inhibitör etki gösterilmiştir. Amino asitlerin mantar tirozinaz enzimi üzerinde herhangi bir inhibitör etkisinin olmaması ise göstermektedir ki bu amino asitlerin hipopigmentasyon etkisinin tirozinaz enzimi ve melanin sentezi ile ilintili sinyal yolları üzerinden inhibitör etki etmektedir (Ishikawa et al., 2007).

Günümüze kadar yapılmış olan en kapsamlı çalışma, spot sentez yöntemi ile tirozinaz enzim inhibisyonu yapan peptidlerin bulunması üzerine olmuştur (Schurink, 2007; Schurink et al., 2007). Bu yöntemde, kısa peptid zincirlerinin selüloz membranlar üzerinde eş zamanlı kimyasal sentezi sağlanmaktadır. Reaksiyon kinetiklerini görmek açısından hızlı ve etkili olan bu yöntemde manuel ve otomatik olarak peptid dizilemesi ile de geliştirilebilmektedir. Yapılan çalışmada; β -kazein (SwissProt, P02666), α -laktalbumin (SwissProt P00711), β -laktoglobulin (SwissProt P02754), ovalbumin (NP_990483), gliadin (SwissProt P02863), glisin (SwissProt P04776), ve β -konglisinin (SwissProt P13916) gibi konvansiyonel, günlük hayatımızda da kullanılan protein dizileri üzerinden çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda ise gelecekte yapılacak olan tirozinaz inhibitör peptid tasarımları için kilometre taşı olacak sonuçlar da ortaya konmuştur.

Tirozinaz-peptid interaksiyonunda kısa peptidler için arjinin (R) varlığı tirozinaz inhibisyon etkinliği açısından oldukça önemlidir (Abdel-Malek et al., 2009; Abu Ubeid et al., 2009; Gupta et al., 2017; Schurink et al., 2007). Peptidin dizi uzunluğu arttıkça ise arjinin amino asidinin etkisi azalmakta; ancak arjinin birim sayısı arttıkça konumu ve pozisyonu ile N-terminal ve C-terminal uçlarında beraber bulunduğu amino asitlere göre aktivite etkilenmektedir. Aspartik asit ve glutamik asit gibi asidik yapıya sahip olan amino asitlerce yoğun peptidler tirozinaz enzim inhibisyonu sağlayamamaktadır. Ayrıca dizide bu amino asitlerin varlığı inhibitör etkiyi düşürmektedir. Yapısında valin içeren peptidler tirozinaz enzime kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır ve anlamlı ölçüde tirozinaz inhibisyonu gerçekleştirmektedir. Güçlü tirozinaz inhibisyonu yapan peptidler arjinine bağlı fenil alanin içermektedir. Tirozinaz bağlanmasında arjinin-fenil alanin kombinasyonun güçlü olması fenil alaninin tirozinaz substrat analogu benzeri yapı içermesinden kaynaklanmaktadır (Ishikawa et al., 2007; Ochiai et al., 2016a). Tirozinaz enzimi tirozin amino asitlerini dönüştürmektedir. Fenil alanin ve tirozinin bağlı olduğu aktif grupların yapısal benzerliği neticesinde fenil alaninin enzim aktif

bölgesine bağlanma eğilimi gösterdiği bilinmektedir. Kahn'ın yapmış olduğu çalışmada fenil alaninin güçlü bir inhibitör olması da bu sonucu doğrular niteliktedir. (Kahn et al., 1985).

Alanin, valin, lösin, metionin, izolösin gibi hidrofobik aromatik gruplara sahip amino asitler içeren peptidler genellikle yüksek oranda tirozinaz inhibisyonu göstermektedir (Schurink et al., 2007; Shimizu et al., 2000). Fenil alaninin yapıya bağlanmasına istinaden tirozinaz inhibisyonuna katkısı bu amino asitlere göre düşüktür. Bunun yanında düşük bir etkinliğe sahip olsa da polar amino asitler (sistein, serin) ve treonin içeren peptidler düşük de olsa tirozinaz inhibisyon etkinliği göstermektedir (Hsiao et al., 2014; Tseng et al., 2015).

Tirozinaz enzimine bağlanan her peptidin inhibisyon yapmasını beklemek doğru değildir. Örneğin tirozin ve triptofan içeren peptidlerde tirozinaz enzimi aktive olabilmektedir. Tirozinin doğal substrat olması aktivatör etkiyi arttırabilmektedir (Ochiai et al., 2016a). Ancak tirozinin konumu da aktivatör ya da inhibitör katkısı belirleyici özelliğindedir.

Çizelge 2.5'te de görüldüğü üzere arjinini/fenil alanin–valin (alanin/lösin kombinasyonları yapıya ciddi ölçüde tirozinaz inhibitör etkisi kazandırmaktadır. Bu kombinasyonlarda yola çıkılarak oluşturulan peptid pirinç proteinlerinden elde edilen YRSRKYSWY ($C_{65}H_{90}N_{18}O_{17}$) bu zamana kadar bulunmuş en düşük IC_{50} değerine sahiptir ve ticari olarak da cilt renk bozukluklarının ve kusurların düzeltilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Ochiai et al., 2016a). Decapeptide-12 olarak isimlendirilmiş bu peptidi içeren kozmetik ürün grubu Lumixyl olarak piyasada bulunmaktadır (Şekil 2-12 b-c).

Çizelge 2.3 Peptid/protein bazlı tirozinaz inhibitörleri

Peptid adı/dizisi	Elde edilme yöntemi	Aktivite türü	Kaynak
2-{2-amino-3-[(2-amino-2- {[1-carboxy 3(methylsulfanyl)propyl] carbamoyl}ethyl) disulfanyl]propanamido}- 4(methylsulfanyl)butanoic asit (dSHP)	Kimyasal sentez	ERK yolağı üzerinden MITF degradasyonuna bağlı tirozinaz inhibisyonu	(Choi et al., 2016)
MHRL	Süt proteini Katı faz Fmoc peptid sentezi	Mantar, MEL-A (insan), B16-F10 (Fare) tirozinaz enzim inhibisyonu	(J. K. Yang et al., 2018)

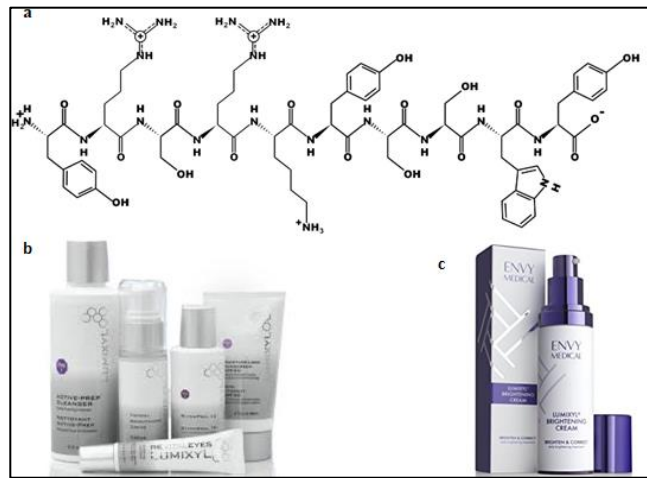
Çizelge 2.5. (devamı)

Peptid adı/dizisi	Elde edilme yöntemi	Aktivite türü	Kaynak
CT-2 (LGPSHY)	Pirinç kepeği Kimotripsin ve trypsin enzimatik hidrolizi	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu	(Ochiai et al., 2016b)
Kafeik asit/kojic asit-AR konjugasyonu içeren peptidler	Fmoc katı faz peptid sentezi	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu	(Lee et al., 2012)
A2 (TRCFRVCS)	Fmoc katı faz peptid sentezi	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu/MITF degradasyonu	(Feng et al., 2018)
MGRY	<i>Pavlova lutheri</i> mikroalgal biyokütleinin <i>Hansenula polymorpha</i> ile fermentasyonu	MITF/ ERK degradasyonu,	(Oh et al., 2015)
L-Glutathione (γ -ECG)	-	-	(Friedman, 1995)
Cyclo (GPYLA) cyclo (GIGGGPPF) cyclo (GTLPSPF) cyclo (GGYPLIL) cyclo (GPPLGPVIF) cyclo (GGYLPPLS) cyclo (PFSFGPLA)	Siklik peptid <i>Lactobacillus Helvetica</i>	Tirozinaz inhibisyonu	(Morita, 1994)
C-fikosiyenin	<i>Spirulina platensis</i> ekstraktı	* ERK yolağının upregülasyonu ile p38/MAPK sinyal yolağının downregülasyonu **GRB2/ERK Sinyal yolağının downregülasyonu	(Wu et al., 2011)* **(Hao et al., 2018a)
Oscillapeptin G	<i>Oscillatoria agardhii</i> ribozomal olmayan peptid	Tirozinaz inhibisyonu (mantar)	(Sano and Kaya, 1996)
MRSRERSSWY	Fmoc katı faz peptid sentezi/molecular docking	B16F10 tirozinaz inhibisyonu (IC50=102 mM)	(Bagherzadeh et al., 2015)
(SFKLRY-NH2)	Kimyasal sentez	Dermal fibroblastlara antioksidan aktivite, B16-F10 hücrelerinde melnin ve tirozinaz inhibisyonu	(Lee et al., 2009)
IQSPHFF	Phage kütüphaneleri	B16F10 tirozinaz inhibisyonu Mantar tirozinaz inhibisyonu,	(Nie et al., 2017)
Ac-RSRFS	Katı faz kimyasal sentez (9H-fluoren-9-ylmethoxy) carbonyl	B16F10 tirozinaz inhibisyonu (IC50=0.29mg/mL)	(Lien et al., 2014)
Zebrafish phosvitin peptidi, Pt5	<i>Escherichia coli</i> rekombinant sentezi	cAMP miktarında azalış TRP-1, TRP-2 miktarında azalış, MITF degradasyonu	(Liu et al., 2017)
P3 RADSRADC P4 YRSRKYSSWY	Kimyasal sentez	Mantar tirozinaz inhibisyonu, B16-F10 tirozinaz inhibisyonu, P3 IC50 123 mM P4 IC50 40 mM	(Abu Ubeid et al., 2009)
Tavuk tüyü proteini pepsinpancreatin hidrolizatları <3 kDa	Pepsin pankreatin, Papain hidrolizi	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu	(Pongkai et al., 2017)
CRY	<i>In silico</i> tasarım	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu (IC50 = 6.16 μ M)	(Hsiao et al., 2014)
SSEYYGGEGSSSEQYYGEG.	Pirinç kepeği albümin hidrolizat	B16-F10 tirozinaz inhibisyonu	(Kubglomsong et al., 2018)
Vazoaktif bağırsak peptidi (VIP), cilt nörüpeptidi	-	MITF, CREB, PKA miktarında artışı ile tirozinaz aktivasyonu	(Yuan et al., 2016)

Çizelge 2.5. (devamı)

Peptid adı/dizisi	Elde edilme yöntemi	Aktivite türü	Kaynak
İpek proteini Serisin	-	Mantar tirozinaz inhibisyonu	(KATO et al., 1998)
<i>Babylonia areolata</i> protein hidrolizat <3 kDa	Proteaz G hidrolizi	B16-F10 tirozinaz inhibisyon	(Prakot et al., 2015)
Kalamar kollajeni hidrolizatı F3 (3–10 kDa)	Alkalaz	1 mg/ ml F3 il3 %39,65 inhibisyon (B16-F10 hücre hatlarında)	(Nakchum and Kim, 2016)
Bufo peynir altı suyu hidrolizatları	Alkalaz ile enzimatik hidrolizat	Red Delicious elmalarında PPO inhibisyonu	(da Silva et al., 2018)

Tirozin amino asidinin peptid içerisindeki konumu tirozinaz aktivitesine doğrudan etki eden bir parametredir (Ochiai et al., 2016a). Tirozinin inhibisyona katkısının incelenmesi amacıyla decapeptide-12 dizisi üzerinden C terminal ve N terminal tirozin varlığının aktiviteyi ciddi ölçüde değiştirdiği saptanmıştır. Decapeptide-12'nin yapısı incelenecek olursa; C ve N terminal uçlarda tirozin bulunmaktadır. Yapıda toplamda 3 tirozin, 2 arjinin ve 3 serin amino asidi yer almaktadır. İki tane serin amino asidinin birbirine bağlı olduğu da gözlenmiştir. C terminal tirozin birimi kaldırıldığında peptid anlamlı bir aktivite kaybı yaşamamıştır ancak N terminal tirozin birimi uzaklaştırıldığında; arjinin varlığında dahi peptidin tirozinaz inhibisyonu yapmadığı gözlenmiştir. Her iki tirozin birimi uzaklaştırıldığında yine belirgin bir aktivite görülmezken C terminal triptofan arjinin olarak değiştirildiğinde 400 μ M IC₅₀ değeri elde edilmiştir ki bu da bilinen peptidin IC₅₀ değerinin 10 katıdır. Bu çalışma özellikle tirozin birimlerinin konumunun inhibitör etkiye büyük katkı sağladığını, tirozinin olmadığı durumlarda ise yapıda bulunan arjinin birimlerinin inhibisyon için önemli olduğunu vurgulamıştır.



Şekil 2.12 YRSRKYSWY Yapısı ve kozmetik formülasyonları a) Decapeptide-12 peptid yapısı, b) Decapeptide-12 Lumixyl deri beyazlatıcı topikal ürünler, c) Decapeptide-12 ENVY Medical deri beyazlatıcı ürün serisi

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki;

- Arjinin varlığı (Schurink vd. 2007),
- C terminal tirozin aminoasidi varlığı (Ochiai vd., 2016),
- Lösin +Arjinin kombinasyonları (Ubeid vd., 2007),
- Arjinin/Fenil alanin + Alanin/Valin/Lösin kombinasyonları olan peptidlerin yoğun tirozinaz inhibisyonu gösterdiği saptanmıştır (Schurink vd., 2007).

Sentetik peptidler dışında bir takım biyolojik peptidlerin de tirozinaz inhibisyonuna katkısı olduğu bulunmuştur. Özellikle arpa, pirinç, kazein gibi insan beslenmesinde de sıklıkla kullanılan protein kaynaklarından türevlenmiş peptidler gelecek için umut vaat edici tirozinaz inhibitörleri olma potansiyeline sahiptirler (Kubglomsong et al., 2018). Peptid temelli tirozinaz inhibitörleri (i) proteince zengin kaynaklardan enzimatik hidroliz yolu ile (da Silva et al., 2018; Pongkai et al., 2017; Prakot et al., 2015), (ii) proteince zengin kaynaklardan SPOT sentezi ile (Schurink et al., 2007), (iii) proteince zengin kaynaklardan *in silico* tasarım ve moleküler docking çalışmaları ile (Tseng et al., 2015; Ubeid et al., 2012), (iv) fungal, bakteriyel kaynakların doğal peptid üretim metabolizması ile (Sano and Kaya, 1996), dizisi bilinen peptidlerin ise rekombinant sentezi (Liu et al., 2017) ile gerçekleştirilebilmektedir.

2.6. Mikroalgler

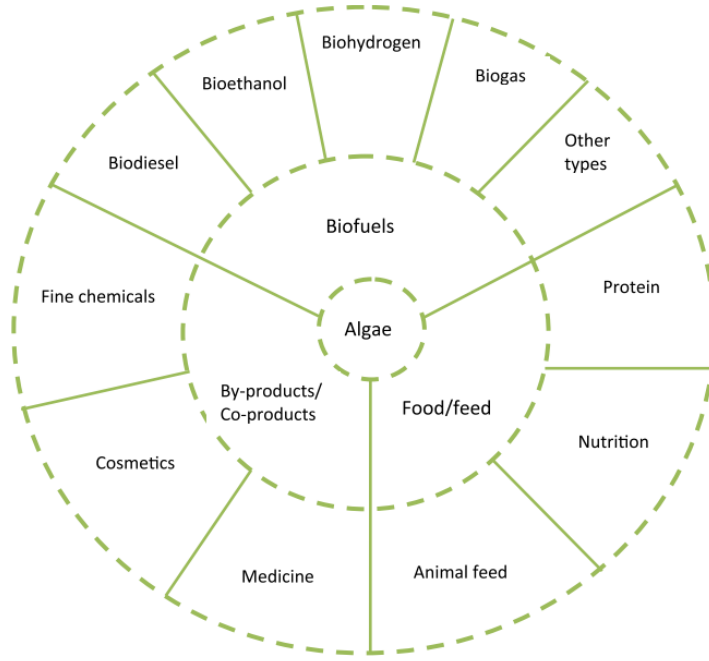
Mikroalgler çoğunlukla sucul ekosistemler başta olmak üzere, kaya, toprak, kar, bitki ve hatta hayvanlar üzerinde (tembel hayvan) yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Koller et al., 2014). Buzul cepleri, kaya kırıkları, termal kaynaklar gibi ekstrem çevresel koşullarda da var oldukları bilinmektedir. Ayrıca liken, mercan resifleri gibi simbiyotik yaşam formları içerisinde de dahil olmaktadır. Görüldüğü üzere alglerin pek çok farklı bölgelerde varlığı onları özel organizmalar statüsüne getirmiştir. Yaşadıkları habitatların farklılığı nedeniyle de taksonomik olarak oldukça fazla tür çeşitliliği bulunmaktadır (Borowitzka, 1992). Algler dünya üzerindeki fotosentetik oksijen üretiminin yaklaşık yarısından sorumludurlar ve bu üretimlerin çoğu deniz ve okyanuslarda yaşayan alglerden sağlanmaktadır (Rasmussen et al., 2008). Bu sayı abartılı gibi görünse de alglerin küçük olması, tür çeşitliliğinin fazla olması, yaşam döngülerini kısa ve ikilenme sürelerinin bitkilere göre çok çok hızlı olması bu durumu olası kılmaktadır (López et al., 2010).

Mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonu türe ve kültür koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterse de temel olarak proteinler ve serbest aminoasitler, lipidler, pigmentler, vitaminler ve antimikrobiyal metabolitlerden oluşmaktadır. Bunlar arasında özellikle proteinler dikkat çekicidir (Pulz and Gross, 2004).

Mikroalgler 4 ana grup altında sınıflandırılmaktadır; yeşil algler (*Chlorophyceae*), kırmızı algler (*Rhodophyceae*), diatomlar (*Bacillariophyceae*) ve kahverengi algler (*Phaeophyceae*) şeklindedir (Azam et al., 2017b). Bu 4 ana gruba ek olarak siyanobakteriler (mavi-yeşil algler) de bulunmaktadır (Raja et al., 2016). Siyanobakteriler taksonomik olarak bakterilerin altında yer alsa da fotosentetik doğaları nedeniyle algler grubuna dahil edilmektedirler. Biyoteknolojik olarak ise mikroalgler ve siyanobakteriler arasında terimsel bir ayrım yapılmadan *mikroalg* olarak ifade edilmektedir.

Ökaryotik mikroalgler fototrofik yaşamakla beraber, fotomiksotrofik ve heterotrofik olarak da yaşamlarını devam ettirebilmektedirler (Kose ve Oncel, 2016). Bu nedenle özellikle yağ asidi üretimlerinde klasik biyoproses sistemlerinin heterotrofik olarak uygulanabilmesi, hem ışığa bağımlılığı azaltmış/ortadan kaldırmış hem de ölçek büyütmenin önündeki engelleri bir nebze de olsa azaltabilmiştir (Isleten-Hosoglu ve Elibol, 2017).

Mikroalgler ototrof üretimlerde CO₂, N, S, P, iz elementler ve ışık gibi besin kaynaklarına gereksinim duyarlar (Deviram et al., 2020; Singh and Dhar, 2019). Doğal koşullarda güneşten yapay olarak da diğer ışık kaynaklarından topladıkları ışık enerjisini fotosentez ile biyokütle üretimine transfer etmektedirler. Fotosentetik dönüşüm hızları ortalama %3'tür ve bu değer karasal bitkilerde %0,2-2 arasında değişiklik göstermektedir (Sepulveda et al., 2019). Sahip oldukları fotosentetik üstünlük nedeniyle, fotosentetik biyoteknolojide bitkilerin yerini alan pek çok farklı uygulama alanlarında karşımıza çıkmaktadırlar (Şekil 2.13). Görece olarak basit çevresel koşullar ve nutrient gereksinimleri, mikroalglerin sürdürülebilir lipid, karbonhidrat, protein ve pek çok doğal molekülün ölçeklenebilir şekilde üretilmesini sağlayabilmektedir (Pulz and Gross, 2004).



Şekil 2.13 Mikroalgal ürünler (Zhu, 2015)

Günümüzde mikroalglerden elde edilen ve çok fazlaca bilinen ürünler *Spirulina* ve *Chlorella* gibi tek hücre proteini nutrisötik ürünler (Barka and Blecker, 2016), karotenoidler (β -karoten, astaksantin, lutein, fukoksantin gibi) (Apt and Behrens, 1999), fikobiliproteinler, yağ asitleri, polisakkaritler, vitaminler, proteinler, peptidler, antibakteriyel ürünler gibi yem, gıda, akuakültür, nutrisötik, farmasötik, biyomalzeme, doku mühendisliği gibi pek çok endüstride hızla yer edinmeye başlamıştır (E.W. Becker, 2007a; Bleakley and Hayes, 2017; Borowitzka, 2013; Manirafasha et al., 2016; Mourelle et al., 2017; Raja et al., 2008; Walker et al., 2005).

Mikroalglerin kimyasal kompozisyonu büyük ölçüde çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Su, sıcaklık, ışık, nutrient, tuzluluk, pH gibi çevresel etkenler, aynı tür olsa dahi, değiştiği zaman biyokimyasal kompozisyonda dolayısıyla biyoteknolojik olarak üretilmek istenen hedef maddenin de verim/verimlilik değerlerinde değişikliklere neden olmaktadır. Biyoreaktör/fotobiyoreaktör gibi üretim sistemlerinde çevresel koşulların mikroalg gelişimi ve fizyolojisine etkisi kontrol edilebilse de açık alan üretimlerinde mevsimsel değişimlere bağlı çevresel koşullardaki değişiklikler mikroalglerin büyümesini ve değerli moleküllerin biyosentezini de olumsuz etkileyebilmektedir (Benemann, 1997; Leupold et al., 2012; Oncel ve Kose, 2014). Bu nedenle fotobiyoreaktör sistemlerinde kontrollü aseptik koşullar altında üretimler sağlanabilmekte ancak, kurulum ve operasyon maliyetleri yüksek olduğu için

katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanıldıklarında maliyetin negatif etkisi ortadan kalkabilmektedir.

Mikroalglerin besin ve kozmetik olarak üretimi ve kullanımı yeni olmasa da, ticari üretimleri 1960'lı yıllarda Japonya'da *Chlorella* üretimi ile başlamış ve daha sonra *Spirulina* üretimi ile 1980'lerden sonra büyük ölçekli mikroalg üretimleri hızlıca artış göstermeye başlamıştır (Borowitzka, 1992). 1980'li yıllarda Asya ülkeleri başta olmak üzere, İsrail, Hindistan ve Amerika gibi ülkeler ticari üretimlere öncülük etmişlerdir. Mikroalgal biyoteknoloji ile alakalı yatırımların bu derece cesaretlendirilmesi ve teşvik edilmesinin en temel nedeni konvansiyonel karasal ticari bitkilerle kıyaslandığında daha yüksek biyokütle verimliliklerine (10-50 kat daha fazla) sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. İkilenme sürelerinin kısa olması ve alan/hacim olarak bitkilere göre daha az yer kaplamaları, fotosentetik CO₂ dönüşümünün de yüksek olması nedeniyle aradaki üretim farkı ise giderek artmıştır (Somers and Quinn, 2019; Wang et al., 2008). Akuatik türler olmasına rağmen su kaynaklarını bitkilere göre daha az ve etkili kullanabilmektedirler. Üretimde kullanılan taze su ya da atık su gibi kaynaklar mikroalglerin kültivasyonu için tercih edilmekte, böylece çevresel sürdürülebilirlik de mikroalgler tarafından sağlanmış olmaktadır (Hemalatha et al., 2019). Tatlı su kaynaklarının kullanımının az olması da yine bir diğer çevresel etki noktasıdır. Mikroalgal üretimlerde herhangi bir pestisit ya da herbisit kullanımı gerekmediği için, bu gibi zirai ürünlerin toksik yükü de uzaklaştırılmış olmaktadır. Atık su kaynaklarında kültivasyonları sayesinde NH₄, NO₃ ve P kaynaklarının da dışarıdan sağlanmasına gerek kalmamaktadır (Benemann, 1997).

Sahip oldukları bu kadar çok avantaja rağmen mikroalgal biyoteknoloji henüz erken gelişim safhasındadır. Sucul ortamların %70'ine yakınıni oluşturmaları ve çok büyük ölçüde tür çeşitliliğine sahip olmaları nedeniyle henüz biyoteknolojik olarak çok az tür keşfedilmiş ve üretimlerde yer almaya diğer mikrobiyolojik biyoproseslere görece geç başlanmıştır. Böyle olsa dahi, var olan türlerdeki biyoaktif moleküller ve ürünler mikroalgal endüstrinin gelişmesi için ciddi derecede motive edicidir. Mikroalgal üretimlerin gelişmesinin biraz daha yavaş olması henüz ticari üretimlerinin gerçekleştirilmesine olan güvenin az olması, ilk yatırım ve işletme maliyetlerinin yüksek olması gibi nedenlerden ötürüdür. Özellikle açık kültür sistemlerinde bakteri ya da diğer mikroalg türleri ile kontaminasyon ve sıcaklığa bağlı olarak buharlaşma ile su kaybı gibi sorunlar hala tam anlamıyla çözülebilmiş değildir (Pires et al., 2017; Wang et al., 2019). Bu nedenle üretimlerde kullanılacak türlerin tanınması, fizyolojik ve biyokimyasal

karakterizasyonlarının üretimler öncesinde iyi bir şekilde yapılması gerekmektedir. Tür seçiminde dikkat edilecek unsurlar; (i) hedef ürünü yüksek verimde üretme, (ii) sıcaklık değişimlerini tolere edebilme, (iii) yüksek tuzluluk ya da alkali koşullarda çoğalabilme/yaşayabilme gibi özelliklere sahip olmak olarak 3 temel parametre altında incelenebilir. Ayrıca düşük ikilenme süresi ve kısa yaşam döngüsü olması da aranan özellikler arasındadır. Bu gibi özelliklere sahip mikroalg türleri kolaylıkla biyoproseslerde yığın üretimler için kullanılabilir.

Tanımlanan 20.000-30.000 tür arasından 10-20 tanesi ticari üretimlerde kullanılmaktadır (Safi vd., 2013). Bunlar *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum* ve *Porphyridium* türleridir (Borowitzka, 1992; Deviram et al., 2020). Bu türlere ek olarak *Chaetoceros*, *Cryptocodinium*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* ve *Skeletonema* gibi türler de bulunmaktadır. Her bir türün üretiminde özelleştiği bir veya birden fazla biyoaktif molekül bulunmaktadır (Çizelge 2-6). *Arthrospira platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* var. *flos-aquae*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* ve *Chlorella luteoviridis* türleri ise Avrupa komisyonunun yeni gıda türleri listesinde yer almaktadır (http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/index.cfm).

Çizelge 2.4 Çeşitli mikroalg türleri ve ürettikleri biyoaktif moleküller

Mikroalg Türü	Değerli bileşikler
<i>Muriellopsis</i> sp.	Lutein
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	
<i>Dunaliella salina</i>	β-karoten
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	astaksantin
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	
<i>Monodus subterraneus</i> , <i>P. cruentum</i>	
<i>C. calcitrans</i>	PUFA
<i>Nannochloropsis</i>	DHA
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	EPA
<i>Isochrysis galbana</i>	
<i>Pavlova salina</i>	
<i>Odontella aurita</i>	
<i>Porphyridium</i>	Fikobiliproteinler
<i>Spirulina</i>	Fikoeritrobinler Sülfatlı polisakkaritler
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	TAG
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	
<i>Tetraselmis</i> sp.	Sülfatlı polisakkaritler
<i>Isochrysis</i> sp.	

Çizelge 2.6. (devamı)

Mikroalg Türü	Değerli bileşikler
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	İmmünostimülant polisakkaritler
<i>Chlorella elipsoide</i>	
	Protein
	Yağ asitleri
<i>Chlorella</i>	Klorofil
	β-1,3-glucan
<i>Botryococcus</i>	Hidrokarbonlar
	Yağ asitleri
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Vitamin E
<i>Spirulina platensis</i>	Vitamin B
<i>Tetraselmis suecica</i>	Vitamin C
<i>Euglena gracilis</i>	
<i>Chlamydomonas</i>	Lektin
<i>Chlorella</i>	
<i>Dunaliella</i> sp.	Glutasyon
<i>Spirulina</i> sp.	Biyoplastikler (PHA, PHB)
<i>Nostoc</i> sp.	
<i>Synechocystis</i> sp.	
<i>Spirulina maxima</i>	
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Fitohormonlar

Mikroalglerden elde edilen bu ürünler ise gıda koruyucuları, gıda katkı maddesi, renklendirici, gibi gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Apt and Behrens, 1999; Hu et al., 2019; Khazi et al., 2018). Algal polisakkaritlerden biyoplastik ve tekstil ürünlerini üretilmesi de yine mikroalgal biyokütlenin tasarımcı ve yenilikçi doğasını desteklemektedir (Mistry et al., 2019). Özellikle lipidler, pigmentler, polisakkaritler, polifenoller, vitaminler, proteinler ve amino asitler öncül, değerli ürünler olmakla beraber; yeni keşfedilen antiviral, antibakteriyel moleküller, ribozomal olmayan peptidler, mikosporin benzeri aminoasitler, steroller gibi farklı sınıflara ait moleküller de mikroalgal ürün çeşitliliğini arttırmaktadır (Raja et al., 2016). Antioksidan ve prebiyotik özellikteki çoğu mikroalgal biyoaktif molekül ise yeni nesil nütrisötik ve kozmesötik formülasyonlarda kullanılmaya da başlanmıştır (E.W. Becker, 2007a; Raja et al., 2008).

2.6.1. Mikroalgal Kozmetikler

Kozmetik ürünlerin kullanımı güzellik unsurunu ve kusursuzluğu ön plana çıkarmakla ilintilidir. Bireylerin sosyopsikolojik davranışlarının belirlenmesinde aynı doğada olduğu gibi, güzellik, pürüzsüzlük, çekicilik, beğenilme gibi parametreler belirler ve göz önünde olmayı sağlayarak bireylerin sosyal çevreleri arasında seçilmelerini de sağlamış olur. Aynı şekilde bireyde meydana gelen kusurlar ise beğenilme ve dikkat çekme özelliklerini negatif etkilediği için

psikolojik yük oluşturmakla beraber rahatsızlıklar oluşmasına, bireylerin kendilerinden memnun olmaması, sosyal çevreye adaptasyon sorunları yaşamasına kadar gidebilecek hassas sonuçlar doğurur (Wang et al., 2015). Sonuç olarak; kozmetik ürünlerin kullanımı görsel algıların değerlendirilmesinde bilinçli bir manipülasyon aracı halini almıştır.

Bunun bir diğer terimsel yakını ise kozmesötik ürünlerdir. Klasik kozmetik ürünlerden farklı olarak sadece güzellik algısı için kullanılmaz, topikal uygulamalarda pek çok farklı fonksiyona sahiptir ve fizyolojik olarak bir takım iyileştirme sağlayıcı, yenileyici ürünlerdir (Mourelle et al., 2017). Tüketici bilincinde meydana gelen artış sonucunda, kimyasal ürünlerin ve toksik özellikleri olabilecek maddelerin kullanımı yerine doğal ve güvenilir yeni kozmesötik ürünlerin kullanımına olan talep de bu doğrultuda hız kazanmıştır. Saf biyokatif ürün ya da ekstrelerin kullanıldığı bitki ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen pek çok kozmesötik ürün arık krem, losyon, maske, renkli kozmetik, hijyen ürünleri olarak raflarda yerlerini almaya başlamıştır (Hayes et al., 2017; Rahnamaeian and Vilcinskas, 2015; G. Yang et al., 2018). Mikroalgler ve ayrıca makroalgler de içerdikleri primer ve sekonder metabolitler sayesinde son zamanlarda sıklıkla kullanılan bir diğer kozmesötik ürün kaynakları haline gelmiştir.

Pigmentler, fikobiliproteinler, fitohormonlar ve diğer birçok UV stresini azaltıcı antioksidan ürünler kozmetik endüstrisinde katma değeri yüksek hammaddeler olarak yer almaya başlamıştır (Chan et al., 2011b; Fernández-Rojas et al., 2014; Fu et al., 2005; Koller et al., 2014; Levy-Ontman et al., 2017). Örneğin; siyanobakteri türlerine özgü mikosporin benzeri amino asitler UV filtreleme özellikleri nedeniyle güneş koruyucu ürünlerin içerisinde kullanılmaktadır (Pereira, 2018). Sikotinemin gibi indol ve fenol bileşikler UV maruziyetine bağlı deri hasarlarını minimize eden umut verici bileşikler arasındadır (G. Yang et al., 2018). Mikroalglerden elde edilen saf moleküllerin yanı sıra çeşitli protein hidrolizatlar (Fan et al., 2014a) ve solvent ekstreleri de kozmetik ve hijyen ürünlerinde kullanılmaktadır (Kose ve Ocel, 2015; Gürlek vd., 2019). Çoğunlukla yaşlanma karşıtı kremler ve losyonlar, kolajen yenileyici krem ve losyonlar, koruyucu ürünler, cilt sıkılaştırıcı, selülit giderici, kızarıklık giderici, yara iyileştirici, kırışıklık ve çatlak giderici, detoksifiye edici, ağır metal filtreleyici, ferahlatıcı ve yenileyici krem ve losyonlar, antioksidan ve tahriş önleyici ürünler ile deodorant gibi ürünlerde kullanılmaktadırlar. Mikroalglerden elde edilen kozmetik ürünler o kadar popülerleşmiş ve ekolojik toplum konsepti açısından dikkat çekmiştir ki, Louis

Vuitton Moët Hennessy ve Danial Jouvance gibi moda devleri de algal kozmetik ürünlerini içeren yeni nesil tasarım kozmetik ürünleri geliştirmişlerdir.

Doğal ve biyoyumlu pigmentler ile renkli kozmetik endüstrisinde eye liner, far ve ruj gibi ürünlerde sürdürülebilir ve vegan renklendirici alternatifleri sunmaktadır (Rizwan et al., 2018). Sadece gıda ürünlerinde değil aynı zamanda kozmetik ve hijyen ürünlerinde de artan vegan yaklaşımları neticesinde mikroalgal renkli pigmentler, fikobilinler ve fikoeritrinler sayesinde modern tasarımlar ve ürün formülasyonları da ortaya sunulmaktadır. Çevreci yaklaşımın bu denli arttığı, ekolojik dengenin korunmasının ve bilinçli, doğru tüketim odaklı çalışmaların hızlanmasıyla beraber mikroalgal ürünler yenilenebilir ve sürdürülebilir ekolojik kozmetik ve kozmesötik ürünlerin merkezine girmeyi başarmıştır.

2.7. Mikroalgal Proteinler

1950'li yıllarda üretimlerin artmasıyla beraber bazı mikroalg türlerinin protein kaynağı olabileceği ve bitkisel ya da hayvansal proteinler ile yer değiştirilebileceği fikri ortaya atılmıştır (E.W. Becker, 2007a). Tabi ki bu iddiaların kaynağında mikroalg türlerinin protein içeriklerinin yüksek olması (Çizelge 2.7) ve amino asit kompozisyonlarının besinsel amino asit kompozisyonları ile uyumlu olmasından kaynaklanmaktadır (Morris et al., 2008; Walker et al., 2005).

Çizelge 2.5 Farklı mikroalg türleri ve konvansiyonel gıda kaynaklarının % protein içerikleri (Barka and Blecker, 2016)

Kaynak	Protein içeriği (%)
<i>Spirulina paltensis</i>	65
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62
<i>Arthrospira maxima</i>	56-77
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	42.2
<i>Chlorella ovalis</i>	10.97
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57
<i>Chlorella spaerckii</i>	6.87
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58
<i>Dunaliella primolecta</i>	12.26
<i>Dunaliella salina</i>	57
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	11.4
<i>Porphyridium aerugineum</i>	32
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
<i>Euglena gracilis</i>	39-61
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20
<i>Synechococcus sp.</i>	63
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	42
<i>Scenedesmus obliquus</i>	48
<i>Tetraselmis</i>	36

Çizelge 2.7. (devam)

Kaynak	Protein içeriği (%)
<i>Tetraselmis chuii</i>	31-46,5
Süt tozu	36
Soya unu	37
Tavuk	24
Balık	24
Dana eti	22
Yer fıstığı	26

Süregelen çalışmalarda mikroalgal proteinlerin insan ve hayvan fizyolojisini regüle edici önemli biyoaktiviteleri bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Bleakley and Hayes, 2017). Bu aktiviteleri sınırlandırmamakla beraber, başlıcaları; antioksidan, antihipertansif, immünomodülatör, antikanser, karaciğer koruyucu, nöroprotektif, antibakteriyel, antiviral, UV koruyucu, ağır metal şelatlayıcı, kalp-damar hastalıklarına karşı koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir (Draaisma et al., 2013; Gürlek et al., 2019; Ochoa-Méndez et al., 2016; Waseem et al., 2018). Biyoaktiviteleri sadece ham proteinlerde değil, ayrıca mikroalglerden elde edilen peptidler ve çeşitli yollarla üretilen protein hidrolizatlarında da gözlenebilmiştir (A. Kose vd., 2017; Kose ve Oncel, 2015). Sıklıkla protein kaynağı olarak kullanılan türler ise *Chlorella*, *Spirulina* ve *Dunaliella* türleridir (Buono et al., 2014). Ancak *Dunaliella* daha çok β -karoten üretiminde tercih edilmesi nedeniyle (Borowitzka, 1992), insan tüketimi için daha çok *Spirulina* ve *Chlorella*'dan elde edilen proteinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Yağ ekstraksiyonu sonrasında ise, *Nannochloropsis* ve *P. tricornutum* gibi türlerin protein ve amino asit kompozisyonları incelendiğinde; amino asit kompozisyonunun soya unu ile eşdeğer özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu da yağ endüstrisinde kullanılan mikroalglerden atık haline gelen biyokütlenin biyorafineri yöntemiyle fonksiyonel protein ve peptidler üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir.

Gıda olarak tüketilecek olan proteinlerde protein kalitesini belirleyici unsur amino asit kompozisyonu ve proteinin sindirilebilirliğidir (Bleakley and Hayes, 2017; Kose ve Oncel, 2015). Hayvansal proteinler genellikle esansiyel amino asitleri de içerdiği için tam protein kaynakları olarak kabul edilirken, diyetle tüketilen bitkisel proteinlerde bir takım amino asitlerde eksiklikler gözlenebilmektedir (Bleakley and Hayes, 2017). Bitkisel proteinler esansiyel amino asitlerden (histidin, izolösin, lösin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin) en az biri ya da birkaçını içermeyebilmektedir. Ayrıca yapılarında çok fazla çözünmez polisakkaritler de bulunduğu için mikroalgal proteinler ciddi derecede alternatif yeni nesil protein kaynakları olarak düşünülmektedir (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.6 Konvansiyonel protein kaynakları ile mikroalgal proteinlerinin amino asit değerlerinin karşılaştırılması (g/100 g) (Becker, 2007)

	Ile*	Leu*	Val*	Lys*	Phe	Tyr	Met*	Cys*	Thr*	Trp*	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His*	Pro	Ser
Yumurta	6,6	8,8	7,2	5,3	5,8	4,2	3,2	2,3	1,7	5,0	-	6,2	11	12,6	4,2	2,4	4,2	6,9
Soya Fasulyesi	5,3	7,7	5,3	6,4	5	3,7	1,3	1,9	1,4	4	5	7,4	1,3	19	4,5	2,6	5,3	5,8
<i>Aphanizomenon</i> sp.	2,9	5,2	3,2	3,5	2,5	-	0,7	0,2	0,7	3,3	4,7	3,8	4,7	7,8	2,9	0,9	2,9	2,9
<i>Arthrospira maxima</i>	6	8	6,5	4,6	4,9	3,9	1,4	0,4	1,4	4,6	6,8	6,5	8,6	12,6	4,8	1,8	3,9	4,2
<i>Chlorella</i>	4,4	9,2	6,1	8,9	5,5	4,2	2,2	0,4	-	4,7	6,8	6,5	8,6	12,6	4,8	1,8	3,9	4,2
<i>Dunaliella</i> sp.	4,5	9,3	6	6,2	6	4	2,5	4	-	5	7,8	6,6	10,5	13,6	5,7	2,5	4,9	4,4
<i>Dunaliella dardavil</i>	4,2	11	5,8	7	5,8	3,7	2,3	1,2	0,7	5,4	7,3	7,3	10,4	12,7	5,5	1,8	3,3	4,6
<i>Spirulina</i>	5,8	9	6,4	5,1	4,8	4,8	2,9	0,3	-	5,1	7,4	7,6	10,2	16,1	4,6	2	3,3	4,8
<i>Spirulina platensis</i>	6,7	9,8	7,1	4,8	5,3	5,3	2,5	0,9	0,3	6,2	9,5	7,3	11,8	10,3	5,7	2,2	4,2	5,1

Mikroalgal proteinlerin gıda takviyesinde kullanımlarının önündeki en büyük engel biyo-yararlanımlarıdır (Bleakley and Hayes, 2017; Iwaniak et al., 2019). *Spirulina* gibi yumuşak çeperli türlerin insan sindirim sistemindeki biyo-yararlanımı ve sindirilebilirliği yüksek iken, *Chlorella* gibi sert selülozik çeperli türlerin çeper yapısı nedeniyle sindirilebilirliği de bir hayli düşüktür (Morris et al., 2009). Bunun bir sonucu olarak protein ve protein hidrolizatlarının kullanımının artırılması ile sindirilebilirlik probleminin önüne geçilmiş olmaktadır (Kose ve Oncel, 2015). Özellikle *Spirulina* proteinlerinin yüksek olması, GRAS kategorisine alınması, esansiyel amino asitleri içermesi ve buna ek olarak pek çok vitamin ve fonksiyonel yağ asitlerine sahip olması nedeniyle hem açlık ile mücadelede hem de uzayda gıda kaynağı olarak kullanılabilirliğine dair çok fazla çalışma yürütülmüştür.

Mikroalgal proteinler miktar ve kompozisyon olarak gıda, kozmesötik ve farmasötik endüstrinin yeni gözdesi gibi görünse de tekno-fonksiyonel olarak henüz ortaya çıkarılmamış birçok özelliği olduğu, bu kısmın eksiklikleri nedeniyle protein ürünlerinin pazarda yer almasının da yavaşladığı bilinmektedir (Barka and Blecker, 2016). Mikroalgal proteinlerin emülsifiye edici özellikler, çözünürlük karakteristikleri, sabunlaşma, köpük oluşturma, viskozite, termal dayanımı gibi fizyokimyasal tanımlamalarını yapılması, kozmesötik formülasyonların hazırlanması kısmında büyük ölçüde fayda sağlayacaktır. Mikroalgal ekstraktların kozmetikte kullanımında sulu ya da yağ fazlı sistemlerde çözünür ekstraktların kozmetik formülasyonlara uygulaması başarıyla gerçekleştirilebilmiştir (Buono et al., 2014). Ancak ekstraksiyon verimi ve maliyete etkisi henüz tam olarak bilinmediği için, bu kısımdaki boşlukların doldurulması gerekmektedir.

- (i) Öncelikli problem mikroalgal biyokütle üretim verimliliğidir. Kuru biyokütlerde hacim başına *Spirulina* daha ağır iken *Chlorella* gibi türler daha hafiftir.

- (ii) Sert silika ya da selülozik çeperlerin varlığı proteinlere erişimin kısıtlanmasına neden olmaktadır. Bu engeli aşabilmek için mekanik, kimyasal ya da enzimatik çeper parçalayıcı işlemler kullanılmaktadır.
- (iii) İçerdikleri saponifiye edici moleküller, steroidler, yağlar ve pigmentler nedeniyle proteinlerin erişilebilirliği düşük olmaktadır. Pigment ve yağ bazlı molekülleri uzaklaştırabilmek amacıyla toksik solventler kullanılması da istenmeyen bir durum olduğu için, etanol ya da süperkritik CO₂ gibi alternatif ekstraksiyon yöntemleri ön işlem olarak uygulanabilmektedir.
- (iv) Enzimatik protein hidrolizatları elde edileceği zaman yine çeper varlığı ve diğer pigment yapıları bileşikler de proteazların hücre içerisine girmesini ve aktivite göstermesini zorlaştırdığı için verimlerde düşüşler gözlenmektedir.

2.7.1. Fikobiliproteinler

Fikobiliproteinler; siyanobakteriler, rodofitler, kriptomonadlar gibi alg türlerinde bulunan renkli, ışık yakalayan, fotosentetik, floresans aktivite gösteren kromoproteinlerdir (Khazi et al., 2018) Suda çözünürlükleri oldukça yüksektir (Bleakley and Hayes, 2017; Fernández-Rojas et al., 2014). Floresans özellikleri bilin gruplarına bağlı sistein birimlerinden kaynaklanmaktadır. Fikobiliproteinler spektral karakteristiklerine göre 3 ana grupta sınıflandırılmışlardır, (i) fikoeritrinler (PE), (ii) fikosiyeninler (PC) ve (iii) allofikosiyeninler (APC) (Angeles, 1973; Costa et al., 2017). Fikoeritrinler kırmızı, fikosiyeninler ise mavi renktedirler. Fikosiyeninler iki farklı polipeptid zincirinden meydana gelmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı α ünitesi (12-19 kDa) ve β ünitesi (14-21 kDa)'nden oluşmaktadır (Kumar and Wattal, 2014).

Fikobiliproteinler arasında fikosiyeninler biyolojik ve farmakolojik özellikleri neticesinde en çok önem görmüş proteindir (Fernández-Rojas et al., 2014). Genel olarak nöroprotektif, antioksidan, anti-enflamatuvar, yara iyileştirici özelliklere sahiptir. Radikal süpürme aktivitelerinin yanı sıra güçlü bir immünomodülatör bileşiktir. Enflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi kontrol altında tutar ve azaltır. Kanseri hücrelerinde apoptozu indükler, yara iyileştirme özelliği gösterir. Ayrıca hayvan beslemesi ile yapılan çalışmalarda oral sağlanan fikosiyenin hepatotoksiteyi minimize ettiği bulgularına rastlanmıştır. Nörodejeneratif hastalıkların iyileştirilmesinde, bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların mücadelesinde de kullanılan bir proteindir.

Fikosiyanin üretimi çoğunlukla *Spirulina platensis*'ten sağlanmaktadır. Toplam biyokütlenin %20'si ve toplam proteinin %30-50'sini oluşturmaktadır. *S. platensis*'ten elde edilen fikosiyanin genellikle kozmetik endüstrisinde doğal boyar madde (ruj ve göz kalemleri), immüno-diagnostik ajan, floresans sensör ve analitik madde olarak kullanılmaktadır (Khazi et al., 2018). Günümüzde fikobiliproteinler sakızlarda, süt ürünlerinde, fırıncılık ve pasta endüstrisinde, dondurmalarda doğal ve fonksiyonel renklendirici olarak tercih edilmektedir. Vegan beslenme ürünlerinde, vegan içeceklerde ve yoğurtlar ve tatlılarda hem protein kaynağı olarak kullanılmakta hem de renkleri nedeniyle tasarım gıda üretiminde tercih edilmektedir.

Yapılan bir çalışmada fikosiyaninin MAPK yolağı üzerinde regülatör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. İlintili olan yolaklar arasında p38, MAPK ve ERK yolakları da bulunmaktadır ki bu yolaklar melanositlerde melanin üretimini ve tirozinaz enzim aktivitesini düzenleyen yolaklar arasındadır. Fikosiyanin; ERK yolağının fosforilasyonu neticesinde MITF degradasyonuna neden olmaktadır (Hao et al., 2018b). MITF degradasyonu tirozinaz enzimi ve alakalı genlerin (TRP-1, TRP-2) de ekspresyon seviyelerini inhibe etmekte ve böylece de tirozinaz enzimini sinyal yolakları üzerinden inhibisyonu sağlanmaktadır (Wu et al., 2011).

Wu et al., (2011) yapmış olduğu çalışmada, fikosiyanin doza bağlı olarak tirozinaz ve melanin üretimini inhibe etmiştir. Sinyal yolakları üzerinden bakıldığında ise; fikosiyanin hücre içi cAMP seviyelerinde artışa neden olmuş, ERK1/2 yolağının fosforilasyonu ile MITF degradasyonunu sağlamıştır. Ayrıca p38 aktivitesini baskılayarak CREB ve MITF transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu inhibe etmiş ve her iki yolak üzerinden de tirozinaz enzim ekspresyonu ve melanin sentezini durdurmuştur. Bu sayede fikosiyaninin melanogenez inhibisyonu yapması ile deri beyazlatıcı kozmetik ürünlerinin formülasyonlarında kullanılma potansiyellerine sahip olduğu anlaşılmıştır.

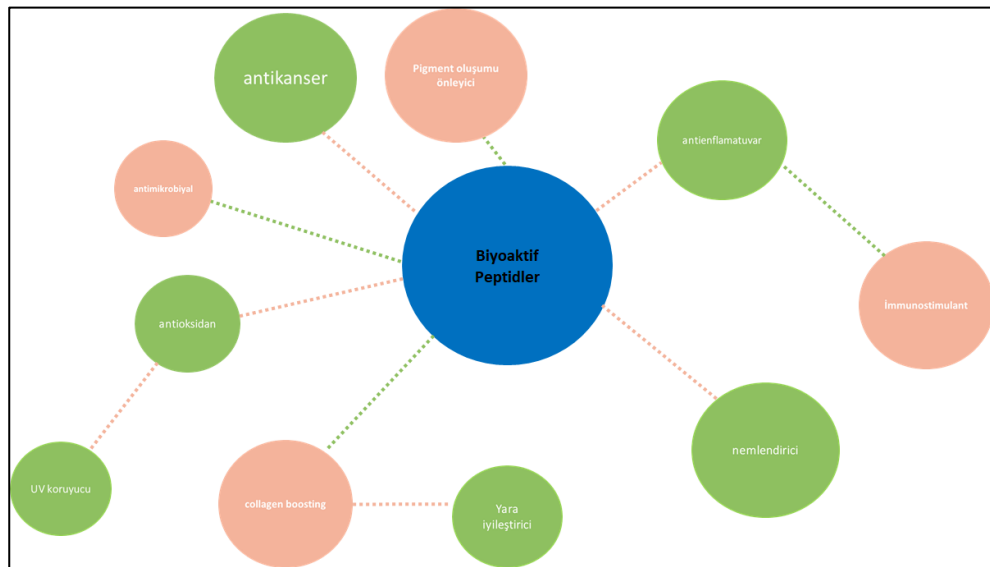
2.8. Biyoaktif Peptidler

Biyoaktif peptidler, kısa amino asit zincirli peptidlerdir (da Silva et al., 2018). Çoğunlukla enzimatik hidroliz, fermentasyon ya da kimyasal hidroliz yöntemleriyle elde edilmektedirler (Ejike et al., 2017). Biyoaktif peptidler genelde 2-20 amino asitlik dizilerden oluşmaktadır. Moleküler ağırlıkları 6000 Da'ü geçmemektedir (Udenigwe et al., 2017). Boyut olarak küçük olmaları nedeniyle özellikle gastrointestinal bariyerden rahatlıkla geçebilmektedirler. Bu nedenle

sindirim esnasında ana proteinin parçalanmasıyla da pek çok biyoaktif peptid açığa çıkabilmektedir (Sheih et al., 2009). Fakat sindirim sisteminde diyetle alınan protein miktarı ve türüne bağlı olarak ortam koşulları kontrol edilemediği için, açığa çıkan biyoaktif peptid miktarları ve yapıları tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle sindirim ile elde edilen endojen peptidlerin terapötik etkileri tam olarak bulunamamaktadır.

Biyoaktif peptidler gıda proteinleri, süt ve süt ürünleri, tahıllar, fermente gıdalar, böcekler, mantar, bakteri, deniz canlıları, makro ve mikroalglerden elde edilebilmektedir (Lacroix and Li-Chan, 2012; Samarakoon et al., 2013). Doğal kaynaklardan sağlanması nedeniyle yenilenebilir özellikte olmalarına rağmen, hayvansal ürünlerin tercih edilmemesi, gluten ve süt ürünlerine karşı gelişen intoleranslar neticesinde biyoaktif peptidlerin makro ve mikroalglerden elde edilmesine yönelik çalışmalar giderek hız kazanmıştır (Bleakley and Hayes, 2017; Udenigwe, 2016).

Peptidler dizisi, amino asit kombinasyonları ve konumları neticesinde farklı biyoaktiviteler göstermektedirler (Şekil 2.14). Bunlar arasında kozmetik ve farmasötik açıdan en çok ilgi çeken, antikanser, opioid, antibakteriyel, antiviral, anti-hipertansif, mineral bağlayıcı, immünomodülatör, antioksidan, antitrombotik ve hipokolesterolomik özellikleridir (Fan et al., 2014b; Sharma et al., 2011). Biyoaktif peptidler nörotransmitter etki gösterebilmekte, hormon ve antibiyotik özellikler sağlamaları nedeniyle de hücre içerisinde farklı hedef reseptörlere bağlanarak biyolojik yanıt oluşturabilmektedir.



Şekil 2.14 Biyoaktif peptidlerin biyoaktiviteleri

Mikroalglerden biyoaktif peptid eldesi işlemleri çoğunlukla enzimatik hidroliz ve mikrobiyal fermentasyon yöntemleri ile gerçekleştirilir (Vo et al., 2013). Enzimatik hidroliz yöntemlerinin kimyasal hidroliz işlemlerine göre birtakım üstünlükleri bulunmaktadır. Kimyasal hidrolizi işlemleri asit (sülfürik asit, hidroklorik asit) ya da baz (NaOH) varlığında gerçekleştirilmektedir. Yüksek hacimlerde ve ticari ölçekte kolay ve ucuz olmasına rağmen pek çok dezavantajı da beraberinde getirmektedir (Kristinsson and Rasco, 2000).

- Kimyasal hidroliz işlemlerinde yüksek sıcaklıklar ve yüksek basınç altında çalışma koşulları gerekebilmektedir.
- Asit hidrolizi kullanıldığında nötralizasyon işlemi sonrası açığa yüksek miktarda tuz çıkmaktadır.
- NaOH ile yapılan hidroliz işlemlerinde amino asitler toksik forma dönüşebilirler. Ayrıca alfa karboksilik asidin uzaklaştırılması nedeniyle amino asitler L- formundan D-izomerlerine dönüştürülür (Kristinsson and Rasco, 2000). Bu da fonksiyonel özelliklerin ve biyoyarlanımlarının kaybedilmesine neden olur.
- Asit veya baz hidrolizinde hedefe yönelik amino asitler arasındaki peptid bağları rastgele parçalandığı için açığa çıkan peptid dizileri kontrolsüzdür.

Gıda ve farmasötik endüstrisinde enzimatik hidroliz ve mikrobiyal fermentasyon işlemleri tercih edilmektedir (Ovando et al., 2018). Her iki yöntemde de organik solventler kullanılmaz ve hidroliz işlemleri düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Toksik kimyasalların oluşması gibi riskler ortadan kaldırılmış olur. Enzim seçimi açığa çıkarılmak istenilen peptidlere göre ayarlanabildiği için, multifonksiyonel biyoaktif peptidlerin açığa çıkma olasılığı artmış olur. Enzimatik hidroliz işlemlerinde genellikle, tripsin, alkalaz, pankratin, kimotripsin, pepsin, papain, flavourzyme, bromelain, Protamex, Kojizyme, Neutrase ve termolizin gibi proteazlar tek başına ya da birlikte kullanılarak elde edilmektedir (Ko et al., 2012; Kose ve Oncel, 2015; Kubglomsong et al., 2018; Udenigwe et al., 2009).

Ana protein dizisi bilinmeden yapılan hidroliz işlemlerinde, örneğin biyokütlenin direkt olarak enzimatik hidroliz işlemine tabii tutulması sonucu açığa çok farklı boyut, dizi ve sayıda peptid, amino asit ve protein kokteyli ortaya çıkmaktadır. Ultrafiltrasyon, membran ayırma ve kromatografik yöntemler ile birlikte biyoaktif peptid dizisi/dizileri adım adım açığa çıkarılsa da geriye dönük olarak peptidin ait olduğu protein kaynağını bulmak oldukça zor bir iştir (Samarakoon and Jeon, 2012; Ursu et al., 2014). Bu sebeptendir ki mikroalgal

proteinler de dahil olmak üzere deneme yanılma yöntemiyle peptid arayışları gerçekleştirilmektedir. Mikroalgal protein profillerinin tam olmaması, proteom bilgilerinin yetersiz kalması ile biyoinformatik yöntemler henüz etkili bir şekilde peptid protein ilişkisini kurmakta yetersizdir. Mikroalgal proteom bilgisinin de yetersiz olması neticesinde, *in silico* peptid salınımı ve biyoaktivite tayini gibi kaynakların kullanımı da günümüzde kısıtlı kalmaktadır.

Mikroalgal biyoaktif peptidler genellikle antioksidan aktiviteleri başta olmak üzere, hipertansiyon problemleri ile mücadele etmek için kullanılmaya başlanmıştır (Ejike et al., 2017; Sheih et al., 2009). Buna ek olarak *Spirulina*'dan elde edilen peptid ve proteinler ise anti-diyabetik özellik gösterdiği için diyabet ile mücadelede etkili bir nütrisötik olduğu düşünülmektedir (Ovando et al., 2018). Ayrıca antioksidan, antikanser, immüno stimulant özelliklerinin olması neticesinde kozmetik formülasyonlarda da biyoaktif moleküller olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kang et al., 2011; Thomas and Kim, 2013). Emülsifiye edici özellikleri nedeniyle ise formülasyonlarda krem, losyon ve tonik üretimlerinde de fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanım potansiyelleri yüksektir.

Biyoaktif peptidlerin ticari üretimlerinde bilinen iki ürün Calpis Ameal-S (Ile-Pro-Pro) içeceği ve Evolus (Val-Pro-Pro) gibi ACE inhibitör peptidlerdir (Aeihara, 2006). Ayrıca Solazyme AlgaVia isimli algal un üretimiyle mikroalgal gıda endüstrisine giriş yapmaya başlamıştır. Henüz mikroalgal biyoaktif peptidlerin ticari üretimleri için yeterli çalışma mevcut değildir ancak pazara özellikle kardiyovasküler sistem bozuklukları, beslenme bozuklukları, sporcu ürünleri ve kozmetik hammaddeler ile gireceği düşünülmektedir (Ejike et al., 2017).

Mikroalgal biyoaktif peptidlerin gıda olarak tüketilmesinin önünde birtakım engeller mevcuttur. Örneğin gıda ürünlerinin pişirilmesinde yüksek sıcaklıklara ulaşılması ile yapısal bozulmalar ve amino asit kopmaları meydana gelebilir. Bu da fonksiyonel özelliklerin kaybolması ile sonuçlanabilir. Gastrointestinal sistemde tekrar hidrolize uğraması da yine yapıyı bozacak ve yararlanımını azaltacaktır. Hidrofobik amino asitlerin varlığı acı tada neden olduğu için gıda olarak kullanımının önünde bir engel oluşturmaktadır (Zhou et al., 2013). Lakin kozmetik kullanımlarda stabilite ve formülasyon problemleri çözümlendiğinde gıdada yaşanan problemler yaşanmayacağından bu alandaki ilerlemeler daha hızlı gerçekleşebilir.

2.9. Algal Tirozinaz ve Melananogenez İnhibitörleri

Tirozinaz inhibitörleri söz konusu olduğunda, mikroalglerden elde edilen biyoaktif metabolitler ile alakalı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Şimdiye kadar yapılan en kapsamlı çalışmada fikosiyaninin CREB aktivasyonunu baskıladığı ve bu sayede p38 MAPK yolağı üzerinden MITF degradasyonunu sağlayarak, MAPK/ERK yolağı üzerinden tirozinaz enziminin ekspresyonunu bloke etmesiyle melanin sentezini inhibe ettiği görülmüştür (Wu et al., 2011). Ancak fikosiyanin enzimin direkt inhibitörü değildir. Sinyal yolları üzerinden inhibisyon yaptığı için hücresel yanıtı baskılaması sonucu melanin sentezini inhibe etmektedir. *Oscillatoria*'dan elde edilen Oscillapeptin G isimli ribozomal olmayan peptidin ise %55 oranında tirozinaz inhibisyonu yaptığı ifade edilmiştir (Sano and Kaya, 1996). Ancak peptidin yapısının ve ekspresyon yolağının tam bilinmemesi nedeniyle, bu peptid ile alakalı tek çalışma budur. Bilinen bir diğer mikroalgal protein/ peptid bazlı inhibitör ise *Pavlova lutheri* mikroalgal biyokütlesinin *Hansensula polymorpha* mayası tarafından fermentasyonu ile elde edilen 526 Da boyutunda Met-Gly-Arg-Tyr dizisine sahip peptiddir (Oh et al., 2015). Yapıda C-terminal tirozin amino asidi ve arjinin varlığı sayesinde inhibisyon yaptığı düşünülmektedir. Peptid, MITF ve TRY ekspresyonunu azaltarak tirozinaz inhibisyonu gerçekleştirmektedir. İnhibisyon ise ERK yolağı üzerinden gerçekleştirilirken; JNK ve p38/MAP yolağının inhibisyona herhangi bir katkısının bulunmadığı saptanmıştır.

Günümüze kadar belirtilen algal tirozinaz/melanogenez inhibitörleri genellikle makroalg türlerinden elde edilmektedir. Kahverengi alglerde bulunan phloroglucinol polimerleri olan phlorotannin polifenolik bileşikler güçlü tirozinaz inhibitörleridir (Azam et al., 2017a; Thomas and Kim, 2013). Phlorotanninler sadece anti-melanojenik etki göstermezler ayrıca cildin yaşlanmasını da önledikleri, anti-enflamatuvar, antioksidan ve anti-alerjik aktivite göstermeleri nedeniyle de cilt kusurlarının iyileştirilmesinde oldukça etkilidir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar yetersiz olsa da phlorotannin, phloroglucinol, eckol, dieckol, diphlorethohydroxycarmalol ve octaphlorethol A bileşiklerinin güçlü tirozinaz inhibitörleri olduğu bulunmuştur (Azam et al., 2017a; Heo et al., 2009; Kang et al., 2004). *Ecklonia cava*'dan elde edilen eckol ve dieckol sadece hücrelerde değil; mantar tirozinaz enzimi üzerinde de inhibitör etki göstermektedir.

Tirozinaz inhibisyonu çalışmalarında kullanılan makroalg türleri *Ecklonia stolonifera*, *Ishige okamurae*, *E. cava*, *Caulerpa* sp., *I. foliacea*, *Hizika fusiformis*,

Fucus versiculosus, *Laminaria japonica*, *Ulva lactuca*, *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum serratifolium*, *S. polycystum*, *Palmaria* gibi türlerdir. Bu türlerden elde edilen astaksantin, β -karoten, lutein ve fukoksantin gibi karotenoidler, solvent ekstraktları, fucoidan adı verilen sülfatlı polisakkaritler de tirozinaz inhibisyonu yapan metabolitler arasındadır (Kajiwar et al., 2006; Song et al., 2015).

Palmaria palmata'dan elde edilen ve Whitoniy adı verilen üründe, *Palmaria* oligosakkarit ekstresinin melanozom transferini inhibe etmesi neticesinde ciltteki kahverengi noktaların ve izlerin giderilmesini sağlamaktadır. *Laminaria japonica*'dan elde edilen fukoksantin pigmentinin de UVB radyasyonuna maruz kalmış Gine domuzlarında ve farelerde tirozinaz aktivitesini baskıladığı bulunmuştur. Oral yolla alınmasında ise, melanogenez yolağına ait proteinlerin derideki mRNA seviyelerini azalttığı gözlenmiş ve fukoksantin melanogenez yolağına transkripsiyonel kontrol yaptığı bilinmektedir (Shimoda et al., 2010).

Tez çalışması kapsamında, içeriğinde bu derece çeşitli ve umut vaat edici biyoaktif metabolitler olmasına rağmen; tirozinaz inhibisyonu açısından değerlendirilmemiş mikroalgal proteinler hedef alınmıştır. Genel olarak peptid ve protein bazlı tirozinaz inhibitörler yeni yeni keşfedilmeye başlanmıştır. Tabii ki ilk olarak yine bitkisel kaynaklardan ya da kimyasal sentez yöntemi kullanılarak tirozinaz inhibitör peptidler bulunmaya çalışılmıştır (Feng et al., 2018; Ochiai et al., 2016b; Schurink et al., 2007). Temel olarak hangi amino asitlerin tirozinaz inhibisyonuna katkı sağladığı, hangi amino asit kombinasyonlarının tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etki gösterdiği bulunmaya başlanmıştır. Bu bilgiler ışığında ise yeni ve etkili inhibitör peptidlerin taranması ve aktivite sonuçlarına göre belki de formülasyonlarının yapılması kozmetik ürünlerin biyoekonomiye katkısını da arttırmış olacaktır. Mikroalgler sağladıkları pek çok teknik ve biyokimyasal avantaj ile umut vaat eden tirozinaz inhibitör kaynakları olma potansiyeline sahiptir. Yapılan literatür taramasında ise mikroalgal ham proteinlerin ve protein ürünlerinin tirozinaz inhibisyonuna etkisi üzerine gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma olmaması nedeniyle, tez konusu bu konudaki öncü çalışmalardan birisi olacaktır.

Tez üç ana başlık altında toplanmıştır:

- i. Mikroalgal türlerin kültivasyonu ve protein miktarlarının belirlenmesi sonucu seçilen türlerin farklı enzimler ile hidrolizi sonucu elde edilen protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibisyonuna etkisi,

- ii. Saf fikosiyaninin farklı enzimler ile hidrolizi sonucu elde edilen protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibisyonuna etkisi,
- iii. Fikosiyaninin *in silico* enzimatik hidrolizi sonucu seçilen peptidlerin kimyasal sentez ile eldesi ve bu peptidlerin tirozinaz inhibisyonuna etkisinin incelenmesidir.

Her üç başlık için ise;

- a. Mantar tirozinaz enziminin inhibisyonu,
- b. Antioksidan aktivite tayini,
- c. B16-F10 fare melanoma hatlarına sitotoksik etkinin belirlenmesi,
- d. B16-F10 fare melanoma hatlarında hücre içi melanin sentezi ve tirozinaz enzim aktivitesini belirlenmesi için gerekli çalışmalar yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında kullanılan mikroalg türleri, kimyasal malzemeler, solüsyonlar, çözeltiler ve yararlanılan cihazlar ile metotlar bu bölümde açıklanmıştır.

3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan malzemeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışma boyunca kullanılan kimyasal sarflar ve markaları

İsim	Marka
Alkalaz (Subtilisin A, 2,4 U/g)	Sigma, Almanya
Tripsin	Sigma, Almanya
Pankreatin	Sigma, Almanya
Mantar (<i>Agaricus bisporus</i>) tirozinaz 50 KU	Sigma, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Gibco/BRL
Penisilin/Streptomisin Solüsyonu	Gibco/BRL
Gentamisin	Gibco/BRL
Fötal Sığır Serum (FBS)	Gibco/BRL
Tripsin/EDTA	Sigma, Almanya
Tripan Mavisi (%0,4)	Biochrom, Almanya
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma, Almanya
Sığır Serum Albumin (BSA) Fraksiyon V	Merck, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Etanol (%95)	Merck, Almanya
Triton-x100	Sigma, Almanya
NaCl	Merck, Almanya
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck, Almanya
K ₂ PO ₄	Merck, Almanya
KCl	Merck, Almanya
Na ₂ HPO ₄	Merck, Almanya
NaH ₂ PO ₄	Merck, Almanya
PMSF	Sigma, Almanya
Gliserol	Sigma, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
Commasie Blue G-250	Merck, Almanya
H ₃ PO ₄	Merck, Almanya
DPPH	Sigma, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar ve marka-modelleri Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışma boyunca kullanılan cihazlar

Cihaz	Firma-Model
Otoklav	HV-50L, Hirayama
Terazi	Explorer Pro, OHAUS
Laminar akışlı steril kabin	HFSafe 1200, Heal Force
Spektrofotometre	Optizen POP, MECASYS
Liyofilizatör	Christ, Alpha 1-2 L-D plus, Almanya
Santrifüj	NF400, Nüve
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY-2112B, ZCICHENG
Vortex karıştırıcı	VM-10, ViseMix
Mikroskop	SOIF
Su banyosu	Memmert, Almanya
Evaporatör	Stuart RE300, UK
pH probu	Hamilton Easyferm K8 200, Bonaduz, Switzerland
pHmetre	HI2211 pH/ORPmeter, HANNA Instruments
Oksijen probu	Hamilton Oxyferm FDA 225, Bonaduz, Switzerland
Işıklıçer	LI-250A (Licor, Lincoln, USA)
Manyetik karıştırıcı	MSH-20A, Wise Stir
Etüv	WiseWen
Mikroplaka Okuyucu	BioTek Instruments, USA
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Ters faz ışık mikroskobu	Olympus CK40, Japonya)
CO ₂ ’li inkübatör	Thermo Scientific, ABD
Laminer hava akışlı biyogüvenlik seviyesi-IIA kabin	Heraeus, Almanya
Su banyosu	Lauda, ABD
Mikroplaka çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
-80°C derin dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.3. Mikroalg Türlerinin Seçimi

Bu çalışma kapsamında farklı siyanobakteri türleri, yeşil algler ve heterotrofik mikroalg türleri kullanılmıştır. Türlerin kültür koşulları ve besin ortamı Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Besin ortamı reçeteleri ise George Austin Universitat, SAMMLUNG VON ALGENKULTUREN (SAG) veri tabanındaki besin ortamı reçetelerine göre hazırlanmıştır (<https://www.uni-goettingen.de/de/list-of-media-and-recipes/186449.html>, Erişim tarihi, 12.04.2020).

Çizelge 3.3 Mikroalg türleri ve besin ortamları

Tür adı	Genus	Trofik koşul	Besin ortamı
<i>Schizothyrium limacinum</i>	Marin maya	Heterotrofik	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mikroalg	Fotomiksotrofik	BG-11
<i>Prorocentrum micans</i>	Dinoflajellat	Fototrofik	f/2
<i>Oscillatoria sp. SAG 50.96</i>	Siyanobakteri (Filamentöz)	Fotorofik	SWES
<i>Lyngbya SAG 36.91</i>	Siyanobakteri (Filamentöz)	Fotorofik	ES/CBM
<i>Nodularia SAG 50.79</i>	Siyanobakteri (Filamentöz)	Fotorofik	ES/CBM
<i>Tolypothrix sp. SAG 93.79</i>	Siyanobakteri (Filamentöz)	Fotorofik	ES/CBM
<i>Nostoc muscorum SAG</i>	Siyanobakteri (Filamentöz)	Fotorofik	BG11
<i>P. tricornutum</i>	Diatom	Fotorofik	f/2
<i>Spirulina platensis</i>	Siyanobakteri	-	-

3.4. Kullanılan Mikroalg Türleri

Tez çalışması kapsamında protein hidrolizatlarının oluşturulmasında *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 ve *Spirulina platensis*, mikroalg türleri kullanılmıştır. *Spirulina platensis* EGERT firmasında toz halinde temin edilmiştir. *Chlorella vulgaris* ise laboratuvar koşullarında aksenik olarak üretimleri gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Solüsyonlar

Çalışma boyunca kullanılan çözelti, tampon ve solüsyonların hazırlanma şekli, içerikleri ve çalışmalar süresince hangi amaçla kullanıldığı Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Çizelge 3.4 Tez çalışması boyunca kullanılan çözeltiler, tamponlar ve solüsyonlar

Tampon çözeltileri	
0,1 M (pH 6,8) fosfat tamponu	1 M Na ₂ HPO ₄ ve NaH ₂ PO ₄ 'ten hazırlanmıştır. Tirozinaz enzim aktivite tayini işlemlerinde kullanılmıştır.
0,1 M (pH 8) fosfat tamponu	1 M Na ₂ HPO ₄ ve NaH ₂ PO ₄ 'ten hazırlanmıştır. Alkalaz ve tripsin ile gerçekleştirilen enzimatik hidroliz işlemlerinde kullanılmıştır.
0,1 M (pH 7,5) fosfat tamponu	1 M Na ₂ HPO ₄ ve NaH ₂ PO ₄ 'ten hazırlanmıştır. Pankreatin ile gerçekleştirilen enzimatik hidroliz işlemlerinde kullanılmıştır.
Hücre lizis tamponu	1% Triton-x100, 0.1 M PMSF ve %10 gliserol olacak şekilde 0,1 M (pH 6,8) fosfat tamponu içerisine hazırlanmıştır.
0,1 M fosfat tamponu (PBS) (Ca ⁺² -Mg ⁺² içermeyen)	8,5 g NaCl (Merck, Almanya), 1,34 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (Merck, Almanya), 0,2 g K ₂ PO ₄ (Merck, Almanya) ve 0,2 g KCl (Merck, Almanya) 1 L saf su içerisinde hazırlanmıştır.
Bradford Protein Tayini	
Dye-Binding Çözeltisi	100 mg Commasie Blue G-250 50 ml metanolde çözölmüştür. Bu solüsyona 100 ml %85 H ₃ PO ₄ eklenmiş ve 200 ml distile su ilave sonrası filtre edilmiştir. Dye-binding'den (pH 1,1) 1 hacim 4 hacim su ile karıştırılarak buzdolabı şartlarında saklanmıştır.
Melanin pigmenti miktar tayini için	
1 M NaOH+%10 DMSO	1 M NaOH (40 g/L) içerisine %10 (v/v) DMSO karıştırılması suretiyle hazırlanmıştır. Melanin pigmentinin çözdürülmesi amacıyla kullanılmıştır.
Melanin pigmenti standardı (1,56- 200 µg/ml)	400 µg sentetik melanin pigmenti 1 ml 1 M NaOH+%10 DMSO içerisinde çözdürölmüştür. Melanin standart grafiğinin oluşturulması amacıyla istenilen konsantrasyona seyreltilmiştir.
Tirozinaz inhibisyonu için	
2 mM L-DOPA	10 mg L-DOPA çözeltisi 2,03 ml tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Mantar tirozinaz enzim aktivitesi işlemleri için kullanılmak üzere 0,1 M pH 6,8 sodyum-fosfat tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır.
5 mM L-DOPA	10 mg L-DOPA 10,14 ml tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. 5 mM L-DOPA çözeltisi B16-F10 hücrelerinden hücrel tirozinaz aktivitesini ölçek için kullanılmıştır.
5 mM L-Tirozin	59,095 mg L-tirozin 50 ml tampon çözeltisi içerisinde hazırlanarak 10 mM stok L-tirozin çözeltisi elde edilmiştir. Mantar tirozinaz enzim aktivitesi tayini için 5 mM derişime seyreltilerek kullanılmıştır.
50 U/g Mantar tirozinaz enzimi	50.000 U/mg tirozinaz enziminden tampon içerisinde çözdürölerek kullanılmıştır.
Kojik asit standardı (6,25-800 µg/ml)	4 mg kojik asit alınıp tampon çözelti ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 800 µg/mL kojik asit çözeltisi tampon çözelti ile istenilen derişimlere seyreltilerek kullanılmıştır.
DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi İçin (%ROS)	
DPPH Reaktifi (0.1 mM)	100 mL'si için; 3,94 mg DPPH tartılmış, bir miktar metanolde çözüölerek hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Sitotoksite Tayini için	
MTT çözeltisi (5 mg/mL)	250 mg MTT, 50 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS 1X) (pH: 7.4) içerisinde çözdürölmüştür. 1 ml alikotlar -20 °C'de karanlıkta saklanmıştır.

3.6. Yöntem

3.6.1. Mikroalg Kültivasyonu

Mikroalg türlerinin ana stokları yatık agar kültürlerinde sürekli aydınlatma koşullarında saklanmıştır. Mikroalg hücrelerinin kültür çoğaltımı işlemi amacıyla, 5 ml besin ortamı içeren tüpler hazırlanmış ve aseptik koşullarda agar kültürlerinden sıvı kültürlerle aktarım gerçekleştirilmiştir. Kültürler yaklaşık 40 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatma koşullarında inkübe edilmiş ve böylece hücrelerin aktivasyonu sağlanmıştır. 4-5 gün süresince kültürler hücre çoğalması ve canlılığı açısından takip edilmiştir.

5 ml besin ortamı içeren tüplerden sırasıyla 20 ml ve 100 ml çalışma hacmine sahip erlenlere kültür aktarımı yapılmıştır. $23\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 40 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatma ve 120 rpm karıştırma koşullarında inkübe edilen mikroalg kültürleri takip eden çalışmalarda inokulasyon olarak kullanılmıştır. Yığın biyokütle üretimlerini sağlamak amacıyla steril 20 L cam damacanalara kullanılmıştır. Ortalama ışık yoğunluğu $70\pm10\text{ } \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olacak şekilde, 1 vvm havalandırma koşullarında kültür üretimleri gerçekleştirilmiştir. 14 günlük üretimler sonrasında biyokütle hasat edilmiş ve liyofilizasyon ile kurutulmasının ardından toz haline getirilerek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.6.2. Mikroalgal Biyokütleden Etanol ile Pigment Ekstraksiyonu

Protein hidroliz işlemi öncesinde mikroalgal kuru biyokütleden etanol ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Biyokütle %5 (w/v) oranında %96'lık etanol ile karıştırılmıştır. 30 saniye süreyle, 6 tekrar olacak şekilde buz banyosu içerisinde sonikasyon işlemi (9 döngü, %50 güç) gerçekleştirilmiştir. Her 30 saniyede bir 30 saniye bekletilmiştir. Ardından $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 120 rpm karıştırma hızında 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Solvent ve biyokütleyi ayırmak için 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve %2 (w/v) olacak şekilde etanol eklenerek 1 saat daha $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübasyon işlemi yapılmıştır. Solvent fazı santrifüj ile alınmış ve 0,2 μg PTFE filtreden geçirilerek partiküller uzaklaştırılmıştır. Etanol fazı $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de evapore edilmiştir ve pigment ekstraktları $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Biyokütle $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ etüv içerisinde kurutulmuş ve hidroliz işlemleri için $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.6.3. Enzimatik Hidroliz İşlemleri

Enzimatik hidroliz işlemlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla etanol ekstraksiyon sonrası biyokütle; alkalaz, tripsin ve pankreatin enzimleri ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Enzimlere ait tampon sistemleri ve reaksiyon sıcaklıkları Çizelge 3.5’te sunulmuştur.

Çizelge 3.5 Enzimlerin inkübasyon koşulları

Enzim	Tampon	pH	Sıcaklık (°C)
Alkalaz		8,0	55
Tripsin	0,1 M Sodyum-Fosfat		37
Pankreatin	Tamponu	7,5	45

3.6.3.1. Enzimatik hidroliz optimizasyon işleminin gerçekleştirilmesi

Etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen biyokütle %10 (w/v) olacak şekilde 0,1 M sodyum-fosfat (pH 8.0) tamponu içerisinde karıştırılmış ve 55 °C sıcaklıkta inkübatöre alınmıştır. Biyokütle-tampon karışımının sıcaklığı 55 °C’ye ulaştığında %2 (v/v) oranında Alkalaz (Alcalase® 2.4L, Subtilisin A, 2,4 U/g) enzimi ilave edilmiştir. Enzimatik hidroliz işlemi 55 °C’de 150 rpm karıştırma koşullarında sabit pH değerinde gerçekleştirilmiştir. pH düşüşü 1 M NaOH çözeltisi ile engellenmiş ve pH değeri 8.0’de sabit tutulmuştur. 4, 6, 8, 10,12 ve 24 saat hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hassas çeperli hücreleri temsilen *S. platensis*, kalın ve sert çeperli hücreleri temsilen ise *C. vulgaris* enzimatik hidroliz optimizasyonu işlemleri için kullanılmıştır. Örneklemeler arası hatayı minimize etmek amacıyla aynı reaksiyon ortamı içerisinde gerekli saatlerde örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Anlamlı sonuçlar alınması amacıyla denemeler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatlar 85 °C’de 15 dakika boyunca enzim inaktivasyonu amacıyla inkübe edilmiştir. Hidroliz işlemi sonucunda her bir örnek 4000 rpm’de, +4 °C’de, 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan hidroliz derecesini (%DH) belirlemek amacıyla Lowry yöntemiyle protein tayini yapılmıştır.

Tripsin ve pankreatin enzimleri için yüksek lisans tez çalışması kapsamında optimize edilmiş reaksiyon koşulları ve süresi kullanılmıştır (Ayse Kose vd., 2017; Kose ve Oncel, 2015). Tripsin için %10 (w/v) alg karışımı 1 saat boyunca 37 °C’de, 120 rpm karıştırma koşullarında inkübe edilmiştir. E/S oranı 1/100 (w/v) olacak

şekilde eklenmiş ve 4 saat boyunca 37 °C’de hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Pankreatin ile gerçekleştirilen hidroliz işleminde %10 (w/v) algal biyokütle 1 saat boyunca 45 °C’de inkübe edilmiştir. Ardında %8 (w/v) E/S olacak şekilde pankreatin enzimi ilave edilmiş ve 4 saat boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz reaksiyonu 85 °C’de 15 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu sağlanmıştır.

3.6.3.2. Hidroliz derecesinin belirlenmesi (%DH)

Hidroliz derecesini (%DH) belirlemek amacıyla 200 µl süpernatant 200 µl %20 TCA ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %10 TCA içerisinde çözünebilir proteinlerin elde edilebilmesi amacıyla inkübe edilmiştir. Ardından, 20 dakika boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ardından çözünebilir proteinleri içeren süpernatant ile çözünmemiş proteinleri içeren pellet ayrılmış ve Lowry yöntemi kullanılarak protein miktarları tayin edilmiştir. %DH hesaplanması için hidroliz edilmemiş mikroalgal biyokütle kullanılmıştır. %DH aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (3.1).

$$DH(\%) = \frac{\text{Hidrolizat örneklerindeki protein konsantrasyonu}}{\text{Mikroalgal biyokütlerde protein konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.6.4. *S. platensis* Fikosiyanin Proteininden *in silico* Peptid Tasarımı

S. platensis fikosiyanin proteinine ait amino asit dizisi Uniprot veri tabanından elde edilmiştir. Uniprot girdilerine göre α-ünitesi (cpcA, P72509) ve β-ünitesi (cpcB, P72508) erişim kodları ile her iki alt ünitenin amino asit dizileri elde edilmiştir. Elde edilen diziler BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) veri tabanında bulunan proteolitik enzimler (Çizelge 3.6) ile *in silico* olarak hidroliz edilmiştir. Hidroliz sonucu açığa çıkan peptid dizileri listelenmiştir (Ek.1).

Çizelge 3.6 BIOPEP veri tabanında bulunan proteolitik enzimlerin listesi

Chymotrypsin EC 3.4.21.1	Thermolysin EC 3.4.24.27	Ficin EC 3.4.22.3
Tyrosin EC 3.4.21.4	Chymotrypsin C EC 3.4.21.2	Leukocyte elastase EC 3.4.21.37
Pepsin pH 1.3 EC 3.4.23.1	Plasmin EC 3.4.21.7	Metridin EC 3.4.21.3
Proteinase K (Endopeptidase So) EC 3.4.21.67	Cathepsin G EC 3.4.21.20	Thrombin EC 3.4.21.5
Pancreatic elastase EC 3.4.21.36	Clostripain EC 3.4.22.8	Pancreatic elastase II EC 3.4.21.71
Prolyl oligopeptidase EC 3.4.21.26	Chymase EC 3.4.21.39	Stem bromelain EC 3.4.22.32
V-8 Protease (Glutamyl endopeptidase), pH 4 EC 3.4.21.19	Papain EC 3.4.22.2	Glutamyl endopeptidase II EC 3.4.21.82
Oligopeptidase B EC 3.4.21.83	Calpain 2 EC 3.4.22.53	Glycyl endopeptidase EC 3.4.22.25
Oligopeptidase F	Proteinase P1 (lactocepin) EC 3.4.21.96	Xaa-Pro dipeptidase EC 3.4.13.9
Pepsin pH>2, EC 3.4.23.1	Cocolysin EC 3.4.24.30	Subtilisin EC 3.4.21.62
Chymosin EC 3.4.23.4	Ginger protease (zingipain) EC 3.4.22.67	V-8 protease pH=7.8, EC 3.4.21.19

Olası tirozinaz inhibisyonu yapabilecek peptidlerin seçimi için,

- Yapıda en az 1 arjinin amino asidi varlığı,
- En az 3 en fazla 20 amino asit olması,
- C terminal tirozin amino asidi varlığı,
- Moleküler ağırlığının 2 kDa'dan yüksek olmaması,
- Lösin+Arjinin (LR/RL) kombinasyonları varlığı,
- Arjinin/Fenilalanin (R/F) + alanin/valin/lösin (A/V/L) kombinasyonları göz önünde bulundurulmuştur.

Bu kriterler dikkate alındığında Çizelge 3.7'deki peptidler seçilmiştir. Seçilen peptidlerin kombinasyonları altı çizili olarak işaretlenmiştir. Peptidler arasından kimyasal sentez için sadece 7 tanesi seçilmiştir. Peptidlerin sentez işlemi Genaxxon firmasına yaptırılmıştır. Seçilen peptidler ise, P1-AFGRFR, P2-MAACLR, P3-RCLNGRL, P4-RYVTYAVF, P5-SPSWY, P6-GRF, P7-AADQRGKDKCARDIGY'dir.

Çizelge 3.7 *S. platensis* PC'den seçilen peptidler

Sayı	Peptid Dizisi	Aminoasit sayısı	Moleküler ağırlığı (Da)	BIOPEP Hidroliz Enzimi
1.	AADQRGKDKC <u>ARDIGY</u>	16	1766,9	Kimotripsin Subtilisin Chatepsin G Chymase Metridin
2.	<u>RCLNGLR</u>	7	831	V8 proteaz
3.	IIILRYVTTY <u>AVFAGD</u>	14	1600,9	V8 proteaz Tripsin Plasmin
4.	MAAC <u>LR</u>	6	663,7	Clostripain Oligopeptidase B
5.	VAESNK <u>RL</u>	8	916	Chatepsin G
6.	<u>AFGRFR</u>	6	752,8	Lactocepin
7.	IASYFDR <u>ACAAVS</u>	13	1373,6	V8 protease
8.	<u>RFLSSTEIQVAFG</u>	13	1454,6	Glisil endopeptidaz
9.	<u>RRMAACL</u>	7	820,1	Subtilisin
10.	<u>RYVTTYAVE</u>	8	1018,2	Pepsin
11.	NKFP <u>Y</u>	5	667,8	Pankreatik elastaz
12.	SPSW <u>Y</u>	5	638,7	Chatepsin G Kimotripsin Pepsin Subtilisin
13.	<u>GRF</u>	3	378,4	Proteinaz K Chatepsin G Chymase Metridin

3.6.4.1 P1-P7 Fikosiyanin peptidlerinin in silico biyoaktivitelerinin taranması

In silico antikanser, toksik ve anti-enflamatuvar aktiviteleri çeşitli hesaplamalı veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toksik özelliklerini belirlemek için ToxinPred veri tabanı (<http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/>) kullanılmıştır. Anti-enflamatuvar peptid tahmini AIPred (<http://thegleelab.org/AIPred.html>) veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma yapmak için PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PreAIP/>) veri tabanı da kullanılmıştır. Antikanser peptid tahmini karşılaştırmalı olarak iACP (<http://lin-group.cn/server/iACP>) ve AntiCP (<http://crdd.osdd.net/raghava/anticp/>) veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.5. Fikosiyaninden Enzimatik Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi

Fikosiyanın proteini ticari olarak Kyanos Blue adı verilen firmadan satın alınmıştır. Bu ürün gıda olarak kullanıma uygun fikosiyanın ekstraktı içerdiği için çalışmada kullanımı tercih edilmiştir. Öncelikle saflık kontrolü yapılması amacıyla 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan çözeltiden 400-800 nm’de spektrum taraması gerçekleştirilmiştir. Tarama işleminin ardında 620 ve 280 nm’de absorbans değerleri okunmuş ve A_{620}/A_{280} formülünden saflık oranı tayin edilmiştir.

%10 (w/v) olacak şekilde tampon çözeltilere hazırlanan fikosiyanın solüsyonu tripsin, alkalaz ve pankreatin ile enzimatik hidroliz işlemine tabii tutulmuştur. Hidroliz işlemleri 4 saat süresince Çizelge 3-5’te sunulan koşullarda gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası 5 kDa ultrafiltrasyon membranlarından geçirilerek boyutlara ayrılmış ve ardından liyofilizasyon ile kurutulmuştur.

3.6.6. Liyofilizasyon İşlemi

20 °C’de saklanan biyokütle liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuştur. Mikroalg hücreleri -52 °C’de 0,030 bar basınç altında 7 saat; son olarak da -55 °C’de 0,021 bar basınçta 3 saat tutularak kurutulmuştur. Liyofilize edilmiş örnekler ve biyokütleler -20 °C’de saklanmıştır.

3.6.7. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu Tayini

Bu deneme kapsamında mikroalgal protein hidrolizatları ve peptidlerin mantar tirozinaz (EC 1.14. 18.1) enzimi üzerinde monofenolaz ve difenolaz aktivitelere bağlı inhibisyonu ölçülmüştür (Cui et al., 2018). Bu amaçla monofenolaz aktivitesi için 40 µl 5 mM L-tirozin, 40 µl 0,1 M pH 6,8 sodyum-fosfat tamponu ile karıştırılmış ve 10 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından 40 µl farklı konsantrasyonda örnekler (6,25-800 µg/ml) ve 40 µl 50 U/g mantar tirozinaz enzimi eklenmiştir. Karanlıkta ve 37 °C’de 15 dakika inkübasyonun ardından 15 ve 20. dakika örnekleri mikropilaya okuyucuda 490 nm’de ölçülmüştür. Absorbans ölçümlerine 30 dakikada bir olacak şekilde 120 dakika boyunca devam edilmiştir.

Mantar enziminin difenolaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla; 40 µl 2 mM L-DOPA, 40 µl 0,1 M pH 6,8 sodyum-fosfat tamponu ile karıştırılmış ve 10 dakika

37 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından 40 µl farklı konsantrasyonda örnekler (6,25-800 µg/ml) ve 40 µl 50 U/g mantar tirozinaz enzimi eklenmiştir. Örneklerin absorbansı 1. dakikadan itibaren 120 dakika boyunca 490 nm’de ölçülmüştür. Tirozinaz inhibisyonu (%) aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Tirozinaz inhibisyonu (\%)} = \left(1 - \frac{ABS_{\text{örnek}}}{ABS_{\text{kontrol}}}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

Kontrol örneği olarak PBS kullanılmıştır. Referans molekül olarak kojik asit test edilmiştir. Elde edilen örnekler madde miktarına karşı (µg/ml) tirozinaz inhibisyonu (%) olacak şekilde grafiğe aktarılmıştır. Grafikten elde edilen doğru denklemi ile her bir maddenin IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.6.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu kısımda B16-F10 hücre kültürlerinin nasıl yapıldığına dair bilgilere yer verilmiştir.

3.6.8.1. B16-F10 hücre kültürü çalışmaları

B16-F10 Fare (*Mus musculus*) deri melanom hücre hattıdır. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi’nden Prof. Dr. Azmi Yerlikaya tarafından temin edilmiştir. Getirildiklerinde pasaj sayısı 65’tir. Tüm hücre kültür çalışmaları aynı pasaj sayısındaki hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştirmek için sıvı azot ana stokları ve -80 °C çalışma stokları oluşturulmuştur. Hücreler DMEM içerisinde (%10 FBS, %0,1 Pen-Strep, %0,1 Gentamisin sülfat (50 mg/ml)), 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatör koşullarında kültüre alınmıştır. Hücrelerin her iki günde bir alt kültürlemesi gerçekleştirilmiştir. Hücre hasat işlemleri, kültür yaklaşık %80 konfülansa ulaştıktan sonra %0,25 Trypsin/EDTA solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. B16-F10 hücreleri tirozinaz inhibisyonu potansiyeli olan örneklerin sitotoksosite testlerinin yapılabilmesi, hücre içi tirozinaz enzim aktivitesi ve melanin miktarlarının tayin edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.6.8.2. MTT ile sitotoksosite ve hücre canlılığı tayini

B16-F10 hücreleri 2,5x10³ hücre/ kuyucuk (100 µl/kuyucuk) olacak şekilde 96 gözlü plakalara dağıtılmıştır. 24 saat boyunca, %5 CO₂ içeren, 37 °C sıcaklıktaki

inkübatörde bekletilmiştir. Böylece hücrelerin yüzeye tutunması sağlanmıştır. Ardından besin ortamı uzaklaştırılmış ve farklı serum içeren taze besin ortamı kuyucuklara dağıtılmıştır. Değişen konsantrasyonlarda 6,25-800 µg/ml) örnekler ile muamele edilmiştir. Madde içermeyen hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise hücreler besin ortamı yerine DMSO ile muamele edilmiştir. MTT plakaları 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonrasında hücreler 100 µl %90'lık MTT solüsyonu ile muamele edilmiştir. Örnekler 3 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO eklenmiştir. Çalkalayıcı üzerinde, karanlıkta, 5 dakika inkübasyon ardından absorbands değerleri 570 nm'de ölçülmüştür. Hücre canlılığı aşağıdaki formül (3.3) ile hesaplanmıştır.

$$\%Canlılık = \left(\frac{Abs_{\text{örnek}} - Abs_{Kör}}{Abs_{Kontrol} - Abs_{Kör}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

3.6.8.3. Hücresel tirozinaz aktivitesinin belirlenmesi

B16-F10 hücreleri 1x10⁵ hücre/ kuyucuk (2 ml) olacak şekilde 6 gözlü plakalara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması amacıyla 24 saat, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Ardından besin ortamı serum içeren taze besin ortamı ile değiştirilmiş ve değişen konsantrasyonlarda (12,5-200 µg/ml) örnek uygulaması yapılmıştır. Plakalar 72 saat inkübe edilmiştir.

3.6.9. Lowry Protein Tayin Yöntemi

Mikroalgal protein ve hidrolizatlarından protein tayini Lowry metoduna uygun olarak yapılmıştır (Lowry, 1951). %5'lik Na₂CO₃ solüsyonu (Reaktif A), %1'lik K-Na-Tartarat solüsyonu içerisinde %0,5'lik CuSO₄.5H₂O solüsyonu (Reaktif B) hazırlanmıştır. 50 ml Reaktif A içerisine 2 ml Reaktif B ilave edilmesiyle Reaktif C elde edilmiştir. 1 N Folin-Ciocalteu solüsyonu (Reaktif D) hazırlanmıştır. Standart eğri oluşturmak amacıyla 0,7g/l BSA çözeltisi kullanılmıştır. Lowry yöntemi Çizelge 3.8'de anlatılmıştır.

Reaktif D ilavesinden sonra laboratuvar koşullarında 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve 750 nm'de köre karşı absorbands değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Reaktif A, B, C taze hazırlanıp kullanılmıştır. Bu nedenle her protein tayini işleminde yeni bir standart eğri oluşturulmuştur.

Çizelge 3.8 Toplam protein tayini yöntemi standart grafik ve örnek hazırlanması

	Kör	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Örnek
BSA (ml)	-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	-
DH ₂ O (ml)	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	-
Örnek(ml)	-	-	-	-	-	-	0,5
1NNaOH(ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5 dakika süresince 100 °C'deki su banyosunda bekletilir.							
Reaktif C(ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Reaktif D(ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

3.6.10. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

B16-F10 hücrelerinden protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu metodun seçilmesinin nedeni 0,01–0,05 mg/ml konsantrasyonundaki protein miktarlarına olan hassasiyetinden kaynaklanmaktadır. Standart eğri çizimi için BSA kullanılmıştır.

Standart konsantrasyonları 0,02 mg/ml- 0,2 mg/ml aralığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok çözelti için 10 mg/ml 'lik konsantrasyona sahip BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 0,1 ml alınıp 49,9 ml su eklendiğinde 0,02 mg/ml'lik konsantrasyona sahip çözelti elde edilmiştir.

Buna göre;

- 0,02 mg /ml BSA çözeltisi için: 0,1 ml stok + 49,9 ml dH₂O
- 0,05 mg/ml BSA çözeltisi için: 0,25 ml stok + 49,75 ml dH₂O
- 0,1 mg /ml BSA çözeltisi için: 0,5 ml stok + 49,5 ml dH₂O
- 0,15 mg /ml BSA çözeltisi için: 0,75 ml stok + 49,25 ml dH₂O
- 0,2 mg /ml BSA çözeltisi için: 1 ml stok + 49 ml dH₂O şeklinde hazırlanan çözeltilerden 150 µl alınarak üzerine 3 ml dye-binding çözeltisi ilave edilmiş ve 10 dakika beklenmiştir. Absorbans değerleri 595 nm'de ölçülmüştür.

Kullanılan örnekler için ise; 150 µl örnek 3 ml dye-binding çözeltisi eklenmiş, 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Gerekli görüldüğü durumlarda seyreltmeler gerçekleştirilmiştir.

3.6.11. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi (%RSA) Tayini

0,1 mM 1,2 ml DPPH   zeltisi farklı konsantrasyonlarda 0,8 ml örnek ile muamele edilmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta inkübasyonun ardından absorbands değeri 517 nm’de ölçülmüştür. Peptidler ve protein hidrolizatları 12,5-2000  g/ ml konsantrasyon aralığında denenmiştir. Referans tirozinaz inhibitörü olan kojik asit molekülü 12,5-800  g/ml aralığında incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) (12,5-200  g/ml) kullanılmıştır.

3.6.12. B16-F10 Hücre Lizisi

Hücresel tirozinaz aktivitesi ve melanin miktarlarının tayini amacıyla;

- B16-F10 hücreleri madde uygulanması ardından mikroskopik görüntüleme işlemleri yapılmıştır. Ardından 6-well plakalar buz üzerine alınmıştır.
- Kuyucuklardaki besin ortamı uzaklaştırılmış ve üzerine 500  l soğuk PBS eklenmiş ve 2 defa PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama işlemi ardından hücrelerin üzerine 300  l soğuk lizis tamponu eklenmiş ve hücre kazıyıcı ile kazınarak daha önceden soğutulmuş 1,5 ml hacimli ependorf tüplere alınmıştır.
- Buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Buz küveti içerisinde 5 saniye boyunca sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Lizat 15 dakika 13.000 rpm’de +4  C’de santrifüjlenmiştir. Protein miktarları Bradford yöntemine göre tayin edilmiştir.
- 5 saniye 9 döngü %50 g   olacak şekilde sonikasyon işlemi yapılmış ve 15 dakika daha buz içerisinde inkübe edilmiştir.
- 13.000 rpm’de 15 dakika boyunca +4  C’de santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant protein miktar tayini ve hücresel tirozinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ayrılmıştır.
- Pelletten ise melanin miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.6.13. Hücresel Tirozinaz Enzim Aktivite Tayini

Hücre lizati 100 µl içerisinde 100 µg protein olacak şekilde 0,1 M sodyum-fosfat tamponu (pH 6,8) ile seyreltilmiş ve 100 µl 5 mM L-DOPA ile reaksiyona sokulmuştur. Karışım 1 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilmiş ve ardından absorbans değeri 490 nm’de ölçülmüştür. Tirozinaz aktivitesi aşağıdaki formüle (3.4) göre hesaplanmıştır.

$$\text{Tirozinaz aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.6.14. Melanin Miktarının Tayini

Lizis sonrası B16-F10 hücrelerinden arta kalan kahverengi-siyah renkli pellet 2 defa, 500 µl 0,1 M sodyum-fosfat tamponu (pH 6,8) ile yıkanmıştır. Ardından 500 µl 1M NaOH (%10 DMSO) eklenmiş ve 80 °C’de 1 saat boyunca melanin pigmentinin çözülmesini sağlamak amacıyla inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında inkübasyondan çıkarılan örnekler vortekslenmiştir. Inkübasyonun ardından melanin pigmenti içeren örnekler 100 µl, 3 tekrarlı olacak şekilde 96-well plakaya eklenmiş ve absorbans değeri 405 nm’de ölçülmüştür. Kör olarak 1 M NaOH (%10 DMSO) kullanılmıştır. Melanin miktarı hem µg melanin/ µg protein hem de kontrole göreceli olarak % melanin içeriği olarak hesaplanmıştır.

3.6.15. Melanin Standart Doğru Denkleminin Oluşturulması

400 µg/ml stok melanin çözeltisi 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde seyreltilmiştir. 100 µl farklı konsantrasyonlardaki melanin örneklerinin absorbans değeri 405 nm’de ölçülmüştür. Absorbansa bağlı olarak melanin miktarı grafiğe dökülmüş ve doğru denklemi oluşturulmuştur (Ek 3).

3.6.16. Enzim Kinetiği ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Fikosiyanin peptidlerinin enzim inhibisyon kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla Michelis-Menten ve Lineweaver-Burk kinetikleri incelenmiştir. Bu amaçla değişen konsantrasyonlarda L-tirozin ve L-DOPA (0,3125-5 mM), fikosiyanin peptidleri (200-800 µg/ml) kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından kinetik parametreler (K_m , V_{max} ve K_I) ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

3.6.17. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz çalışmaları Microsoft Office, Excel (Office 365) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. ANOVA ile gerçekleştirilen istatistiksel çalışmalarda $\pm\%95$ güven aralığında ($p<0,05$) çalışılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Mikroalg Türlerinin Seçilmesi ve Ön Eleme Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında Çizelge 3.3'te yer alan mikroalg türleri ile çalışılmıştır. Tür seçiminde protein içerikleri açısından zengin olması, biyoteknolojik olarak da tercih edilen, ümit vaat edici türler olması dikkate alınmıştır. Özellikle, seçilen siyanobakteri türleri göller ve denizel ortamlarda ötrifikasyona neden olan türlerdir ve tez kapsamında tirozinaz inhibisyonu sağlayan peptidler elde edilebilirse çevresel açıdan da bir etki yaratacağı düşünülmüştür. Ayrıca *Oscillatoria* sp., *Lyngbya*, *Nodularia*, *Tolypothrix* sp., *Nostoc muscorum* türleri için farmasötik ve kozmetik alanda da önem teşkil eden, pek çok biyoaktif fonksiyona sahip ribozomal olmayan peptidleri de sentezlediği bilinmektedir. Ancak siyanobakterilerin tirozinaz inhibisyonu olarak kullanıldığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Oscillopeptin G hariç). Çoğu siyanobakteri türü (*Oscillatoria*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Tolypothrix* gibi) insan ve hayvan fizyolojisini olumsuz etkileyen toksin moleküller üretmektedirler. Bu nedenle siyanobakterilerden toksik olan türlerin biyoteknolojiye girişi oldukça azdır (Cullen et al., 2019; Xiao et al., 2010).

Tür seçimi işlemi ardından, mikroalglerin büyüme kinetiklerinin oluşturulması amacıyla 100 ml erlen çalışma hacminde üretim setleri kurulmuştur. Bu aşamada yığın biyokütle üretimine uygunluk, ölçek büyütme ve biyokütle verimi gibi parametreler göz önüne alınmıştır. Biyokütle verimi 2 g/L'nin altında olan türler ile ikilenme süresi 60 saatten yüksek olan türler bu kısımda elenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Mikroalg türlerinin ikilenme süreleri

Tür adı	İkilenme süresi (t _d , saat)	Biyokütle üretimi (g/L)	Besin ortamı
<i>Schizothyrium limacinum</i>	12±1,2	5,5±0,5	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	26,4±2,3	2,5±0,5	BG-11
<i>Prorocentrum micans</i>	>80	-	f/2
<i>Oscillatoria</i> sp. SAG 50.96	55±2,4	0,8±0,3	SWES
<i>Lyngbya</i> SAG 36.91	59,3±1,2	0,7±0,3	CBM
<i>Nodularia</i> SAG 50.79	>60	-	CBM
<i>Tolypothrix</i> sp. SAG 93.79	>80	-	CBM
<i>Nostoc muscorum</i> SAG	>60	-	BG11
<i>C. reinhardtii</i> CC124	14±2	2,0±0,2	TAP
<i>P. tricornutum</i>	26±1	2,2±0,2	f/2

Yapılan ön çalışmada; *Prorocentrum micans*, *Tolypotrix*, *Nostoc muscorum* ve *Nodularia* türleri ikilenme sürelerinin yaklaşık 60 saatin üzerinde seyrettiği bulunmuştur. Bu nedenle bu türlerin üretimleri durdurulmuş ve geriye kalan türlerden *Oscillatoria* sp., *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Schizochytrium limacinum*, *Lyngbya* sp., ve *Chlamydomonas reinhardtii* türleri ile çalışmalara devam edilmiştir.

Oscillatoria sp. ve *Lyngbya* sp., filamentöz toksik siyanobakteri türleridir (Raja et al., 2016; Videau et al., 2016). Genellikle nörotoksin ve hepatotoksin üretmeleri, denizel ve tatlı su kaynaklarında N, P birikmesi sonucu ötrifikasyon oluşturmalarıyla bilinmektedir. Özellikle yapısında bulunan lipopolisakkaritlerin insanlarda baş ağrısı, kusma, ateş, alerjik reaksiyonlar, solunum sistemi problemleri ve sindirim sistemi sorunları yaşattığı bilinmektedir. Biyoteknolojik olarak ağır metal giderimi, toksin sentezi, biyohidrojen üretimi gibi konularda çalışılmıştır.

S. platensis ve *C. vulgaris* FDA tarafından güvenilir gıda olarak ilan edilmiştir ve tek hücre proteini olarak kullanılan mikroalg türleridir (E.W. Becker, 2007). *S. platensis* daha çok protein, fikosiyanın üretimi ve gıda çalışmalarında yer alsa da *C. vulgaris*'in uygulama alanları daha geniştir. Gıda, yem, akuakültür, yakıt endüstrisi başta olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Douskova et al., 2009; Sydney et al., 2010).

Schizochytrium limacinum heterotrofik yaşayabilen denizel mikroalg türleridir. Ticari olarak EPA, DHA gibi önemli yağ asitlerinin üretiminde kullanılmaktadır (Gürlek et al., 2020; Isleten-Hosoglu ve Elibol, 2017).

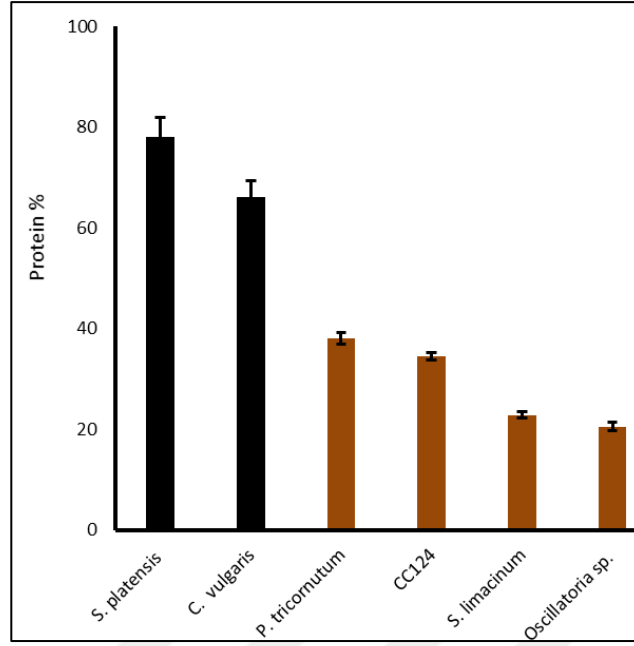
C. reinhardtii ökaryotik mikroalg modelidir. Genellikle mikroalgal fizyolojinin anlaşılmasında, moleküler metabolizmanın aydınlatılmasında ve genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Mayfield and Franklin, 2005). *C. reinhardtii* ayrıca terapötik rekombinant protein üretimi için kullanılan diğer modellere göre post-transkripsiyonel modifikasyon açısından avantaj sağlayan bir türdür. Yapısındaki hidrojenaz enzimleri nedeniyle mikroalgal biyohidrojen üretimi için de hem laboratuvar ölçeğinde hem de pilot ve ticari ölçekte kullanılmaya çalışılan bir mikroalgdir (Kose ve Oncel, 2016; Oncel et al., 2015).

P. tricornutum özellikle fukoksantin ve omega-3 yağ asitlerinin üretiminde oldukça fazla çalışılmış bir diyatom türüdür (Aslanbay Guler vd., 2019; Gammone

et al., 2015). Tüm genom sekanslaması tamamlandığı için ise diyatomların yaşam döngüsü ve fizyolojik regülasyonlarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Çoğunlukla EPA, TAG ve fukoksantin üretiminin gıda, farmasötik, nütisötik ve kozmetik kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır. Fukoksantin de tirozinaz inhibisyonu yaptığına dair çalışmalar olsa da bir ileriye götürülememiştir (Shimoda et al., 2010). Ayrıca *Haematococcus pluvialis* mikroalginden elde edilen astaksantin ve benzeri pigmentlerin de tirozinaz inhibisyonu yaptığı bulunmuştur (Rao et al., 2013).

Bu türlerin hepsinin tez çalışması kapsamında incelenmek istenmesinin bir diğer nedeni ise içeriğinde var olan çok farklı moleküller olmasına rağmen, protein değerleri üzerinden yapılan çalışmalar oldukça azdır ve mikroalgal proteinlerin pek çok biyoaktiviteye sahip olduğu ise yavaş da olsa anlaşılmaya başlanmıştır (Bleakley and Hayes, 2017). Ayrıca mikroalgal proteinlerin ve peptidlerin tirozinaz inhibisyon kapasiteleri kapsamında herhangi bir kayda değer çalışmanın henüz gerçekleşmediği bilinmektedir.

Devam edilen türlerde ikinci kıstas ise protein değerleridir. Hücre yapısı ve büyüme hızının yanı sıra biyokütlenin protein içeriği ve proteinlerin erişilebilirliği de enzimatik hidroliz işlemleri için kullanılıp kullanılmayacağına karar vermek açısından önemlidir. Protein içeriği biyokütlenin %40'ı olması ön koşulu enzimatik hidroliz işlemleri öncesinde tür seçimi için uygun görülmüştür. Bu ön koşul başlangıç protein girdisini birim biyokütle başına arttırmak amacıyla dikkate alınmıştır. Her bir biyokütle örneğinden Lowry yöntemi ile yapılan protein miktarları Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 Mikroalg türlerinin % protein değerleri

Seçilen mikroalg türlerini % protein değerleri sırasıyla; *S. platensis* %78,1±3,9; *C. vulgaris* %66,2±6,7; *P. tricornutum* %38±1,2; *C. reinhardtii* CC124 %34,5±0,65; *S. limacinum* %20,5±0,6 ve *Oscillatoria* sp. %12,07±0,89 şeklinde bulunmuştur ($p < 0,05$). Mikroalglerin % protein değerleri literatür bilgisi ile uyumludur (E.W. Becker, 2007a; Walker et al., 2005). *S. limacinum* için protein içerikleri ilk defa bu çalışmada incelenmiştir. Bilindiği üzere *S. platensis* ve *C. vulgaris* türleri konvansiyonel olarak kullanılan ve tek hücre proteini olarak tüketilen nutrisötik mikroalg türleridir (Kose vd., 2017). FDA tarafından GRAS kategorisine alınmıştır; gıda ve farmasötik olarak tüketilmesinde herhangi bir sakınca (doz aşımı dışında) bulunmamaktadır (E W Becker, 2007).

Protein miktarları göz önüne alındığında; çalışmalara *S. platensis* ve *C. vulgaris*, türleri ile devam edilmesine karar verilmiştir. Her iki türe ait proteinlerin enzimatik hidroliz işlemleri sonrası sindirilebilirliği ve erişilebilirlikleri ile farklı hücre hatlarında sitotoksik etkisi yüksek lisans tezi olarak daha önce incelenmiştir (Kose ve Oncel, 2015; Kose vd., 2017). Bu doğrultuda, yine farklı enzimler ile hidroliz işlemleri sonrasında *S. platensis* ve *C. vulgaris* protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibisyonuna etkisi göz önünde bulundurulmuştur.

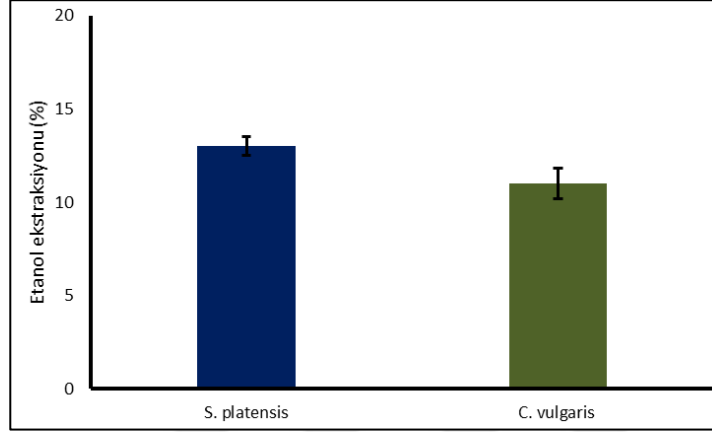
Hidroliz işlemi öncesinde mikroalgal biyokütle etanol ile ön ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Mikroalglerin protein içerikleri yüksek olsa da hücre çeperleri nedeniyle protein erişilebilirliği görece olarak zordur (Kose ve Oncel, 2015; Morris et al., 2008). *Chlorella* gibi türlerin sert selülozik çeperleri sindirimi

ve protein ekstraksiyonunu zorlaştırmakta, bu nedenle proteinlere erişilebilirliği arttırmak için ise bir takım ön işlemler gerekli olabilmektedir. *Chlorella* türlerinde çeperin %50'ye yakını selülozik ağlardan oluşmaktadır (Fu et al., 2010). Hücre çeperi hücre içi proteinlerin çözünebilir hale getirilebilmesinin önündeki en büyük fiziki engeldir. Bu engel moleküler hareketi kısıtlandırarak çoğu hücre içi komponentin ekstraksiyonunu minimize etmektedir. Yeşil mikroalgler, siyanobakteriler ve kırmızı mikroalgler ile kıyaslandığında çeperin etkisi anlam kazanmaya başlamaktadır. Çoğu kırmızı algde çeper sülfatlı polisakkaritlerden oluşan bir enkapsüle bölge görevi görmektedir. Bu nedenle de yeşil algler ile gerçekleştirilen çalışmalarda ılımlı teknikler hücre içerisine ulaşmak konusunda başarısız olmaktadır. Hücre içerisine ulaşmak için kullanılan mekanik işlemler sonucu ise ortaya çıkan ısı protein ve enzimlerin aktivitesini düşürebilmektedir (Ursu et al., 2014). Bu nedenle olabildiğince az protein kaybı sağlayacak ön işlemler tercih edilmektedir.

Özellikle mikroalglerin gıda takviyesi olarak kullanıldığı ürünlerde enzimatik hidroliz yolu ile protein ve esansiyel amino asitlerin erişilebilirliğinin arttırılması sağlanmaktadır. Protein hidrolizinin verimini hücre çeper yapısı, protein içeriği, başlangıç enzim konsantrasyonu gibi parametreler etkilemektedir (Morris et al., 2008). İçeriklerindeki proteinlerin yansira, lipofilik yapılar ve pigmentlerin de bulunması proteazlar ile proteinlerin etkileşimini azaltmakta ve enzimatik hidroliz verimini düşürmektedir. Ayrıca yapılan ön çalışma ile hücre çeperinin hasara uğratılması ile hücre içerisine enzimin ulaşması da arttırılmaktadır. Bu amaçla genelde organik solventler kullanılsa da gıda ve kozmetik gibi alanlarda kullanılacak ürünlerde solvent seçimi, solventin toksistesine bağlı olarak değişiklik göstermelidir. Etanol gibi güvenli solventler ile ekstraksiyon yapılması hem toksik yükü minimize etmekte hem de hücre içerisindeki lipofilik maddelerin bir kısmı ile diğer pigment ve kimyasal yapıların da uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Morris et al., 2009). Yapılan çalışmalarda ise daha polar solventlerin ekstraksiyon verimini arttırdığı yönündedir. Bu nedenle çalışmada ön işlem olarak etanol ekstraksiyonu tercih edilmiştir.

Şekil 4.2'de şematize edildiği üzere; biyokütlenin %10-15 oranında etanol ile ekstraksiyonunun sağlandığı görülmüştür. Etanol yapıdaki klorofili, yağları ve diğer pigment moleküllerinin bir kısmını alabilmiştir. Etanol muamelesine eşlik eden sonikasyon ile hücre çeperinde yapısal deformasyonlar sağlanmış ve sıcaklığın da etkisiyle hücre çeperinin enzimatik hidroliz öncesinde genişlemesi sağlanmıştır. Her ne kadar *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in ekstraksiyon sonuçları %

olarak birbirine yakın olsa da istatistiksel olarak incelendiğinde $p=0,019<0,05$ olarak bulunmuştur. Bu bağlamda, *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in çeper yapılarının etkisi ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.2 Mikroalglerden etanol ekstraksiyon verim değerleri (%)

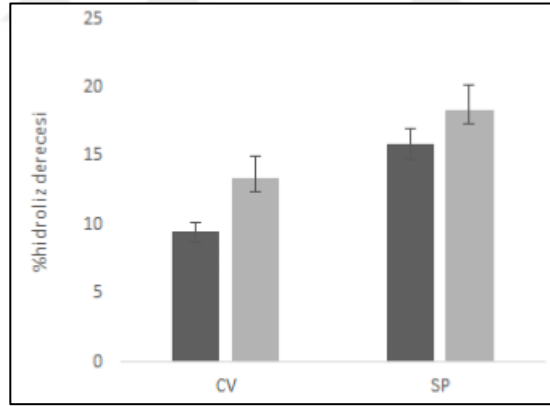
Etanol ekstraksiyonu sonrasına geriye kalan biyokütle tekrar kurutulmuş ve enzimatik hidroliz işlemleri için hazır hale getirilmiştir.

4.1.1. Alkalaz Enzimi İçin Hidroliz Süresinin Belirlenmesi

Çalışmalarda Alcalase® 2.4 L (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) kullanılmıştır. Alkalaz *Bacillus licheniformis*'den elde edilen bir serin endopeptidaz enzimidir. Spesifik aktivitesi 2,4 AU/g'dır. Genellikle aromatik amino asit bölgelerinden hidroliz işlemi gerçekleştirilmekte olup pek çok farklı kompleks protein yapıları (keçi sütü, soya, buğday, pirinç, çeşitli balık türleri, mikroalg, makroalg) kolaylıkla hidroliz edebilmektedir. Enzimin çalışma pH aralığı 6-9 arasındadır ve 45-70 °C sıcaklıklarda aktiftir. Alkalaz aynı zamanda subtilisin olarak da bilinmektedir. Genellikle deterjan endüstrisinde yumurta, süt, peynir, kan gibi protein yapıların uzaklaştırılmasında kullanılır. Buna ek olarak bitkisel (Cian et al., 2012; Li et al., 2005; Xie et al., 2019), hayvansal (da Silva et al., 2018; Onuh et al., 2014) ve algal (Cian et al., 2012; S.-C. Ko et al., 2012; Wang and Zhang, 2012; Wijesekara et al., 2011) protein kaynaklarından biyoaktif özellik gösterecek peptidlerin oluşturulmasında da kullanılan başarılı bir hidroliz enzimidir. Alkalaz enzimi ile yapılan çalışmalarda antihipertansif, antioksidan, metal şelatlayıcı ve tirozinaz inhibitörü peptidler ve protein hidrolizatlar olduğu bulunmuştur (Je et al., 2007; Ngo et al., 2016; Onuh et al., 2014).

Tanıdığı ve kesim yaptığı amino asit bölgeleri tirozin, fenil alanin, lizin, valin, triptofan ve serindir. Kesim yaptığı amino asitler özellikle tirozinaz inhibisyonu açısından önem teşkil eden amino asit gruplarını içermektedir. Bunlar arasında en net olanı ise C terminal tirozin birimlerinden kesim yapmasıdır. Literatürde yer alan tirozinaz inhibitör peptidleri göstermiştir ki C terminal tirozin birimi tirozinaz inhibisyonu için önemli bir role sahiptir (Ochiai et al., 2016).

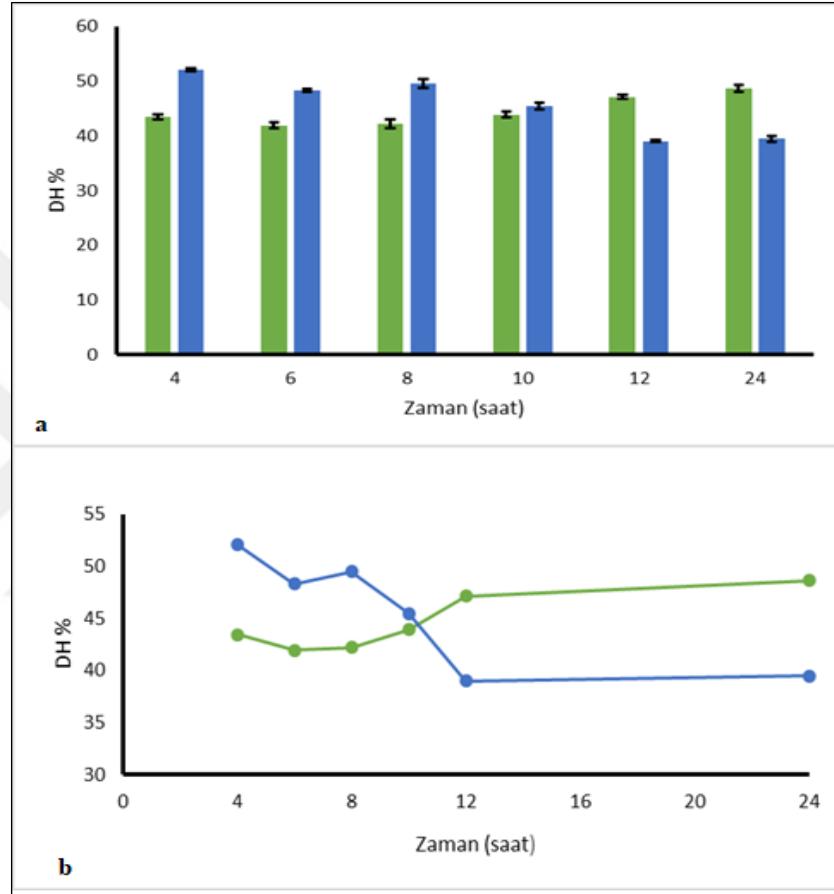
Çalışmanın bu kısmında, alkalaz enzimi için öncelikle hidroliz işlem koşulları ve süresi belirlenmiştir. Literatür taraması ve üretici firma tarafından tavsiye edildiği üzerine; 55 °C’de hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Geçmiş kaynaklarda enzimin 4-24 saat arasında reaksiyona tabi tutulduğu bitkisel ve süt ürünleri kökenli proteinler ile çalışmalar bulunmaktadır (Je et al., 2007; Jin et al., 2015; Ngo et al., 2016). Hücre çeperi sert olan mikroalg türlerini temsilen *C. vulgaris*; yumuşak hücre çeperine sahip olan türleri ve siyanobakterileri temsilen ise *S. platensis* kullanılmıştır (Kose vd., 2017). Öncelikli olarak optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 7 ve pH 8 değerlerinde 4 saat süren hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Her iki tür için de pH 8 değerinde % DH değerlerinde artış görülmüş ($p < 0,05$) ve süre denemesi öncesinde pH 8, 55 °C işlem koşullarında çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.3 Alkalaz enzimi için optimum pH değerinin belirlenmesi (siyah; pH 7, gri pH 8)

pH değerinin belirlenmesinin ardından, zamana bağlı %DH belirlenmiştir (Şekil 4.4). *S. platensis* ile yapılan çalışmada 4 saat sürenin ardından %DH değeri %10 kadar azalmıştır. Bu azalma zamana bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir. 4 saat sonrasında $52,1 \pm 0,3$ değerinde bir DH elde edilmişken, 12. saatte bu değer $39 \pm 0,4$ ’e gerilemiş ve 24. saatte de yine $39,5 \pm 0,6$ olarak hesaplanmıştır ($p < 0,05$, 12 ve 24 saat değerleri için $p > 0,05$). *S. platensis* için elde edilen sonuç göstermiştir ki; zaman %DH değeri için negatif bir etkiye sahipken 12. saat sonunda enzimin hidroliz etkinliği stabil kalmıştır. *C. vulgaris* için yapılan denemede süre

anlamlı bir fark yaratmamıştır ($p>0,05$). %DH değerleri %40-48 arasında değişiklik göstermiştir. Enzimatik hidroliz işlemi için reaksiyon süresi 4 saat olarak seçilmiştir. Bunun nedeni *S. platensis* için sürenin negatif anlamda etkisi olduğunun bulunması iken *C. vulgaris*'de zamanın etkisi olmasa da daha uzun hidroliz süresinin gerek olmadığı kanısına varılmış olunmasıdır. *C. vulgaris* ve *S. platensis* kıyaslandığında %DH bakımından *C. vulgaris* %10'luk bir düşüş göstermiştir. Bu da çeper yapısının etkisi olarak incelenebilmektedir (Morris et al., 2009).



Şekil 4.4 *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in alkalaz enzimi ile hidroliz süresi optimizasyonu, (yeşil; *C. vulgaris*, Mavi *S. platensis*)

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 kıyaslandığında; Şekil 4.3'teki veriler etanol ile ekstrakte edilmeden elde edilen %DH değerleridir. Şekil 4.4'te ise etanol ile ekstraksiyon yapılmış biyokütleden elde edilen veriler sunulmuştur. Her iki deneme için 4 saat pH 8 değerindeki örneklerin %DH değerleri kıyaslandığında bu değerler sırasıyla, *S. platensis* %18±1,7; %52,1±0,3, *C. vulgaris* için ise %17,0±0,8; %43,5±0,5 şeklindedir. Etanol ekstaksiyonu öncesinde gerçekleştirilen hidroliz işleminde türler arası anlamlı bir fark oluşmaz iken ($p>0,05$); etanol ön işlemi sonrasında %DH değer fark kazanmıştır ($p<0,05$). Etanol ekstraksiyonu hücre içerisindeki bir takım lipid yapılarını, pigmentleri ve fenolik

bileşikleri ekstrakte etmiş; sıcaklık ve sonikasyonun etkisiyle de çeper yapısındaki bozulmalar ve açılmalar ile enzimin daha iyi penetrasyonu sağlamıştır. Etanol ekstraksiyonu öncesi ve sonrası kıyaslandığında tür ve çeper yapısından bağımsız olarak 2,5-3 kat %DH değerlerinde artış olduğu net bir şekilde gözlenmiştir. Görüldüğü üzere lipofilik maddelerin uzaklaştırılması enzim-protein interaksyonunu anlamlı ölçüde arttırmıştır (Tchorbanov and Bozhkova, 1988).

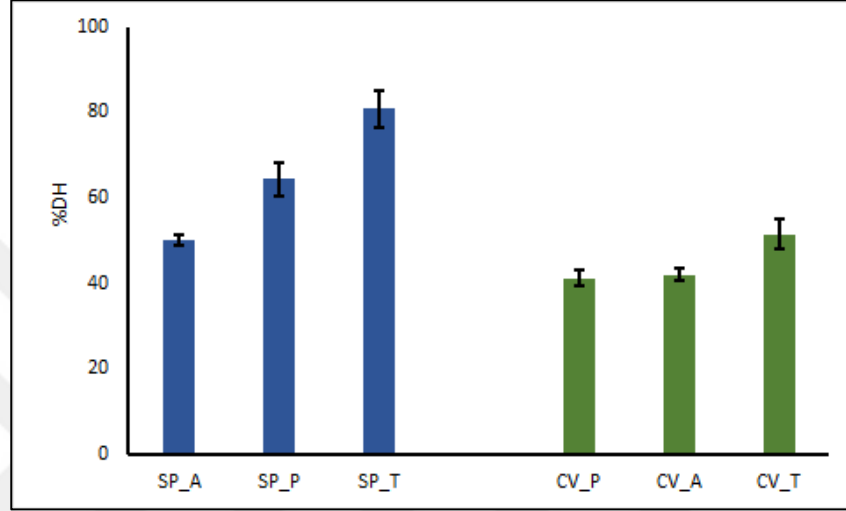
4.2. Mikroalgal Proteinlerden Enzimatik Hidrolizat Eldesi

S. platensis ve *C. vulgaris*'den etanol ile ekstraksiyon sonrasında elde edilen biyokütleler pankreatin, tripsin ve alkalaz enzimleri ile hidroliz edilmiştir. Geçmiş çalışmalarda tripsin ve pankreatin hidrolizi ile mikroalgal biyokütleden antikanser, antibakteriyel, anti-hipertansif, ACE inhibitörü, antioksidan, antienflamatuvar, immünstimülant pek çok biyoaktif peptid bulunmuştur (Huang et al., 2012; Kang et al., 2012; Kose and Oncel, 2015b; Ochiai et al., 2016b; Onuh et al., 2014; Zhang et al., 2016). Tripsin enzimi proteinleri C terminal arjinin birimlerinin olduğu bölgelerden kesmektedir. Ayrıca C terminal lizin birimlerinden de kesim yapmaktadır. Ancak, eğer lizin sonrasında prolin amino asidi bulunur ise lizin bölgesinden kesim yapılmaz iken; eğer eşlik eden triptofan var ise yine lizin bölgesinden kesim yapılabilmektedir. Pankreatin enzimi amilaz, lipaz ve proteazlardan oluşan bir enzim kokteylidir. Genellikle sindirim sistemi problemi olan (kistik fibroz gibi) ya da sindirim enzimleri çalışmayan bireylerde besinlerin sindirilmesi için dışarıdan sağlanan litik enzimler bütünüdür (Kose ve Oncel, 2015; Morris et al., 2008). Pankreatin enzimi genellikle proteinlerin *in vitro* ve *in vivo* sindirilebilirliğini arttırmakta kullanılsa da biyoaktif peptid üretimi açısından da önem teşkil etmektedir. Yapısında bulunan lipaz ve amilazların aktivitesi sayesinde gastrointestinal sindirilebilirliği diğer saf proteazlara göre arttırmaktadır (Morris et al., 2009).

Çalışmanın bu kısmında öncelikle hidroliz işlemi sonrasında her bir enzim ve mikroalg türü için %DH değerleri ve protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.5). Daha sonra liyofilize edilmiş hidrolizatlar kademeli olarak 10, 5 ve 3 kDa santrifüj tipi ultrafiltrasyon tüplerinden geçirilmiş ve yine her bir aşamasındaki protein miktarları belirlenmiştir.

S. platensis'den elde edilen DH sonuçları incelendiğinde; enzimlerin hidroliz derecesine anlamlı etkisi olduğu gözlenmiştir. Tripsin ile yapılan hidroliz %DH açısından en başarılıdır ve biyoküttelede yer alan proteinlerin $80,77 \pm 4,2$ 'sini

hidroliz edebilmiştir. Bunu takiben pankreatin enziminde $64,45 \pm 3,9$, alkalaz enziminde ise $50,2 \pm 1,2$ 'si hidroliz edilebilmiştir. *C. vulgaris* için ise yine tripsin hidroliz derecesi anlamından en yüksek sonucu vermiştir ($51,59 \pm 3,3$) ancak pankreatin ($41,24 \pm 1,7$) ve alkalaz ($42 \pm 1,4$) %DH olarak bir farklılık yaratmamıştır. Mikroalg türleri kendi arasında kıyaslandığında; enzimlerin türe göre %DH etkisi anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak aynı türde enzimler arasında bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.5 *S. platensis* (SP) ve *C. vulgaris* (CV) biyokütlesinin Tripsin (T), Alkalaz (A), ve Pankreatin (P) enzimleri ile hidrolizi sonucu elde edilen %DH değerleri

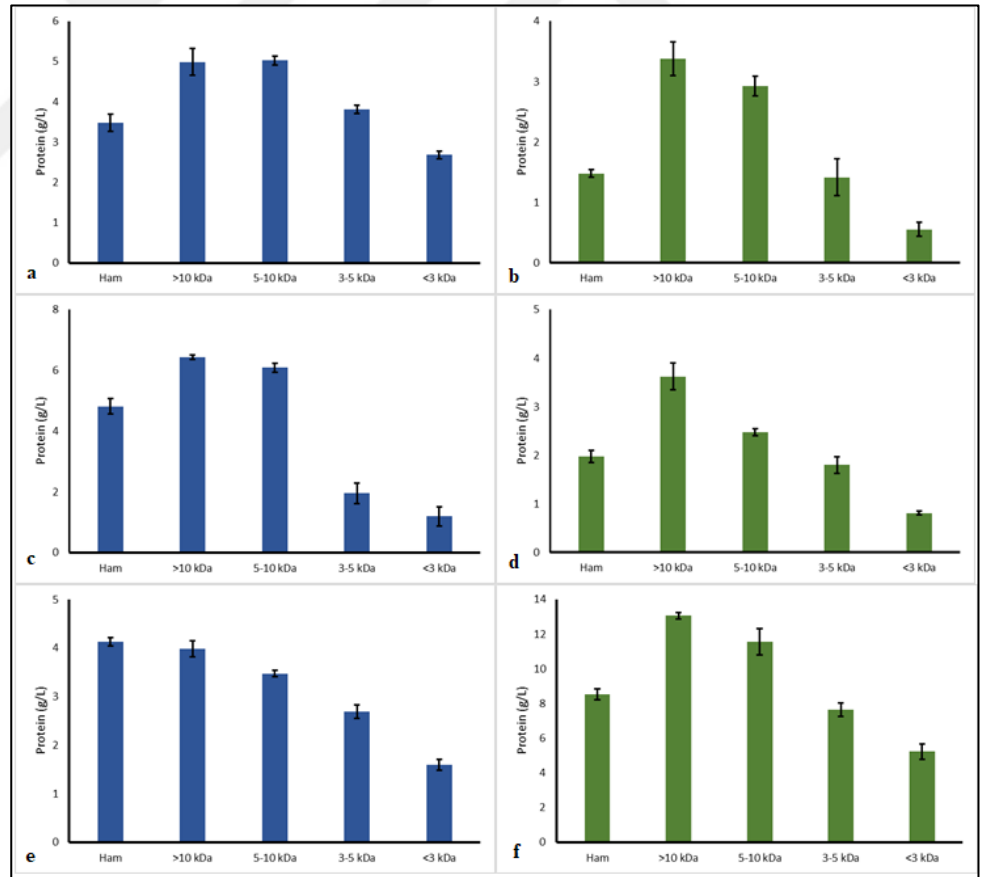
Spirulina'dan elde edilen anlamlı farklılıkların hücrenin çeper yapısıyla ve enzimlerin amino asit spesifiklikleriyle alakalı olduğu düşünülmektedir. *C. vulgaris* ile gerçekleştirilen çalışmada ise %DH değerleri *S. platensis*'in altında kalmıştır. Daha önce gerçekleştirilen çalışmada etanol ekstraksiyonu olmadan, biyokütlenin tampon içerisinde 1 saat boyunca bekletilmesi sonucunda tripsin ve pankreatin ile gerçekleştirilen hidroliz çalışmasında proteinlerin %40-50'si hidroliz edilmiş ve çözülebilir faza aktarılmıştır (Kose ve Oncel, 2015). %DH değerleri farklı olmasına rağmen enzimlerdeki farklılıkların etkisi asıl tirozinaz enzimi ve melanin üretimine etkisinin kıyaslanmasıyla ortaya konulabilecektir. Henüz mikroalglerin proteom atlasları tam olarak bulunmadığı için yapıdaki protein dizileri ve amino asit kombinasyonları bilinmemektedir. Bu nedenden ötürü enzimlerin etkisinin türler arasındaki amino asit dizilerinden kaynaklı farklılıklardan etkilendiği çıkarımı şu an için maalesef varsayımsaldır. Ancak mikroalgal proteinlerin % amino asit dağılımlarının bilinmesi hangi enzimle çalışılması gerektiği konusunda aydınlatıcıdır.

4.2.1. Enzimatik Hidroliz Sonuçları

Hidroliz işlemi gerçekleştirildikten sonra, elde edilen protein hidrolizatlar, ultrafiltrasyon membranları kullanılarak boyut fraksiyonlarına ayrılmıştır. 10 kDa'dan elde edilen permeat fazı 5 kDa membrandan geçirilmiş, 5 kDa membrandan elde edilen permeat fazı 3 kDa membrandan geçirilmiş, 3 kDa membrandan retentat ve permeat fazları ayrılmıştır. Sonuç olarak fraksiyonlama işlemi sonrasında ham hidrolizatın yanı sıra;

- >10 kDa,
- 5-10 kDa,
- 3-5 kDa,
- <3 kDa olacak şekilde 4 farklı boyut fraksiyonuna ayrılmıştır.

Her bir enzim, mikroalg türü ve fraksiyon için protein miktarları (g/L) belirlenmiştir (Şekil 4.6).

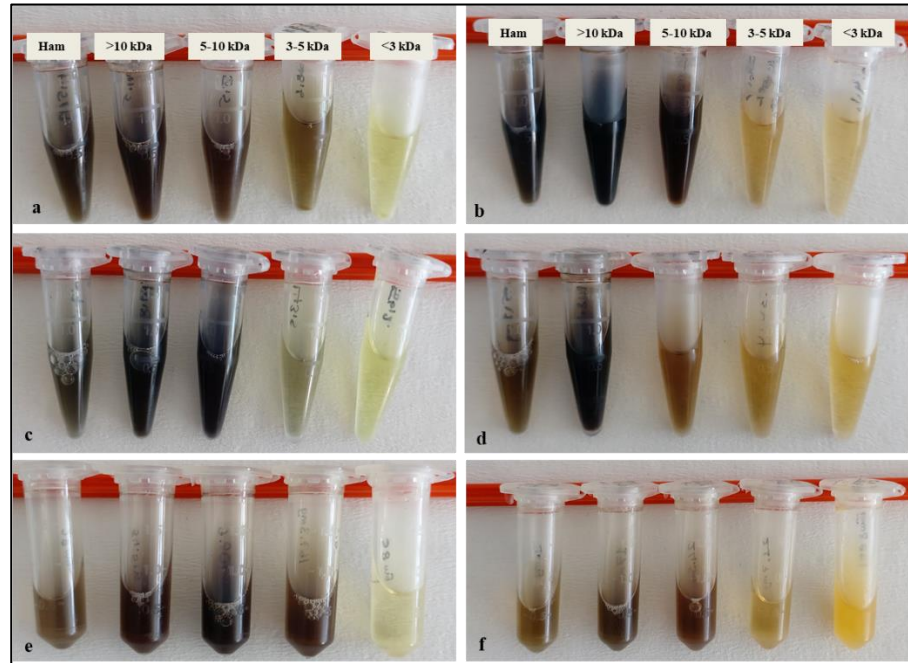


Şekil 4.6 *S. platensis* ve *C. vulgaris* protein hidrolizatları ultrafiltrasyon fraksiyonları protein (g/L) miktarları; a) *S. platensis* pankreatin hidrolizatı, b) *C. vulgaris* pankreatin hidrolizatı, c) *S. platensis* tripsin hidrolizatı, d) *C. vulgaris* tripsin hidrolizatı, e) *S. platensis* alkalaz hidrolizatı, f) *C. vulgaris* alkalaz hidrolizatı

Ultrafiltrasyon fraksiyonlarında >10 kDa fraksiyonunda protein miktarlarında konsantrasyon işlemine bağlı artış, devam eden fraksiyonlarda ise giderek azalma görülmesi öngörülmüştür. Şekil 4.6, a, b, c, d ve e denemelerinde 10 g biyokütle ile başlanmıştır. Ancak Şekil 4.6, f setinde 50 g biyokütle kullanılmıştır. Bu nedenledir ki Şekil 4.6, a ve c denemelerinde ham protein hidrolizat örneğinin protein miktarları birbirine yakın iken, e örneğinde farklılık göstermiştir. Aynı şekilde, Şekil 4.6 b ve d örneklerinde ham protein miktarları hemen hemen eşit iken, Şekil 4.6 f'de bu miktarlar daha yüksektir. Ayrıca ham protein hidrolizat miktarları %DH değerleri ile de ilişkilidir. Genel olarak her 3 enzim için dikkate alındığında %DH değerleri ile orantılı olarak *S. platensis* ham hidrolizat miktarları *C. vulgaris* 'e kıyasla daha fazla olmuştur.

Fraksiyonlama işlemi sonrasında örnekler yeniden liyofilize edilmiş ve sonraki denemelerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

S. platensis içerdiği fikosiyanin nedeniyle ham hidrolizatları koyu mavi-yeşil renk aralığında iken, *C. vulgaris* hidrolizatları kahverengi-yeşil renk aralığındadır (Şekil 4.7). Boyut azaldıkça, yapıdaki safsızlıklar ve büyük proteinler uzaklaştığı için fraksiyonların renkleri giderek açılmakta ve berrak, saydam, sarımtırak renklere dönüşmektedir.



Şekil 4.7 *S. platensis* ve *C. vulgaris* biyokütlesinden elde edilen enzimatik hidrolizatlar, a) *S. platensis* pankreatin, b) *C. vulgaris* pankreatin, c) *S. platensis* tripsin, d) *C. vulgaris* tripsin, e) *S. platensis* alkalaz, f) *C. vulgaris* alkalaz (Her birisi için soldan sağa ham, > 10 kDa, 5-10 kDa, 3-5 kDa, <3 kDa)

4.2.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi (%RSA) Değerlerinin Belirlenmesi

Antioksidan maddeler hücre içerisinde serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasarı durduran ya da yavaşlatan maddelerdir. Serbest radikalleri nötralize ederek hücrenin üzerinde biriken oksidatif stresi ve bu strese bağlı metabolizma hasarlarını minimize eder ya da ortadan kaldırırlar. Oksidatif stres insanlarda kalp damar hastalıkları, deri hastalıkları, görme kusurları gibi pek çok ciddi sağlık problemi olarak yansıtmaktadır.

Tirozinaz inhibitörleri topikal formülasyonlar olarak düşünüldüğünde UV hasarının yarattığı oksidatif stresi de minimize edecek inhibitörlerin olması multifonksiyonellik açısından önem arz etmektedir. Deri sürekli olarak UV radyasyona maruz kalmaktadır ve bu nedenle reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu sürekli olarak gerçekleşmektedir. ROS birikmesindeki kontrolsüz artış patolojik deri hastalıklarına, DNA hasarına, kansere ve deri bütünlüğünde bozulmalara neden olmaktadır. Melanin, UV radyasyondan koruyucu bir etkiye sahip olsa da melanin üretimindeki artış yine farklı patolojik ve estetik cilt kusurları olarak karşımıza çıkabilmektedir.

Antioksidan savunma sistemi ile melanogez arasında direkt ve hassas bir bağlantı bulunmaktadır. Tirozinaz inhibitör maddelerin RSA aktivitelerinin olması sinerjistik bir etki yaratarak hem oksidatif stresi elimine eder hem de tirozinaz enzimini kontrol altına alır.

Tez  alışması kapsamında *S. platensis* ve *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarından DPPH radikali süpürme aktivitesi kullanılarak farklı enzimler ve boyut fraksiyonlarının %RSA aktivitesi belirlenmiştir. Bu çalışmada kojik asit (tirozinaz inhibitörü) ve BHT (antioksidan referans molekül) referans maddeler olarak kullanılmıştır.

Mikroalgal protein hidrolizatları, özellikle ham, >10 kDa, 5-10 kDa fraksiyonları, renkli maddelerdir. Bu nedenle yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında artan renk DPPH radikali süpürme aktivitesine bağlı renk düşüşlerini maskeleyiştir. İlk olarak 8 mg/ml konsantrasyonda başlanmış ancak bu durum neticesinde renklere göre 2 ya da 1 mg/ml konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonları olarak kullanılabilmiştir. 2 g/ml üzerinde DPPH ile karıştırıldığında bulutsu yapılar oluşmuştur. Doza bağlı linear bir değişim olmadığı

için DPPH analizlerinde mikroalgal protein hidrolizatlarından IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Ancak doza bağlı elde edilen %RSA değerleri *S. platensis* için Çizelge 4.2 ve *C. vulgaris* için Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

S. platensis pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatlarında farklı boyut fraksiyonlarında elde edilen maksimum %RSA aktivitesi pankreatin hidrolizatu 5-10 kDa boyut aralığında (%53,42±0,50) bulunmuştur. Her dozda belirgin bir antioksidan aktivite gözlenmesine rağmen, etkili doz değerinin en az 1 mg/ml olması gerektiği gözlenmektedir. Genel olarak peptid boyutu azaldıkça %RSA değerlerinde azalmalar meydana gelmiştir. Daha yüksek aktivite gözlenebilmesi için doz miktarının mg/ml üzerine çıkarılması gerekmektedir ancak daha önce de bahsedildiği üzere, örneklerin kendi renklerinden dolayı DPPH yöntemi bunu tayin etmekte kısıtlı kalmıştır.

Çizelge 4.2 *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının doza bağlı %RSA değerleri (%RSA±SS)

	Konsantrasyon (µg/ml)					
	2000	1000	500	250	125	62,5
Pankreatin						
Ham	30,21±0,32	26,93±0,42	20,54±0,65	21,43±0,43	19,20±0,54	17,26±0,32
>10 kDa	51,93±0,31	43,30±0,30	28,57±0,32	26,04±0,12	25,60±0,29	22,02±0,98
5-10 kDa	53,42±0,50	45,24±0,55	32,44±0,76	28,57±0,65	23,66±0,31	19,79±0,48
3-5 kDa	41,96±0,62	31,70±0,43	21,73±0,21	19,49±0,43	14,88±0,20	13,71±0,19
<3 kDa	40,33±0,30	27,98±0,42	22,77±0,14	18,75±0,28	19,05±0,65	17,86±0,27
Tripsin						
Ham	38,10±0,41	29,32±0,04	23,96±0,20	19,05±0,01	17,41±0,93	17,86±1,5
>10 kDa	50,15±0,05	36,46±0,72	28,87±0,05	26,93±0,13	21,43±0,27	18,60±0,75
5-10 kDa	48,07±0,07	36,31±0,02	27,98±0,83	24,55±1,2	20,98±1,2	16,52±0,84
3-5 kDa	40,48±1,2	29,02±0,01	22,02±0,22	21,58±0,23	16,22±2,2	14,15±2,5
<3 kDa	33,93±0,94	24,85±0,51	21,58±0,28	20,39±0,65	16,82±2,8	14,75±1,4
Alkalaz						
Ham	35,90±1,4	24,26±0,42	19,84±1,1	14,26±0,36	11,15±0,06	0,20±0,20
>10 kDa	43,11±0,65	30,66±0,71	21,48±0,08	13,28±2,7	7,30±0,54	0,40±0,12
5-10 kDa	41,31±2,3	24,92±0,48	19,18±0,74	15,08±0,89	7,30±0,30	9,93±0,75
3-5 kDa	26,39±0,45	17,21±0,05	15,41±0,65	9,18±0,83	9,12±1,01	4,87±0,43
<3 kDa	28,52±0,54	16,89±0,05	13,93±0,96	10,16±0,34	8,51±0,94	0,20±0,20

Doza bağılı olarak değerlendirildiğinde; örnekten bağımsız olarak dozun anlamlı bir etkisi olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). 1 mg/ml konsantrasyonda enzim ve enzimatik hidrolizatlardan elde edilen boyut fraksiyonlarının ise birbirlerinden anlamlı ölçüde farklılık gösterdiği istatistiksel olarak tespit edilmiştir ($p<0,001$). Bu bağlamda *S. platensis* için, dozun, boyutun ve enzimlerin antioksidan aktivite üzerindeki etkisi anlamlıdır ve beklenildiği üzere farklı enzimler, farklı antioksidan aktivite yanıtı oluşturulmasını sağlamıştır.

C. vulgaris için gerçekleştirilen antioksidan aktivite denemesinde, doza bağılı antioksidan aktivitede azalmalar meydana gelmiştir. *C. vulgaris* için maksimum %RSA değeri alkalaz hidrolizatı 5-10 kDa ($64,65\pm0,37$) ve <3 kDa hidrolizatında ($64,34\pm0,36$) 1 mg/ml konsantrasyonlarında bulunmuştur. *C. vulgaris* hidrolizatları *S. platensis*'e göre anlamlı ölçüde farklılık göstermiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.3 *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının %RSA değerleri (%RSA $\pm$ SS)

		Konsantrasyon (μ g/ml)					
		2000	1000	500	250	125	62,5
		Pankreatin					
Ham		39,88 $\pm$ 2,6*	45,09 $\pm$ 0,85	43,45 $\pm$ 0,35	29,46 $\pm$ 0,56	20,54 $\pm$ 0,57	11,46 $\pm$ 0,46
>10 kDa		36,46 $\pm$ 3,3*	52,38 $\pm$ 0,34	44,05 $\pm$ 0,57	31,85 $\pm$ 0,24	22,32 $\pm$ 0,93	14,14 $\pm$ 0,48
5-10 kDa		47,62 $\pm$ 2,9*	58,33 $\pm$ 0,43	46,13 $\pm$ 0,07	26,93 $\pm$ 0,75	20,39 $\pm$ 0,53	18,30 $\pm$ 0,78
3-5 kDa		44,94 $\pm$ 0,54	41,52 $\pm$ 0,60	29,17 $\pm$ 0,03	20,39 $\pm$ 0,36	17,26 $\pm$ 0,26	15,18 $\pm$ 0,36
<3 kDa		35,86 $\pm$ 0,24	29,61 $\pm$ 0,35	20,98 $\pm$ 0,06	10,86 $\pm$ 0,37	12,05 $\pm$ 0,47	12,65 $\pm$ 0,68
		Tripsin					
Ham		31,99 $\pm$ 3,7*	36,46 $\pm$ 0,62	27,83 $\pm$ 0,37	22,47 $\pm$ 0,25	20,24 $\pm$ 0,92	13,99 $\pm$ 0,15
>10 kDa		42,4 $\pm$ 1,91*	53,42 $\pm$ 0,97	56,99 $\pm$ 0,75	37,80 $\pm$ 0,37	27,08 $\pm$ 0,26	18,15 $\pm$ 0,25
5-10 kDa		45,54 $\pm$ 2,8*	50,15 $\pm$ 0,46	31,70 $\pm$ 0,25	23,81 $\pm$ 0,86	18,01 $\pm$ 0,26	14,14 $\pm$ 0,01
3-5 kDa		44,94 $\pm$ 0,68	38,69 $\pm$ 0,36	25,60 $\pm$ 0,25	17,26 $\pm$ 0,92	13,54 $\pm$ 0,25	8,33 $\pm$ 0,16
<3 kDa		19,35 $\pm$ 0,89	16,22 $\pm$ 0,76	11,01 $\pm$ 0,87	10,86 $\pm$ 0,27	8,93 $\pm$ 0,08	13,99 $\pm$ 0,18
		Alkalaz					
Ham		60,93 $\pm$ 0,36	51,63 $\pm$ 0,26	44,19 $\pm$ 0,27	26,51 $\pm$ 0,36	38,33 $\pm$ 3,56	9,94 $\pm$ 0,83
>10 kDa		54,73 $\pm$ 0,67	48,68 $\pm$ 0,86	39,69 $\pm$ 0,93	28,99 $\pm$ 0,25	33,06 $\pm$ 3,24	10,34 $\pm$ 0,32
5-10 kDa		64,65 $\pm$ 0,37	58,29 $\pm$ 0,47	54,11 $\pm$ 0,26	36,90 $\pm$ 0,86	30,43 $\pm$ 2,34	15,82 $\pm$ 0,43
3-5 kDa		58,14 $\pm$ 0,97	47,60 $\pm$ 0,38	33,64 $\pm$ 0,26	24,65 $\pm$ 0,26	20,48 $\pm$ 1,56	6,86 $\pm$ 0,54
<3 kDa		64,34 $\pm$ 0,36	41,40 $\pm$ 0,36	26,36 $\pm$ 0,67	16,74 $\pm$ 0,98	17,44 $\pm$ 0,38	8,92 $\pm$ 0,49

* İşaretli olan denemelerde hidrolizatların rengi nedeniyle elde edilen sonuçlar tutarsızdır.

C. vulgaris için yine enzimler kendi içerisinde değerlendirildiğinde dozun etkisi gözlenmiştir ($p<0,05$). 1 mg/ml konsantrasyonları için ise enzimin ve boyutun anlamlı etki gösterdiği bulunmuştur ($p<0,05$).

Mikroalgal protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri, kojik asit ve BHT maddelerinin %RSA değerlerine göre kıyaslanmıştır (Çizelge 4.4). Her iki madde için doza bağlı antioksidan aktiviteleri 12,5-800 µg/ml konsantrasyonlarında denenmiştir. Kojik asit 12,5 µg/ml değerinde antioksidan aktivite göstermemiştir. BHT için ise 200 µg/ml konsantrasyonun üzerinde, %99 üzerinde inhibisyona neden olduğu için üst konsantrasyonlar denenmemiştir. Her iki maddenin doza bağlı inhibisyon değerleri linear bir şekilde değişiklik gösterdiği için IC_{50} dozları hesaplanabilmiştir. Kojik asit ve BHT için IC_{50} değerleri sırasıyla $362,56\pm0,50$; $61,13\pm0,20$ µg/ml olarak bulunmuştur. Her iki maddenin de %RSA değerleri mikroalgal hidrolizatların antioksidan aktivitesi ile kıyaslandığında arada ciddi ölçüde farklılık olduğu gözlenmektedir. Bunun en önemli nedeni mikroalgal hidrolizatların saf maddelerden ziyade birçok farklı peptid, protein ve amino asit yapıların bir karışımı olmasından kaynaklanmaktadır. Görüldüğü üzere hidroliz enzimleri ne olursa olsun belirli ölçüde antioksidan aktivite bulunsun da aktiviteye neden olan saf peptidin ne olduğu bilinmemektedir, ayrıca karışım içerisinde miktarca az kalmaktadır ve bu nedenle de elde edilen antioksidan aktivite sonuçları belirgin bir peptitten ziyade, bir protein hidrolizat karışımına aittir.

Çizelge 4.4 Kojik asit ve BHT için konsantrasyona bağlı %RSA değerleri

	Konsantrasyon (µg/ml)						
	800	400	200	100	50	25	12,5
Kojik asit	76,87	65,97	26,91	15,17	6,62	2,60	---
BHT	----	---	85,08	71,17	49,04	27,41	17,85

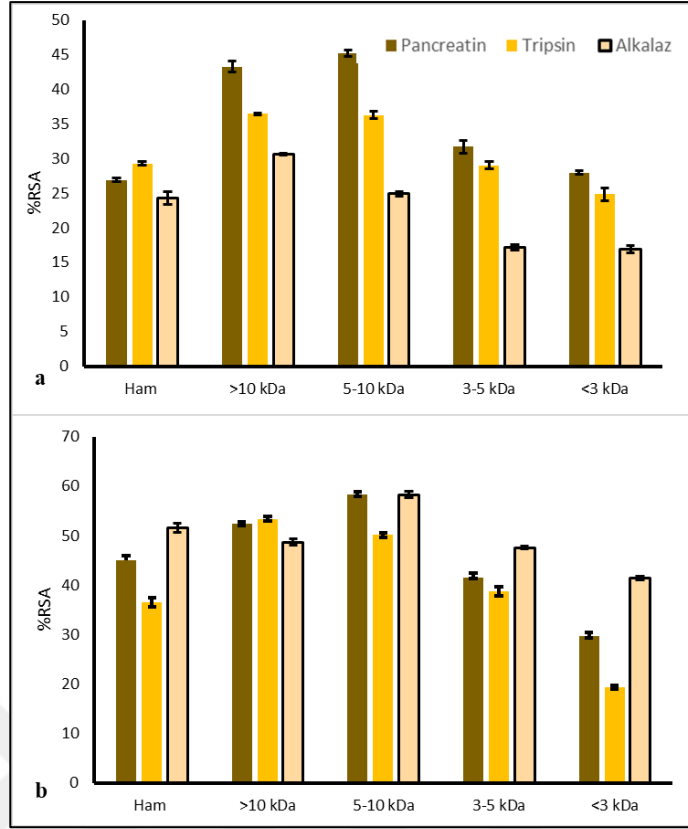
Şekil 4.8’de 1 mg/ml hidrolizat konsantrasyonunda DPPH radikali süpürme aktivitesine dayalı %RSA aktiviteleri verilmiştir. Şekil 4.8’a *S. platensis* pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatları sonucunda hidrolizatların boyut fraksiyonlarından elde edilen sonuçları göstermektedir. Ham hidrolizat antioksidan aktivite bakımından farklılık göstermez iken, hidrolizatların boyutları küçüldükçe her bir enzim için %RSA değerlerinde de anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. Pankreatin ve tripsin hidrolizatlarında antioksidan aktivite değerleri %30’un üzerinde seyrederken alkalaz ile yapılan hidrolizde %RSA değerleri %20’nin altında kalmıştır. Her üç enzim için antioksidan aktivite her ne kadar eş değer hidrolizat miktarları ile çalışılsa da ultrafiltrasyon fraksiyonlarında gözlenen protein miktarlarındaki trende sahiptir. *S. platensis* için sonuçlar göstermiştir ki, >10 kDa

ve 5-10 kDa arasındaki protein hidrolizatlarında pankreatin için en yüksek %RSA değerlerine ulaşılmıştır. Bunun nedeni ise tam olarak hidroliz olmayan fikosiyanın miktarından kaynaklanıyor olabildiği düşünülmüştür.

Şekil 4.8b’de ise *C. vulgaris*’den elde edilen protein hidrolizatlarının 1 mg/ml değerinde %RSA değerleri sunulmuştur. *S. platensis* ile kıyaslandığında *C. vulgaris* hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri anlamlı ölçüde farklılık göstermektedir. Antioksidan aktivite değerleri ultrafiltrasyon ile elde edilen protein trendini takip etmiştir. Her iki örnekte aynı sonuç olması göstermiştir ki boyut azaldıkça antioksidan aktivitede azalmalar meydana gelmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile farklılık göstermektedir. Tuna, *Chlorella* ve mikroalgal biyokütle atığı, tavuk tüylerinde elde edilen sonuçlarda hidrolizat boyutu küçüldükçe antioksidan aktivitede artış görülmüştür (Admassu et al., 2018; Je et al., 2007; S. C. Ko et al., 2012; Pongkai et al., 2017) ancak tez kapsamında yapılan bu çalışmada benzer bulgular elde edilmemiştir.

Genel olarak;

- Enzimlerin antioksidan aktivite üzerine etkisi olduğu bulunmuştur. Bu da enzimlerin amino asit spesifikliklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak beklenenin aksine alkalaz için *S. platensis* örneğinde antioksidan aktivite diğerlerine göre daha düşüktür.
- Antioksidan peptid üretimi açısından *C. vulgaris* biyokütlesi daha başarılı sonuçlar vermiştir. *S. platensis*’in aksine, <3 kDa örneğinde alkalaz pankreatin ve tripsine göre 1,5-2 kat daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Alkalaz enzimi göstermiştir ki 3 kDa’dan küçük boyutlarda antioksidan peptid üretme kapasitesi *C. vulgaris* biyokütlesinde daha yüksektir.
- *C. vulgaris* için <3 kDa örneği hariç olmak üzere enzimlerin %40-60 RSA değerlerine sahip olmalarına rağmen enzimler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.



Şekil 4.8 DPPH Radikali süpürme aktivitesi (%RSA); a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris*

Mikroalgal protein hidrolizatlarından elde edilen %RSA değerleri göstermiştir ki, mikroalg ve kullanılan enzim türü antioksidan peptidlerin oluşmasına direkt etki göstermiştir. Her ne kadar antioksidan aktivite kojik asit ve BHT'ye göre düşük olsa da ($p > 0,05$) ümit vaat eden hidrolizatlardan peptidlerin saflaştırılarak, saf peptidler üzerinden antioksidan aktivite tayini yapıldığına, hidrolizat karışımından ziyade saf peptidin antioksidan aktivitesi belirlenebilecektir.

Antioksidan peptid var olsa da antioksidan aktiviteye katkı sağlayan sözü geçen peptid ya da peptidlerin miktarı ile alakalıdır. IC_{50} değeri oldukça düşük bir peptid olsa da karışım içinden bunun belirlenmesi mümkün değildir. Bu nedenle hidrolizat karışımından elde edilen antioksidan aktivite karışımın karakteristiği açısından ön hazırlık olarak belirleyicidir.

4.3. Mikroalgal Enzimatik Hidrolizatlardan Tirozinaz Aktivite Tayini

Tirozinaz enzimi inhibisyon çalışmaları hem mantar tirozinaz hem de B16-F10 fare melanoma hücre hatlarından gerçekleştirilmiştir. Mantar tirozinaz enzimi (PDB kodu 2Y9X) genellikle tirozinaz inhibisyon çalışmalarında kullanılan

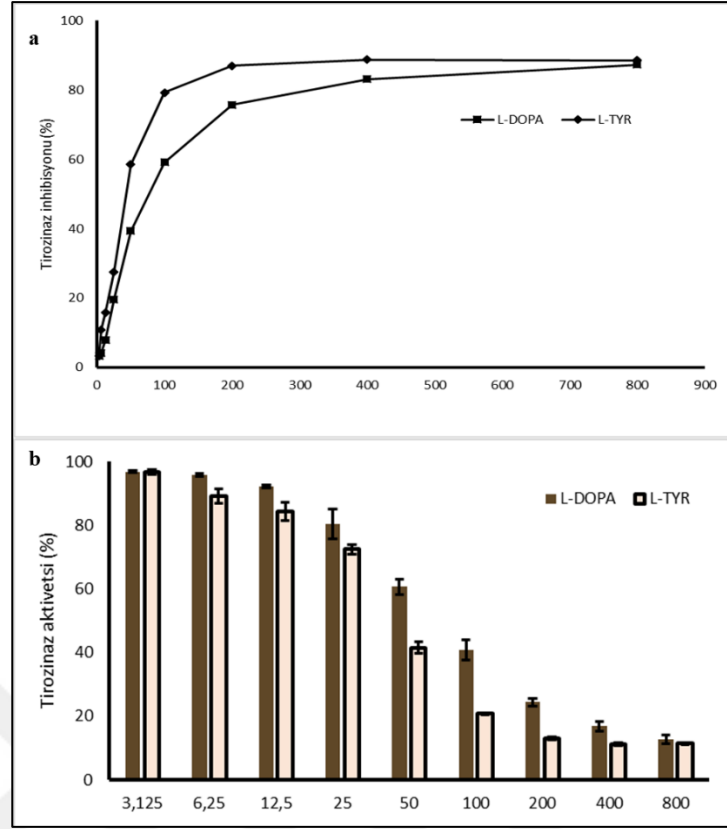
referans tirozinaz enzimidir. Hem *in vitro* hem de *in silico* molecular docking çalışmalarında tercih edilmektedir. İnsan tirozinaz enzimiyle yapısal benzerliği olsa da tirozinaz enziminin katalitik aktivitesi direkt enzim inhibisyonu dışında sinyal yolları üzerinden de inhibe edilebilmektedir. Ayrıca memeli tirozinaz enzimi inhibitörleri bazen mantar tirozinaz inhibisyonu yapmayabilmektedir. Bu nedenle ilk olarak mantar tirozinaz enzim inhibisyonu denenmiş olsa da inhibisyon göstermeyen örnekler diğer örneklerle beraber B16-F10 hücre hatlarında tirozinaz enzim aktivitelerine etkisinin incelenmesi amacıyla denemelere dahil edilmiştir.

4.3.1. Mantar Tirozinaz Aktivitesi

S. platensis ve *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarından mantar tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları 50-800 µg/ml konsantrasyonlarında doza bağlı olarak denenmiştir. Öncelikli olarak L-tirozinin kullanıldığı monofenolaz aktivitesi üzerinden aktivite tayini, 50 U tirozinaz enzimi ve 5 mM L-tirozin varlığında gerçekleştirilmiştir.

Pozitif kontrol olarak kojik asit kullanılmıştır. Kojik asidin mantar tirozinaz enzimi üzerinde monofenolaz ve difenolaz aktivitesine etkisi doza bağlı olarak (3,125-800 µg/ml) incelenmiştir (Şekil 4.9). L- DOPA (difenolaz) ve L-tirozin (monofenolaz) aktivitesine bakıldığında (Şekil 4.9-a) 200 µg/ml konsantrasyondan sonrası için bir substrat doygunluğu yaşanmış ve inhibisyon aktivitesi stabilize olmuştur. Ancak 100 µg/ml konsantrasyona kadar linear bir inhibisyon gözlenmiştir. İnhibisyon değerleri üzerinden monofenolaz ve difenolaz aktivitesi için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Monofenolaz aktivitesi için inhibisyon IC₅₀ değeri 47,03±0,6 µg/ml; difenolaz aktivitesi için ise 77,34±0,83 µg/ml olarak elde edilmiştir.

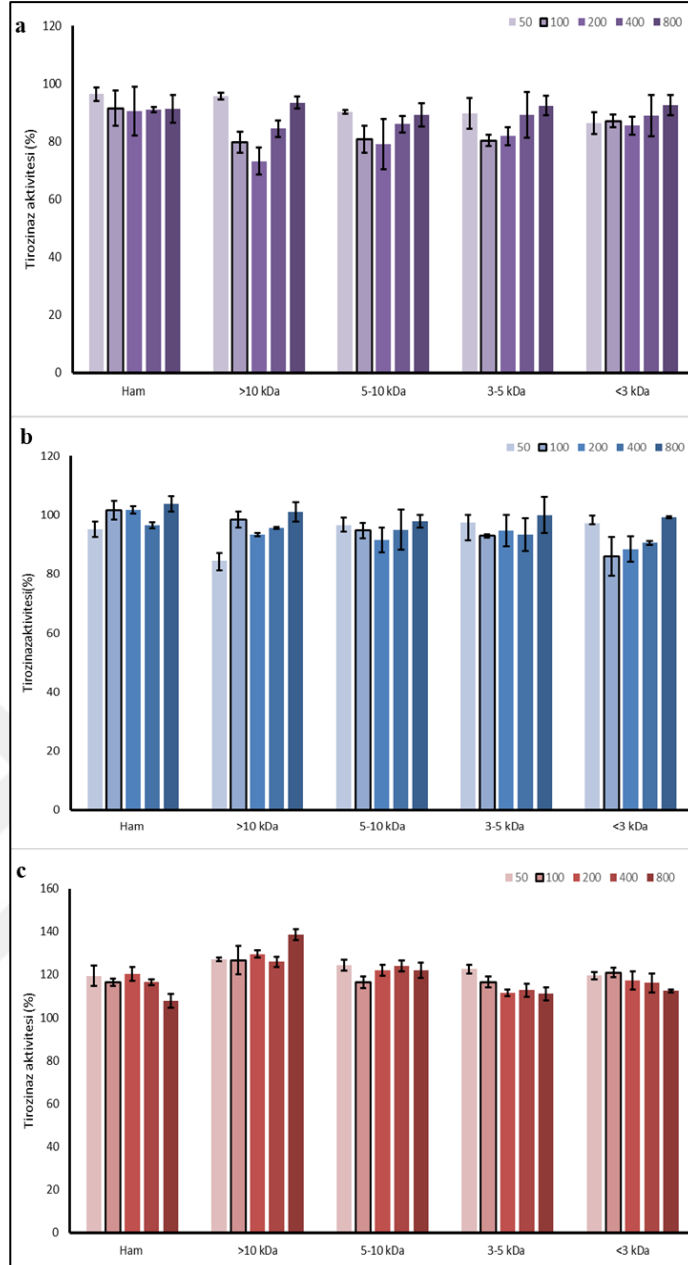
800 µg/ml konsantrasyonda monofenolaz aktivitesi için enzimin %88,54±0,84; difenolaz aktivitesi için ise %87,23 ±0,46 oranında inhibisyonu gözlenmiştir (Şekil 4.9b).



Şekil 4.9 Kojik asidin mantar tirozinaz enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitesine etkisi
a) doza bağlı inhibisyon değerleri (%), b) doza bağlı tirozinaz enzim aktivitesi (%)

S. platensis pankreatin (mor), tripsin (mavi) ve alkalaz (kırmızı) enzimleriyle yapılan hidroliz işlemlerinde boyut fraksiyonlarının tirozinaz enzimi üzerinde konsantrasyona bağlı etkisi Şekil 4.10'da sunulmuştur. Pankreatin ve tripsin hidrolizatlarında doza bağlı tirozinaz enzim inhibisyonları gerçekleşmemiştir. Her iki enzimin hem doz hem de boyut fraksiyonu olarak istatistiksel analiz işlemleri gerçekleştirildiğinde; dozun ve boyutun herhangi belirgin ve anlamlı etkisi olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Bazı dozlarda hafif de olsa azalmalar ya da enzim aktivitesinde artışlar gözlenirse de bu sonuçların tesadüfi olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca 800 µg/ml'nin üzerinde inhibisyon gerçekleşse dahi IC_{50} değerleri yüksek olacağı için tercih edilecek mantar tirozinaz inhibitörü ürünler arasına gireceği ise düşünülmemektedir.

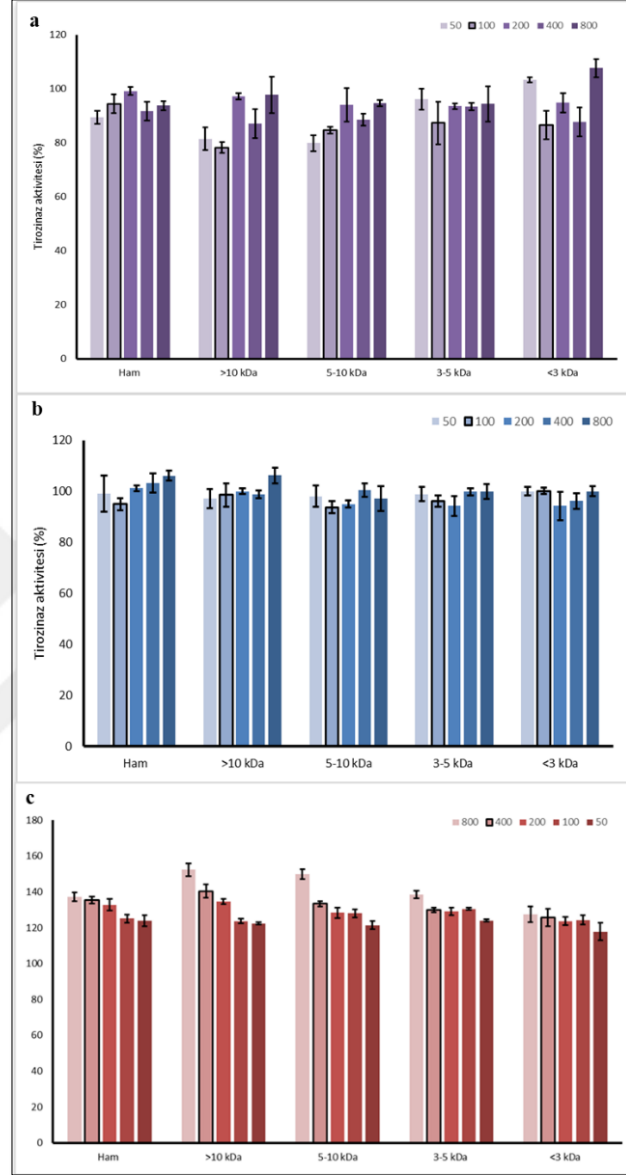
Pankreatin ve tripsin ile elde edilen sonuçların aksine, alkalaz enziminde doza ve hidrolizat tipine bağlı olmayan bir artış söz konusu olmuştur. Tirozinaz enzimi %10-30 aralığında aktive edilmiştir. Alkalaz enziminin kendi içerisinde anlamlı farklılık oluşturmadan ($p>0,05$) böyle bir artış elde edilse de pankreatin ve tripsin örnekleri ile kıyaslandığında alkalaz hidrolizatının mantar tirozinaz enzim aktivitesini dozdan bağımsız olarak bir miktar arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.10 *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi
a) pankreatin, b) tripsin, c) alkalaz

C. vulgaris'in pankreatin (mor), tripsin (mavi) ve alkalaz (kırmızı) enzimleriyle gerçekleştirilen hidrolizatlardan mantar tirozinaz enzimi üzerinde monofenolaz aktivitesine katkısı incelenmiştir (Şekil 4.11). *S. platensis* örneklerinde elde edilen sonuçlar gibi tripsin ve pankreatin örneklerinde mantar tirozinaz enzimi inhibisyonu gerçekleşmemişken ($p>0,05$), alkalaz ile yapılan denemelerde yine madde türü ve konsantrasyondan bağımsız olarak alkalaz hidrolizatı örneklerinin tirozinaz aktivasyonu yaptığı ($p>0,05$) gözlenmiştir. Her iki farklı örnek grubunda da alkalaz enzimine ait örneklerin aktivasyon yapmasının tesadüfi olmadığı ve alkalaz enziminin amino asit spesifitesine bağlı olarak elde edilen peptid C ve N terminal uçlarda yer alan amino asit birimlerine ve peptid

dizilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. *C. vulgaris* ve *S. platensis* için alkalaz enzimine ait tirozinaz aktivasyon değerleri karşılaştırıldığında; boyuta bağlı olarak gerçekleştirilen aktivasyonlar *C. vulgaris* açısından anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 4.11 *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi
a) pankreatin, b) tripsin, c) alkalaz

Çizelge 4.5'te *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in enzimatik hidrolizatlarının 800 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzim aktivitesine etkisi sunulmuştur. Görüldüğü üzere, pankreatin hidrolizatları genel olarak %1-11 değerlerinde enzim inhibisyonu sağlamış; tripsin hidrolizatlarında ise %6-7 değerlerinde aktivasyon ile %3-5 değerlerinde inhibisyon gözlenmiştir. Sonuçlar arasında en çok göze çarpan ise alkalaz hidrolizatlarının %10-40 aralığında aktivasyon yapmış olması ve bu

aktivasyon değerlerinin hem *S. platensis* hem de *C. vulgaris* hidrolizatlarının her birinde gözlenmiş olmasıdır.

Çizelge 4.5 *S. platensis* ve *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının 800 µg/ml konsantrasyonda mantar tirozinaz enzim aktivitesine etkisi

	<i>S. platensis</i>			<i>C. vulgaris</i>		
	Pankreatin	Tripsin	Alkalaz*	Pankreatin	Tripsin	Alkalaz*
Ham	91,34±4,81	103,82±2,6	107,88±3,2	93,72±1,70	106,17±2,0	123,84±3,0
>10 kDa	93,45±1,98	101,01±3,3	138,51±2,5	97,70±6,64	106,24±3,0	122,42±0,8
5-10 kDa	89,09±4,00	97,76±2,2	122,07±3,6	94,64±1,25	97,12±5,0	121,41±2,2
3-5 kDa	92,33±3,39	100,00±6,1	111,04±3,0	94,33±6,56	99,86±3,0	124,04±0,8
<3 kDa	92,53±3,57	99,28±0,4	112,39±0,6	107,59±3,38	100,07±2,0	117,88±4,8

“*” işaret alkalaz enziminin aktivasyon yaptığını ifade etmektedir.

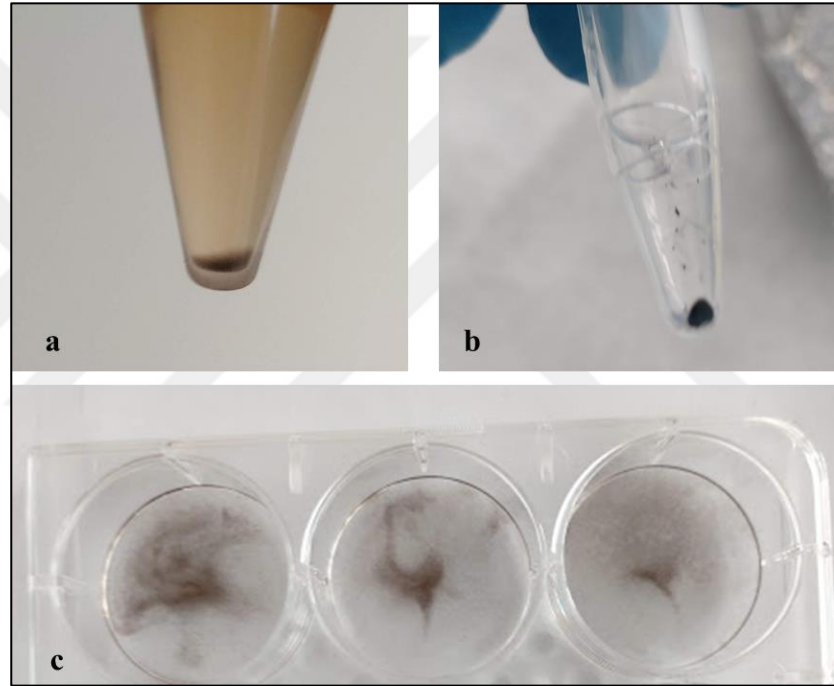
Sonuç olarak kojik asidin mantar tirozinaz inhibisyonu üzerinde monofenolaz ve difenolaz aktivitelerine bağlı olarak inhibisyon değerleri ve buna bağlı IC₅₀ dozları belirlenmiştir. Literatürde çalışma bazında kojik asidin IC₅₀ değerleri arasında değişkenlik gösterdiği fark edilmiştir (Casañola-Martín et al., 2007; Masuda et al., 2005; Prakot et al., 2015; Yoon et al., 2009). Bunun nedeni enzimin farklı üretimlere ait olması ve bazen ticari olsa da tirozinaz enzimi içerisinde yer alabilecek safsızlıklar ile alakalı olduğu bilinmektedir. Genel olarak mantar tirozinaz enzimi çalışmaları aynı lot ve katalog numarasına dahil enzim örneklerinden gerçekleştirildiği için, enzimin üretim serisine bağlı inhibisyon ölçümlerindeki farklılıklar elimine edilmiştir.

Mikroalgal protein hidrolizatlarında etkin bir monofenolaz inhibisyonu gözlenmediği için difenolaz aktivitesi tayini gerçekleştirilmemiştir. Mantar tirozinaz enzimine mikroalgal protein hidrolizatlarının etkisinin anlamlı olmaması, örneklerin direkt enzim inhibisyonu yapmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ancak, protein hidrolizatlarının belirgin bir antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle, hücresel tirozinaz enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüşlere neden olacağı düşünülmüştür.

4.3.2. Mikroalgal Hidrolizatların B16-F10 Hücre Canlılığına Etkisi

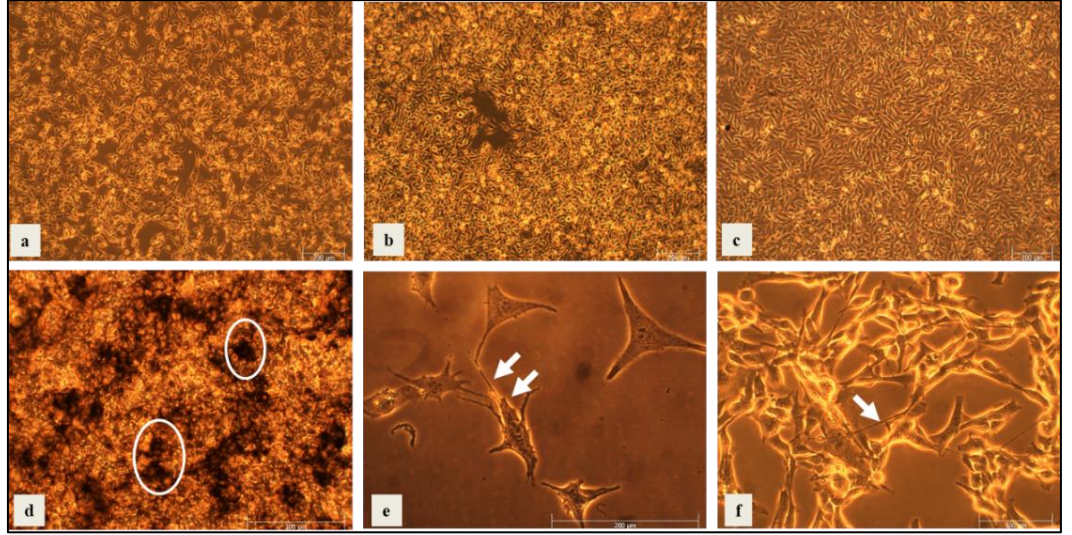
B16-F10 hücre hattı *Mus musculus* (fare) derisinden elde edilen melanoma hücre hattıdır (ATCC CRL-6475). Melanositler yüzeye bağlı, epitel benzeri

dendritik yapılara sahip hücrelerdir. Hiperpigmentasyon, tirozinaz enzim aktivitesi, hipopigmentasyon gibi olguların *in vitro* ve *in vivo* çalışılmasında kullanılan tümör hücre hattıdır. *In vitro* kültürleri oldukça kolaydır ve hücreler çok hızlı çoğalmaktadırlar (2 günden az sürede %80 konfülsans). İnsan ile melanojenik özellikleri oldukça benzer olduğu için genellikle maddelerin antimelanojenik etkilerinin incelenmesi ve pigmentasyon düzenleyici kozmesötik moleküllerin taranmasında kullanılmaktadır. Pasaj sayısı arttıkça hücrelerde melanin üretimine bağlı kararmalar meydana gelmektedir. Hem intraselüler hem de ekstraselüler melanin üretimi arttığı için kültür kabı yüzeyinde hücreler siyah olarak gözlenmektedir, besin ortamı rengi de koyu kahverengine doğru değişmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 B16-F10 hücrelerinin görüntüleri a) p/68 santrifüj sonrası görüntüsü, b) p/69 hücre lizisi sonrası melanince zengin hücre kalıntısı, c) p/69 madde uygulaması 72. saat sonunda plaka yüzeyinde B16-F10 hücreleri

B16-F10 hücreleri ile hücre canlılığı, melanin üretimi ve tirozinaz enzim aktivitesi üzerine çalışılmıştır. Pasaj sayısı çok artmasa dahi, pasajlar arasında melanin üretimi açısından farklılıklar olduğu için tüm deneyler p/69'da gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki mikroskop görüntülerinde B16-F10 hücrelerinin farklı günlerde ve farklı büyütme ölçeklerinde görüntüleri sunulmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 B16-F10 melanoma hücrelerinin mikroskop görüntüleri, a) 10x büyütmede 24 saat kültür sonrası görüntü (p/67), b) 10x büyütmede 48 saat kültür sonrası görüntü (p/67), c) 10x büyütmede 72 saat kültür sonrası görüntü (p/67), d) p/69 72 saat sonra oluşan melanin depoları, e) p/69 24 saat içerisinde hücrelerin dendritik yapıları, f) p/69 48 saat sonra hücrelerin görüntüsü

B16-F10 hücreleri dendritik yapıları (beyaz oklar, Şekil 4.13-e, f) ile birbirlerine tutunmakta ve kültür kabı yüzeyini kaplamaktadır. Özellikle 24 saat sonrasında hücre içerisinde siyah yapılı melanozom granülleri gözlenebilmektedir. 72 saat içerisinde ise hücrelerin içerisinde birikmeye başlayan melanin yapıları görülmeye başlamaktadır (Beyaz halkalar, Şekil 4.13-d). Yapılan çalışmalarda B16-F10 hücreleri melanin üretimi amacıyla herhangi bir stimülasyona uğratılmamıştır. Hücrelerin kendi metabolizmaları içerisinde aktive olan tirozinaz enzimi ve üretilen melanin miktarı temel alınmıştır. Bazı çalışmalarda (Balcos et al., 2014; Jang et al., 2012; Marini et al., 2012) α -MSH hormonu ile melanin üretimi stimüle edilse de hâlihazırda hücreler yüksek miktarda melanin üretebildiği için stimülasyona gerek duyulmamıştır.

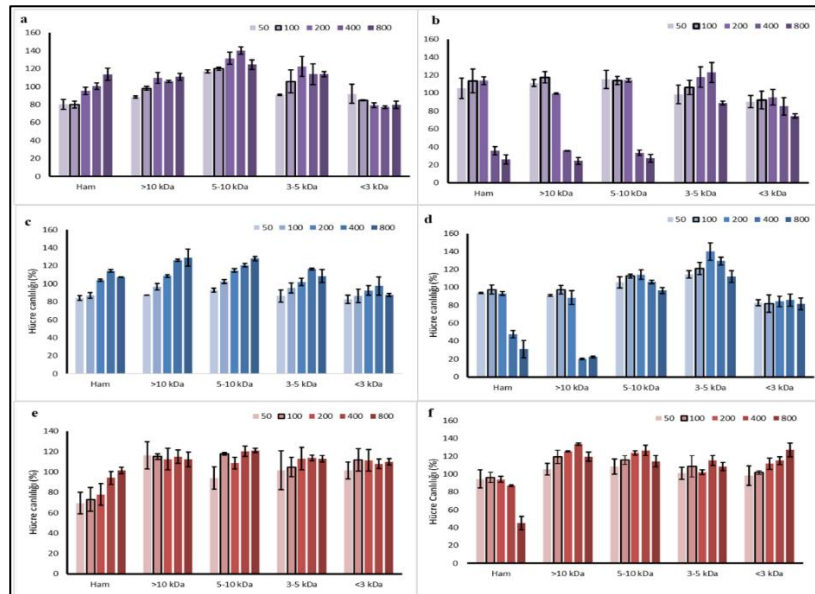
4.3.2.1. *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının hücre canlılığına etkisi

Protein hidrolizatlarının hücresel tirozinaz enzim aktivitesine ve melanin üretimlerine etkisini incelemekten önce; B16-F10 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri belirlenmiştir. Canlılık denemesi 50-800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında 48 ve 72 saat için incelenmiştir.

Genel olarak *S. platensis* protein hidrolizatları doza bağlı olarak hücre canlılığını arttıracak etki göstermiştir (Şekil 4.14). Pankreatin ve tripsin

hidrolizatlarında <3 kDa fraksiyonu haricinde 48 saat içerisinde büyüme ve canlılık %120 ve üzeri olarak hesaplanmıştır. İlginç bir şekilde pankreatin ve tripsin hidrolizatlarında 72. saatte 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlar için canlılık %40 değerinin altına inmiştir. 3-5 kDa fraksiyonu için artan dozlarda canlılık da doza uyumlu bir şekilde artarken, 800 µg/ml konsantrasyonunda canlılık %80-90 değerleri arasına gerilemiştir. Bu dozda hücre canlılığı önemli ölçüde azalmasa da 800 µg/ml konsantrasyonun hücelere olan negatif etkisi hem tripsin hem de pankreatin hidrolizatlarında gözlemlenmiştir. 72 saatte 800 µg/ml dozu yine pankreatin hidrolizatlarında <3 kDa örnekleri için canlılığı az da olsa azaltmış ama diğer dozlarda sitotoksik etkisi bulunmamıştır. 72. saat sonundaki sonuçlar için; dozun hücre canlılığına etkisinin anlamlı olduğu bulunmuş ($p<0,001$), ancak hidrolizat boyutunun canlılığa etkisi birbirinden anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tripsin hidrolizatlarında ise 3-5 kDa ve <3 kDa dozlarının 72. saati için dozun etkisi gözlenmiştir. 5-10 kDa hidrolizatlarında doza bağlı bir azalma olsa da etkisizdir. Ancak 3-5 kDa için canlılık 200 µg/ml konsantrasyonlarına kadar artış göstermiş, artan konsantrasyonlar canlılığın hızlı bir şekilde azalmasına neden olmuştur. <3 kDa örnekleri için ise doza bağlı sitotoksikite gözlenmemiştir. Tripsin hidrolizatları için hem boyutun ($p<0,001$) hem de dozun ($p<0,05$) hücre canlılığına etkisinin anlamlı olduğu yapılan istatistiksel analiz sonucunda saptanmıştır.



Şekil 4.14 *S. platensis* enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h

Alkalaz hidrolizatları için 48 saatte ham ekstrenin doza bağlı canlılık artışı yaptığı gözlenmiş ancak diğer fraksiyonlarda doza bağlı belirgin bir toksik etki kaydedilmemiştir. 72. saatte doğru ilerlediğinde ise artan ham ekstre dozu 800 µg/ml için canlılığı %60 değerlerine kadar azaltmış ancak diğer dozların etkisi olmamıştır. >10 kDa, 5-10 kDa ve <3 kDa örneklerinde ise doza bağlı canlılık artışları gözlenmiştir. İstatiksel analiz sonuçlarına göre; konsantrasyonun anlamlı bir etkisi gözlenmez iken ($p>0,05$), hidrolizat boyutunun hücre canlılığını etkilediği bulunmuştur ($p<0,001$).

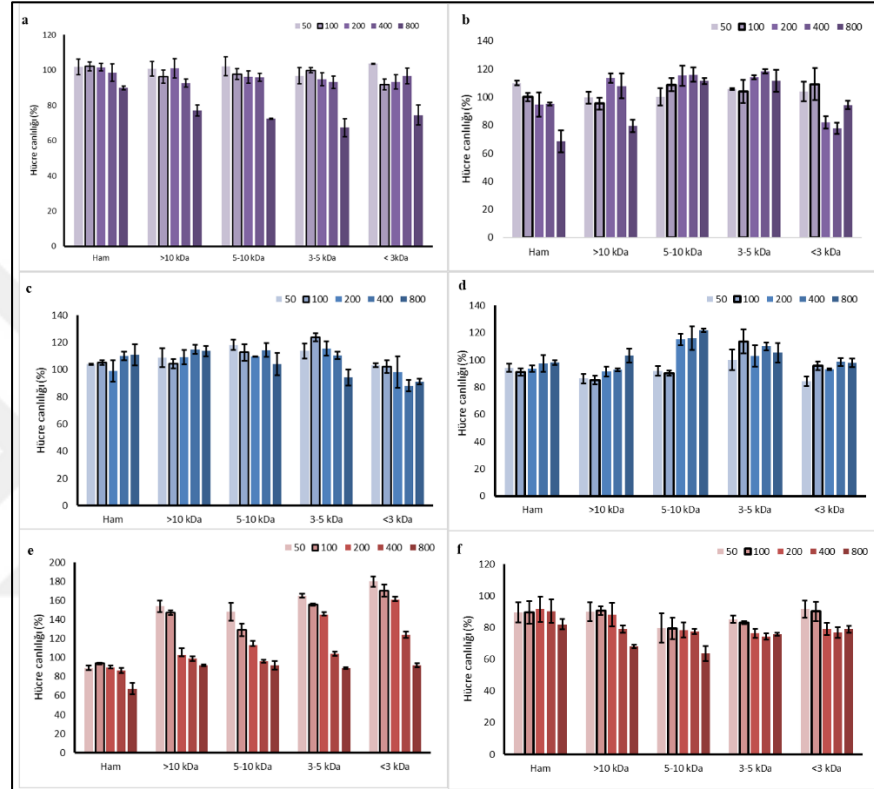
Genel olarak hidrolizatlarının doza bağlı toksik etkisi olmamıştır. <3 kDa fraksiyonları haricinde 72 saatte canlılık azalması gözlenmiştir. Ancak pankreatin, tripsin ve alkalaz için ham hidrolizatlarda görülen canlılık kayıpları yüksek olduğundan tirozinaz inhibisyon denemelerinde üst limit (alkalaz hidrolizi hariç) 200 µg/ml konsantrasyon olarak uygun görülmüştür.

4.3.2.2. *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının hücre canlılığına etkisi

S. platensis hidrolizatlarında olduğu gibi *C. vulgaris* pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatlarının da hücre canlılığına etkisi incelenmiştir (Şekil 4.15). Genel olarak 800 µg/ml konsantrasyonu dışında hidrolizatların hücre canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. Canlılık artışı 48 saatte daha hızlı iken 72 saat doğru ilerlendiğinde düşüşler gözlenirse de yine sitotoksik etkiye sahip olmadığı söylenebilir. 72. saatte meydana gelen ani canlılık düşüşleri hücrelerin çoğalma hızı nedeniyle kontak inhibisyona uğradığı yönündedir. Genel mikroskopik gözlemlerde hücrelerin bütünlüğünün bozulmadığı ve sağlıklı oldukları söylenebilir.

C. vulgaris protein hidrolizatlarında gözlenen, *S. platensis* aksine tripsin hidrolizatlarının canlılığa katkısının en yüksek olduğu bunu da alkalaz ve pankreatin enzimleri ile elde edilen hidrolizatların takip ettiği gözlenmiştir. Dozun etkisi 5 kDa'dan büyük hidrolizatlarda gözlenmiş ancak 3 kDa ve altı hidrolizatlar için doza bağlı canlılık değişimleri anlamlı farklılıklara neden olmamıştır. Canlılık stabilitesi gün ve doza bağlı olarak incelendiğinde; tripsinin genel olarak canlılığı arttırdığı ama doza bağlı olarak bu durumun değişmediği gözlenmiştir. Pankreatin için dozun ve boyutun anlamlı etkisi bulunmaz iken ($p>0,05$); tripsin için dozun ($p<0,05$) ve boyutun ($p<0,001$) anlamlı etki gösterdiği bulunmuştur.

Alkalaz enzimi denemelerinde ise 48 saatte düşük dozlarda hücre canlılığının %170 değerlerine ulaştığı gözlenirse de bu değerler 72 saatte azalmış ve %80-90 aralığında seyretmiştir. Belirgin bir toksisite etkisi gözlenmese de 800 µg/ml konsantrasyonlarda gerçekleşen düşüşler nedeniyle hücresel tirozinaz aktivitesi çalışmalarında 200 µg/ml konsantrasyonu üst limit olarak belirlenmiştir. Alkalaz için ise yine dozun ($p<0,001$) ve boyutun ($p<0,05$) anlamlı etkisi gözlenmiştir.

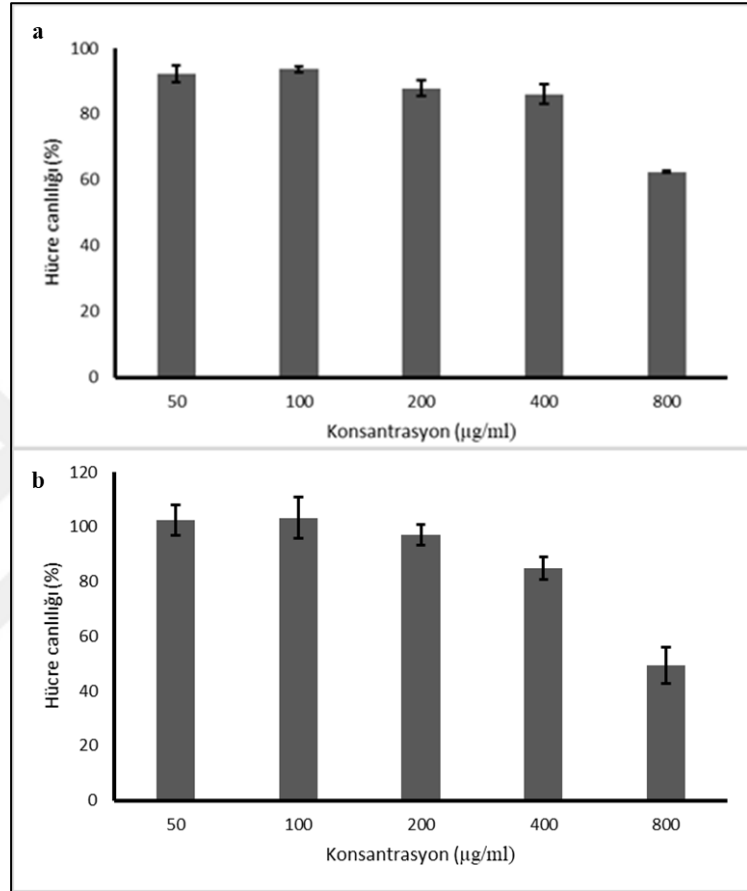


Şekil 4.15 *C. vulgaris* enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h

4.3.2.3. Kojik asidin hücre canlılığına etkisi

Tirozinaz inhibisyonu için referans molekül olan kojik asidin B16-F10 hücrelerinin canlılığına etkisi incelenmiştir (Şekil 4.16). Dozun toksik etkisi 72 saat sonunda oldukça net bir şekilde gözlenebilmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.16-b). 72 saatin sonunda özellikle 800 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı $\%49,40\pm4,21$ 'dur. Yaklaşık %50 canlılık kaybı aslında literatürlerde de ifade edildiği üzere kojik asidin toksisitesine dikkat çekmektedir (Hsiao et al., 2014; Momtaz et al., 2008; Pillaiyar et al., 2017a). 200 µg/ml konsantrasyonda ise canlılık $\%97,00\pm7,49$ olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle hücresel tirozinaz ve melanin inhibisyon denemeleri

için üst limit 200 µg/ml olacak şekilde doz ayarlaması gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değeri ise 808,64±5,48 µg/ml'dir ki aslında bu konsantrasyon mantar tirozinaz enziminde görülen monofenolaz ve difenolaz inhibisyon IC₅₀ değerlerinin üzerinde kalmaktadır. Yine de toksisitesinin bu derece belirgin olması alternatif tirozinaz inhibitörlerinin arayışını haklı kılmaktadır.



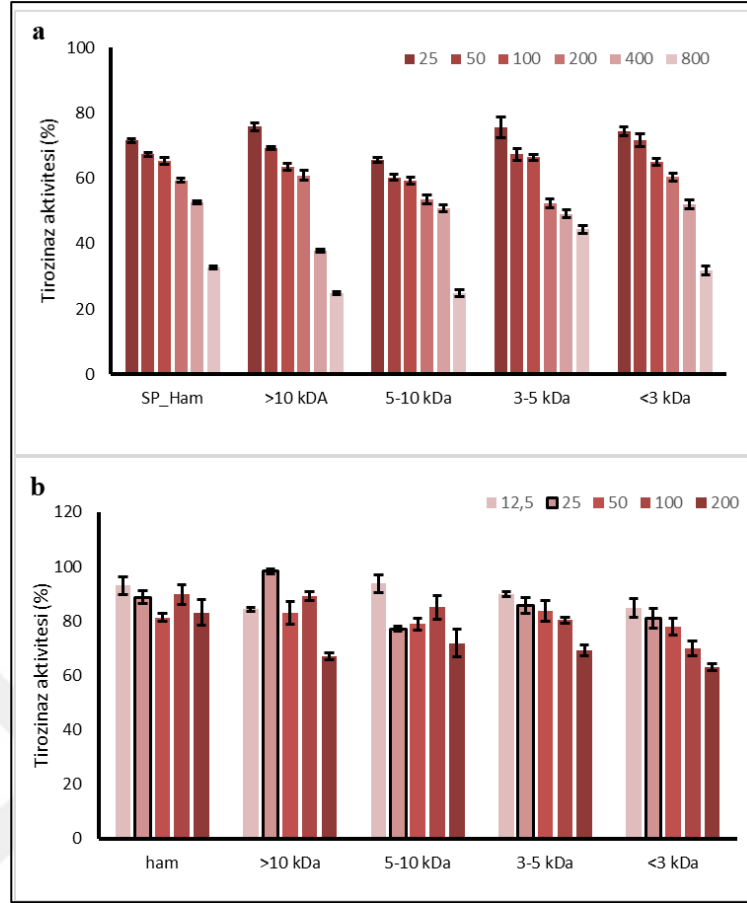
Şekil 4.16 Kojik asidin B16-F10 hücre canlılığına etkisi a) 48 saat, b) 72 saat

4.3.3. B16-F10 Hücresel Tirozinaz Aktivitesi

Mantar tirozinaz enzimi moleküllerin tirozinaz enzim aktivitesine etkisinin ölçülmesinde referans olarak kullanılsa da mantar tirozinaz inhibisyonu vermeyen moleküller insan ya da fare tirozinaz inhibisyonu ile sonuçlanabilmektedir (Balcos et al., 2014; Wu et al., 2011). İnsan ve mantar tirozinaz enzimi %22 homoloji göstermektedir (Hsiao et al., 2014). Bu sebeple, *in vitro* ve *in silico* çalışmalarda fare melanoma hatlarında tirozinaz inhibisyonu denemeleri sıklıkla gerçekleştirilmektedir.

Çalışmanın bu kısmında *S. platensis* ve *C. vulgaris*'ten elde edilen enzimatik hidrolizatlara ait boyut fraksiyonları 12,5-200 µg/ml konsantrasyonlarında B16-F10 hücre hatlarına uygulanmıştır. Pankreatin, alkalaz ve tripsinden elde edilen hidrolizatların tirozinaz enzim aktivitesine etkisi incelenmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Alkalaz enzimi ile elde edilen hidroliz işleminde *S. platensis* için doza ve hidrolizat boyutuna bağlı olacak şekilde tirozinaz inhibisyonu gerçekleştirdiği gözlenmektedir (Şekil 4.17-a). *S. platensis* hidrolizatlarının herhangi bir sitotoksiste göstermemesi neticesinde 25-800 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. 800 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz aktivitesi %24-%45 arasında değişiklik göstermektedir. Ancak doza bağlı inhibisyonun etkisi oldukça nettir ($p < 0,001$). 3-5 kDa boyut aralığında 800 µg/ml konsantrasyonda %60 civarında inhibisyon sağlanmış; onun dışındaki hidrolizatlarda bu inhibisyon değeri %70-80 aralığında değişiklik göstermiştir. Dozun her hidrolizat boyutu için etkisi gözlenirse de örneklerde boyut farklılığının anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). *S. platensis*'in aksine *C. vulgaris*'in alkalaz hidrolizatında doza ve boyuta bağlı olarak tirozinaz inhibisyonu anlamlı ölçüde konsantrasyon ve boyuttan etkilenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.17-b). Ancak; *S. platensis* ve *C. vulgaris* kendi aralarında kıyaslandığında; *S. platensis* için tirozinaz inhibisyonu *C. vulgaris* 'e kıyasla anlamlı ölçüde farklılık göstermiştir (200 µg/ml konsantrasyon değerleri için $p < 0,05$). *C. vulgaris* için ham hidrolizatta belirgin bir tirozinaz inhibisyonu gözlenmemiştir. Fark 3-5 kDa ile <3 kDa fraksiyonunda dozun etkisine bağlı olarak sağlanabilmiştir ancak özellikle <3 kDa örneğinde doz arttıkça inhibisyon değeri artmıştır. Mantar tirozinaz enzimi ile yapılan denemelerde alkalaz enzimi %10-30 arasında aktivasyona neden olmuştur ancak hücrel tirozinazın inhibisyon ile sonuçlandığı açıkça gözlenmektedir.



Şekil 4.17 Alkalaz hidrolizatlarının B16-F10 tirozinaz aktivitesine etkisi; a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris*

DPPH ile yapılan antioksidan aktivite tayinine bakıldığında, antioksidan aktivite ile tirozinaz inhibisyonunun alkalaz hidrolizinde birbirlerine bağlı olmadığı gözlenmiştir. <3 kDa örneğinde *S. platensis* için $250 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda $10,16 \pm 0,34 \% \text{RSA}$; *C. vulgaris* için ise $16,74 \pm 0,98 \% \text{RSA}$ değeri bulunmuştur. $200 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda ise tirozinaz inhibisyonu <3 kDa örneğinde *S. platensis* ve *C. vulgaris* için sırasıyla $\%39,61 \pm 1,27$ ve $\%37,1 \pm 1,33$ 'tür. Her iki mikroalg için de <3 kDa boyutlarında inhibisyon değerleri birbirleriyle neredeyse eşdeğerdir. Alkalaz hidrolizatı göstermiştir ki boyut küçüldükçe tirozinaz inhibisyonuna hidrolizatın türü ve boyutunun etkisi azalmıştır.

Çizelge 4.6'da *S. platensis* ve *C. vulgaris* biyokütlesinden alkalaz enzimi ile elde edilen % tirozinaz inhibisyon değerleri sunulmuştur. *C. vulgaris* hidrolizatı için IC_{50} değerleri hesaplanamamıştır. Her iki biyokütle için ham ekstratlar kıyaslandığında; *S. platensis* 2 kat daha yüksek inhibisyon göstermiştir. Bu inhibisyon nedeninin biyokütlede bulunan fikosiyenin miktarlarıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. *C. vulgaris*'e bakıldığında hidrolizat boyutlarının küçülmesi tirozinaz inhibisyon değerini arttırmışken, *S. platensis* için <10 kDa boyutlarında

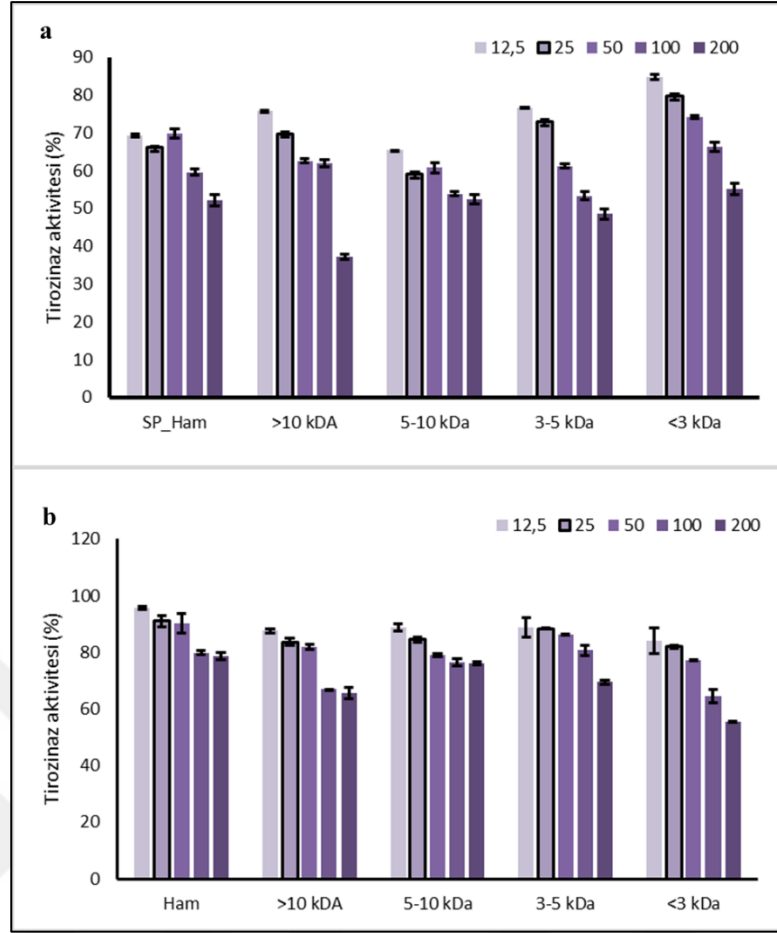
etkisi olduğu söylenebilmektedir. Genel olarak ise *S. platensis* IC₅₀ değerlerine bakıldığında 3-5 kDa fraksiyonu hariç IC₅₀ değerleri 500 µg/ml değerinin altındadır.

Çizelge 4.6 *S. platensis* ve *C. vulgaris* mikroalglerinden alkalaz hidrolizi sonucu elde edilen IC₅₀ ve % tirozinaz inhibisyon değerleri

	<i>S. platensis</i>		<i>C. vulgaris</i>
	IC ₅₀ (µg/ml)	%Tirozinaz inhibisyonu (200 µg/ml)	%Tirozinaz inhibisyonu (200 µg/ml)
Ham	481,59±2,65	40,57±3,18	16,88±4,77
>10 kDa	380,14±1,79	39,11±1,75	32,90±1,23
5-10 kDa	290,74±2,38	46,42±1,24	28,18±5,07
3-5 kDa	561,22±3,27	47,69±1,27	30,90±1,95
<3 kDa	438,22±1,49	39,61±5,43	37,05±1,33

Şekil 4.18’de *S. platensis* (a) ve *C. vulgaris* (b) pankreatin hidrolizatları için tirozinaz aktivitesi değerleri sunulmuştur. *S. platensis* denemesinde her bir fraksiyonun doza bağlı olarak tirozinaz enzim aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği görülmektedir ($p<0,05$). Moleküler ağırlığı yüksek fraksiyonlarda dozun etkisi doza bağlı düzenli bir inhibisyona neden olmasa da moleküler boyut düştükçe (<5 kDa) tirozinaz enzimi inhibisyonu için konsantrasyonun etkisi daha net gözlenmiştir. 12,5 µg/ml konsantrasyonda dahi tirozinaz enzim aktivitesi %20-30 arasında azalmıştır. 10 kDa’dan büyük hidrolizatlar için 200 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzim aktivitesi %38,18±0,75 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.7’de 200 µg/ml konsantrasyon için % tirozinaz enzim inhibisyon değerleri sunulmuştur. >10 kDa fraksiyonları haricindeki örneklerde tirozinaz enzim aktivitesi %70’in altına düşmüştür.

C. vulgaris örneklerinin *S. platensis* hidrolizatlarına göre tirozinaz inhibisyonu etkisi 200 µg/ml konsantrasyonu için incelendiğinde anlamlı ölçüde düşüktür ($p<0,05$). <3 kDa örneğine kadar özellikle 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında aktivite %60 ve altına gerilemiş ancak 100 µg/ml konsantrasyonundan daha düşük değerlerde ise dozun etkisi belirgin olmamıştır. <3 kDa konsantrasyonunda ise doza bağlı bir düşüşü gözlenmiş ve 200 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz aktivitesi en düşük değerine (%55,43±0,23) ulaşmıştır. *C. vulgaris* pankreatin hidrolizatları kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise boyut ve konsantrasyonun inhibisyona etkisi olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).



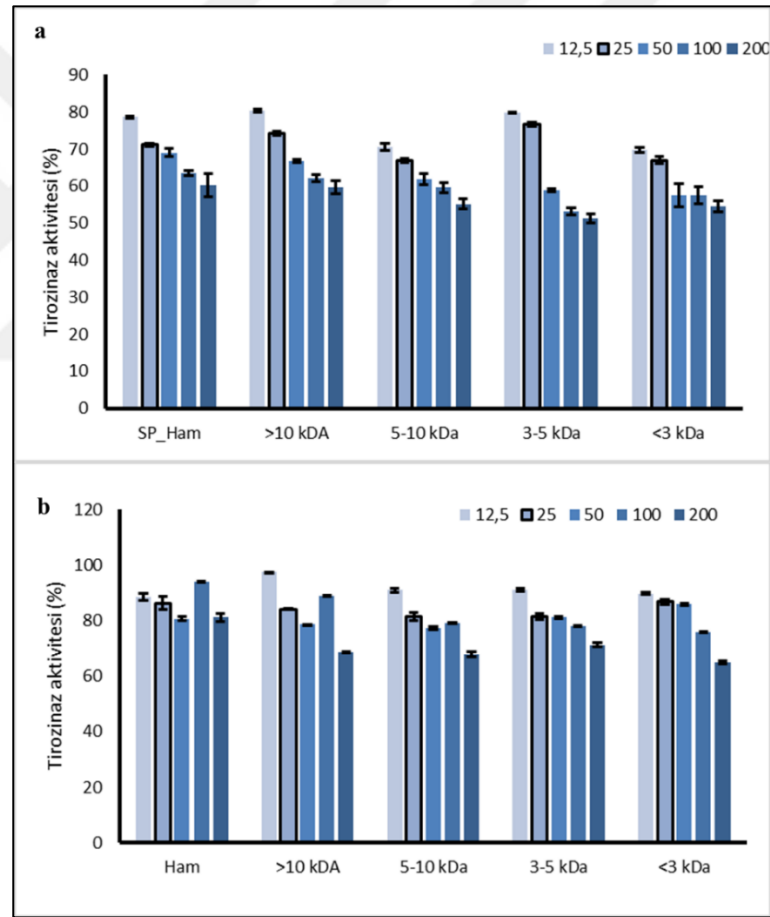
Şekil 4. 18 Pankreatin hidrolizatlarının B16-F10 hücresel tirozinaz aktivitesine etkisi a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris*

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere, pankreatin hidrolizatları içerisinde en yüksek tirozinaz inhibisyonu *S. platensis* >10 kDa fraksiyonunda gerçekleşmiş; bunu 3-5 kDa fraksiyonu takip etmiştir. Her iki mikroalg için <3 kDa fraksiyonlarında aynı inhibisyon değerleri gözlenmiştir. Pankreatin hidrolizatları için boyutun tirozinaz enzim inhibisyonuna etkisi her iki mikroalg türü için de anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4. 7 *S. platensis* ve *C. vulgaris* pankreatin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda %tirozinaz inhibisyon değerleri

%Tirozinaz inhibisyonu (200 µg/ml)		
	<i>S. platensis</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ham	47,81±1,45	21,46±2,10
>10 kDa	62,82 ±0,80	34,33±0,56
5-10 kDa	47,58±1,24	24,03±0,75
3-5 kDa	51,48±1,27	30,47±0,23
<3 kDa	44,80±1,43	44,57±1,24

Tripsin hidrolizatları için elde edilen tirozinaz enzim aktivitesi sonuçları şekil 4.19'da sunulmuştur. Tripsin hidrolizatlarında *S. platensis* için (Şekil 4.19-a) sonuçlar pankreatin hidrolizatları ile kıyaslandığında farklı bir trend vermiştir. Alkalaz hidrolizatlarında her örnek için dozun enzim inhibisyonuna katkısı birbiriyle bağlantılı olmuş ($p<0,001$), pankreatin hidrolizatları için ise bu bağlantı <5 kDa boyutları için gözlenebilmiştir. Ancak tripsin hidrolizatlarında <3 kDa fraksiyonu haricinde doza bağlı aktivite gözlenmiş olsa da ($p<0,001$) bu fraksiyon için dozun $50 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları üzerinde inhibisyona katkısı anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). *C. vulgaris* tripsin hidrolizatlarında (Şekil 4.19-b) düzensiz enzim aktivitesi sonuçları gözlenmiştir. Ham ekstre haricinde $200 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda aktivite düşüşleri bulunmuş, lakin $<3\text{kDa}$ dozu haricinde ise diğer dozlar aktiviteye anlamlı bir etki göstermemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4. 19 Tripsin hidrolizatlarının B16-F10 hücresel tirozinaz aktivitesine etkisi a) *S.platensis*, b) *C. vulgaris*

Çizelge 4.8'de $200 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları için *S. platensis* ve *C. vulgaris*'e ait tripsin hidrolizatlarında tirozinaz enzimi inhibisyonu (%) hesaplanmıştır. *S. platensis*'in *C. vulgaris*'e göre inhibisyon değerleri %10-20 oranında artış gösterse

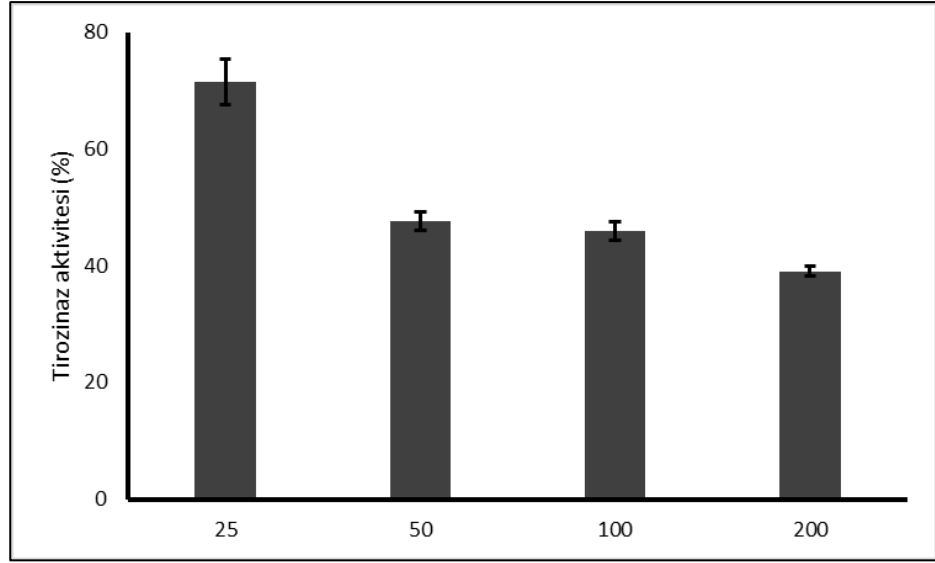
de her iki hidrolizat için boyutun tirozinaz enzimi inhibisyonuna anlamlı bir katkısı olmadığı bulunmuştur. *C. vulgaris* için ise <3 kDa fraksiyonu (*C. vulgaris* tripsin hidrolizatı örnekleri için) en yüksek tirozinaz inhibisyon değerine ulaşmıştır.

Genel olarak 200 µg/ml konsantrasyonları için *C. vulgaris* pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatlarının tirozinaz enzimine katkısı incelendiğinde, boyutların birbirleriyle anlamlı ölçüde tirozinaz inhibisyonu yapmadığı saptansa da ($p>0,05$) enzimlerin tirozinaz inhibisyonuna etkili olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). *S. platensis* için 200 µg/ml konsantrasyon verileri incelendiğinde; boyut ve enzimlerin tirozinaz enzim inhibisyonuna katkısı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tripsin, pankreatin ve alkalaz için değerlendirildiğinde ise, *S. platensis*'in *C. vulgaris*'e göre inhibisyon değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4. 8 *S. platensis* ve *C. vulgaris* tripsin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda %tirozinaz inhibisyon değerleri

%Tirozinaz inhibisyonu (200 µg/ml)		
	<i>S.platensis</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ham	39,72±3,18	18,88±1,44
>10 kDa	40,42±1,75	31,33±0,92
5-10 kDa	44,80±1,43	32,19±0,68
3-5 kDa	48,72±1,27	28,76±0,54
<3 kDa	45,49±1,24	35,19±0,15

Referans olarak kullanılan kojik asit için 25-200 µg/ml değerleri arasında çalışılmıştır (Şekil 4.20). Elde edilen değerlere bakıldığında 200 µg/ml konsantrasyonda %70±2,3 değerinde tirozinaz inhibisyonu sağlanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca IC_{50} değeri ise 123,48±3,84 µg/ml'dir. Referans molekülün IC_{50} değerleri ile kıyaslandığında *S. platensis* alkalaz hidrolizatının peptid tirozinaz inhibitörleri arasında yer alabileceği düşünülmektedir. Kojik aside göre *C. vulgaris* hidrolizatlarından elde edilen inhibisyon değerleri anlamlı bir fark yaratmamışken ($p>0,05$); *S. platensis* için özellikle alkalaz hidrolizatları kojik aside eş değer seviyede inhibisyon değerlerine ulaşmıştır.

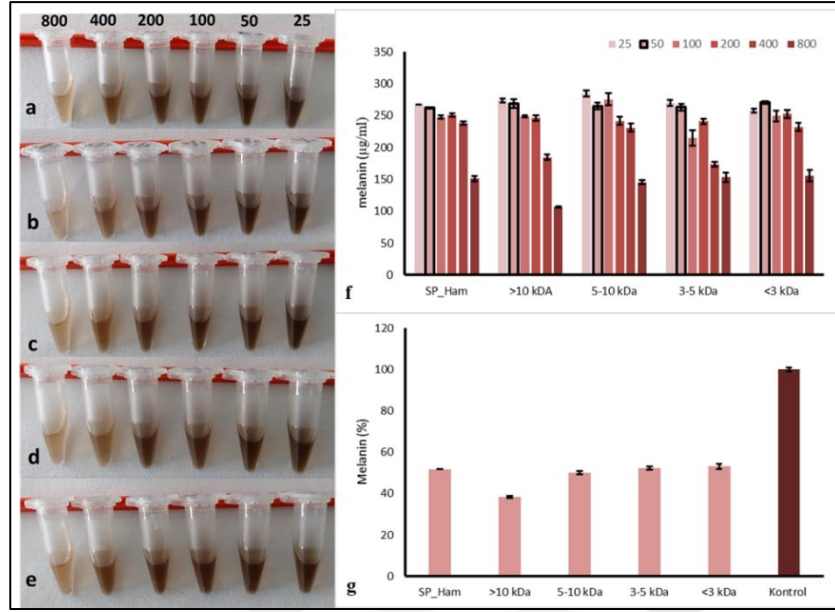


Şekil 4.20 Kojik asit için B16-F10 hücre hatlarında tirozinaz inhibisyon değerleri

Genel olarak mikroalgal proteinlerin enzimatik hidrolizatları tirozinaz inhibisyonu açısından umut verici sonuçlara sahiptir. Bu aşamada enzimin ve protein kaynağının tirozinaz enzim aktivitesine etkisi net olarak gözlenmiştir.

4.3.4. Melanin üretimi

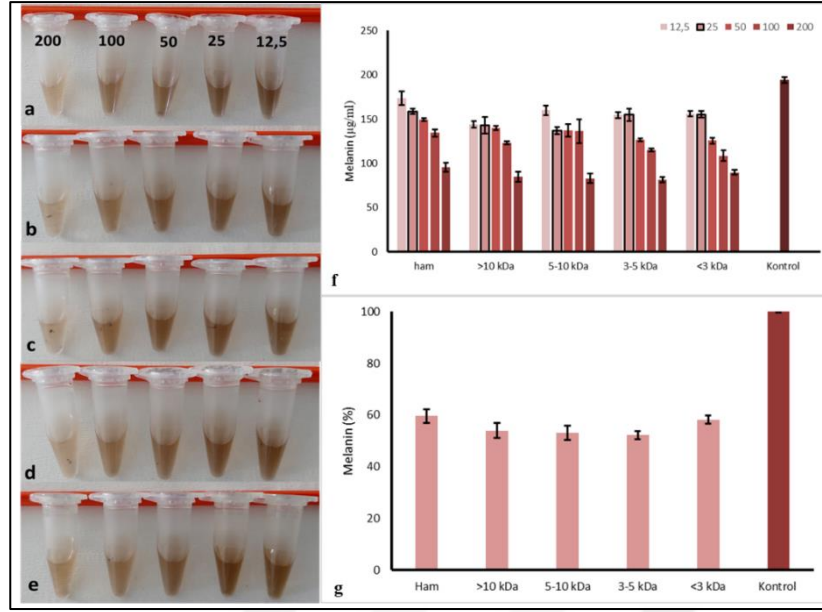
B16-F10 hücrelerinde mikroalgal protein hidrolizatların melanin üretimine etkisi incelenmiştir. Tirozinaz enziminin son ürünü olan melanin inhibisyonu uygulanan protein hidrolizatlarının nihai etkisini göstermektedir. Şekil 4.21’de görüldüğü üzere *S. platensis*’in alkalaz enzimiyle elde edilen hidrolizatlarından doza bağlı melanin miktarları (µg/ml) ölçülmüştür. Melanin miktarlarındaki değişim tirozinaz enzimi aktivitesiyle ilişkili olarak doza bağlı şekilde azalmıştır ($p < 0,05$). Bu azalma 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarında fark edilirken 400 µg/ml konsantrasyonun altında önemli bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol örneklerinden elde edilen melanin miktarı $444,59 \pm 1,3$ µg/ml iken, 800 µg/ml konsantrasyonda bu değerler yarı yarıya azalmış ve melanin üretim aktivitesi %55’in altına düşmüştür. Ancak 200 µg/ml konsantrasyonları incelendiğinde ise boyutun melanin üretimine etkisi anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4.21 *S. platensis* alkalaz hidrolizatlarının melanin üretimine etkisi; a) Ham, b) >10 kDa, c) 5-10 kDa, d) 3-5 kDa, e) <3 kDa, f) doza bağlı melanin miktarları (µg/ml), g) 800 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%)

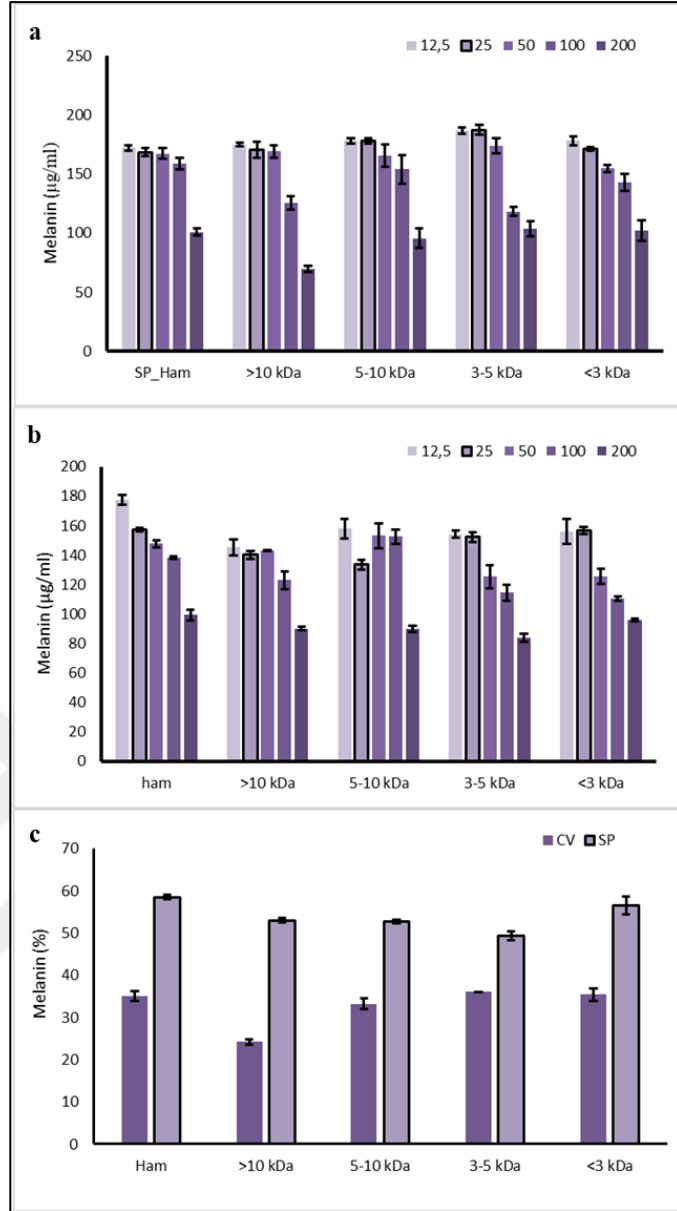
C. vulgaris ile elde edilen alkalaz hidrolizatlarından melanin üretimi Şekil 4.22’de sunulmuştur. Melanin üretimi tirozinaz enzim inhibisyonunun aksine uygulanan doza bağlı olarak linear bir azalma göstermiştir ($p < 0,05$). Boyuttan bağımsız olarak 200 µg/ml uygulanan konsantrasyonda melanin üretim miktarları birbiriyle aynıdır ve boyutun anlamlı bir etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Melanin üretimi %40-50 seviyelerinde inhibe edilmiştir. Melanin içeren ependorf fotoğraflarından (Şekil 4.22, a-e) görüldüğü üzere melanin miktarları bir hayli azalmış, doz arttıkça renk kahverengiden açık kahverengi sarımsı bir renge dönüşmüştür. Kontrol örneğinde $169,87 \pm 0,40$ µg/ml konsantrasyonda melanin miktarı elde edilmiştir. Bu değer %100 olarak görecelendirildiğinde, *C. vulgaris* alkalaz hidrolizatlarının melanin üretimini $44,6 \pm 2,9$ değerinde inhibe ettiği gözlenmiştir.

C. vulgaris alkalaz hidrolizatı tirozinaz enziminin inhibisyonuna katkısı melanin üretimi inhibisyonuna katkısından düşük olmuştur. Melanin üretimi inhibisyonunun daha etkili gözlenmesi bu hidrolizatların direkt tirozinaz metabolizması ile alakalı değil de belki melanazom transferi, melanin salgılanması ve taşınması gibi metabolik aktivitelerde blokajları yaratabileceği yönündedir.



Şekil 4.22 *C. vulgaris* alkalaz hidrolizatlarının melanin üretimine etkisi; a) Ham, b) >10 kDa, c) 5-10 kDa, d) 3-5 kDa, e) <3 kDa, f) doza bağlı melanin miktarları (µg/ml), g) 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%)

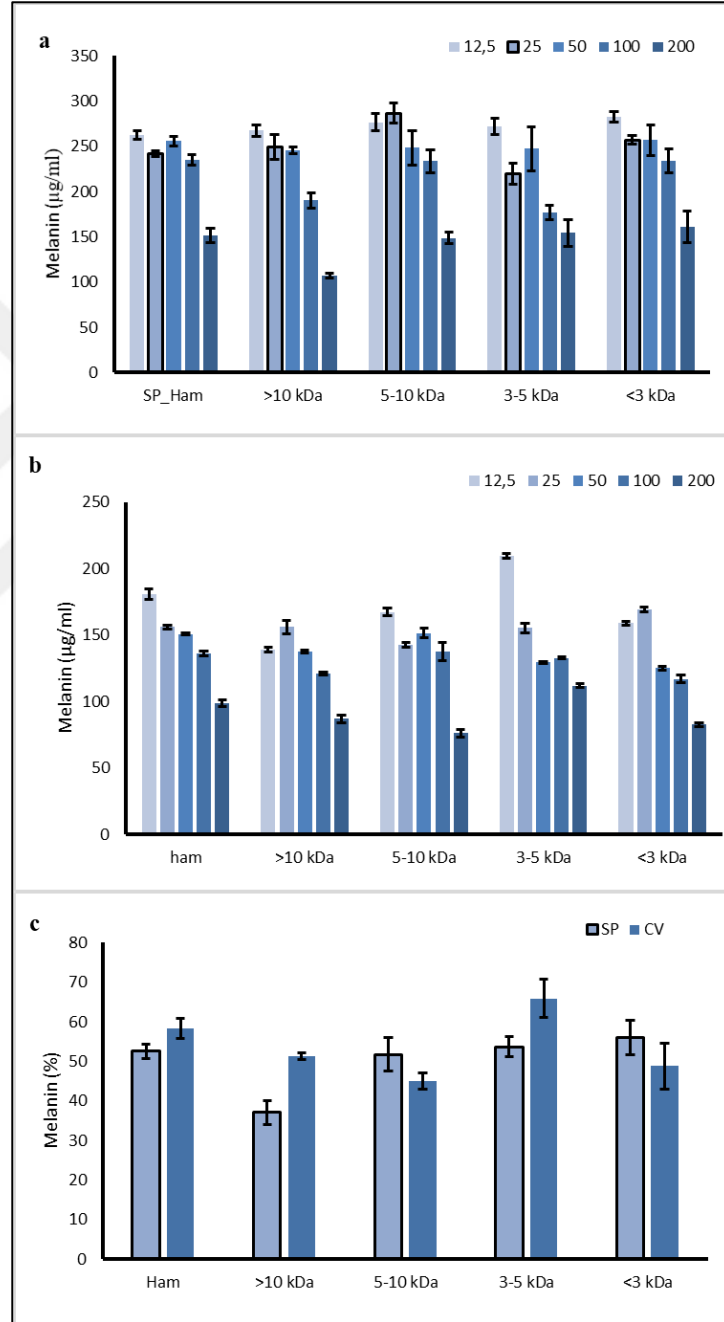
Pankreatin hidrolizi sonucu elde edilen melanin miktarları Şekil 4. 23'te sunulmuştur. Genel olarak her bir hidrolizatın 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretim miktarlarını azalttığı net bir şekilde gözlenmektedir. *S. platensis* için (Şekil 4.23-a) >10 kDa fraksiyonunda en az melanin üretimi gerçekleşmiştir. Melanin üretimleri tirozinaz enzimi aktivitesi ile uyumlu sonuçlar vermiştir. *S. platensis* >10 kDa fraksiyonunda tirozinaz enzim aktivitesi en düşük iken melanin üretimleri de en düşük sonuca ulaşmıştır. Sonuçlar *C. vulgaris* için değerlendirildiğinde aynı maddenin dozlar arasında bir, takım dalgalanmalar gözlenirse de genel olarak doza bağlı melanin miktarlarında azalmalar gözlenmiştir. Pankreatin hidrolizatlarında melanin üretimleri tirozinaz enzim aktivitesi ile uyumlu seyretmiştir. *S. platensis* çini dozun etkisi ($p < 0,001$) ve boyutun etkisi ($p < 0,05$) anlamlı ölçüde melanin üretiminin inhibe ederken; tripsin için inhibisyon etkisi sadece doza bağlı olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 200 µg/ml konsantrasyonları için pankreatin hidrolizatları incelendiğinde *S. platensis*'in melanin miktarını *C. vulgaris*'e kıyasla inhibe etme kapasitesi yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 4. 23 Pankreatin hidrolizatlarının hücresel melanin üretimine etkisi a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris*, c) *S. platensis* ve *C. vulgaris* için 200 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimleri (%)

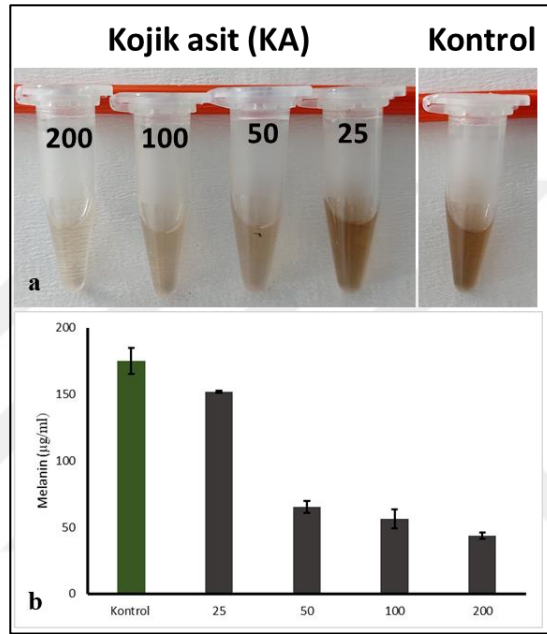
Tripsin hidrolizatları incelendiğinde, melanin üretimleri açısından *C. vulgaris* ve *S. platensis* hidrolizatlarının hepsinde gözle görülür ve dozlar arası anlamlı melanin üretim farklılıkları göze çarpmaktadır. Ancak Şekil 4.24-c incelendiğinde 200 µg/ml konsantrasyonda her iki tür için tripsin hidrolizatlarında anlamlı bir farklılık sağlanmamış ve enzimin ve tür farkının etkisi tripsin hidrolizatlarında gözlenmemiştir. Genel değerlendirilme yapıldığında enzim ve proteinden farksız olarak her bir örneğin 200 µg/ml konsantrasyonda melanin miktarını %50-60 azalttığı gözlenmiştir ki mikroalgal protein hidrolizatlarının toksik olmaması ve buna rağmen çok düşük konsantrasyonlarda melanin üretiminin %50'ye varan değerlerde azaltılması, mikroalgal protein hidrolizatlarının üzerinde araştırılmaya değer yenilikçi tirozinaz ve melanogenez inhibitörleri olduğunu ortaya koymuştur.

S. platensis için doz ve boyut anlamlı olarak melanin üretimin inhibe etmiştir ($p<0,05$). Ancak; *C. vulgaris* için dozun etkisi gözlemlense de boyutun etkisi anlamlı bulunmamıştır ($P<0,05$). 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları için ise tripsin her iki biyokütleden elde edilen hidrolizatlar için anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($p>0,05$). Alkalaz dışında ise pankreatin ve tripsin için biyokütleler kendi içerisinde kıyaslandığında etkili bir fark yaratmadığı; pankreatin ve tripsinin melanini benzer ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur.



Şekil 4. 24 25 Tripsin hidrolizatlarının hücresel melanin üretimine etkisi a) *S. platensis*, b) *C. vulgaris*, c) *S. platensis* ve *C. vulgaris* için 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda melanin üretimleri (%)

Referans olarak kullanılan kojik asidin de melanin üretimine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.25). Hücreler 200 µg/ml konsantrasyonda neredeyse tüm renklerini kaybetmişlerdir (Şekil 4.18a). Kojik asit ve kontrol kıyaslandığında, 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretiminin %60 inhibisyona uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.25-b). Kontrol değeri ile kıyaslandığında; doza bağlı olarak melanin üretiminde dramatik bir azalma meydana gelmiştir. Mikroalgal protein hidrolizatlarının 200 µg/ml konsantrasyonda melanin üretimi yüzdeleri kıyaslandığında kojik asit ile farklı bulunmamıştır.



Şekil 4.26 Kojik asidin melanin üretimine etkisi a) melanin görselleri, b) doza bağlı melanin miktarı (µg/ml)

4.4. Fikosiyanin Peptidleri

Fikosiyanin, floresans ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle gıda ve biyoteknolojide sıklıkla kullanılan doğal bir pigmenttir. Çoğunlukla *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyanin pek çok önemli özellik göstermektedir. Radikal süpürme aktivitelerinin yanı sıra güçlü bir immünomodülatör bileşiktir. Enflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi kontrol altında tutar ve azaltır. Kanseri hücrelerinde apoptozu indükler, yara iyileştirme özelliği gösterir. Ayrıca hayvan beslemesi ile yapılan çalışmalarda oral sağlanan fikosiyaninin hepatotoksisiteyi minimize ettiği bulgularına rastlanmıştır. Nörodejeneratif hastalıkların iyileştirilmesinde, bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların mücadelesinde de kullanılan bir proteindir (Bleakley and Hayes, 2017; Borowitzka, 1992; Costa et al., 2017).

Yapılan bir çalışmada fikosiyaninin MAPK yolağı üzerinde regülatör etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Wu et al., 2011). İlintili olan yolaklar arasında p38 (Bellei et al., 2010; K. N. Kim et al., 2013), MAPK (Graells et al., 2004; Kang et al., 2015) ve ERK (Choi et al., 2016; Graells et al., 2004; Nakashima et al., 2010; Yuan et al., 2016) yolakları da bulunmaktadır ki; bu yolaklar melanositlerde melanin üretimini ve tirozinaz enzim aktivitesini düzenleyen yolaklar arasındadır. Fikosiyanin ERK yolağının fosforilasyonu neticesinde MITF degradasyonuna neden olmaktadır. MITF degradasyonu tirozinaz enzimi ve alakalı genlerin (TRP-1, TRP-2) de ekspresyon seviyelerini inhibe etmekte ve böylece de tirozinaz enzimini sinyal yolakları üzerinden kontrol etmektedir.

(Wu et al., 2011) yapmış olduğu çalışmada, fikosiyanin doza bağlı olarak tirozinaz ve melanin üretimini inhibe etmiştir. Sinyal yolakları üzerinden bakıldığında; fikosiyanin hücre içi cAMP seviyelerinde artışa neden olmuş, ERK1/2 yolağının fosforilasyonu ile MITF degradasyonunu sağlamıştır. Ayrıca p38 aktivitesini baskılayarak CREB ve MITF transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu inhibe ederek her iki yolak üzerinden de tirozinaz enzim ekspresyonu ve melanin sentezini azaltmıştır.

Tez çalışmasının bu kısmında bu çalışmalar göz önünde bulundurulmuş ve fikosiyanin proteinin belirli proteazlar ile hidroliz ürünlerinin de tirozinaz enzim inhibisyonu ve melanin sentezi üzerine etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla çalışma iki şekilde yürütülmüştür;

(i) Ticari olarak fikosiyanin içeren bir ürün satın alınmış ve bu üründen enzimatik hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

(ii) *S. platensis*'e ait fikosiyaninin amino asit dizisi Uniprot'dan elde edilmiş ve *in silico* enzimatik hidroliz sonucu seçilen peptidlerin tirozinaz inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

4.4.1. Ticari Fikosiyanin ile Enzimatik Hidroliz İşlemleri

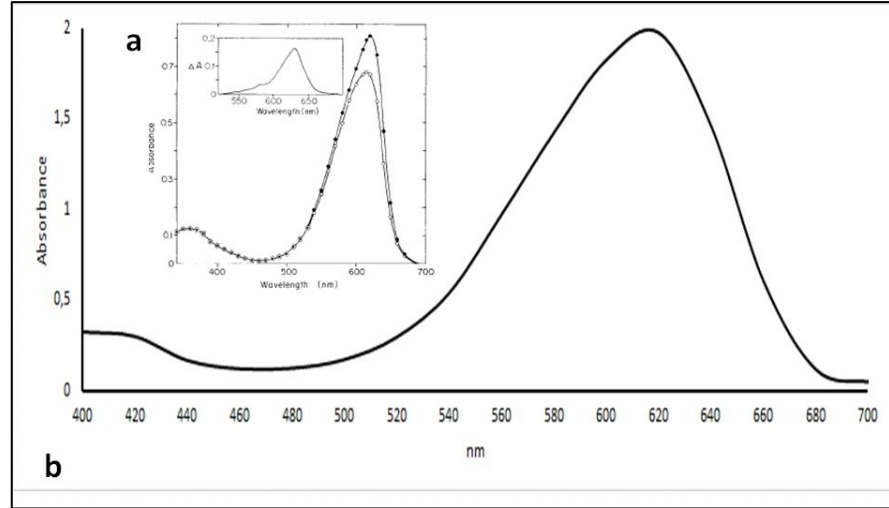
Ticari fikosiyanin olarak Kyanos Blue Bioactive Phycocyanin Powder-Spirulina 10x Extract isimli ürün satın alınmıştır. Bu ürünün tercih sebebi genel olarak içeriği ve kullanıcı yorumlarıdır. Ürün çoğunlukla gıda takviyesi, pasta ve meyve sularında renklendirici ajan olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra vegan

beslenmeyi tercih eden bireylerin fonksiyonel gıda olarak da kullandığı bir üründür (Şekil 4.26).



Şekil 4.27 Ticari olarak kullanılan fikosiyanin; a) Kyanos Blue fikosiyanin Spirulina extract ambalajı, b) Kyanos Blue fikosiyanin Spirulina extract toz hali

1 mg/ml hazırlanan örneklerden öncelikli olarak spektrum taraması gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.27). 400-700 nm arasında gerçekleştirilen taramada, fikosiyaninin 620 nm’de absorbans verdiği gözlenmiştir. Elde edilen spektrum referans spektrumlar ile de uyumludur (Khazi et al., 2018; Kumar and Wattal, 2014). $ABS_{620/280}$ oranı fikosiyanin saflık derecesini göstermektedir. $ABS_{620/280} \geq 0,7$ ise gıda amaçlı kullanılabilir, $ABS_{620/280}$ 0,7-3,9 arasında ise kimyasal molekül olarak, bu değer 4’den büyük ise analitik olarak kullanılabilir (Antelo et al., 2010; Kuddus et al., 2013). Kyanos Blue fikosiyanin ürününden elde edilen 620 absorbans değeri 1,969; 280 için ise bu değer 0,361 olarak ölçülmüştür. $ABS_{620/280}$ değeri ise 5,45 olarak bulunmuştur ki bu değer analitik olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak içeriğindeki protein oranı hesaplanmıştır ve 0,32 mg protein/mg toz ürün olarak bulunmuştur.

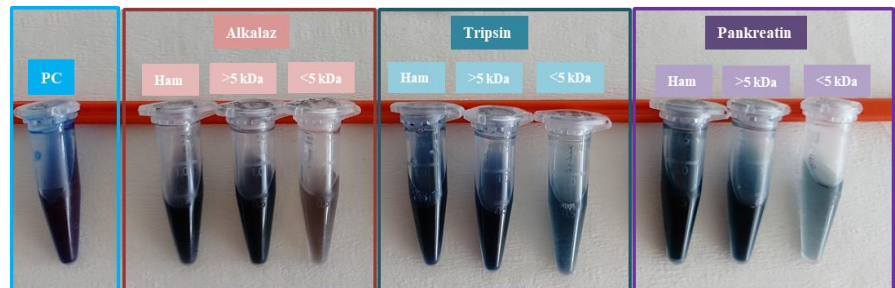


Şekil 4.28 Fikosiyanin pigmentinin absorpsiyon spektrumu, a) Referans spektrum (Glazer vd., 1973), b) Kyanos Blue fikosiyanin spektrum bilgisi

4.4.2 Fikosiyaninden Enzimatik Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi

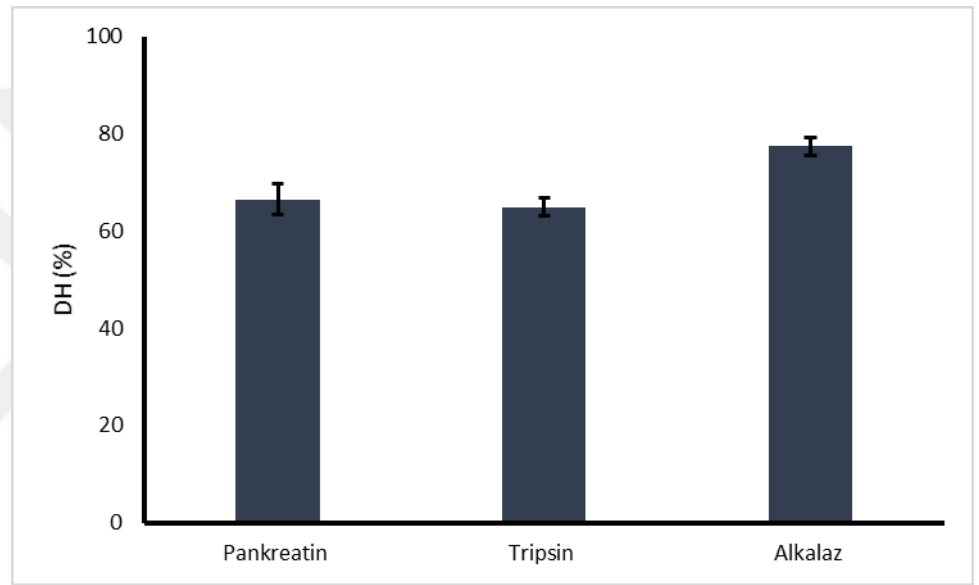
Saflık kontrolü ve protein miktar tayini sonrasında, tripsin, alkalaz ve pankreatin enzimleri kullanılarak enzimatik hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işlemi sonrasında %DH değeri hesaplanmış ve 5 kDa membran kullanılarak boyut fraksiyonları elde edilmiştir (Ham, >5 kDa ve <5 kDa).

Şekil 4.28’de hidroliz işlemi sonrasında gerçekleştirilen fraksiyonlarda fikosiyanin ve protein hidrolizatlarının rengi ve görüntüsü sunulmuştur. Fikosiyanin görüldüğü üzere koyu mavi/lacivert arasında bir renge sahiptir. Fraksiyonlardan alkalaz enzimi <5 kDa için renkte biraz kahverengileşme mevcuttur. Ancak genel olarak boyut küçüldükçe fraksiyonlarda da mikroalgal örneklerde olduğu üzere renk açılması gözlenmiştir.



Şekil 4.29 Fikosiyanin, alkalaz, tripsin ve pankreatin hidrolizatları ve boyut fraksiyonları görüntüleri

Hidroliz işleminin ardından ham hidrolizatlardan %DH değerlerinin hesaplanmıştır (Şekil 4.29). Mikroalgal biyokütledeki değerlerin aksine alkalaz enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz işlemi %DH açısından alkalazın en etkili enzim olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Sırasıyla pankreatin, tripsin ve alkalaz enzimleri için %DH değerleri $66,5\pm3,22$; $64,90\pm1,78$; $77,40\pm1,80$ şeklindedir. Pankreatin ve tripsin enzimleri için anlamlı bir farklılık gözlenmemişken ($p>0,05$), alkalaz enzimi %10-12’lik bir artış göstermiş ve protein yapıların oldukça fazla hidroliz olmasını sağlamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki her üç enzim arasında farklılıklar söz konusu olsa da her üç proteaz grubu da fikosiyaninin %50’sinden fazlasını rahatlıkla hidroliz edebilmiştir.

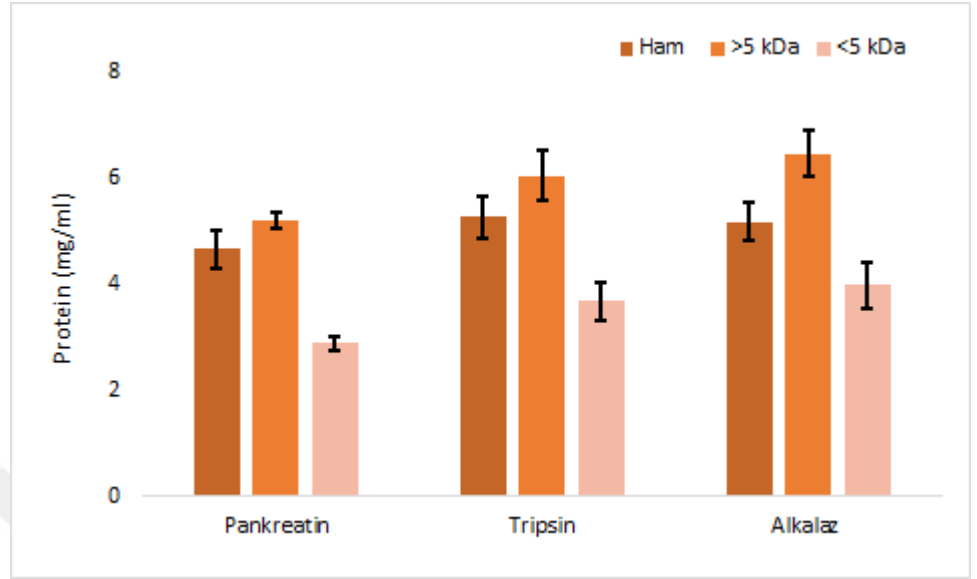


Şekil 4.30 Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarından %DH değerlerinin belirlenmesi

Şekil 4.30’da ise boyut fraksiyonları sonrasında her bir fazda ölçülen protein yapıların miktarlarını ifade etmektedir. Ham hidrolizatlarda 4-5 mg/ml değerleri arasında protein hesaplanmıştır. Sırasıyla ham hidrolizatlardaki protein miktarları pankreatin, tripsin ve alkalaz için $4,66\pm0,36$; $4,99\pm0,40$; $5,17\pm0,37$ mg/ml şeklindedir. Protein miktarları %DH ile uyumludur ve alkalaz hidrolizatından elde edilen ham hidrolizat miktarı 0,3-0,6 mg/ml fazlalık göstermektedir.

Konsantrasyonun etkisiyle >5 kDa boyutundaki proteinlerde ham hidrolizatlara kıyasla 1,5-2 kat artış olmuştur. Ancak esas enzimin hidroliz edebilme kabiliyeti <5 kDa fraksiyonlarda gerçekleşmiştir. Sırasıyla pankreatin, tripsin ve alkalaz için <5 kDa fraksiyonundaki hidrolizat miktarları $2,88\pm0,12$; $3,67\pm0,37$; $3,97\pm0,42$ mg/ml şeklindedir ve %DH ile uyumlu olacak bir şekilde

alkalaz enziminden elde edilen protein fraksiyonları daha fazla küçük yapıli hidrolizatların elde edildiğini karşılıklı olarak desteklemektedir.



Şekil 4.31 Fikosiyanin pankreatin, tripsin ve alkalaz hidrolizatlarında boyuta bağıli hidrolizat miktarlarının belirlenmesi

Fikosiyanin için yapılan boyutlandırma çalışmalarında sadece 5 kDa membran kullanılmıştır. Ancak mikroalgal hidrolizatlarda 10 kDa'dan başlanmasının sebebi ise hücreli protein miktarlarının ve boyutlarının komplikasyon göstermesinden kaynaklanmaktadır.

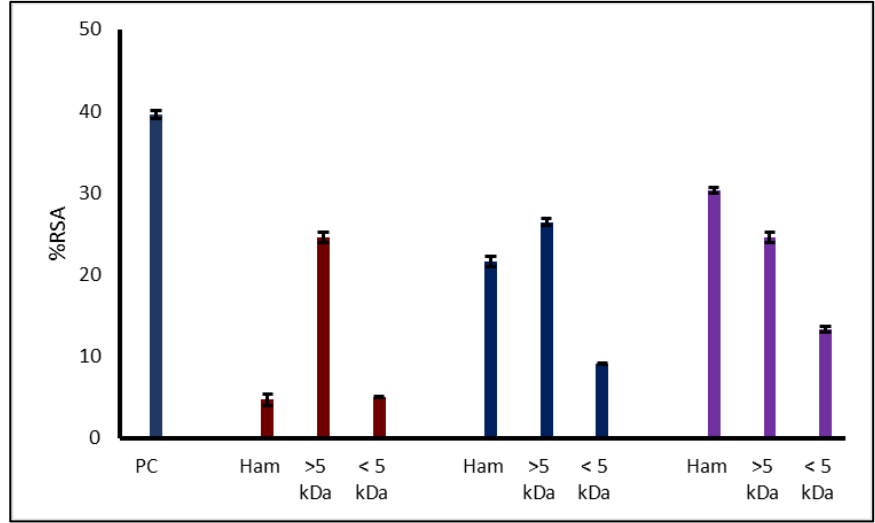
4.4.3. DPPH radikali süpürme aktivitesi (%RSA) değerlerinin belirlenmesi

Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatlarından DPPH radikali süpürme aktivitesine bağıli antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatların ve fikosiyaninin koyu renginden dolayı 1 mg/ml örnekleri seyreltilerek doza bağıli %RSA değerleri hesaplanmıştır. 2 mg/ml konsantrasyonlar için %RSA değerleri sadece her bir enzimin <5 kDa fraksiyonlarından gerçekleştirilebilmiştir (Çizelge 4.9)

Çizelge 4.9 Fikosiyenin ve enzimatik hidrolizatların doza bağlı %RSA değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)						
	2000	1000	500	250	125	62,5
Fikosiyenin (PC)						
	---	39,5±0,43	30,5±0,21	21,5±0,65	18,9±0,46	14,8±0,94
Alkalaz						
Ham	---	4,7±0,42	2,9±0,63	2,7±0,25	4,5±0,83	7,0±0,28
>5 kDa	---	24,6±0,25	19,1±0,26	15,4±0,83	14,5±0,32	13,9±0,3
<5 kDa	13,5±0,12	5,1±0,5	4,2±0,82	2,5±0,13	4,0±0,12	3,9±0,9
Tripsin						
Ham	----	19,3±0,1	14,3±0,42	11,3±0,1	10,5±0,84	8,6±0,12
>5 kDa	----	26,4±0,25	25,4±0,13	22,5±0,06	18,6±0,25	13,1±0,05
<5 kDa	15,0±0,13	9,1±0,04	6,1±0,27	5,2±0,91	2,5±0,02	3,7±0,01
Pankreatin						
Ham	---	30,3±0,9	19,3±0,07	15,4±0,94	11,9±0,32	13,7±0,82
>5 kDa	---	24,6±0,09	22,3±0,4	18,4±0,12	13,9±0,8	11,9±0,17
<5 kDa	23,6±0,06	13,3±0,39	5,9±0,09	7,4±0,05	6,6±0,43	10,2±0,64

Hidrolizatların %RSA değerleri fikosiyenin değerlerine göre düşük olsa da her bir hidrolizat için belirgin bir antioksidan aktivite gerçekleştirdiği bulunmuştur. Hidrolizatların antioksidan aktiviteye etkisi doza bağlı olarak değişmektedir. Şekil 4.31 ile çizelge 4.9 karşılıklı olarak incelendiğinde; fikosiyenin 1 mg/ml konsantrasyonda %40 civarında antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Her bir enzim için antioksidan aktiviteye katkı aynı şekilde seyretmemiştir. Alkalaz enzimi için özellikle <5 kDa fraksiyonlarında uygulanan dozlar arasında alakasız bir ilişki bulunmuştur. >5 kDa hidrolizatında artan %RSA değeri (24,6±0,09) > 5 kDa fraksiyonu için azalmıştır (13,3±0,39). Tripsin için fraksiyonlara bağlı antioksidan aktivite %DH trendini takip etmektedir ve <5 kDa fraksiyonunda kendi arasındaki en düşük %RSA (9,1±0,04) değerine ulaşmıştır. Pankreatin hidrolizatları için ise %RSA değerleri ham, >5 kDa ve <5 kDa sıralamasıyla azalmalar göstermiştir. Sırasıyla %RSA değerleri %30,3±0,9; %24,6±0,09; %13,3±0,39 'dir. Genel olarak pankreatin hidrolizatlarında antioksidan aktivitenin belirgin olduğu, tripsin ve alkalaz için ise >5 kDa hidrolizatlarında gözlenebilir bir etki yarattığı söylenebilir.



Şekil 4.32 Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatlarda (1 mg/ml) %RSA değerleri, alkalaz (kırmızı), tripsin (mavi), pankreatin (mor)

Doza bağlı %RSA değerlerinden ise antioksidan aktivite için IC_{50} (mg/ml) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.10). Fikosiyaninin $1,33 \pm 0,38$ mg/ml iken pankreatin ham hidrolizatında da bu değer $1,32 \pm 0,83$ mg/ml'dir. Ancak pankreatin <5 kDa, tripsin >5 kDa, alkalaz ham ve <5 kDa örneklerinde IC_{50} değeri 10 mg/ml üzerindedir ki, bu da sahip oldukları inhibitör konsantrasyonun yüksek olması nedeniyle değersizdir.

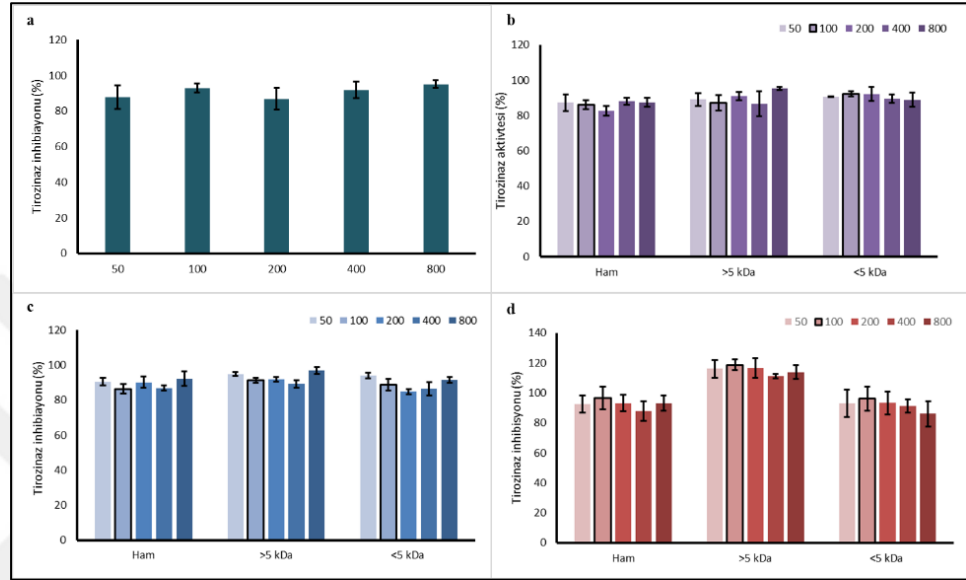
Çizelge 4.10 PC ve enzimatik hidrolizatların %RSA bağlı IC_{50} değerleri

		IC_{50} (mg/ml)		
PC		$1,33 \pm 0,38$		
	Pankreatin	Tripsin	Alcalase	
Ham	$1,32 \pm 0,83$	$3,8 \pm 0,52$	>10	
>5 kDa	$1,48 \pm 0,72$	>10	$3,19 \pm 0,73$	
<5 kDa	>10	$8,73 \pm 1,2$	>10	

4.4.4. Fikosiyanin Enzimatik Hidrolizatlarının Mantar Tirozinaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

Hidrolizatların mantar tirozinaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Fikosiyanin, pankreatin, tripsin hidrolizatlarında aktiviteye belirgin bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.32). Alkalaz için ise sadece >5 kDa fraksiyonlarında dozdan bağımsız olarak %120 aktivite değerleri elde edilmiştir. Bu aktivite doza bağlı olarak değişiklik göstermese de ($p > 0,05$) boyutlar arasındaki

farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). <5 kDa fraksiyonu için ise doza bağlı %10'lara varan inhibisyonlar izlenebilmiştir (Şekil 4.32-d). Her üç enzimin <5 kDa fraksiyonlarında %10-12 inhibisyonlar elde edilse de bu değerler $800 \mu\text{g/ml}$ dozlarında sağlandığı için genel kanıda fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatlarının mantar tirozinaz inhibisyonu yapma kapasitelerinin kojik asit ve literatürde bulunan bir takım diğer moleküllerden oldukça düşük olduğu söylenebilir.



Şekil 4.33 Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatların mantar tirozinaz enzimi aktivitesine etkisi (%), a)Fikosiyanin, b) Pankreatin, c)Tripsin, d) Alkalaz

Çizelge 4.11'de $800 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda mantar tirozinaz inhibisyon değerleri sunulmuştur. Fikosiyanin için bu değer $95,0\pm2,2$ 'dir. Görüldüğü üzere, mikroalgal protein hidrolizatlarında olduğu gibi mantar tirozinaz inhibisyonuna katkı sağlamamakla beraber, alkalaz enzimi ile hidroliz sonucunda bir miktar enzim aktivasyonu da sağlanmış olmaktadır. Ancak inhibisyon değerleri doza bağlı bir tutarlılık seyretmemektedir. %10 üzerinde inhibisyon gözlenmediği için ise fikosiyanin ve hidrolizatlarının mantar tirozinaz enzimine etkisi hem inhibisyon hem de aktivasyon anlamında ihmal edilebilecek niteliktedir.

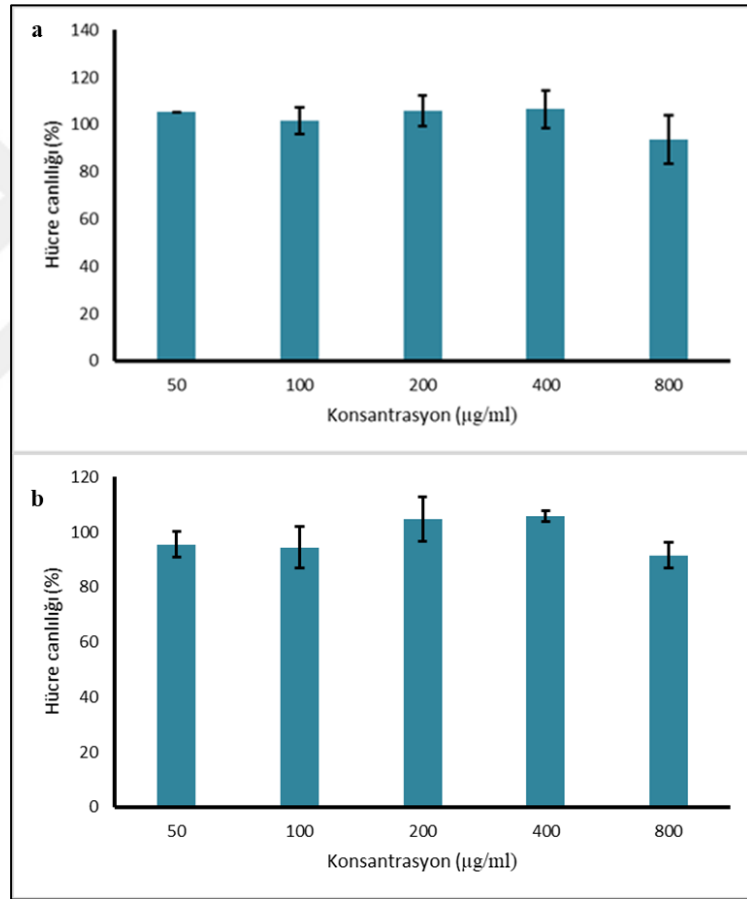
Çizelge 4.11 Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarının $800 \mu\text{g/ml}$ mantar tirozinaz enzimi inhibisyon değerleri

	Pankreatin	Tripsin	Alkalaz
Ham	87,4 $\pm$ 2,5	92,3 $\pm$ 4,1	93,1 $\pm$ 5,2
>5 kDa	95,4 $\pm$ 0,9	96,9 $\pm$ 1,9	113,9 $\pm$ 4,8*
<5 kDa	88,9 $\pm$ 4,0	91,5 $\pm$ 1,8	86,1 $\pm$ 8,5
“*” işareti alkalaz enziminin aktivasyon yaptığını göstermektedir.			

4.4.5. B16-F10 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.4.5.1. Fikosiyanin Enzimatik Hidrolizatlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Fikosiyanin ve enzimatik hidrolizatlarının hücre canlılığına etkisi 48 ve 72 saat boyunca takip edilmiştir. Öncelikle fikosiyanin değerlendirilecek olursa (Şekil 4.32) 48 ve 72. saatte doza bağlı belirgin bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Sadece 800 µg/ml konsantrasyon için 48 saatte 7 ± 3 , 72. saatte 9 ± 4 bir canlılık kaybı söz konusu olmuştur. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda; fikosiyaninin doza bağlı hücre canlılığına etkisi olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).



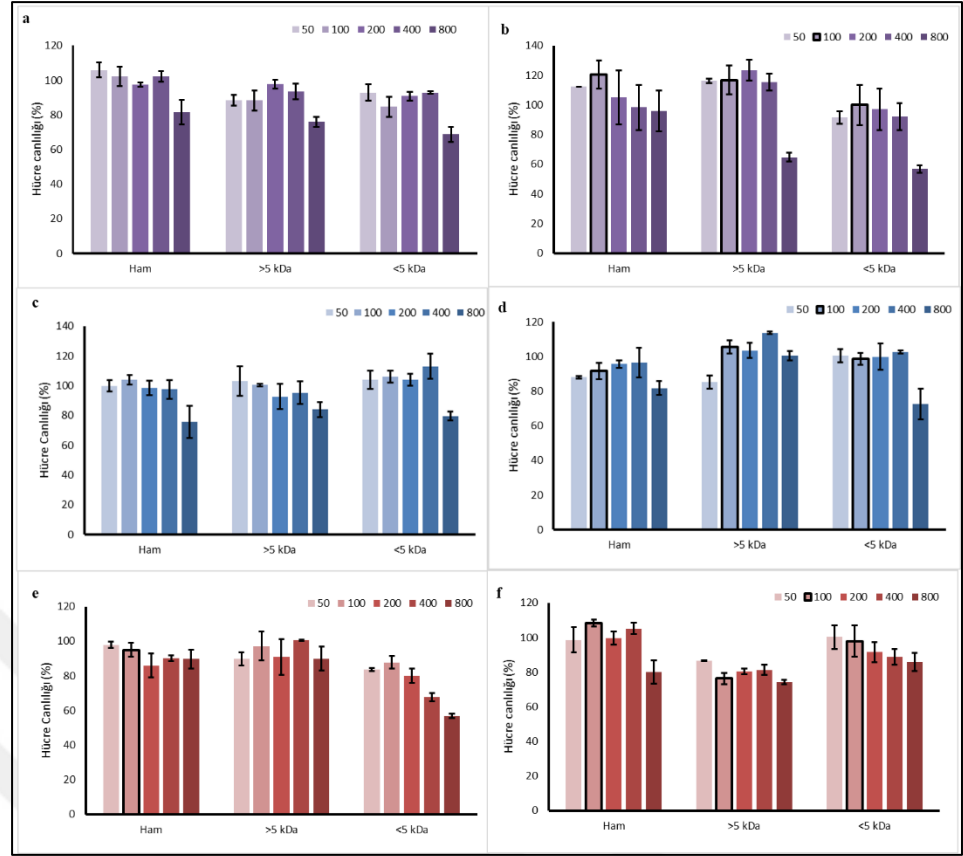
Şekil 4.34 Fikosiyaninin B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) 48 saat, b) 72 saat

Fikosiyanin ardından enzimatik hidrolizatlarda da hücre canlılığının nasıl etkilendiği incelenmiştir (Şekil 4.34). Şekil 4.34-a ve b pankreatin için 48 ve 72. Saat örneklerini temsil etmektedir. 48. saatte canlılık 800 µg/ml konsantrasyondan etkilenmiş görünmektedir. Ham, >5 kDa ve <5 kDa örneklerinde canlılık sırasıyla %81,65; %75,99 ve %68,71'dir. Bu değerler 72. saatte

ise %95,88; %64,61 ve %56,83 olmuştur. Ham hidrolizat zamanla canlılığın azalmasına neden olmamış ancak > ve <5 kDa örneklerinde canlılık %40-50 oranlarında azalmıştır ki bu tablo 800 µg/ml konsantrasyonun toksik etkilerini ortaya koymaktadır. Ancak 72. saatte ham hidrolizat hariç diğer dozlar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Tripsin hidrolizatlarında (Şekil 4.34-c ve d) 800 µg/ml haricinde uygulanan hidrolizat konsantrasyonları canlılığı %10-12 oranında arttırmış ve etkili bir toksisite göstermemiştir. Ancak 48 saat için elde edilen verilerde 800 µg/ml konsantrasyonda ham, >5 kDa ve <5 kDa hidrolizatlarında sırasıyla %75,76; %84 ve %79,52 oranında canlılık izlenebilmiştir. 72. saate ilerlediğinde 50-400 µg/ml dozlarının canlılığı etkilemediği bulunmuştur ($p>0,05$). 800 µg/ml dozunun etkisi >5 kDa için ortadan kalmış ancak ham hidrolizatta canlılık %20, <5 kDa için ise %28 azalmıştır.

Alkalaz için gerçekleştirilen çalışmalarda (Şekil 4.34-e ve f) 48 ve 72. saatte ham hidrolizatlar büyümeyi anlamlı ölçüde etkilemez iken > ve <5 kDa hidrolizatlarının toksik etkileri gözlenebilmiştir. Özellikle <5 kDa için doza bağlı toksisite belirgin bir şekilde izlenebilmiştir. Ancak konsantrasyona bağlı canlılık düşüşleri anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu örnek grubu için IC_{50} değeri $911,81 \pm 6,87$ µg/ml olarak hesaplanmıştır. 72. Saatte doza bağlı linear bir değişim olmasa da >5 kDa örneğinin büyümeyi %20-30 arasında inhibe ettiği gözlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde; alkalazın her bir boyut fraksiyonu için yapılan incelemede konsantrasyonun canlılığı etkilemediği gözlenirse de boyut örneklerinin canlılığı farklı seviyelerde etkilemiş olması anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.35 Fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarının B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) pankreatin 48 saat, b) pankreatin 72 h, c) tripsin 48 h, d) tripsin 72 h, e) alkalaz 48 h, f) alkalaz 72 h

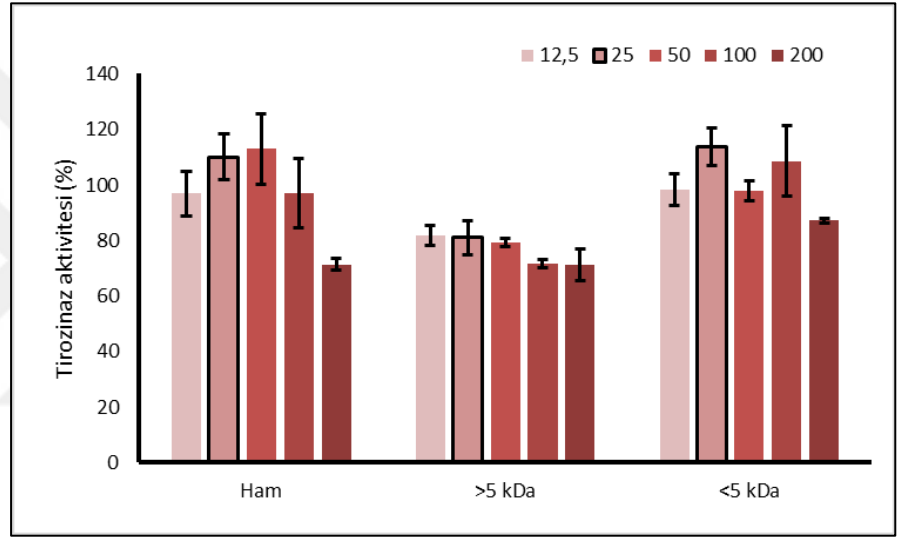
Fikosiyanin ve hidrolizatları doza bağlı bir inhibisyon göstermese de 800 µg/ml konsantrasyonlarda gözlenen düşüşleri sonucunda, hücresel tirozinaz aktivitesi tayini için 200 µg/ml konsantrasyonu üst limit olarak kullanılmıştır.

Peptid bazlı tirozinaz inhibitörleri, bu alanda henüz yeni gelişen ve etki mekanizması yeni yeni anlaşılmaya başlayan düşük moleküler ağırlıklı tirozinaz inhibitörleri grubundadırlar. Tez çalışması kapsamında sürdürülebilir akuatik kaynaklardan olan, protein içeriği yüksek mikroalgler kullanılmış ve bu mikroalglerden peptid ve protein bazlı tirozinaz inhibitörlerinin hem mantar tirozinaz enziminde direkt etkisi hem de B16-F10 fare melanoma hücre hatlarında hücresel tirozinaz enzim aktivitesine ve melanin üretimine etkisi incelenmiştir.

4.4.5.2. B16-F10 hücresel tirozinaz aktivitesi

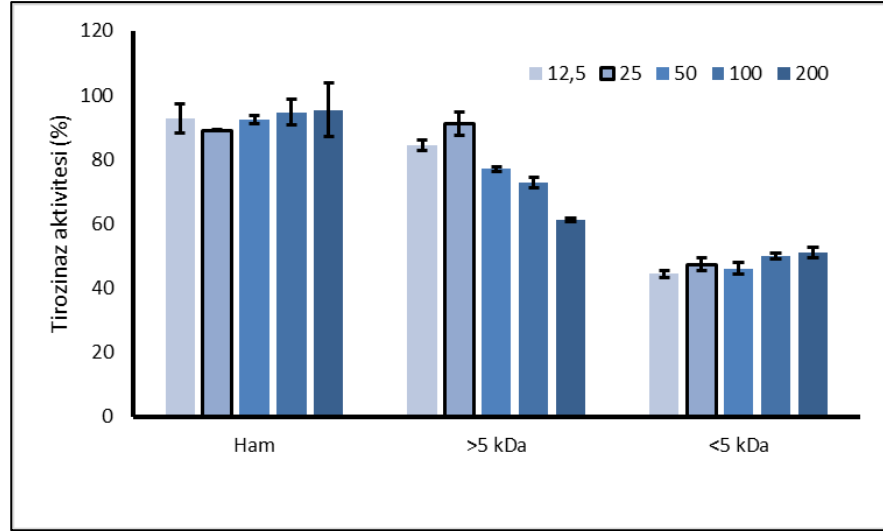
Bu bölümde, fikosiyanin ve fikosiyanine ait enzimatik hidrolizatlardan hücresel tirozinaz enzim aktivitesi sonuçları incelenmiştir. İlk olarak alkalaz enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizatlar incelendiğinde (Şekil 4. 35) ham hidrolizatlarda 100 µg/ml değerlerine kadar belirgin bir inhibisyon gözlenmemiştir. 25 ve 50 µg/ml

konsantrasyonlar için bir miktar enzim aktivitesi artışı gözlenmiş ancak 100 µg/ml ve üzeri dozlarda inhibisyon ile sonuçlanmıştır. >5 kDa fraksiyonu için doza bağlı olmayan bir inhibisyon söz konusu olmuştur. Tirozinaz enzim aktivitesi değerleri %70-80 aralığına düşmüş ve enzim aktivitesinde %20-30'luk bir inhibisyon gözlenmiştir. Ancak <5 kDa fraksiyonu için yine doza bağlı bir inhibisyon gözlenmese de 200 µg/ml için %10'luk bir inhibisyon söz konusu olmuştur. Alkalaz için ham kestrenin konsantrasyona bağlı inhibitör etkisi anlamlı bulunmuş ($p<0,05$), ancak >5 kDa ve <5 kDa örnekleri için konsantrasyonun etkisinin önemsiz olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Örnekler arasında meydana gelen inhibisyon farklılıkları ise, 3 farklı örneğin de tirozinaz inhibisyon etkisinin birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur ($p<0,05$).



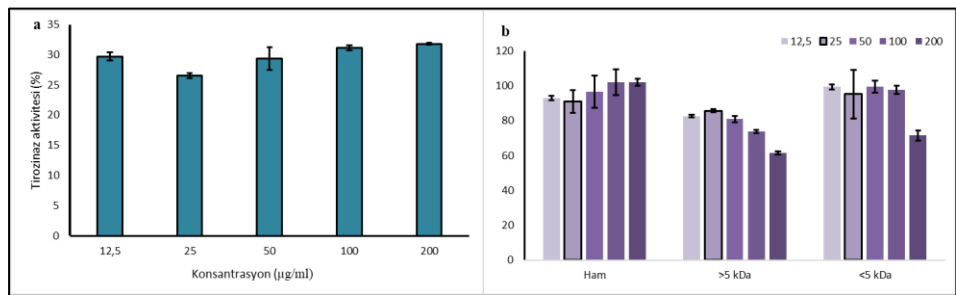
Şekil 4. 36 Fikosiyanin alkalaz hidrolizatlarında Tirozinaz enzim aktivitesi (%)

Tripsin için (Şekil 4.36) ham hidroizatlar tirozinaz enzim aktivitesini neredeyse hiç etkilememiştir ($p>0,05$). Ancak >5 kDa fraksiyonu için doza bağlı kayda değer bir inhibisyon sağlanmış; 200 µg/ml konsantrasyonu için ise enzim aktivitesi $61,27\pm0,50$ olarak ölçülmüştür. >5 kDa fraksiyonu için inhibisyon etkisi dozdan bağımsız olarak gerçekleşmiştir ($p<0,05$). <5 kDa konsantrasyonu için ise dozun etkisi gözlenmemiş ($p>0,05$) ancak enzim aktivitesi %50 oranında inhibe edilmiştir. Sonuçlar değerlendirilecek olur ise, tripsin hidrolizi fikosiyaninden potansiyel tirozinaz inhibisyonu yapabilecek peptidlerin açığa çıkmasını sağlamış ve bu peptidler ise <5 kDa fraksiyonunda yoğun bir şekilde elde edilmiştir. Boyut grupları arasında gözlenen farklılıklar anlamlı bulunmuş ($p<0,001$); özellikle <5 kDa için tirozinaz inhibisyonu yapma kabiliyetinin yüksek olduğu bulunmuştur.



Şekil 4. 37 Fikosiyanin Tripsin hidrolizatlarında Tirozinaz enzim aktivitesi (%)

Şekil 4.37’de fikosiyanin (a) ve pankreatin (b) için hücresel tirozinaz aktivite değerleri hesaplanmıştır. Fikosiyanin %70 oranında tirozinaz enzim aktivitesini inhibe etmiştir. İnhibisyona dozun katkısı gözlenmemiş ($p>0,05$); ancak Wu et al. (2012)’nin yapmış olduğu çalışma göz önüne alındığında birbirini destekler sonuçlara ulaşılmıştır. Pankreatin hidrolizatında ham ekstrede ve <5 kDa boyutlarında herhangi bir inhibisyon gözlenmez iken >5 kDa fraksiyonu için doza bağlı bir inhibisyon karakteristiği gözlenmiştir. 200 $\mu\text{g/ml}$ için enzim aktivitesi %61 değerlerine gerilemiştir. Muhtemelen pankreatin oldukça fazla serbest amino asit ve dipeptid üretme kapasitesine sahip olduğu için <5 kDa fraksiyonunda tirozinaz enzim inhibisyonu etkili olmamıştır (200 $\mu\text{g/ml}$ hariç, $p>0,05$).



Şekil 4. 38 Fikosiyanin (a) ve pankreatin hidrolizatlarında tirozinaz enzim aktivitesi (%)

Çizelge 4.12’de 200 $\mu\text{g/ml}$ için enzim inhibisyon değerleri sunulmuştur. Fikosiyanin $68,13 \pm 0,16$ değerinde enzim inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Alkalaz enzimi hidrolizatlarının inhibisyon güçlerinin düşük olduğu bulunmuştur. Tripsin hidrolizatları için boyuta bağlı inhibisyon değeri artmıştır. Ancak pankreatin hidrolizatlarında da yine ham hidrolizatlara kıyasla boyutun inhibisyona etkisi

olduğu gözlenmiştir. Genel olarak ise tripsin enziminin fikosiyanin için tirozinaz inhibisyonu yapan peptidleri üretmek potansiyelinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

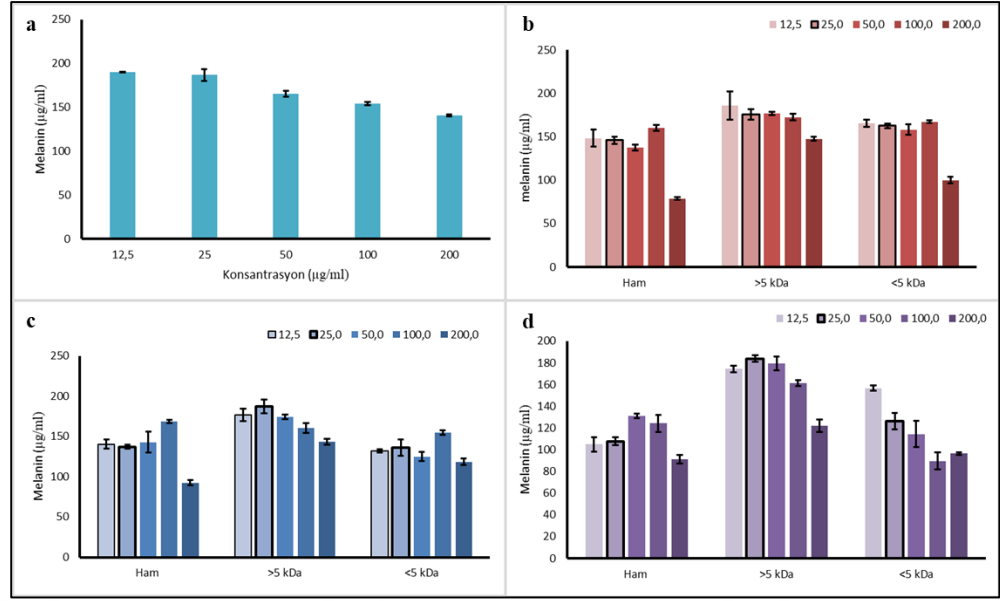
Çizelge 4. 12 Fikosiyanin hidrolizatlarında 200 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz inhibisyonu (%)

	Alkalaz	Tripsin	Pankreatin
Ham	28,57±1,94	4,56±0,83	7,14±1,96
>5 kDa	28,87±5,78	38,73±0,50	38,49±0,88
<5 kDa	12,89±0,74	49,01±1,70	28,57±2,92

4.4.5.3. Melanin Üretim Miktarları

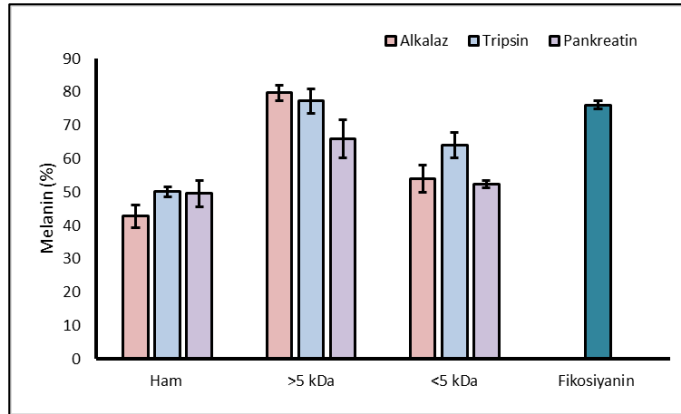
Fikosiyanin ve elde edilen hidrolizatlardan melanin üretim miktarları da incelenmiştir (Şekil 3.38). Görüldüğü üzere fikosiyanin için (Şekil 4.38-a) doza bağlı melanin üretiminde azalmalar meydana gelmiştir. 200 µg/ml için melanin miktarı kontrol örneğine göre %23,9±1,22 oranında azalmıştır. Tirozinaz enzim aktivitesi %70 azalmasına rağmen melanin üretimi ancak %23,9 oranında inhibe edilebilmiştir. Fikosiyanin için melanin üretim miktarları artan doza bağlı olarak azalsa da bu azalış anlamlı değildir ($p>0,05$).

Alkalaz enzimi için (Şekil 4.38-b) ham ekstrede 200 µg/ml konsantrasyonu için anlamlı bir azalma saptanmış iken azalan dozlarda melanin miktarlarında değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$). >5 kDa fraksiyonunda melanin miktarı etkilenmemiş ancak yine <5 kDa için 200 µg/ml konsantrasyonu melanin miktarını belirgin ölçüde azalmayı başarmıştır. Ancak boyut fraksiyonlarının melanin üretimine etkisi belirli ölçüde fark yaratabilmiştir ($p<0,001$). Tirozinaz enzimi için (4.38-c) ham ekstrede (200 µg/ml) ve <5 kDa fraksiyonunda melanin miktarları değişmez iken >5 kDa için doza bağlı azalmalar söz konusu olmuştur. Takiben pankreatin (4.38-d) hidrolizatlarının ise < ve >5 kDa örnekleri için melanin miktarında azalmalara neden olduğu saptanmıştır. Boyuttan bağımsız olarak fraksiyonların konsantrasyonları melanin üretimini etkilememiş ($p>0,05$), buna rağmen boyutlar arası farklılık göze çarpmıştır ($p<0,05$).



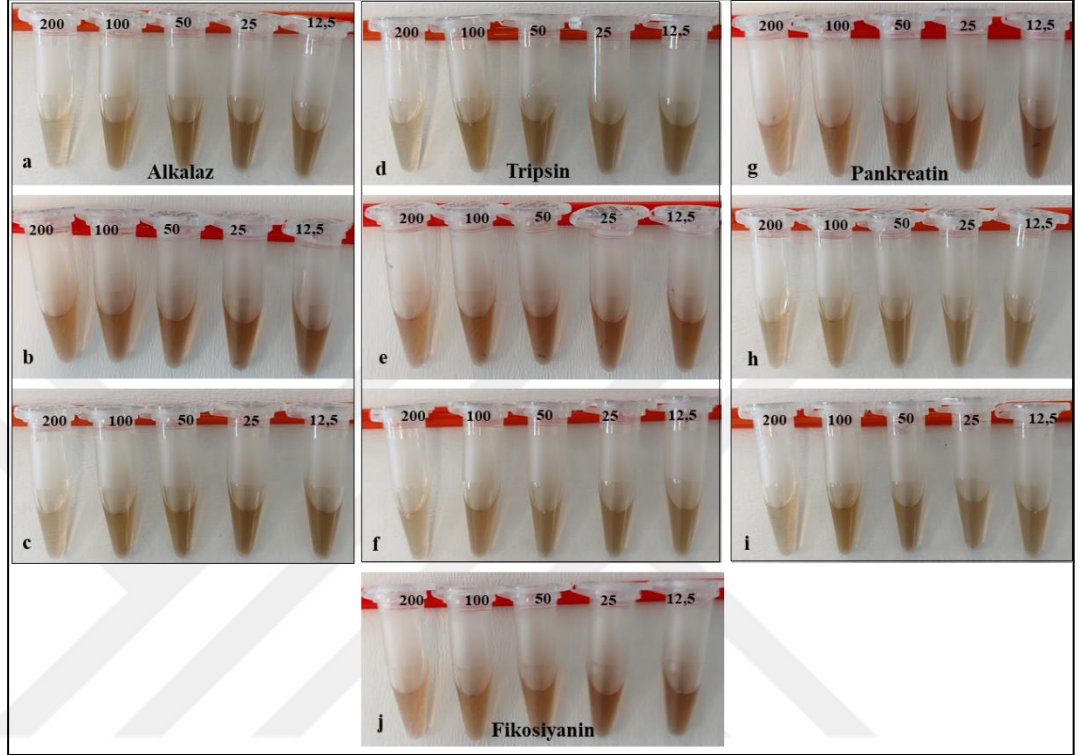
Şekil 4. 39 Fikosiyanin ve hidrolizatlarının melanin üretim değerleri a) Fikosiyanin, b) Alkalaz, c)Tripsin, d) Pankreatin

200 µg/ml konsantrasyonlarda her bir enzime ait hidrolizat örneklerinden %melanin üretim değerleri incelendiğinde; ham hidrolizatlarının melanin üretimine etkisi birbirinden farklı olmamıştır. Ancak boyutlar değiştiğinde melanin üretimleri de değişiklik göstermiştir. Buradan >5 kDa örneği için pankreatin'in melanin üretimini en çok inhibe ettiği gözlemektedir (%22,6). <5 kDa örnekleri için alkalaz ve pankreatin farklılık sağlamaz iken (%45-47, $p>0,05$) tripsin için bu değer %35 civarında olmuştur. Ancak ham hidrolizatlarda melanin üretimi %49-57 arasında azalmıştır. Fikosiyanin ise %23-9 değerinde melanin üretiminin inhibisyonunu sağlamıştır. Her ne kadar fikosiyanin tirozinaz enzimini inhibisyon değeri açısından hidrolizatlardan başarılı olsa da nihai hedef olan melanin üretiminde hidrolizatlara kıyasla %30'a yakın değerlerde daha az etkinlik gösterebilmiştir.



Şekil 4. 40 Fikosiyanin ve hidrolizatlarında melanin üretim değerleri (%)

Şekil 4.40'ta melanin ekstraksiyonu sonrasında her bir örnekten doza bağlı melanin üretim miktarları sunulmuştur. Gözleendiği üzere Şekil 4.38'de elde edilen verilere uyumlu bir şekilde örneklerin renginde açılmalar ya da koyulaşmalar görüntülenmiştir.



Şekil 4. 41 Fikosiyanin ve hidrolizatlarından melanni üretim görselleri a) Alkalaz ham, b) Alkalaz >5 kDa, c) Alkalaz <5 kDa, d) Tripsin ham, e) Tripsin >5kDa, f) Tripsin <5 kDa, g) Pankreatin ham, h) Pankreatin >5 kDa, i)Pankreatin <5 kDa, j) Fikosiyanin

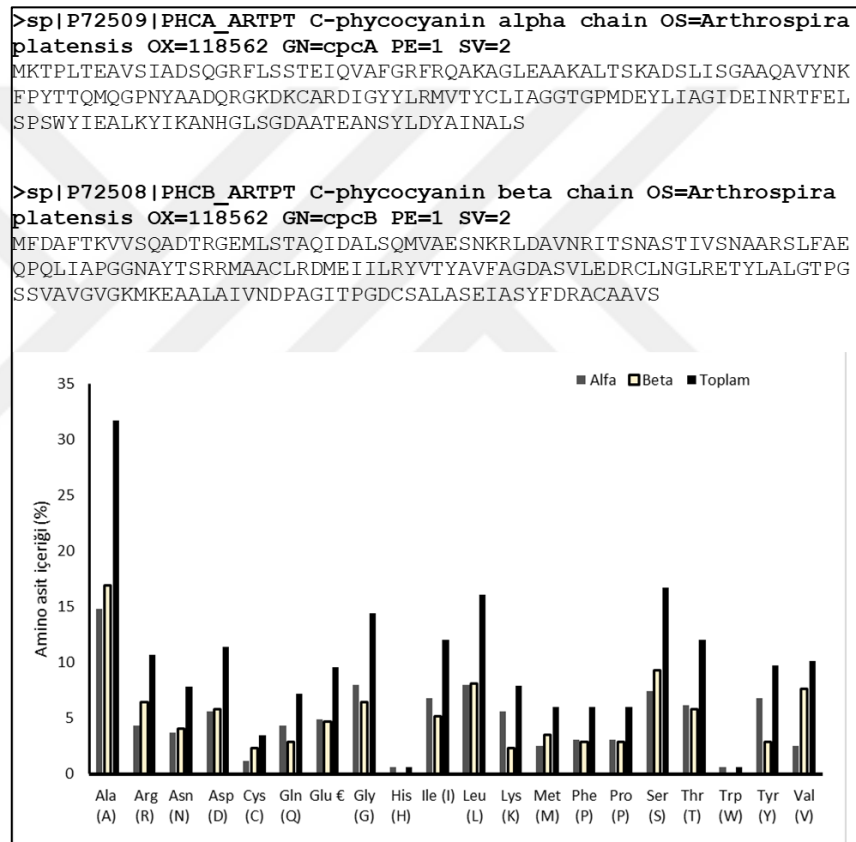
4.5. *In silico* Fikosiyanin Peptidlerinin Tasarlanması

Çalışmanın bu aşamasında fikosiyanin protein dizisi BIOPEP veri tabanı kullanılarak *in silico* enzimatik hidroliz işlemine uğratılmış; ardından peptid seçimi, peptidlerin veri tabanları üzerinden aktiviteleri tahmin edilmeye çalışılmıştır. Seçimi gerçekleştirilip kimyasal olarak sentezletilen peptidlerden mantar ve hücresel tirozinaz enzim aktivite tayini ile, hücresel melanin üretimi incelenmiştir. Peptidlerin ayrıca hücre canlılığına etkisi de değerlendirilmiştir.

4.5.1. *In silico* Protein Hidroliz İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi

S. platensis fikosiyanin alfa ve beta olmak üzere iki üniteden meydana gelmektedir. Her iki ünitenin amino asit dizisi UniProt veri tabanından elde edilmiştir. Alfa zinciri için P72509, beta zinciri için ise P72508 erişim numaraları

kullanılmıştır. Her iki zincir için amino asit dizileri şekil 4.41’de sunulmuştur. Alfa zinciri 162 amino asitten oluşmaktadır. Toplam moleküler ağırlığı 17,601 kDa’dur. Beta zincirinde ise 172 amino asit bulunmaktadır. Moleküler ağırlığı 18,093 kDa’dur. Her iki ünite de Met ile başlayıp, Ser amino asidi ile sonlanmaktadır. Yapıda Ala en yüksek amino asit iken (alfa, %14,8; beta %16,9); bunu Ser, Leu ve Gly amino asitleri takip etmektedir. His ve Trp amino asitleri ise alfa zincirde 1 birim bulunurken (%0,6); beta zincirde yer almamaktadır. Ala, Val, Leu, Ile, Arg, Tyr gibi tirozinaz inhibisyonuna katkı sağlayan amino asitler ise alfa zincirin %55,5 beta zincirin ise %60,5’ini oluşturmaktadır. Bu açıdan da fikosiyaninden elde edilen peptidlerin tirozinaz inhibitör etkisi yapma olasılığı yüksektir.



Şekil 4.42 PC alfa ve beta zincirleri amino asit dizisi ve %amino asit dağılımları

In silico protein hidrolizi işlemi BIOPEP veri tabanlarında yer alan ve “Enzyme (s)” bölümünde var olan proteazlar tarafından gerçekleştirilmiştir. (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>). Veri tabanında yer alan proteazların içerisinde tripsin, pankreatin, subtilisin, papain ve termolizin gibi endüstriyel ve gastrointestinal proteazlar da bulunmaktadır. 33 farklı enzim ile elde edilen hidroliz işlemi sonrasında ortaya çıkan hidroliz ürünleri listelenmiştir (Ek 1).

Bu enzimlerden chymosin ve zingipain dizide herhangi bir kesim gerçekleştirmemiştir. Glutamyl endopeptidase II, glycyl endopeptidase, Xaa-Pro dipeptidase, thrombin, metridin, prolyl oligopeptidase ve plasmin gibi enzimler ise çoğunlukla 30 ve üzeri amino asit dizisi olacak şekilde kesim gerçekleştirmiştir. Bu nedenden ötürü bahsi geçen enzimlerin hidroliz ürünleri dikkate alınmamıştır. Özellikle sindirim enzimleri tripsin, pepsin ve kimotripsin ile pankreatik enzimler 20'den düşük amino asit dizileri ile di-, tripeptidler ve serbest amino asitlerce zengin hidroliz ürünleri ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.13). C terminal tirozin varlığı neticesini veren enzimler ise chymase, chatepsin G ve metridin gibi enzimlerdir ve alfa alt biriminden elde edilmiştir.

Çizelge 4.13 Fikosiyanın elde edilen BIOPEP *in silico* hidroliz sonucu oluşan peptid listesi

Dizi	Enzim Sayısı	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık (Da)	Dizi	Enzim Sayısı	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık (Da)
LR kombinasyonu---/R/F+A/V/L							
AADQR	2	5	559,58	MKTPLTEAVSIADSQGR	1	17	1804,03
AADQRGKDKCARDI	1	14	1546,73	NAAR	1	4	430,46
AADQRGKDKCARDIGY	5	15	1766,96	NAARS	1	5	517,54
AARSL	2	5	516,60	NKR	1	3	416,48
ADQRGKDKC	3	9	1020,13	NKRL	4	4	529,63
ADSQGR	3	6	632,63	NRI	4	3	401,46
ADSQGRF	1	7	779,81	NRIT	1	4	502,57
ADTRGE	1	6	647,64	NRT	2	3	389,41
ADTRGEM	4	7	778,83	NRTF	1	4	536,58
AESNKR	4	6	703,75	QADTR	1	5	589,6
AESNKRL	1	7	816,9	QADTRGEM	1	9	1020,12
ARD	3	3	360,37	QGRF	1	4	506,56
ARS	3	3	332,36	QGRFL	1	5	619,71
AVNR	3	4	458,51	RCLNGLRE	1	8	960,12
AVSIADSQGRFLSSTE	1	16	1667,77	RDI	2	3	402,45
CAR	5	3	348,42	RDM	4	3	420,49
CLNGLR	4	6	674,82	RDMEI	3	5	662,76
DASVLEDRCLNG	1	12	1291,39	RDMEII	2	6	775,92
DAVNR	1	5	573,6	RDMEIIL	4	7	889,07
DAVNRITSNASTIVSNAARSL	2	21	2160,35	RET	3	3	404,42
DCSALASEIASYFDR	1	15	1647,76	RETY	7	4	567,59
DIGYYLR	4	7	899	RETYL	3	5	680,75
DMEILR	4	7	889,07	RFL	1	3	434,53
DQR	1	3	417,42	RFLSSTEIQVAFG	1	13	1454,63
DQRG	1	4	474,47	RFRQA	1	5	676,77
DQRGKDKCA	1	9	1020,12	RFRQAKAG	1	8	933,07
DRACAA	1	6	605,67	RGEM	2	5	604,72
DRACAAV	1	7	704,8	RGKDKCARDIGY	1	12	1381,56
DRACAAVS	6	8	791,88	RITSN	2	5	589,64
DRCL	1	4	505,59	RMV	2	3	404,53
DRCLNGLRE	1	9	1075,2	RMVTYCL	2	7	885,11
EDR	4	3	418,4	RQAKAGL	9	7	742,87
EDRC	1	4	521,55	RRMA	3	4	532,66
EDRCL	12	5	634,71	RRMAACL	1	7	820,04
FDR	3	3	436,46	RSL	1	3	374,44
FDRA	1	4	507,54	RTF	1	3	422,48
FDRACAAVS	1	9	939,05	RTFE	1	4	551,59
FGR	3	3	378,43	RYV	3	3	436,51
FGRFRQA	1	7	880,99	RYVTYAVF	3	8	1018,16
FLSSTEIQVAFGR	4	13	1454,63	SLFAEQPQLIAPGGNAYTSR	1	20	2120,32
FPYTTQMGPNYAADQR	3	17	1988,14	SNAAR	1	5	517,54
FRQ	2	3	449,5	SNAARSL	1	7	717,77

Çizelge 4.13 (devamı)

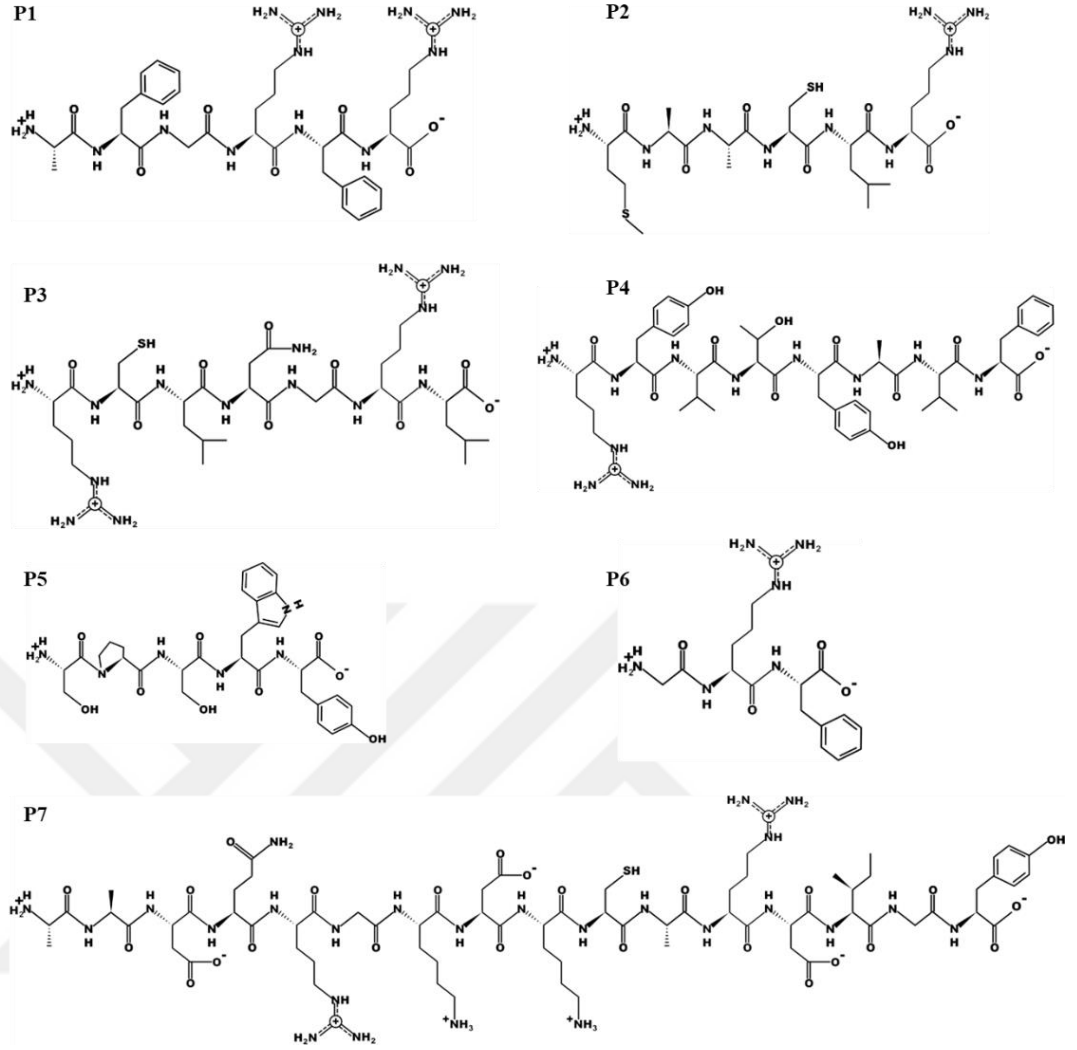
Dizi	Enzim Sayısı	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık (Da)	Dizi	Enzim Sayısı	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık (Da)
GRF	10	3	378,43	SNKR	1	4	503,55
GRFL	1	4	491,58	SNKRLD	2	6	731,8
IAGIDEINRTF	6	11	1248,38	SQADTRGEM	1	9	994,04
IAGIDEINRTFE	1	12	1377,5	SQGRFLSSTE	1	10	1111,16
IAPGGNAYTSRRM	1	13	1393,57	SQMVAESNKRL	4	11	1262,44
IAPGGNAYTSRRMAACL	1	17	1752,03	SRRM	1	4	548,66
IASYFDRACAAVS	1	13	1373,54	SRRMAAC	1	7	793,96
IDEINR	5	6	758,82	SYFDR	1	5	686,71
IILRYVTYAVFAGD	1	14	1600,85	SYFDRACAAV	1	10	1102,22
INRT	3	4	502,57	TEAVSIADSQGRF	7	13	1380,46
IQVAFGRFRQAKAGLE	2	16	1791,06	TKVVSQADTRGEM	4	13	1421,58
ITSNASTIVSNAAR	4	14	1404,53	TKVVSQADTRGEML	4	14	1534,74
KCARD	1	5	591,68	TPLTEAVSIADSQGR	3	15	1544,66
KDKCARDIG	1	9	1005,15	TRGE	1	4	461,47
KRL	2	3	415,53	TSRRM	4	5	649,77
LDVNR	4	6	686,76	TSRRMAACL	1	9	1008,23
LEDRC	3	5	634,71	VAESNKRL	3	8	916,03
LRDME	3	5	662,76	VAFGRFRQ	1	8	980,12
LRET	3	4	517,58	VNR	2	3	387,44
LRETYLALG	1	9	1035,19	VNRITS	1	6	688,77
LRM	2	3	418,56	VVSQADTR	3	8	874,94
LRMVT	1	5	618,79	YFDRA	2	5	670,71
MAACLR	4	6	663,86	YTSRRM	3	6	812,94
MFDAFTKVVSQADTR	2	15	1715,93	YVTYAVFAGDASVLEDR	4	17	1876,03
MFDAFTKVVSQADTRG	1	16	1772,98	YYLRMVTYCLIAG	1	13	1565,9
C terminal Y							
AAQAVY	1	6	621,68	NKFPY	1	5	667,75
ASEIASY	1	7	739,77	PMDEY	2	5	653,7
ASEIASYF	1	8	886,94	PNY	2	3	392,41
ASY	1	3	339,34	QGPNY	1	5	577,59
DEY	2	3	425,39	RMVTY	2	5	668,81
IAGGTGPMDEY	3	11	1110,2	SGDAATEANSY	4	11	1085,04
IAPGGNAY	3	8	761,82	SPSWY	2	5	638,67
ISGAAQAVY	2	9	878,97	TTQMGPNY	1	9	1039,12
MVTY	1	4	512,62	VTY	6	3	381,42

Peptid dizisinin 20 amino asit altında olması, en az bir arjinin birimi içermesi, L/R, R/F+A/V/L kombinasyonları ile C terminal tirozin içeren peptidler manuel olarak seçilmiş ve listelenmiştir (Çizelge 4.13). Arjinin ve kombinasyonlarını içeren peptid sayısı 134; C terminal tirozin içerenler 18 olmak üzere, toplam 152 tane peptid seçilmiştir. Bunlardan hem Arjinin ve hem de C terminal tirozin içeren diziler ise **AADQRGKDKCARDIGY** ve **RETY** peptidleri olmuştur. Aspartik asit (D) ve glutamik asit (E) içeren peptidlerin tirozinaz inhibisyonu açısından negatif bir etki yarattığı bilinmektedir (Schurink et al., 2007). Bu nedenle kısa zincirlerde bu iki amino asit içeren peptidler elenmiştir. Uzun zincirlerde ise arjinin etkisinin birim arjinin sayısı ile orantılı olduğu bilindiği için 10 amino asit üzerindeki peptidlerde birden fazla arjinin birimi olması aranmıştır. Aranan dizi özellikleri bakımından önem teşkil ettiği düşünülen peptidler dışında diğer peptidler için birden fazla proteaz ile ortaya çıkabilir olmasının da *in vitro* enzim seçimi açısından

önemli olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak yapılan elemeler sonucunda çizelge 3.7'deki peptidler seçilmiş ancak nihai olarak **P1-AFGRFR**, **P2-MAACLR**, **P3-RCLNGRL**, **P4-RYVTYAVF**, **P5-SPSWY**, **P6-GRF**, **P7-AADQGRGKDKCARDIGY** peptidleri sentezlenmiştir (Şekil 4.43).

P1 6 amino asitlik bir peptittir. Yapısında hem A-F, hem R-F hem de F-R kombinasyonları bulunmaktadır. Ayrıca orta dizide yer alan G ise yine tirozinaz inhibisyonunda etkili bir amino asittir. P2 L-R kombinasyonu ve ona bağlı C birimine sahiptir. Yapıda eşlik eden iki A ve bağlı olduğu C birimleri ile tirozinaz inhibisyonu yapabilecek dizi niteliğindedir. P3, 2 tane R birimi içermekte, dizi R-L kombinasyonu ile bitmekte, eşlik eden diğer amino asitleri ise C, L ve G şeklindedir. P4 için yapıda iki tane dizi ortası Y, R-Y kombinasyonu A-V kombinasyonu ve C terminal F bulunmaktadır. Bu dizide tirozinaz inhibisyonu etkisi tahmin edilememektedir. Çünkü yapıda yer alan orta dizi tirozin varlığı ve C terminal F ile bitmesi dizinin aktivatör etki göstermesini de sağlayabilecek niteliktedir. F ve Y'nin yapı benzerliği dizinin enzime bağlanmasını sağlayabilir ancak inhibisyon etkisi değişkenlik gösterebilir. P5 C terminal Y içermektedir. P6 R-F kombinasyonu ve G varlığına sahiptir. P6 ise hem uzun dizileri hem de dizide eşlik eden D varlığı olsa dahi R etkisi ile C terminal tirozin etkisini incelemek amacıyla seçilmiştir.

Seçilen peptidlerin biyoaktivite gösterme potansiyelleri *PeptideRanker* veri tabanı ile gerçekleştirilmiştir (<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/>). *PeptideRanker*, peptidlere olası biyoaktivite özellikleri için 0-1 aralığında değer atamaktadır. Bu sayede peptidlerin biyoaktivite seviyeleri tahmin edilmektedir. P1-P7 için *PeptideRanker* skorlamaları sırasıyla 0,950; 0,677; 0,635; 0,22; 0,848; 0,979; 0,361'dir. Genel olarak 0,5 ve üzeri biyoaktivite tahminleri tercih edilmektedir. P1-P3 ile P5 ve P6'nın aktivite tahminlerinin 1'e yakın olduğu görülmektedir. En yüksek tahmin sırasıyla P6, P1, P5, P2, P3, P7 ve P4 şeklinde gerçekleşmiştir. Gözlemlendiği üzere peptidler çeşitli farklı biyoaktiviteler sergileyebilir niteliktedirler.



Şekil 4.43 Fikosiyanin peptidlerinin amino asit dizleri

4.5.2. P1-P7'nin DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi (%RSA) Değerlerinin Belirlenmesi

P1-P7 peptidlerinin %RSA değerlerinin belirlenmesi için DPPH radikali kullanılmıştır. Başlangıç konsantrasyonu 200 $\mu\text{g/ml}$ seçilmiştir. Öncelikle bu konsantrasyon değerinde %RSA değerleri belirlenmiş, bu değerlere bağlı olarak doza bağlı %RSA değerleri ve IC_{50} konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Ön incelemede P2 ve P3 peptidleri haricinde diğer peptidlerin antioksidan aktivitesi gözlenmemiştir. P2 ve P3 için doza bağlı %RSA değerleri çizelge 4.14'te sunulmuştur. Her iki peptid de %RSA değerleri açısından anlamlı bir farklılık sergilememiştir ($p>0,05$). 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda P2 %67,64; P3 ise %62,95 oranında bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Sırasıyla P2 ve P3 için IC_{50} değerleri

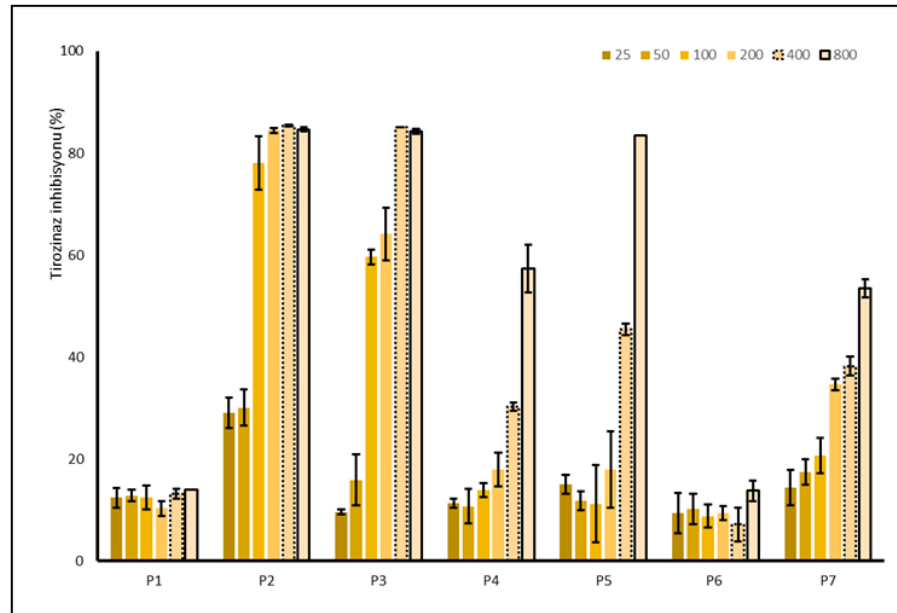
140,46 ile 158,24 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu değer BHT'nin yaklaşık iki katı düşük iken, kojik aside göre antioksidan etki anlamında her iki peptid de 3 kat daha etkilidir.

Çizelge 4. 14 P2 ve P3 peptidlerinin doza bağlı %RSA değerleri

	Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
	200	100	50	25	12,5
P2	67,64	41,66	19,03	11,15	5,45
P3	62,95	40,32	16,18	17,52	5,62

4.5.3 P1-P7'nin Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Peptidlerin öncelikle mantar tirozinaz enzimi üzerindeki monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri belirlenmiştir. Öncelikle monofenolaz aktiviteleri incelenecek olursa (Şekli 4.43) P1'in doza bağlı bir etkisi olmadığı ($p>0,05$) gözlenmiş ancak denenen her dozlarda ortalama %13'lük bir inhibisyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur. P2'nin 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında %30'luk inhibisyon göstermiş doz arttıkça inhibisyon etkisi %80-84 aralığına yükselmiştir ($p>0,05$). P2 için doza bağlı linear bir artış yerine logaritmik bir artış takip edilmiştir. 800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun üzerinde ise doygunluğa ulaştığı düşünülmektedir (200-800 $\mu\text{g/ml}$ aralığı için $p>0,05$). Özellikle 200 ve 800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda doza bağlı etkinin gözlenememesi bu sonucu destekler niteliktedir.



Şekil 4.44 P1-P7 peptidlerinin mantar tirozinaz enzimi monofenolaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Monofenolaz aktivitelerinin ardından difenolaz aktiviteleri ve IC₅₀ değerleri değerlendirilmiştir. Peptidlerin monofenolaz aktivitelerine göre difenolaz aktiviteleri oldukça düşüktür. P1, P4-7'nin belirgin bir difenolaz aktivitesi gözlenememiştir. P2 ve P3 için de monofenolaz aktivitesine kıyasla difenolaz aktivitesi 0.5-2 kat arasında azalmalar göstermiştir (Çizelge 4.15). P2 ve P3 için monofenolaz aktivitesi IC₅₀ konsantrasyonu sırasıyla 57,65 ve 96,54 µg/ml'dir ki bu değerler P2 için kojik asit ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık ifade etmemektedir (p<0,05). P3 ise 2 kat düşük bir IC₅₀ değerine sahiptir. Ancak sonuçlar incelendiğinde şaşırtıcı olan P2, P3 ve P5'in 800 µg/ml konsantrasyonda %83-84 inhibisyon yapmasına rağmen IC₅₀ değerinin 7,74 µg/ml olmasıdır ki kojik asit ile kıyaslandığında 6 kat daha etkili olduğu gözlenmektedir. Buna rağmen bu peptidin difenolaz aktivitesi ile kojik asit kıyaslandığında, difenolaz aktivitesi üzerinden gerçekleştirilen inhibisyon önemsiz denebilmektedir. Her ne kadar aktivite düşüşleri gözlenirse de P2 ve P3 için ise difenolaz aktivite göstermiş olmaları her iki peptidin mantar tirozinaz enzimi için etkili bir inhibitör olduğu yönündedir.

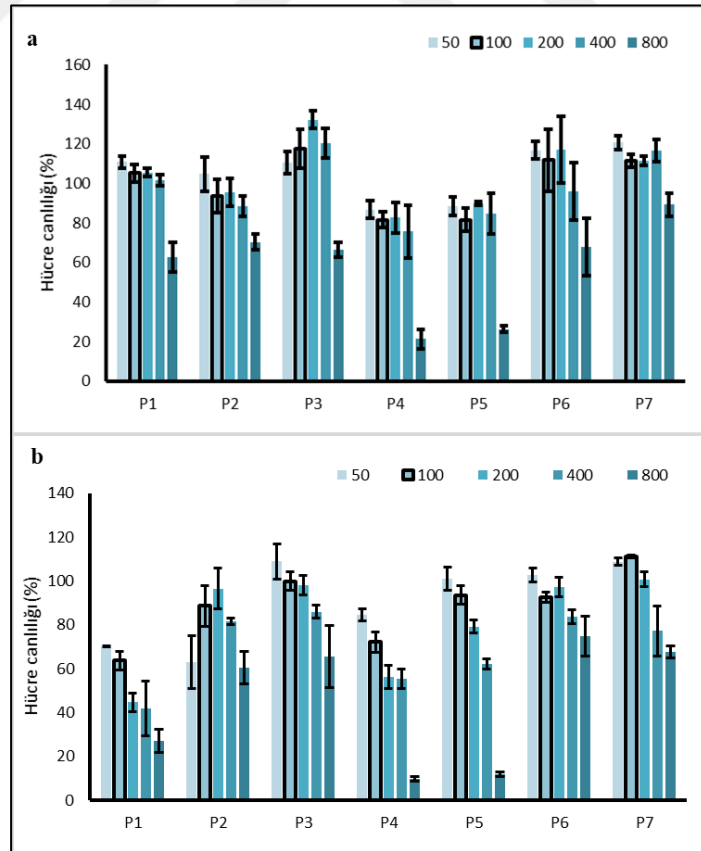
Çizelge 4. 15 P1-P7 peptidlerinin monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri

	Monofenolaz aktivitesi			Difenolaz aktivitesi		
	Tirozinaz inhibisyonu (%800 µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)	Tirozinaz inhibisyonu (%800 µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
P1	13,91	---	---	4,20±1,39	---	---
P2	84,66±0,42	57,65	86,86	52,98±1,51	657,24	990,30
P3	84,27±0,50	96,54	116,17	31,74±3,56	889,86	1069,80
P4	57,32±4,71	635	623,65	9,32±1,47	---	---
P5	83,39±2,64	7,74	12,12	6,03±0,82	---	---
P6	13,78±2,0	---	---	0,96±0,68	---	---
P7	53,48±9,11	338,2	191,40	5,67±1,63	---	---

P2 ve P3 peptidlerinin antioksidan aktivite göstermesi ile difenolaz aktivitesi arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Diğer peptidlerde monofenolaz aktivitesi üzerinden P1 ve P6 hariç %50 üzerinde tirozinaz enzim inhibisyonu gözlenmiş olsa da difenolaz aktivitesi açısından %10 değerlerinin altında seyretmiştir. P5 ise antioksidan aktivite göstermemesine rağmen, en düşük IC₅₀ değerine (12,12 µM) sahip olmuştur. Bunun da yapıda bulunan C terminal tirozin varlığı nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

4.5.4. P1-P7 B16-F10 Hücre Canlılığına Etkisi

P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre canlılığına etkisi doza bağlı olarak 48 ve 72 saat süreleri için incelenmiştir. Genel olarak 800 µg/ml konsantrasyonlarda canlılıkta anlamlı düşüşler olduğu gözlenmiştir. 48 saatte P1, P3, P6 ve P7'nin düşük dozlarında büyümenin negatif olarak etkilenmediği incelenmiştir. 72 saate ilerlendiğinde P1'in artan dozları doğrusal bir canlılık azalması olarak sonuçlanmıştır. P2 için 200 µg/ml konsantrasyon değerine kadar canlılık artış göstermiş ancak 400 ve 800 µg/ml dozlarda sırasıyla %80 ve %60 olarak seyretmiştir. Dozun negatif etkisi P4 ve P5 için 800 µg/ml konsantrasyonda anlamlı bir etki göstermiştir. Canlılık %25'in altında bulunmuştur. Yine P4 ve P5'in 48 saatteki değerleri ile kıyaslandığında benzer bir profil gözlenmiştir. Ancak 200 µg/ml konsantrasyon altında hücre canlılık ciddi ölçüde etkilenmemiştir. P6 ve P7 peptidleri se diğerlerine kıyasla toksik etkisi en düşük peptidler olarak seyretmiştir. Peptidlerin canlılık düşüşleri göstermesi ve doza bağlı olarak bu düşüşün artması anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). P7 için 100-800 µg/ml konsantrasyonları aralığında canlılık açısından belirgin bir fark bulunmasa da ($p > 0,05$); 800 µg/ml için gözlenen düşüş anlamlı olmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4. 45 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre canlılığına etkisi, a) 48 saat, b) 72 saat

Hücre canlılığının bulunması sonrasında peptidlerin canlılık açısından IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır (Çizelge 4.16). Gözleendiği üzere; özellikle P3, P6 ve P7'nin IC₅₀ dozları 1000 µg/ml'nin üzerindedir. P1, P4 ve P5 için IC₅₀ dozları 500 µg/ml'nin altında kalmaktadır.

Çizelge 4. 16 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücre hatlarında canlılık için IC₅₀ konsantrasyonları

Peptid	Hücre canlılığı IC ₅₀ (µg/ml)
P1	350,61±5,18
P2	964,70±7,31
P3	1073,44±14,17
P4	399,61±1,02
P5	478,31±1,23
P6	1404,47±8,92
P7	1087,31±2,64

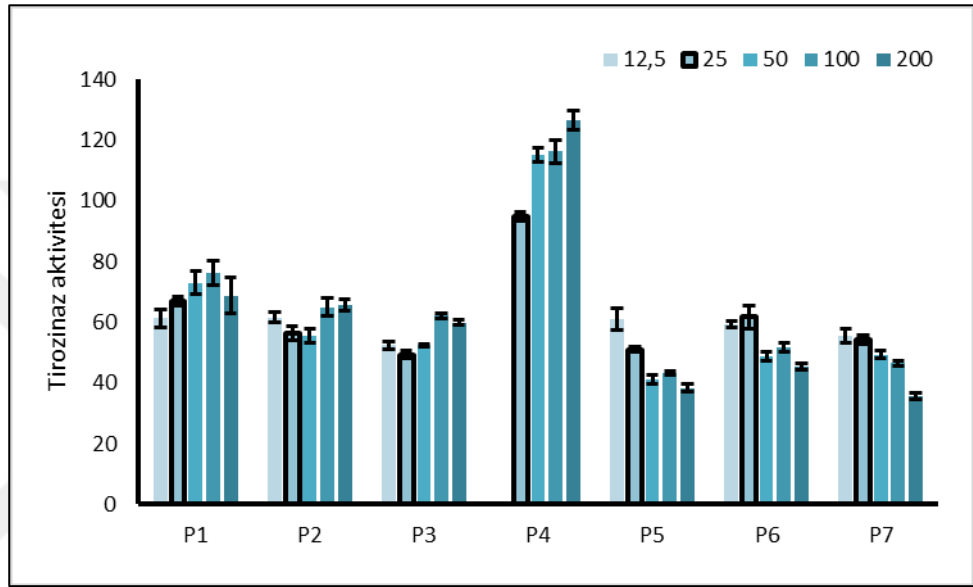
P1, P2, P4 ve P5 peptidlerinin suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Bu nedenle bu peptidler DMSO içerisinde çözdürülmüş ardından pH 6,8 fosfat tamponu ile istenilen konsantrasyona getirilmiştir. DMSO'nun negatif kontrol olarak kullanıldığı çalışmalarda hücre canlılığını %10'un altına düşürdüğü gözlenmiştir. Özellikle çözünürlüğü DMSO ile gerçekleştirilen peptidlerde canlılığının yüksek dozlarda düşük olmasına DMSO'nun da katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hücresel tirozinaz ve melanin üretimlerinin incelendiği çalışmalarda maksimum konsantrasyon 200 µg/ml olarak kullanılmıştır.

4.5.5. P1-P7 Peptidlerinin B16-F10 Hücrelerinde Hücresel Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

Peptidlerin B16-F10 hücrelerinde tirozinaz enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.45). P4 hariç tüm peptidler anlamlı ölçüde tirozinaz enzim inhibisyonu yapmıştır. P1, P2 ve P3 için inhibisyon değerleri dozdan bağımsız olarak %40-50 arasında değişiklik göstermiştir. Ancak P5, P6 ve P7 için özellikle 200 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzimi aktivitesi %70 oranında inhibe edilmiştir. P1-3 aksine (p>0,05); P5-7 doza bağlı bir inhibisyon sergilemiştir (p<0,05). 200 µg/ml konsantrasyonda inhibisyon değerleri P1-7 (P4 hariç) için sırasıyla %31,28; %34,32; %40,07; %61,75; %54,68 ve %64,50 olmuştur. P5 ve P7'nin yapısında bulunan C terminal tirozin varlığının hücresel tirozinaz enzim inhibisyonuna etkisinin olduğu açık bir şekilde gözlenmiştir. P2 ve P3 yapısında bulunan L-R kombinasyonu yine enzim inhibisyonuna katkı sağlamaktadır.

Tripeptid olan GRF'in ise %54,68 inhibisyon yapması dizi boyutundan ziyade amino asit dizilimlerinin inhibisyon miktarı üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir.

Tüm bu sonuçların yanı sıra P4 mantar tirozinaz enzimi inhibisyonu yapmış olmasına rağmen B16-F10 hücrelerinde aktivasyon ile sonuçlanmıştır. Tirozinaz enzimini 200 µg/ml konsantrasyonda %126 oranında arttırmış ve doza bağlı olarak ise bu artış gerçekleştirilmiştir ($p<0,001$).



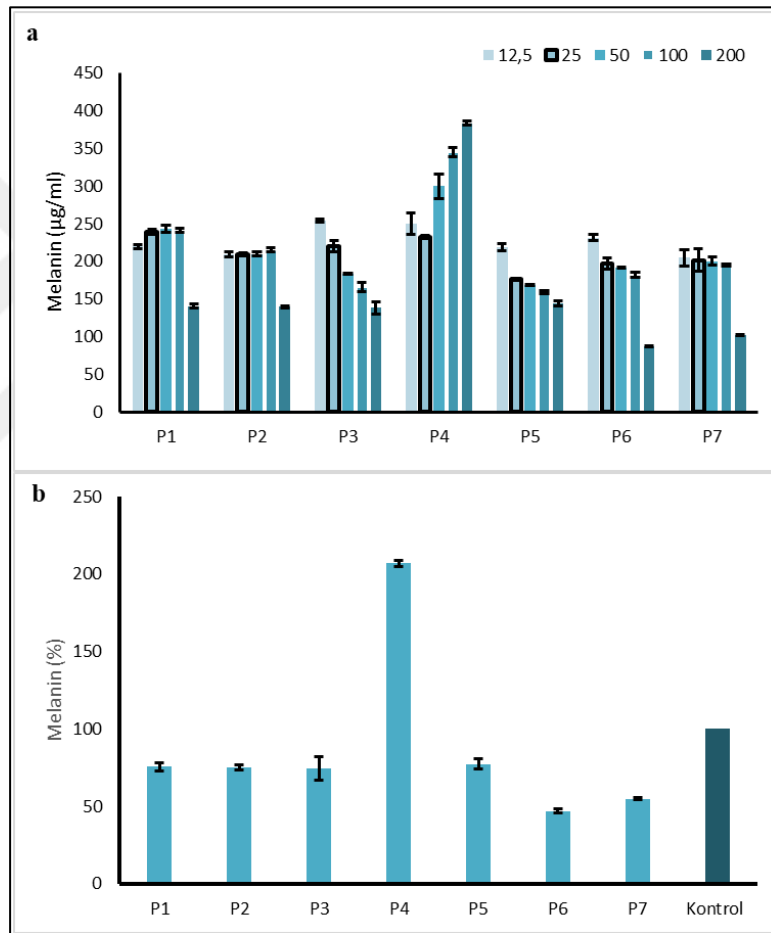
Şekil 4. 46 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücrelerinde hücresel tirozinaz aktivitesine etkisi

4.5.6. P1-P7 Peptidlerinin B16-F10 Hücrelerinde Melanin Üretimine Etkisi

Peptidlerin B16-F10 hücrelerinde üretilen melanin miktarına etkisi doza bağlı olarak incelenmiştir (Şekil 4.46). Sırasıyla peptidler incelendiğinde P1 ve P2 için 12,5-100 µg/ml konsantrasyonlarda melanin miktarlarının doza bağlı bir etkisi gözlenmemiş ($p>0,05$) ancak 200 µg/ml dozda melanin miktarlarında hızlı bir düşüş gözlenmiştir (200 µg/ml için $p<0,05$). 12,5-100 µg/ml konsantrasyonlarında ortalama sırasıyla P1 ve P2 için $235,85\pm9,40$ ve $210,99\pm2,47$ µg/ml melanin miktarı elde edilmişken 200 µg/ml konsantrasyon melanin miktarları yaklaşık %50 azalarak $140,22\pm2,68$ ve $139,53\pm1,70$ µg/ml değerlerine düşmüştür. Hem tirozinaz inhibisyonu hem de melanin miktarları göz önüne alındığında P1 ve P2'nin hücresel tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi birbirlerinden farklı değildir. P3 için dozun etkisi oldukça net bir şekilde gözlenmiştir. 12,5 µg/ml konsantrasyonda $254,24\pm1,46$ µg/ml melanini üretimi olmuşken 200 µg/ml için bu değer $138,15\pm7,78$ µg/ml

değerine düşmüştür. P3 için de her ne kadar doza bağlı orantısız melanin üretimi sağlanmış olsa da ($p<0,001$) 200 $\mu\text{g/ml}$ için P1 ve P2 ile eşdeğer ölçüde melanin üretimi gerçekleştirmiştir.

P4 melanin üretimin doza bağlı olarak arttırmıştır ($p<0,001$). 12,5 konsantrasyonunda $250,56 \pm 14,12$ $\mu\text{g/ml}$ melanin üretimi sağlayarak kontrolün 1,35 katı melanin üretimi sağlamıştır. 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ise bu değer $383,9 \pm 2,25$ $\mu\text{g/ml}$ değerine yükselmiştir ki kontrol değerinin 2 katı melanin üretimi sağlamıştır. Tirozinaz enzimini %26 aktive etse de bunun sonucunda melanin üretimi ikiye katlamıştır.

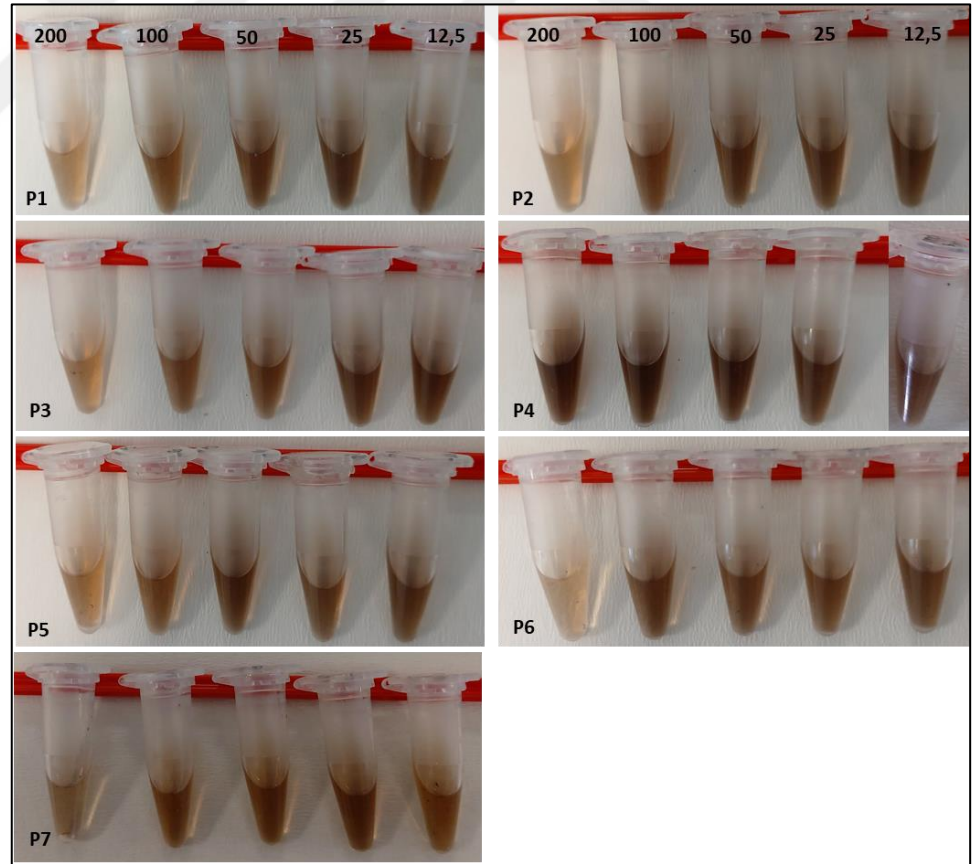


Şekil 4. 47 P1-P7 peptidlerinin B16-F10 hücresel melanin üretimine etkisi a) doza bağlı melanin miktarları, b) 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda %melanin üretimi

P5 için yine doza bağlı melanin miktarı üretiminde azalmalar gözlenmiştir. 12,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için bu değer $218,84 \pm 4,20$ $\mu\text{g/ml}$ iken; 200 $\mu\text{g/ml}$ için $143,67 \pm 3,26$ $\mu\text{g/ml}$ değerine düşmüştür ($p<0,05$). 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu da göz önüne alındığında melanin üretimi açısından P1-P3 ile anlamlı bir farklılığı sahip değildir. P6 için 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda melanin miktarı $87,34 \pm 1,02$ $\mu\text{g/ml}$;

P7 için ise $101,71 \pm 0,71$ $\mu\text{g/ml}$ olmuştur. 200 $\mu\text{g/ml}$ dozda melanin üretimleri ise sırasıyla kontrol örneğine görece olarak %75,54; %75,17; %74,42; %206,82; %77,40; %47,05; %54,80 şeklinde değişiklik göstermiştir. Bu sonuçlardan da çıkarılabildiği üzere P1-P3 ve P5 melanin üretimi açısından anlamlı bir farklılık göstermemiş; P7 melanin üretimini 2 kat arttırmış, P6 ve P7 ise melanin üretimini %50 değerleri seviyesine düşürmüştür. Aralarında anlamlı farklılıklar olsa da her bir peptidin hücrel tirozinaz inhibisyonu ve melanin üretimine etkisi olduğu gözlenmektedir.

Şekil 4.47’de melanin üretimleri her bir peptid için doza bağlı olarak görüntülenmiştir. İzlendiği üzere P1-P3, P5-7 peptidlerinde 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda renkte açılmalar gözlense de P4 için melanin üretiminin artmış olduğu görülmektedir. P4 peptidi hipopigmentasyonun gerilemesini sağlamada, geriye kalan peptidler ise hiperpigmentasyonun azaltılmasında kullanılabilecek aday peptidler arasındadır.

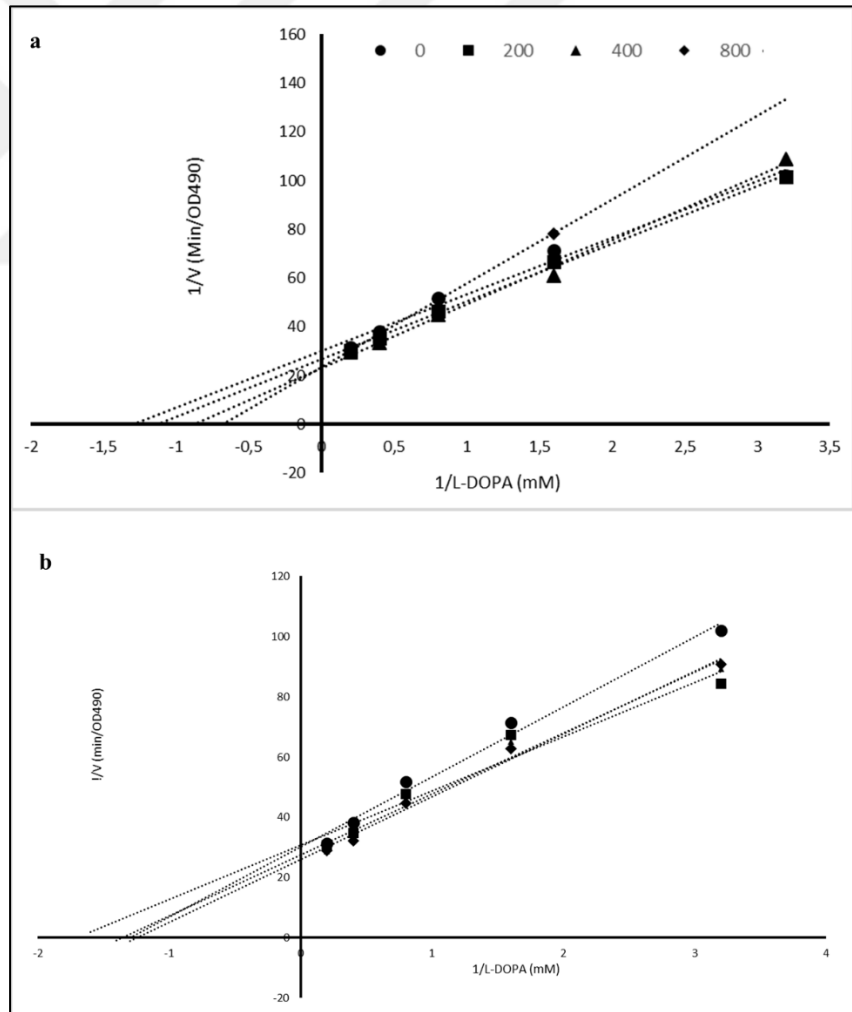


Şekil 4. 48 P1-P7 peptidlerinin doza bağlı melanini üretimlerinin ependorf görüntüleri

4.5.7. Lineweaver-Burk Kinetiklerinin Belirlenmesi

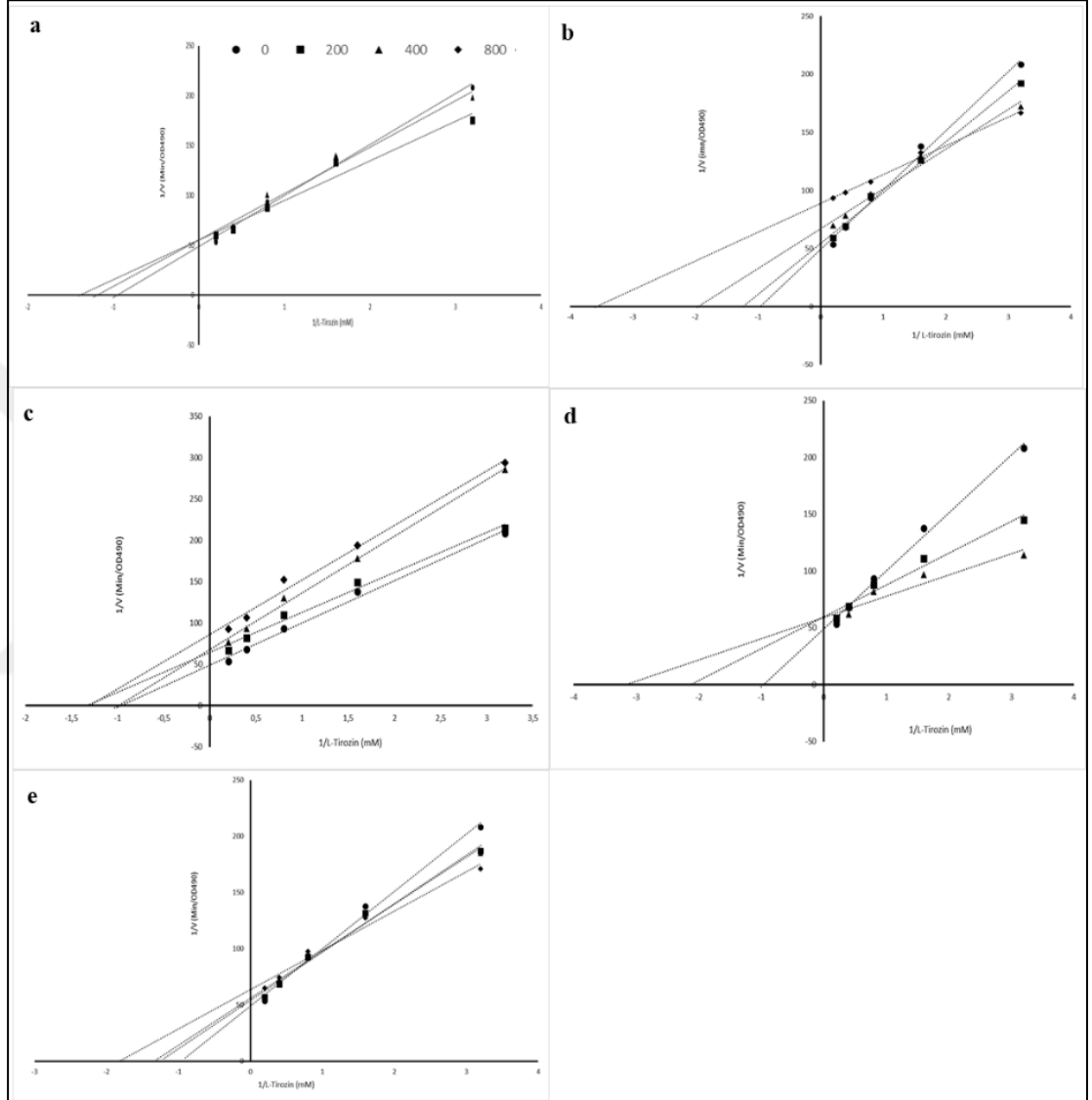
Mantar tirozinaz enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitesini %50 ve üzeri oranda inhibe eden peptidlerden Lineweaver-Burk kinetikleri belirlenmiştir (Michelis-Menten grafikleri ise Ek 4’de sunulmuştur). L-DOPA substratı için P2 ve P3; L-tirozin substratı için ise P2, P3, P4, P5 ve P7 peptidleri enzim inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Difenolaz aktivitesi incelendiğinde (Şekil 4.49); P2 ve P3’ün V_{max} değerleri sabit iken K_m değerlerinde doza bağlı artış meydana gelmiştir (Çizelge 4.17). Bu neticede P2 ve P3’ün difenolaz aktivitesi üzerinden mantar tirozinaz enzimine kompetitif inhibitör olduğu söylenebilir. İnhibitör olmayan durumda K_m değeri 0,596 $\mu\text{g/ml}$ iken 800 $\mu\text{g/ml}$ değerinde P2 ve P3 için sırasıyla 1,483 ve 0,801 $\mu\text{g/ml}$ değerlerindedir.



Şekil 4. 49 P2(a) ve P3(b) peptidinin L-DOPA substratında difenolaz aktivitesine bağlı Lineweaver-Burk kinetikleri

Monofenolaz aktivitesine inhibitör etkileri incelendiğinde (şekil 4.50) P2'nin inhibisyon türü tanımlanamamış ve P3'ün ise unkompetitif inhibisyon yaptığı bulunmuştur (Çizelge 4.17). P4 unkompetitif aktivasyon gerçekleştirmiş, P7 ise unkompetitif inhibisyon göstermiştir. Ancak P5 için inhibisyon türü belirlenememiştir.



Şekil 4. 50 P2(a), P3(b), P4(c), P5(d) P7(e) peptidlerinin L-tirozin substratında monofenolaz aktivitesi üzerinden Lineweaver-Burk enzim kinetikleri

Enzim inhibisyon türlerinin belirlenmesi sonucu elde edilen veriler göstermiştir ki, enzimin kullanmış olduğu substrata göre inhibisyon türü de değişiklik gösterme kabiliyetindedir. Mantar tirozinaz aksine hücresel tirozinaz inhibisyonu için saf enzim ile çalışılmadığından inhibisyon türünün belirlenmesi çalışması gerçekleştirilmemiştir. Ancak moleküler docking çalışmaları ile enzim kinetiklerinin beraber kullanılması sayesinde hem inhibisyon türü hem de statik ve

dinamik koşullarda peptidin bağlanma enerjileri ile bağlanma şekilleri belirlenebilir. Sonuçlar enzimin inhibisyon kinetiklerini bir miktar da ortaya koysa, farklı doz aralıklarının denenmesi ile enzim kinetikleri üzerinden inhibisyon türünün belirlenmesi için ayrı bir çalışma yürütülmesi gerekmektedir. Örneğin, P2 ve P5 için inhibisyon türü bulunamamıştır. Bu iki peptidin de serbest enzimi hücre içermeyen koşullarda inhibe ettiği gözlemlense de inhibisyon kinetiğinin eldeki veriler ile belirlenememesi ek denemelere ihtiyaç duyulduğu yönünde olmuştur. Peptidlerin yine monofenolaz aktivitesi için unkompetitif inhibisyon yapması şaşırtıcı değildir. Özellikle L-tirozin tirozinaz enziminin en etkin substratıdır ve ortamda bulunduğu enzimin aktif bölgesi için yarışan güçlü bir substrattır. Genel olarak L-DOPA'nın enzimin aktif bölgesi için L-tirozine göre daha yavaş hareket ettiği belirtilmiştir. Bu nedenle de P2 ve P3'ün L-DOPA varlığında kompetitif inhibisyon yapmasına rağmen, L-tirozin varlığında enzim kinetiklerinin değişkenlik göstermesi bu yüzden kaynaklanıyor olabilir.

Çizelge 4. 17 Fikosiyanin peptidlerinin Lineweaver-Burk kinetiklerine göre inhibisyon/aktivasyon türleri ve K_m , V_{max} değerleri

L-DOPA (Difenolaz aktivitesi)				
	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	K_m	$V_{\max}$	İnhibisyon türü
P2	0	0,596	0,033	Kompetitif
	200	0,883	0,037	
	400	1,146	0,043	
	800	1,483	0,043	
P3	0	0,596	0,033	Kompetitif
	200	0,757	0,033	
	400	0,791	0,039	
	800	0,801	0,038	
L-Tirozin (monofenolaz aktivitesi)				
P2	0	1,041	0,020	-
	200	0,836	0,020	
	400	0,716	0,020	
	0	1,041	0,020	
P3	200	0,808	0,018	Unkompetitif
	400	0278	0,011	
	800	0,0004	0,010	
	0	1,347	0,020	
P4	200	1,060	0,015	Unkompetitif
	400	0,710	0,014	
	800	0,592	0,011	
	0	1,041	0,020	
P5	200	0,469	0,020	-
	400	0,314	0,020	
	0	1,041	0,020	
	200	0,799	0,018	
P7	400	0,749	0,017	Unkompetitif
	800	0,547	0,005	

4.5.8. *In silico* Biyoaktivite Tahminlerinin Gerçekleştirilmesi

Peptidlerin *in silico* biyoaktivitelerinin belirlenmesi için pek çok farklı veri tabanı kullanılmıştır. Öncelikle, peptid dizilerinin olası biyoaktivite tahminleri BIOPEP veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BIOPEP veri tabanında peptidlerin antioksidan, ACE inhibitörü ve DPP-IV inhibitörü gibi aktivitelere sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.18). 0-1 arasında skorlar kullanılarak biyoaktivite tahminleri gerçekleştirilmektedir. Buna göre ACE inhibisyonu açısından P1, P6, P4, P3 peptidleri 0,5'in üzerinde skorlanmış iken; P5 için ACE inhibitör aktivitesi bulunamamıştır. P2 ve P7 için ise ACE inhibitör aktivitesi olasılığı oldukça düşüktür. DPP-IV inhibisyonu açısından ise, P4 ve P5 peptidleri yüksek skorlanmışken; geriye kalan peptidler anlamlı bir olasılık vermemiştir. Antioksidan aktivite için ise düşük olmakla beraber P4, P5 ve P7 için aktivite tahminleri yapılmıştır. Tez konusunun hedefi olmadığı için gerçekte peptidlerin ACE ve DPP-IV inhibitör etkisi incelenmemiştir. Ancak peptidlerden DPPH radikali süpürme aktivitesi göz önüne alındığında P2 ve P3'ün oldukça güçlü antioksidan peptidler olduğu bulunmuştur. Diğer peptidlerin ise antioksidan aktivitesi gözlenememiştir. Ancak BIOPEP veri tabanı gerçek sonuçlar ile çelişen tahminler sunmuştur.

Çizelge 4 18 BIOEP veritabanına göre P1-P7 peptidlerinin *in silico* biyoaktivite tahminleri

	ACE* inhibisyonu	DPP-IV** inhibisyonu	Antioksidan
P1	0,83	0,33	---
P2	0,33	0,33	---
P3	0,57	0,13	---
P4	0,62	0,75	0,13
P5	---	0,80	0,20
P6	0,66	0,33	---
P7	0,375	0,32	0,06

*ACE Angiotensin II reseptörü, **DPP-IV Dipeptidil Peptidaz-IV

Toksik özelliklerini belirlemek için ToxinPred veri tabanı (<http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/>) kullanılmıştır. SVM skorlaması *in silico* algoritma içerisine gömülü toksik motiflerin varlığına göre artan değerlerdir. SVM skorlarının sıfırın altında olması peptidlerin tahmini toksisitesi olmadığını öne sürmektedir. Yapılan MTT analizi ile de peptidlerin toksik özellikleri olmadığı ortaya konmuştur (Çizelge 4.19).

Çizelge 4. 19 ToxinPred veri tabanına göre peptidlerin toksik aktiviteleri

	SVM Skoru	Toksik aktivitesi
P1	-1,07	Non-toksin
P2	-0,64	Non-toksin
P3	-0,59	Non-toksin
P4	-1,04	Non-toksin
P5	-0,85	Non-toksin
P6	-0,80	Non-toksin
P7	-0,29	Non-toksin

Anti-enflamatuvar peptid tahmini AIPred (<http://thegleelab.org/AIPred.html>) veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anti-enflamatuvar peptid tahmini N-terminal uçta lösin, tirozin, serin, arjinin ve glutamik asit varlığında ayrıca C-terminal uçta ise lösin, glutamin, serin ve arjinin varlığı peptidlerin yüksek anti-enflamatuvar aktivite gösterebileceğini ifade etmektedir. Veri tabanı 5-25 aminoasit aralığını kabul ettiği için GRF (P6) listeden çıkarılmıştır. AIPred veri tabanına göre tüm peptidler olası anti-enflamatuvar aktivite göstermektedir. SVM skorları 0,45-0,5 arasındadır ve bu değere göre anti-enflamatuvar aktivite göstermesi oldukça yüksektir.

Karşılaştırma yapmak için PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PreAIP/>) veri tabanı da kullanılmıştır. PreAIP sonuçlarına göre P7 (AADQRGKDKCARDIGY)'nin SVM skoru 1 üzerinden 0,575'tir ve oldukça yüksek ihtimalle anti-enflamatuvar aktiviteye sahiptir. Anti-enflamatuvar aktiviteye katkı sağlayan unsur N-terminal Tirozin (Y) varlığı olduğu düşünülmektedir. P1, P2, P3, P4'te anti enflamatuvar aktivite gösterme olasılığı orta seviyede olan peptidler (SVM skoru 0,4-0,5 arasında) olarak sonuçlandırılmıştır. Dizlerde yer alan N-terminal arjinin (R) (P1, P2), N-terminal lösin (L) (P3), C-terminal R (P3, P4) neticesinde anti-enflamatuvar etki gösterdiği düşünülmektedir. P5 ise düşük (SVM skoru 0,343) anti-enflamatuvar etki gösterebilir şeklinde sonuçlanmıştır. N-terminal tirozin (Y) ve C-terminal Serine (S) olmasına rağmen kısa bir peptid olduğu için düşük skorlanmış olabileceği düşünülmektedir. Anti-enflamatuvar aktivite gösterme potansiyeli olan peptidler (P1-P5, P7) hücre kültüründe test edilmesi gerekmektedir.

Antikanser peptid tahmini karşılaştırmalı olarak iACP ve AntiACP veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre iACP veri tabanı P4 (RYVTYAVF) için %88 olasılıkla antikanser etkiye sahip olabileceğini tahmin etmektedir. Ancak AntiACP veri tabanına göre ise P6 hariç tüm peptidler antikanser aktiviteye sahip olmakta beraber P2, P3 ve P4 peptidlerinin antikanser olma olasılığı daha yüksektir.

In silico veri tabanlarından elde edilen tahminlerin gerçekte etkili olup olmadığını anlayabilmek amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bahsedilen aktivitelerden özellikle peptidler anti-enflamatuvar etkiye de sahip ise enflamatuvar hiperpigmentasyonun önlenmesinde başarılı topikal kozmesötikler olacağı düşünülmektedir.



5. TARTIŞMA

Tez kapsamında mikroalgal proteinlerden *in silico* ve *in vitro* elde edilen protein hidrolizatlar ve peptidler tirozinaz inhibisyonu özellikleri açısından incelenmiştir. Tirozinaz inhibisyonu etkisi önce mantar tirozinaz enzimi üzerinde, ardından B16-F10 fare melanoma hücre hatlarında gözlenmiştir.

5.1. Enzimatik Hidroliz İşlemleri

5.1.1. Mikroalgal Proteinler

Tez kapsamında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikroalgal Biyoproses Laboratuvarı bünyesinde bulunan mikroalg, diyatom ve siyanobakteri türleri öncelikli olarak büyüme kinetikleri ve protein üretimleri açısından değerlendirilmiştir. Var olan türlerden *Prorocentrum micans*, *Tolypotrix*, *Nostoc muscorum* ve *Nodularia* türlerine ait ikilenme sürelerinin yaklaşık 60 saatin üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu türlerin üretimi durdurulmuş ve geriye kalan türler ile devam edilmiştir. Bilinmektedir ki mikroalgler çok fazla tür çeşitliliğine sahip organizmalardır. Ancak oldukça fazla tür olmasına rağmen (Chauvy et al., 2019; Spolaore et al., 2006), biyoteknolojik kullanıma yatkın olan türlerin sayısının düşük olması mikroalgal biyoproseslerin önünde yer alan belki de en büyük engeldir (Harun et al., 2010; Huntley and Redalje, 2007; Volkman et al., 1998).

Üretilen biyokütle miktarları 2 g/L değerine ulaştığında biyokütleden protein tayini işlemleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bilinmelidir ki mikroalgal biyokütlenin biyokimyasal kompozisyonu besin ortamı içeriği, özellikle N/P ve C kaynağı başta olmak üzere, türün yetiştirilme koşulları, ışık miktarı gibi temel çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bu çalışma kapsamında protein miktarını arttırmaya yönelik herhangi bir besin ortamı ya da kültür koşulları optimizasyonu gerçekleştirilmemiş, türlerin kendi genel üretim ortamlarındaki büyüme hızları ile protein ve biyokütle üretim miktarları dikkate alınmıştır.

Çalışmada geriye kalan türlerden *Oscillatoria* sp., *C. vulgaris*, *S. limacinum*, *Lynghya* sp. ve *C. reinhardtii* türlerinde, *S. platensis* hariç, biyokütle üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ancak protein içeriklerinin %40 değerinin altında kalması neticesinde, devam eden çalışmalar *S. platensis* ve *C. vulgaris* ile sağlanabilmektedir. Her iki türün de protein içerikleri %50'nin üzerindedir. Bu sayede tez çalışmasında

protein kaynağı olarak kullanılabilmişler ve tekrar edilebilir sonuçlar üretilmesini sağlamışlardır. Genellikle literatürde *C. reinhardtii* için protein miktarları %40'ın biraz üzerinde olmasına rağmen bu çalışmada $34,5 \pm 0,65$ miktara ulaşılmıştır (Oncel et al., 2014). Literatür ile ciddi bir farklılık olmasa da biyokütle üretimleri ile de karşılaştırıldığında; *C. reinhardtii* üretim listesinden çıkarılmıştır.

Hidroliz işlemlerinden önce mikroalgal biyokütleden etanol ile ön işlem gerçekleştirilmiş ve bir takım pigment ve yağ moleküllerinin biyokütle içerisinden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu ön işlem ile klorofil başta olmak üzere lipofilik ürünler ile pigment moleküllerinin büyük bir çoğunluğu biyokütleden ekstrakte edilmiş ve yaklaşık %15'lik bir ekstraksiyon verimi sağlanmıştır. Bu ön işlem mikroalgal proteinler ile proteazların interaksyonunu arttırmıştır. Özellikle sert çeperli *Chlorella* gibi türlerde hidroliz işlemi öncesinde ılımlı ön işlemler duvarın kırılmasını sağlayarak hem proteinlerin çözündürülebilirliğini arttırmakta hem de enzimin protein interaksyonunu hızlandırmaktadır. Böylece protein hidroliz işlemi verimi de arttırılmış olmaktadır.

Enzimatik hidroliz işlemleri 3 temel proteaz ile sağlanmıştır. Bunlar gastrointestinal enzimlerden olan tripsin ve pankreatin ile *Bacillus* türlerinden elde edilen ve *in vitro* protein fermentasyonunda özellikle tercih edilen subtilisin olarak da bilinen alkalaz enzimidir. Pankreatin ve tripsin enzimi ile yüksek lisans tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda enzimin koşulları optimize edilmiştir (Kose ve Oncel, 2014). Bu nedenle hidroliz işlemleri yapılmadan evvel sadece alkalaz enzimi için bir takım optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Enzimin optimum çalışma aralığı bilindiği için sıcaklık 55 °C'de, pH 7 ve 8 koşullarında gerçekleştirilmiştir. Enzimin pH değeri, eğer saf bir protein ile çalışılıyorsa proteinin izoelektirik noktası pH değerlerinin bilinmesi önemlidir. Ancak mikroalgal biyokütle substrat olarak kullanıldığı için pH 7 ve 8'de biyokütle partikül halinde tampon çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağıtmaya çalışılmıştır. pH 7 ve 8 arasında tür farkı gözetmeksizin, pH 8 koşullarında 4 saatlik denemede hidroliz işlemleri %5-7'lik bir artış göstermiştir. %DH artışı *C. vulgaris* için belirgin iken, bu artış *S. platensis* için ciddi bir fark yaratmamıştır. Enzimin pH değeri 8 olarak seçilmiş ve devam çalışmalarının hepsi bu pH değerinde sağlanmıştır.

Chlorella ellipsoidea ile gerçekleştirilen bir çalışmada pH 8'de 1/100 (w/w) E/S oranında alkalaz ile gerçekleştirilen 12 saatlik hidroliz işlemi sonrasında, Protamex, Kojizyme, Neutrase, Flavourzyme, tripsin, kimotripsin, pepsin ve papain

enzimleri arasında en yüksek antihipertensif aktiviteye sahip peptid üretme kapasitesine sahip enzimin alkalaz olduğu saptanmıştır (Ko et al., 2012). *Nannochloropsis oculata* mikroalginden 1/100 (w/w) E/S substrat oranında pH 8’de 24 saat gerçekleştirilen hidroliz işleminde ise antihipertensif peptid üretimi açısından pepsin en başarılı sonuçları vermiştir (Samarakoon et al., 2013). *Navicula incerta* mikroalginde ise yine alkalaz enzimi kullanılmış ve açığa çıkan hidrolizatlardan antioksidan aktiviteye sahip peptidler etanole bağlı karaciğer hasarının iyileştirilmesi çalışmasında kullanılmıştır. Bu çalışmada ise alkalaz enzimi ile yine başarılı sonuçlar alınmasına rağmen papain enziminin varlığında daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip peptidlerin elde edildiği bulunmuştur (Kang et al., 2012). Görüldüğü üzere enzimin ortaya çıkardığı peptidlerin biyoaktiviteleri türlerin protein ve amino asit içeriğine göre farklılık göstermektedir. Ancak genel olarak alkalaz ve mikroalglerin bir arada kullanıldığı çalışmalarda pH 8’de hidroliz işlemleri sıklıkla gerçekleştirilmiştir.

C. vulgaris ile *S. platensis* için alkalaz enzimi ile hidroliz işlemleri amacıyla süre optimizasyonu sağlanmıştır. 4-24 saat aralığında gerçekleştirilen çalışmada sürenin *C. vulgaris* proteinlerinin %DH değerine anlamlı bir etkisi olmamıştır. *C. vulgaris* için hidroliz %40-48 verimle gerçekleşmiştir. Ancak *S. platensis* için 4 saat sonunda $52,1 \pm 0,3$ oranında hidroliz verimi elde edilmiş ancak bu verim 12 saatten sonra %40’ın altına gerilemiş ve sabitlenmiştir. Öncelikle her iki tür arasında bulunan en önemli farklılık taksonomik sınıflandırmaları neticesinde çeper yapılarındaki farklı yapılaşma ve çeper içeriğidir. Diğer yeşil alglerde olduğu gibi *C. vulgaris* zırh gibi hücreyi oldukça yüksek stres faktörlerinden koruyan selüloz bir katmana sahiptir (Safi et al., 2014). Bu katman hücrenin mekanik ve kimyasal stres faktörlerinden etkili bir şekilde korunmasını sağlar. Örneğin mikroalgal proseslerde hücrelerin kayma gerilimlerine yanıtı incelendiğinde; *C. vulgaris*’in 6 Pa ve üzeri basınç koşullarında yaşamlarını devam ettirdikleri ancak *S. platensis* için 0,45 Pa üzeri kayma gerilimlerinin kitlesel hücre ölümlerine neden olduğu bilinmektedir (Kumar et al., 2019; Leupold et al., 2013). Buradan yola çıkarak her iki hücrenin de içerisindeki proteinlerine ulaşım zorluğu tahmin edilebilir. Morris ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hücrenin etanol ile ekstraksiyonu sonrası çeperin esnetilmesi proteinlerin hidroliz verimini arttırmıştır. Proteinlerin %DH değerleri protein sindirilebilirliği üzerinden kıyaslandığında ham biyokütleden %70, etanol ekstraksiyonu sonrasında %75, enzimatik hidroliz sonrasında %97 değerlerine ulaşmıştır (Morris et al., 2008).

S. platensis peptidoglikan yapıda ince bir film tabakasını andıran bir çeper yapısına sahiptir. Çeperin kimyasal, solvent ve sonikasyon gibi mekanik işlemlerde hızlıca bozulması hücre içeriğine erişilebilirliğin de artmasını sağlamaktadır. Bu kapsamda alkalaz ile yapılan ön işlemler çeperin etkisini ortaya koymuştur. Muhtemelen enzimin hücre içerisine penetrasyon zorluğu nedeniyle *C. vulgaris* için süreye bağlı bir %DH değişimi gözlenmez iken; *S. platensis* proteinlerinin zamana bağlı %DH değerlerinde gözlenen azalma hidroliz işleminin ilk sürelerinde enzimin yeterli miktarda substrat ile etkileşime girmesi ve bu etkileşimin enzimin hücre içerisine hızlıca girebilmesi nedeniyle çok daha çabuk gerçekleşmesine neden olmuştur. Ancak zaman geçtikçe substratın tükenmesine bağlı olarak %DH de azalmaya başlamıştır (Awuor et al., 2017).

Alkalaz enzimi ile hidroliz koşullarının belirlenmesinin ardından, *S. platensis* ve *C. vulgaris* biyokütleleri tripsin, pankreatin ve alkalaz enzimi ile hidroliz işlemine tabii tutulmuştur. Üç enzim arasında tripsin %DH açısından en etkin sonuçları vermiştir (*S. platensis* %80,77±4,2, *C. vulgaris* %51,59±3,3). Görüldüğü üzere *C. vulgaris* ile *S. platensis* arasında da anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. Öncelikle bu farklılıkta hücrelerin çeper yapısı etkili olmaktadır. Ancak proteinlerin de amino asit dizilerinin de katkısı olabileceği düşünülmektedir. Becker (2007)'e göre *S. platensis* amino asitlerinin %7,3'ü *Chlorella* için ise %6,5'i arjinden oluşmaktadır. Tripsin enzimi arjinin birimlerinden kesim sağladığı için yapıdaki arjinin miktarlarındaki artış enzimin hidroliz etkinliğini de değiştirebilmektedir. Çeper ve amino asit içeriği düşünüldüğünde böyle bir farkın doğması olasıdır. Ancak mikroalglerin proteom analizleri tam olarak bilinmediği için bu tür proteolitik enzimler ile hidroliz sonucu açığa çıkan diziler tam olarak da bilinmemektedir. Pankreatin enzimi incelendiğinde *S. platensis* için %64,45±3,9, *C. vulgaris* için %41,24±1,7'dir. Yüksek lisans tezi kapsamında yapılan denemelerde ise sırasıyla %64,8±3,6 ve %55±0,1 olarak bulunmuştur ki bu değerler *C. vulgaris* için düşüş gözlense de bir önceki çalışmayla kıyaslandığında tekrarlanabilir olmuştur (Kose vd., 2017). Alkalaz enzimi *S. platensis* için %50,2±1,2, *C. vulgaris* için %42±1,4 oranında hidroliz etkinliği sağlamıştır. Her üç enzim *S. platensis* türünde anlamlı farklılıklara neden olmuş, *C. vulgaris* için ise tripsinin hidroliz etkinliği diğerlerinden farklılık göstermiştir. Lakin, genel olarak her üç enzim de mikroalgal proteinlerin %40'ından fazlasını hidroliz edebilmiş ve başarılı bir hidroliz işlemi sunmuştur.

Peptidlerin ve protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi tirozinaz enzimi inhibisyonunda ve antimelanojenik aktivitenin belirlenmesinde kilit bir role sahiptir.

Antioksidan aktivite gösteren bileşikler yüksek oranda anti-tirozinaz aktiviteyi doğrudan ya da dolaylı olarak sahip olmaktadır (Aguilar-Toalá et al., 2019; Feng et al., 2018; Kubo et al., 2000). Çalışmada antioksidan aktivite DPPH radikali üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir hidrolizatın boyut fraksiyonlarının farklı doz aralığında antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Öncelikle ifade edilmektedir ki, boyut fraksiyonları oldukça renkli örneklerdir ve içerideki protein yapılarının boyutu küçüldükçe saflaştırmanın da etkisiyle renkte açılmalar meydana gelmektedir. DPPH radikalının mor renkten sarı-turuncu renge geçişinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi özellikle yüksek moleküler ağırlıklı örneklerde yüksek dozlarda örneğin renginin maskeleye yapmasıyla sonuçlanmıştır. Bu neticede 2 ya da 1 mg/ml örnekler başlangıç konsantrasyonu seçilmiştir. Antioksidan aktivite referansı için BHT, anti-melanojenik aktivite referansı için kojik asit kullanılmıştır. Her iki örneğin de antioksidan aktiviteleri (%RSA) için IC_{50} değerleri sırasıyla $362,56 \pm 0,50$; $61,13 \pm 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere referans molekülün IC_{50} değeri oldukça düşüktür ve daha önceki çalışmalar ile de uyumludur (Gürlek vd., 2019). Kojik asidin de etkin bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu da gözlenmiştir. Geçmiş çalışmalarda mikroagal protein hidrolizatlarında boyutun azalmasıyla antioksidan aktivite arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur (da Silva et al., 2018; Je et al., 2007; Tejano et al., 2019; Zhu et al., 2006). Ancak türden ve enzimden bağımsız olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlarda boyutun antioksidan aktivite ile korelasyonu bulunamamıştır. Doza bağlı da linear bir değişim gözlenmemiştir. Genel olarak *C. vulgaris* hidrolizatlarında antioksidan aktivite *S. platensis*'e göre daha yüksek olmuştur. Eğilim ham hidrolizatlardan sonra >10 kDa fraksiyonlarında %RSA'da artış, daha sonra da boyuta bağlı olarak azalış görülmesi şeklindedir. En başarılı antioksidan aktivite *C. vulgaris* alkalaz hidrolizatları 5-10 ile <3 kDa fraksiyonlarında 2 mg/ml örnek konsantrasyonunda %64 oranında gözlenmiştir. Bunu ise pankreatin fraksiyonlarında 5-10 kDa boyutlu örnek takip etmiştir ($58,33 \pm 0,43$). *S. platensis* için ise yine pankreatin enzimi 5-10 kDa örneği 1 mg/ml konsantrasyonda $53,42 \pm 0,50$ oranında antioksidan aktivite sergilemiştir. *C. vulgaris*'in aksine alkalaz hidrolizatları %40'in altında, boyuta bağlı olarak düşüş göstermekle beraber, belirgin bir antioksidan aktivite sergilemiştir.

Antioksidan aktivite sonuçları bir iki farklı açıdan yorumlanabilir:

- i. Peptidlerin yapısında bulunan glisin ve prolin amino asitlerinin antioksidan aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir (Nakchum and Kim, 2016). *Spirulina*'nın glisin içeriği %5,7, prolin içeriği %4,2; *C.*

- vulgaris* için %4,8 ve %3,9 değerlerindedir (Becker, 2007). Amino asit yüzdeleri açısından kritik bir farklılık bulunmamaktadır.
- ii. Enzimlerin amino asit tanıma ve kesim bölgeleri antioksidan peptidlerin açığa çıkmasında etkili bir role sahiptir (Onuh et al., 2014). Bu da türler arasında enzimlerin ortaya koyduğu farklılıkları gözler önüne sermektedir.
 - iii. Burada gözlenen antioksidan aktivite saf peptitten ziyade bir protein hidrolizat karışımıdır. Boyutlara bağlı olarak da hidrolize olmayan proteinler, yüksek moleküler ağırlıklı peptidleri, di-, -tri ve oligopeptidler ile serbest amino asitleri içeren bir karışım söz konusudur. Genel olarak her bir fraksiyonda belirgin bir antioksidan aktivite gözlemlendiği aşıkardır. Bunun yayında antioksidan aktiviteye katkı sağlayan peptidlerin bu karışım içindeki miktarları antioksidan kapasiteyi belirleyici niteliktedir. Sonuç olarak saf bir peptitten ziyade karışım değerlendirdiği için antioksidan aktivite gösteren peptidlerin saflaştırılması sonucu daha detaylı ve hedefe yönelik sonuçlar alınabilecek niteliktedir.

5.1.2 Fikosiyanin Protein Hidrolizatlarının Eldesi

Mikroalgal proteinlerden en çok bilinen, kullanılan ve üzerinde farklı biyoteknolojik amaçlarla çalışmalar gerçekleştirilen protein fikosiyanindir. Fikosiyanin sahip olduğu eşsiz floresan aktivitesi, UV koruyucu, antikanser, antiviral, immünostimülant ve antioksidan özellikleri neticesinde farmasötik, fonksiyonel gıda ve kozmetik endüstrisinde önem teşkil eden bir molekül haline gelmiştir (Andrade et al., 2019; Costa et al., 2017). Son zamanlarda ise fikosiyaninin hücresel tirozinaz enzimini sinyal yolları üzerinden inhibe ettiği yönünde çalışmalar bulunması, tirozinaz enzimi ile ilişkisini de ortaya koymuştur (Wu et al., 2011).

Kyanos Blue Phycocyanin powder adı verilen ticari fikosiyaninin kullanıldığı bu kısımda 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan örneklerden fikosiyanin saflık ve miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik taramanın ardında ürünün fikosiyanin içerdiği teyit edilmiş, $ABS_{620/280}$ değeri ise 5,45 olarak bulunmuştur ki bu değer analitik olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak içeriğindeki protein oranı hesaplanmıştır ve 0,32 mg protein/mg toz ürün olarak bulunmuştur.

Enzimatik hidroliz işlemleri sonucunda %DH değerleri belirlenmiştir. Sırasıyla pankreatin, tripsin ve alkalaz enzimleri için %DH değerleri $66,5 \pm 3,22$; $64,90 \pm 1,78$; $77,40 \pm 1,80$ şeklindedir. Pankreatin ve tripsin enzimleri için anlamlı bir farklılık gözlenmemişken, alkalaz enzimi %10-12'lik bir artış göstermiş ve protein yapıların oldukça fazla hidroliz olmasını sağlamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki her üç enzim arasında farklılıklar söz konusu olsa da her üç proteaz grubu da PC'nin %50'sinden fazlasını rahatlıkla hidroliz edebilmiştir. Sırasıyla pankreatin, tripsin ve alkalaz için <5 kDa fraksiyonundaki hidrolizat miktarları $2,88 \pm 0,12$; $3,67 \pm 0,37$; $3,97 \pm 0,42$ mg/ml şeklindedir ve %DH ile uyumlu olacak bir şekilde alkalaz enziminden elde edilen protein fraksiyonları daha fazla küçük yapıli hidrolizatların elde edildiğini karşılıklı olarak desteklemektedir.

DPPH ile gerçekleştirilen antioksidan aktivite tayininde fikosiyaninin kendisi 1 mg/ml konsantrasyonda $39,5 \pm 0,43$ RSA değerini göstermiştir. IC_{50} (mg/ml) değeri ise $1,33 \pm 0,38$ mg/ml bulunmuştur. Enzimatik hidrolizatlarından elde edilen sonuçlara göre, fikosiyaninin kendisinden daha yüksek değerde antioksidan aktivite gösteren fraksiyona rastlanmamıştır. Pankreatin ham ve >5 kDa örneklerinde ise fikosiyanin ile benzer IC_{50} değerleri elde edilmiştir (Ham $1,32 \pm 0,83$ mg/ml, >5 kDa $1,48 \pm 0,72$ mg/ml). Mikroalgal protein hidrolizatlarının aksine alkalaz enzimi antioksidan aktivite açısından değerli sonuçlar üretmemiştir. Tripsin hidrolizatları ise boyuta bağlı olarak azalan antioksidan kapasite göstermiştir. Antioksidan aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; protein yapısı ve kullanılan enzim potansiyel biyoaktif peptidlerin antioksidan aktivite sergilemesinde doğrudan ilişkilidir. Mikroalgal protein hidrolizatlarından daha yüksek antioksidan aktiviteye ulaşılması da protein yapı ve amino asit kombinasyonlarının fikosiyaninden zengin olmasından kaynaklanmaktadır.

5.1.3 *In silico* Fikosiyanin Peptidleri Tasarlanması

Fikosiyaninin değerli bir protein kaynağı olması, yapısından ortaya çıkabilecek peptid kombinasyonlarının da kullanılacak proteolitik enzimlere bağlı olması nedeniyle çalışma *in silico* protein hidroliz işlemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada *in silico* hidrolizin sağlanması hem laboratuvar çalışma maliyetini hem de zaman kullanımını düşürecek nitelikte olduğu için tercih edilmiştir. Hidroliz işlemleri BIOPEP veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri tabanında yer alan içerisinde pepsin, tripsin, pankreatin, papain, termolizin, subtilisin gibi önemli proteolitik enzimlerin de yer aldığı toplamda 33 farklı proteolitik enzim ile *in silico*

hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir (Ek-1). Tripsin, kimotripsin, papain, subtilisin, termolizin, proteinaz K, cocoylsine, chymase gibi proteinler genelde 20 amino asit altında hidroliz ürünleri oluşturmuştur. Özellikle peptin, pankreatik elastaz, lökosit elastaz, ficin gibi enzimleri ise di- tri- peptidler, serbest amino asitler ve genel olarak 10 amino asit altında hidroliz ürünleri ortaya koymuştur. Glutamyl endopeptidase II, Glycyl endopeptidase, Xaa-Pro dipeptidase enzimleri etkin bir hidroliz işlemi gerçekleştirmemişken; zingipain ve kimozen enzimi hidroliz işlemi gerçekleştirmemiştir.

Elde edilen hidroliz ürünlerinden tirozinaz inhibisyonu yapma potansiyeli taşıyan peptidler yapıdaki amino asit dizilimi incelenerek manuel olarak birtakım kombinasyonların göz önünde bulundurulması ile sağlanmıştır. Peptidlerin çözünürlük karakteristikleri, boyutu ve doğal olarak da amino asit sayısı peptidlerin topikal uygulamalarda deri altında geçmesi için kısıtlayıcı bir parametredir. Tez kapsamında aranan peptidler de topikal uygulamalar için kullanılması hedeflenen aktif ürünlerdir. Bu neticede çözünürlük özellikleri ile moleküler ağırlıkları önemli bir faktördür. Seçilen peptidlerin 2000 Da üzerinde olmaması, dizi analizine bağlı olarak da 10 amino asit kombinasyonunun üzerine çıkılmamasına özen gösterilmiştir.

Peptid seçiminde bir diğer belirleyici parametre yapıda yer alan amino asitlerin niteliği ve niceliği üzerine olmuştur. Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda bir takım amino asitlerin tirozinaz inhibisyonuna önemli ölçüde katkısı bulunduğu bilinmektedir (Schurink et al., 2007). Örneğin yapıda yer alan negatif yüklü amino asitlerin tirozinaz enzime bağlanma ve inhibisyon yapma özelliğini düşürdüğü yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Fenil alanin, arjinin ve nötral amino asitlerin de hem enzimin aktif bölgesine bağlanmayı arttırdığı hem de inhibisyon yaptığı yönünde olmuştur. Sistein, serin gibi amino asitler ise doğrudan olmasa da dolaylı olarak enzim inhibisyonu yapmıştır. Kritik kombinasyonlar arjinin ve lizin, arjinin/ fenilalanin ile valin/lizin/ alanin kombinasyonlarıdır (Aguilar-Toalá et al., 2019; Feng et al., 2018). Yapıya önemli bir etkinlik kazandıran amino asit ise tirozindir. Tirozin amino asidi tirozinaz enzimi substratıdır ve dizideki konumu neticesinde aktivatör ya da inhibitör etki göstermektedir (Bagherzadeh et al., 2015; Ochiai et al., 2016a).

Tüm bu kriterler değerlendirildiğinde; yapısında en az bir arjinin bulunduran, L/R kombinasyonu başta olmak üzere R/F+V/A/L kombinasyonu ile C terminal tirozin içeren peptidler seçilmiştir. 20 amino asit ve altında hidroliz ürünü ortaya

çıkaran enzimlerde genel olarak arjinin içeren peptidler ve diğer arjinin kombinasyonları oluşturulmuştur. Ancak C terminal tirozin içeren peptidler, ficin, chatepsin G, metridin ve chymase proteazlarından fikosiyaninin α alt ünitesinden gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; öncelikle arjinin ve kombinasyonlarını içeren peptid sayısı 134; C terminal tirozin içerenler 18 olmak üzere toplam 152 tane potansiyel peptid seçilmiştir. Bunlardan P1-AFGRFR, P2-MAACLR, P3-RCLNGRL, P4-RYVTYAVF, P5-SPSWY, P6-GRF, P7-AADQRGKDKCARDIGY olmak üzere 7 tane peptid sentezi gerçekleştirilmiştir.

Peptidlerin *in silico* aktiviteleri değerlendirildiğinde; toksin, antikanser, anti-enflamatuvar etkileri farklı veri tabanları üzerinden incelenmiştir. BIOPEP veri tabanına göre peptidlerin antioksidan, ACE ve DPP-IV inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Antioksidan aktivite tahminleri düşük olsa da P4 ve P5'te, önemsenmeyecek derecede ise P7'de tahmin edilmiştir. ACE inhibitör etki olarak P5 hariç önemli ölçüde etki gösterebileceği, DPP-IV inhibisyonu için ise P3 hariç diğer peptidlerin etkin olduğu bulunmuştur. ToxinPred üzerinden gerçekleştirilen toksin etki tahminlemesinde peptidlerin toksin özellikleri bulunmadığı ortaya çıkmıştır. Karşılaştırmalı gerçekleştirilen anti-enflamatuvar etkilere göre P6 haricindeki peptidlerin kuvvetli anti-enflamatuvar peptidler olabileceği yönündedir. Antikanser özellik olarak ise P4'ün %88'e varan antikanser tahminleri neticesinde değerlendirmeye değer olduğu düşünülmektedir.

In silico tahminleri gerçekleştirilen biyoaktivitelerde sadece DPPH radikali üzerinden antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilebilmiştir. P2 ve P3 peptidleri haricinde diğer peptidlerde belirgin bir antioksidan aktivite gözlenmemiştir. BIOPEP veri tabanı *in silico* peptid tasarımı ve biyoaktivite tahminlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bir veri tabanı olma niteliğindedir. Ancak antioksidan aktivite tahminleri gerçek sonuçlar ile uyumlu olmamıştır. Antioksidan aktivite tahmini elde edilmeyen P2 ve P3, gerçekte, güçlü antioksidan kapasiteye sahiplerdir. 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda P2 %67,64; P3 ise %62,95 oranında bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Sırasıyla P2 ve P3 için IC_{50} değerleri 140,46 ile 158,24 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu değerler göstermiştir ki BHT'ye göre iki kat düşük olmasına rağmen, antioksidan özellik açısından kojik asitten 3 kat daha etkindir. P2 ve P3 peptidlerinde bulunan yüksek antioksidan kapasitesi hücresel tirozinaz aktivitesi açısından önemli bir etkiye sahip olacak niteliktedir.

Veri tabanı sonuçları ile antioksidan aktivite sonuçlarının uyumluluk sağlaması diğer biyoaktiviteler yönünden önemli bir sonuçtur. Antikanser ve anti

enflamatuvar aktivite melanoma ve enflamatuvar hiperpigmentasyon gibi cilt kusurları ve sağlık sorunlarında peptidlerin multifonksiyonel özellik sağlamasına neden olacaktır (Park et al., 2010). Bu nedenle tirozinaz inhibisyonu sağlayan peptidlerin de antikanser, antienflamatuvar, antibakteriyel gibi özelliklerinin *in vitro* koşullarda incelenmesi peptidlerin diğer biyoaktivitelerinin belirlenmesinde önemli bir unsurdur.

5.2. Mantar Tirozinaz Aktivitesi

Mantar tirozinaz enzimi tirozinaz inhibisyonu yapan aktif madde arayışında ilk olarak başvurulmuş tayin yöntemidir (Hsiao et al., 2014). Kojik asit ve hidrokinon gibi moleküller hem hücresel hem de mantar tirozinaz enzim inhibisyonu çalışmalarında kendisini kanıtlamış moleküllerdir. Hem referans standart molekül hem de ticari etkin molekül olarak sıklıkla kullanılsa da sahip oldukları toksik özellikler bu moleküllere alternatif, güvenilir moleküller sunulmasını da gerekli kılmıştır. Her zamanki gibi öncelik bitkisel ve algal kaynaklardan pigment ve fenol içerikli moleküllerin taranması olsa da yine bu moleküllerden izlenen sitotoksik etkiler daha stabil ve güvenilir maddeleri gerekli kılmaktadır. Peptid bazlı kozmesötik ürünler son yılların çok tercih edilen, düşük moleküllü, stabil ve güvenilir terapötik ürünleridir.

Mantar tirozinaz enzimi ilk taramada başarılı ve hızlı yanıt alınmasını sağlayan bir analiz sistemi oluştursa da bu yöntemin birtakım dezavantajları vardır. Literatür özetinde bahsedildiği üzere bitkiler, fungal ve bakteriyel kaynaklara kıyasla memeli hücrelerinde tirozinaz enzimi ve melanin üretiminde çok farklı biyolojik yollar devreye girmektedir. Özellikle hücresel melanin üretimi tirozinaz enziminin ya da enzim substrat kompleksinin direkt inhibisyonun yanı sıra dolaylı olarak cAMP, PKA, Wnt gibi pek çok kritik hücresel yollar üzerinden CREB, MITF gibi transkripsiyon faktörlerinin ve proteozomal degradasyon neticesinde tirozinaz enzimi ekspresyonunun, melanin transferinin ve melanozom hareketliliğinin sekteye uğratılması sonucu etki göstermektedir (Bellei et al., 2008; Pillaiyar et al., 2017b; Wu et al., 2011).

5.2.1. Protein Hidrolizatlarından Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Mantar tirozinaz enzimi ile yapılan çalışmalarda kojik asit referans molekül olarak kullanılmıştır. Kojik asidin doza bağlı olarak mantar tirozinaz enzimini hem

monofenolaz hem de difenolaz aktivitesi üzerinden inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibisyon değerleri için IC_{50} değerleri monofenolaz aktivitesi için $47,03 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$; difenolaz aktivitesi için ise $77,34 \pm 0,83 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. $800 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda monofenolaz aktivitesi için enzimin $\%88,54 \pm 0,84$; difenolaz aktivitesi için ise $\%87,23 \pm 0,46$ oranında inhibisyon gözlenmiştir.

Mikroalgal protein hidrolizatlarından doza, enzime ve boyuta bağlı olarak gerçekleşen herhangi bir inhibitör etki bulunmamıştır. Buna rağmen $\%10$ değerlerine varan düzensiz inhibisyon değerlerinin gözlenmesinin rastlantısal olduğu düşünülmektedir. Enzim inhibisyonu açısından tripsin ve pankreatin arasında anlamlı ve dikkate değer bir sonuç alınamamıştır. Ancak alkalaz enziminde inhibisyon yerine aktivasyon etkisinin gözlemlendiği görülmektedir. *S. platensis* için dozdan ve boyuttan bağımsız olarak $\%120$ oranında enzim aktivitesi değerleri gözlenmiştir. *C. vulgaris* için ise özellikle, 5-10 kDa ve >10 kDa fraksiyonları başta olmak üzere, dozun aktivite artışına etkisi olduğu görülmüştür. Tirozinaz inhibisyonu ile antioksidan aktivitenin etkisinin bir arada görüldüğü durumlar oldukça fazladır (Feng et al., 2018; Kang et al., 2015; Kubo et al., 2000; Wang et al., 2018). Ancak bu çalışmalar genel olarak saf peptid ya da biyoaktif molekülün antioksidan aktivitesi üzerinden kıyaslama yoluna gitmiştir. Öncelikle belirtilmelidir ki hidrolizatlar her ne kadar boyut fraksiyonuna ayrılmış olsa da hala yapının içerisinde bulunan peptidlerin oranı, dizisi ve boyutu bir bilinmezlik içerisinde. *S. platensis* ve *C. vulgaris*'in 1 mg/ml konsantrasyonda antioksidan aktiviteleri göz önüne alındığında; *S. platensis* için alkalaz enzimi en düşük antioksidan aktiviteyi sergilemiştir. Ancak *C. vulgaris* için alkalaz hidrolizatı genel olarak tripsin ve pankreatin enzimlerine kıyaslandığında $\%20-30$ arasında fazladır. Mantar tirozinaz enzimi inhibisyonu ile hidrolizatların antioksidan aktivitesi arasında bir bağlantı gözlenmemiştir.

Protein hidrolizatlarının tirozinaz enzim aktivitesine etkisi ile alakalı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmalar arasında kullanılan proteinler salyangoz, tavuk tüyü ve mürekkep balığı proteini ile gerçekleştirilmiştir. Tavuk tüyleri ile gerçekleştirilen çalışmada hidrolizatın boyutu küçüldükçe monofenolaz ve difenolaz aktivitesi üzerinden tirozinaz inhibisyonuna olan etkisi artış göstermektedir (Pongkai et al., 2017). Pepsin-pankreatin ve papain ile ayrı ayrı gerçekleştirilen hidroliz işlemlerinde boyut küçüldükçe enzimin etkisi de ortaya çıkmış ve <3 kDa fraksiyonlarında monofenolaz aktivitesi açısından pepsin-pankreatin hidrolizatı etkili olurken, difenolaz aktivitesi açısından papain hidrolizatının inhibitör etkisi ortaya çıkmıştır. Salyongaz ile gerçekleştirilen

çalışmada benzer sonuçlar bulunmuş; boyuta bağlı olarak hidrolizat boyutu küçüldükçe inhibitör etkisi giderek artmıştır (Prakot et al., 2018). Mürekkep balığı kolajeninden elde edilen 3-10 kDa boyutundaki fraksiyonda 1 mg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzimi %39,65 oranında inhibe edilmiştir. Kojik asit ise aynı konsantrasyonda %76.81 oranında inhibisyon etkisi göstermiştir (Nakchum and Kim, 2016). *Rhopilema esculentum* kolajen hidrolizatında ise 5 mg/ml konsantrasyonda %47,2 oranında tirozinaz enzim inhibisyonu gözlenmiştir.

Mikroalgal protein hidrolizatlarında mantar tirozinaz inhibisyonunun gözlenmemesinin nedenleri arasında hidrolizatlar içerisinde mantar tirozinaz enzimini direkt inhibe edecek hidroliz ürünleri ortaya çıkmamış olabileceği ya da yapı içerisinde potansiyel mantar tirozinaz inhibisyonu yapacak olan peptidler var ise de denenen konsantrasyon aralığı etkiyi gözlemlemeye yeterli gelmemiş olabilir. Ancak bu durumda da yüksek konsantrasyonlara çıkılması ise mikroalgal hidrolizatlarının en azından diğer biyoaktif maddeler ve saf peptidlere kıyasla uygun ve değerli inhibisyon özelliklerine sahip değillerdir.

Saf fikosiyenin ve tripsin, alkalaz ve pankreatin enzimleri sonucu elde edilen hidrolizatların da mantar tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Alkalaz >5 kDa fraksiyonunu mikroalgal protein hidrolizatlarda olduğu üzere tirozinaz enzimini %120 aktifleştirmiş ancak diğer örneklerin doza ve hidrolizat özelliklerine bağlı herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir.

Öncelikle protein yapılarının, amino asit dizilerinin ve enzimlerin kesim bölgelerinin mantar tirozinaz enzimi ile inhibisyon sağlanmaması hususunda etkili olduğu düşünülmektedir. Alkalaz enziminin aktivasyona etkisi kesim yaptığı tirozin ve fenil alanin bölgesiyle etkili olabilir. Her ikisi de tirozin enziminin substrat ve substrat analogu olduğu için aktivatör etkiye katkı sağlamış olabilirler. Ayrıca bir başka unsur da hidrolizatların sinyal yolu üzerinden bir şekilde tirozinaz aktivitesini düşürerek melanin sentezini azaltıcı etkileri olabileceği yönündedir. Her ne kadar mantar tirozinaz inhibisyonu gözlenmese de hücresel inhibisyon değerleri asıl elde edilen hidrolizatların hedefe uygun olup olmadığını anlamak açısından önemlidir.

5.2.2. Sentetik Peptidlerden Mantar Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

P1-P7 peptidlerinden doza bağımlı mantar tirozinaz aktivitesi seçilen peptid dizilerinin tirozinaz inhibisyonu açısından önem teşkil ettiğini ortaya koymuştur. Peptidlerin hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesi üzerinden tirozinaz enzimi inhibisyonuna etkisi incelenmiştir. Difenolaz aktivitesi değerlendirildiğinde P2 ve P3 güçlü inhibisyon etkisi göstermişse de geriye kalan peptidlerde difenolaz aktivitesi üzerinden inhibisyon etkisi anlamsız kalmıştır. P2 ve P3 için IC_{50} değerleri sırasıyla 990,30 ve 1069,80 μM olarak bulunmuştur. Genel olarak literatüre bakıldığında 500 μM ve üzeri dozları potansiyel tirozinaz inhibitörleri olarak değerlendirmemektedir. Monofenolaz aktivitesi değerlendirildiğinde ise P2, P3, P5, P5 ve P7'nin IC_{50} değerleri 500 μM altındadır. P4'ün de etkili bir inhibisyon sağladığı görülse de eşik değerin üzerinde bir inhibisyon değerine sahip olduğu için değerlendirilmeye alınmamıştır. Geriye kalan 5 peptidin inhibisyon etkisi sırasıyla $P5 > P2 > P3 > P7 > P6$ şeklinde olmuştur.

Literatürde yer alan ve ticari olarak da kullanılan YRSRKYSSWY peptidi bilinen en etkin tirozinaz inhibisyonu yapan peptittir ve IC_{50} değeri 40 μM değerindedir (Abu Ubeid et al., 2009). Aynı çalışmada RADSRAADC peptidi ise 123 μM değerinde bir IC_{50} konsantrasyonuna sahiptir. YRSRKYSSWY peptidinin yapı incelemesi ve inhibisyona katkı sağlayan amino asidin belirlenmesi çalışmasında ise IC_{50} değeri 123 μM olarak bulunmuştur (Ochiai et al., 2016a). Tez kapsamında elde edilen peptidlerden P5 12,12 μM IC_{50} değeri ile literatürde bulunan tüm tirozinaz inhibitör peptidleri arasında mantar inhibisyonu özelinde CRY ($IC_{50} = 6.16 \mu M$) peptidinden sonra (Hsiao et al., 2014) en yüksek aktiviteye sahip peptid olmuştur. P5 peptidinin yapısı deşifre edildiğinde SPSWY amino asit dizisine sahip ve son 3 amino asidi decapeptide 12 ile ortak diziye sahiptir. Literatürde belirtildiğinin aksine (Schurinck et al., 2007) yapısında hiç arjinin birimi bulunmamasın rağmen güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu etki tez çalışması kapsamında hesaplanan kojik asitten 7 kat daha etkili olmuştur. Yapıya tirozinaz inhibisyonu etkiyi katan serin amino asitlerinin etkisi göz ardı edilemez ancak esas etkinin C terminal tirozin birimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

P2 (MAACLR) takip eden ikinci etkili peptid olmuştur. P2 için IC_{50} değeri 86,86 μM 'dır. Ochiai et al. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmaya kıyaslanırsa yine decapeptidden neredeyse 2 kat daha etkili bir peptid olduğunu ortaya koymuştur. Dizide yer alan LR kombinasyonu ve alanin ile sistein amino

asitlerinin varlığı tirozinaz inhibisyonunu etkiler iken, difenolaz aktivitesi göstermesi de peptidin inhibisyonunun LR kombinasyonu üzerinden sağlandığını düşündürmektedir.

P3 (RCLNGRL) 116,17 μ M değerinde bir IC₅₀ konsantrasyonuna sahip olmuştur. Yapıda ter alan RL kombinasyonlarının ve R varlığının hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesine inhibitör etkisi olsa da beklenenin aksine arjinin birimlerinin varlığı IC₅₀ değerinin daha düşük bir dozda olmasını sağlayamamıştır.

Örneğin P1 ve P6 peptidleri GRF kombinasyonuna sahip olsa da etkin bir inhibisyon etkisi göstermemiş ancak P7 yapısındaki karmaşık amino asit dizilerine ve dizinin uzun olmasına rağmen yapısında yer alan C terminal tirozin varlığı sayesinde inhibitör etkisinin yüksek olması ile sonuçlanmıştır. Peptidlerden elde edilen sonuç göstermiştir ki C terminal tirozin varlığı ile yapıda yer alan LR kombinasyonları mantar tirozinaz aktivitesi üzerinde belirleyici etkindir ve bu amino asitlerin dizisi, konumu ve kombinasyonları peptidin etkinliğini ortaya koymaktadır (Abu Ubeid et al., 2009; Hsiao et al., 2014; Lee et al., 2014; Nie et al., 2017; Schurink et al., 2007; Ubeid et al., 2012).

5.3. Protein hidrolizatlarının ve peptidlerin B16-F10 hücrelerinin canlılığına etkisi

Mikroalgal protein hidrolizatlarının, fikosiyanin enzimatik hidrolizatlarının ve *in silico* tasarlanmış peptidlerin B16-F10 hücre canlılığına etkisi doza bağlı olarak incelenmiştir. Öncelikle mikroalgal protein hidrolizatları değerlendirilecek olursa; 800 μ g/ml konsantrasyon dışındaki dozların hücre canlılığını negatif etkilemediği gözlenmiştir. Ancak enzimlerden bağımsız olarak *S. platensis* hidrolizatlarının hücre canlılığını %140 oranına kadar arttırdığı saptanmıştır. Geçmiş dönemde gerçekleştirilen çalışmada ise yine *S. platensis* protein hidrolizatlarının Vero hücre hatlarının proliferasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Kose vd., 2017).

72 saatin sonunda özellikle 800 μ g/ml konsantrasyonda kojik asidin hücre canlılığı $49,40 \pm 4,21$ 'dur. Bilindiği üzere kojik asidin uzun süre kullanımlarında hücre hasara yol açması ve sitotoksik etki göstermesi nedeniyle cilt beyazlatıcı kozmetik ürünlerde alternatif güvenilir etkin madde arayışı bulunmaktadır. Bu bağlamda mikroalgal protein hidrolizatlarının hücre canlılığını pozitif etkilemesi istenen ve aranan özellikler arasındadır.

Fikosiyenin ve fikosiyaninden elde edilen hidrolizatlar incelendiğinde; fikosiyaninin kendisinin doza bağlı belirgin bir toksisite göstermediği ancak büyümenin yine 800 µg/ml konsantrasyonda 9 ± 4 oranında bir canlılık kaybı olmuştur. Fikosiyanini anti-melanojenik etkisinin incelendiği bir çalışmada B16-F10 hücrelerinde 0,2 mg/ml hücre canlılığı %77 olarak gözlenmiştir. Ancak tez kapsamında kullanılan fikosiyaninin 0,2 mg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı %100'e yakındır. Ancak fikosiyaninin aksine enzimatik hidrolizatlarında doza bağlı canlılık kayıpları net bir şekilde gözlenmiştir. Alkalaz enziminin <5 kDa fraksiyonu haricinde genelde 800 µg/ml konsantrasyona kadar canlılık değerlerinde değişiklik olmamış ancak 800 µg/ml dozda ani düşüşler gözlenmiştir. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde mikroalgal proteinlere kıyasla hücre canlılığını negatif etkileşeler de yine de kojik asit ile kıyaslandığında toksik etkileri oldukça düşüktür.

P1-P7 peptidleri hidrolizatların aksine saf maddelerdir. B16-F10 hücrelerinin canlılığına etkileri incelendiğinde; 800 µg/ml konsantrasyonu her peptid için canlılığı oldukça hızlı bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir. Bununla beraber özellikle P4 ve P5 için canlılık 800 µg/ml konsantrasyonlarda %20 değerlerine gerilemiştir. P1 başta olmak üzere tüm peptidlerde dozun etkisi açıkça gözlenmiştir. IC₅₀ değerleri incelendiğinde; peptidlerin toksik dozunun tirozinaz inhibisyon dozunun çok çok üzerinde olduğu ve bu nedenle inhibisyon etkisinin peptidlerin tirozinaz inhibisyonu yapan biyoaktif moleküller olma özelliğinin önüne geçmeyeceği düşünülmektedir.

5.4. B16-F10 Hücre Hatlarında Hücresel Tirozinaz Aktivitesi ve Melanin Üretimi

5.4.1. Mikroalgal Protein Hidrolizatlar ve Fikosiyanın hidrolizatları

Özellikle mikroalgal protein hidrolizatlar ve fikosiyaninden elde edilen hidroliz ürünleri mantar tirozinaz enzimi üzerinde herhangi anlamlı bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. Buna rağmen bu örneklerin B16-F10 hücrelerinde doza bağlı tirozinaz inhibisyonları ve melanin üretim değerleri incelenmiştir. Genel olarak *S. platensis*'ten elde edilen hidrolizatların *C. vulgaris*'e kıyasla hem tirozinaz inhibisyonu hem de melanin üretimi açısından daha etkili sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Özellikle alkalaz ile gerçekleştirilen hidroliz işleminde tirozinaz enzim aktivitesi %70 oranında inhibisyon göstermiştir. Boyutların inhibisyona etkisi düzensiz olmuş her bir boyut fraksiyonunda %50 üzerinde inhibisyon gerçekleştirilebilmiştir. Tripsin hidrolizatı için ise özellikle 5 kDa ve altı

fraksiyonlarda dozun inhibisyona etkisi artmış; fraksiyon boyutu küçüldükçe dozun etkisi de daha belirgin bir hale gelmiş ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda dahi %50 civarında enzim inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. Pankreatin için yine dozun etkisi gözlenirse de >10 kDa fraksiyonu için 200 µg/ml konsantrasyonda enzim aktivitesi %37,18±1,43 olarak hesaplanmıştır. Yine aynı konsantrasyon için diğer fraksiyonlar (<3 kDa başta olmak üzere) %40-50 oranında enzim inhibisyonu sağlamıştır. Bu bağlamda *S. platensis* için farklı enzimlerle protein hidrolizatlarının elde edilmiş olması enzim aktivitesine anlamlı bir farklılık sağlamış ancak nihain olarak boyut küçüldükçe enzimin etkisi de anlamlı kalmamıştır. Her üç enzim de kesim bölgesi açısından benzerlik gösterdiği için muhtemelen <3kDa fraksiyonu için birbirine benzer dizilerde peptidler ortaya çıkmıştır. Ancak bunu netleştirmek için esasen kromatografik ayırım yapıp her bir olası peptid fraksiyonu için aktivite tayininin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu sayede hem bir karışımın etkisi ortadan kaldırılmış olur hem de saf peptid dizisinin de ortaya çıkarılması gerçekleştirilir. Ancak bu gibi ürünlerin ticari boyutları düşünüldüğünde genellikle saf üründen ziyade ekstre karışımı kullanılması da tercih edilen yaklaşımlar arasındadır. Görünen odur ki *S. platensis* hem toksik olmayan doğası hem de yüksek tirozinaz inhibisyonu neticesinde aday hammaddelerden birisidir.

C. vulgaris için elde edilen sonuçlardan yola çıkarak <3 kDa boyutundaki fraksiyonlarda tirozinaz enzimi aktivitesinin %50-60 değerlerine düştüğü gözlenmiştir. Ham ekstreler haricinde 200 µg/ml konsantrasyonda boyut azaldıkça enzim aktivitesinde de boyuta bağlı anlamlı azalmalar gözlenebilmiştir. Bu bağlamda pankreatin hidrolizati <3 kDa örnekleri enzim aktivitesini %55'e düşürmüştür. Tripsin ve alkalaz için inhibisyon değerleri %40 civarında gerçekleşmiş ve enzimler arasında bir fark gözlenmemiştir. Sonuçlar melanin üretimiyle kıyaslandığında, enzim inhibisyonu ile doğru orantılı olarak melanin miktarlarında da azalmalar olmuştur. Sonuç olarak; *C. vulgaris* protein hidrolizatları hücresel tirozinaz inhibisyonu yapma konusunda olumlu sonuçlar vermiş ve ilerleyen çalışmalar için inhibisyon yapan peptid dizilerinin açığa çıkarılması ile yeni potansiyel tirozinaz inhibisyonu yapan anti-melanojenik peptidlerin hammaddesi olabilecek nitelikte olduğunu göstermiştir.

Wu et al. (2011) yapmış olduğu çalışmada fikosiyaninin melanogenez inhibisyonu yaptığını ortaya koymuştur. Bu nedenle de fikosiyaninden elde edilen enzimatik hidrolizatların tirozinaz inhibisyonuna etkisi ilk olarak tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Wu et al. (2011) çalışmasında 50-200 µg/ml konsantrasyonlarında tirozinaz enzim aktivitesinin %75,7'den %47,5'e düştüğünü

gözlemlemiştir. Yapmış olduğu çalışmada fikosiyanin tirozinaz mRNA ekspresyonunu inhibe ederek tirozinaz ekspresyonunu bloke ettiği, böylece melanin üretiminin inhibe olduğunu bulmuştur. Fikosiyaninin antioksidan kapasitesinin DOPAKinonun DOPA'ya dönüşümünü sağladığı böylece de hız sınırlayıcı basamakta reaksiyon kinetiklerinin de inhibisyona uğradığını belirtmiştir. Melanin miktarı ise tirozinaz enzim aktivitesinde oransal olarak azalma göstermiştir. Tez çalışmasında sinyal yolları üzerinden bir çalışma gerçekleştirilmemiş, sadece fikosiyaninin B16-F10 hücre hatlarında enzim inhibisyonu ve melanin üretimi sonuçları değerlendirilmiştir. 12,5 ile 200 µg/ml konsantrasyonlarda fikosiyanin konsantrasyonları denenmiş ve dozun etkisi olmaksızın enzim aktivitesinin %30 civarında olduğu gözlenmiştir. Ancak, tirozinaz enziminin aksine, doza bağlı olarak melanin miktarlarında anlamlı ölçüde düşüşler meydana gelmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar Wu et al. (2011) ile örtüşmektedir. Kullanılan fikosiyaninin saflığı gibi unsurların da sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir.

Devamında tripsin, alkalaz, pankreatin enzimleri ile gerçekleştirilen hidrolizatların tirozinaz enzimi ve melanin üretimine etkisi incelenmiştir. Alkalaz enziminin tirozinaz inhibisyonu üzerinde belirgin bir etkisi olmamıştır. >5 kDa fraksiyonlarında enzim inhibisyonu doza bağlı olmayacak şekilde %20-30 aralığında inhibisyona uğramıştır. Pankreatin için ise benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak tripsin hidrolizatında özellikle <5 kDa boyutunda enzim aktivitesi %40 değerlerine gerilemiştir. Her üç enzim arasında inhibisyon değerleri açısından değerlendirildiğinde tripsin enziminin anlamlı ölçüde başarılı olduğu gözlenmiştir. Melanin üretim değerleri kıyaslandığında ise özellikle ham ekstrelerde melanin üretimleri %50 civarında inhibe olmuştur. Bu sonuçlar göstermektedir ki bu hidrolizatlar arasında tirozinaz inhibisyonu sağlayan peptidlerden ziyade melanozom transferinin inhibisyonu ya da tirozinaz enzimi sonrasında yer alan yollar ve reaksiyonlarda bir şekilde melanin üretiminin inhibisyona uğradığı yönündedir.

Mikroalgal protein hidrolizatlar ile fikosiyanin hidrolizatları kıyaslandığında ortak olan şey, her üç enzimin de tirozinaz inhibisyonu ve melanin sentezi açısından başarılı sonuçlar verdiği yönünde olmuştur. Bir diğer husus ise sinyal yolları üzerinden inhibisyonun hangi aşamada gerçekleştiği ve hangi yollar üzerinden sağlandığı hem hidrolizat karışımı hem de saflaştırılma sonrası elde edilen peptidler üzerinden gerçekleştirilmelidir.

5.4.2. P1-P7 Fikosiyanin Peptidleri

Seçilen peptidler hücrel melanin üretimi ve tirozinaz inhibisyonu açısından değerli sonuçlar vermiştir. P4 (RYVTYAVF) hariç diğer 6 peptid de tirozinaz inhibisyonu sağlamıştır. Ancak özellikle P5, P6 ve P7 tirozinaz enzim aktivitesini %70'e varan oranlarda inhibe etmiştir. P1, P2 ve P3 için bu değerler %30-40 aralığında kalmıştır. Mantar tirozinaz inhibisyonu ile kıyaslandığında P2 ve P3 monofenolaz aktivitesi için değerli olsa da difenolaz aktivitesi için inhibisyon değerleri için daha yüksek dozlar gerektirmektedir. Hücrel tirozinaz aktivitesine göre bu derece farklı sonuçlar vermesi ilk olarak her iki tirozinaz enziminin yapısal ve aktivite farklılığı ikincisi ise hücrel tirozinaz inhibisyonu için L-DOPA'nın substrat olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Ancak P5 her iki tirozinaz enzimi için oldukça etkili bir inhibisyon karakteristiği sunmuştur. P5 ve P7 için ortak olan C- terminal tirozin birimleridir. Bu çalışmada da diğer literatürler desteklenmiş ve C-terminal tirozin birimlerinin hücrel tirozinaz inhibisyonuna etkisi gözler önüne serilmiştir (Ochiai et al., 2016a). Ochiai et al. (2016) yapmış olduğu çalışmada YRSRKYSSWY peptidinin amino asit dizilerini değiştirmiştir. Bu dizide hem C- hem de N- terminal tirozin (Y) birimleri bulunmaktadır. C-terminal tirozin birimi triptofan, fenil alanin ve metionin ile değiştirildiğinde IC₅₀ değerleri 500 µM üzerine çıkmıştır. Ancak N-terminal tirozin birimi kaldırıldığında IC₅₀ değerinde anlamlı değişiklikler bulunmamıştır. Arjinin birimlerinin değiştirilmesi ya da kaldırılması da aktivitede değişikliklere neden olmamıştır. P5 peptidi YRSRKYSSWY ile son üç amino asit ortak bir peptittir (SPSWY). Muhtemelen P5'e aktivitesini sağlayan amino asit C-terminal tirozin varlığıdır. Ancak aktiviteye katkısı sağlayan amino asidin anlaşılabilmesi için hem moleküler docking çalışmaları ile peptidin tirozinazın aktif bölgesine bağlanma değerleri hem de amino asit değişiklikleri ile aktivite takipleri gerçekleştirilebilir. P7 ise yine C-terminal tirozin varlığı olan diğerlerine görece uzun (13 amino asit) bir dizidir. Yapısında yer alan arjinin ve tirozin birimlerinin inhibisyon etkisi sağladığı düşünülmektedir.

Şaşırtıcı olan P2 ve P3 peptidlerinde inhibisyon değerlerinin mantar tirozinaza göre hücrel tirozinaz için düşük olmasıdır. Bu iki peptidin antioksidan aktivitelerinin de yükselmesine rağmen hücrel tirozinaz inhibisyonunu yüksek oranda inhibe etmese de (%80-90 inhibisyon beklenmekteydi) yine de etkin inhibitör peptidler olduğu söylenebilir.

Ancak P4 için izlenimler hem mantar hem de hücrel tirozinazda birbirinden farklı olmuştur. Mantar tirozinazda monofenolaz aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibisyon değeri sergilemiş ama difenolaz aktivitesini inhibe edememiştir. Hücrel tirozinaz aktivitesi incelendiğinde ise doza bağlı %140'a varan değerlerde tirozinaz enzim aktivasyonu yapmış ve melanin üretimini arttırmıştır. Bu da göstermiştir ki P4 hipopigmentasyon tedavisinde ve uygulamalarında kullanılabilecek aday bir peptittir. Günümüzde bilinen tirozinaz aktivatörü olarak ticari kullanılan peptid bulunmamaktadır. Bu neticede P4 bu alanda yenilikçi bir aktif madde olma özelliği göstermektedir. P4'ün yapısı incelendiğinde N terminal uca yakın tirozin birimi ile C terminal ucta bulunan fenil alanin amino asidinin tirozinaz enzime bağlanmayı sağladığı ve bu sayede fenil alaninin tirozin ile yapısal benzerliği neticesinde tirozinaz substratı olarak kullanıldığı düşünülmektedir. Schurink et al. (2007) gerçekleştirdiği spot sentezi çalışmasında fenil alanin içeren peptidlerin tirozinaz enzime bağlanmalarının tirozin yapısı benzerliği neticesinde güçlü olduğunu ifade etmiştir. Yapıda yer alan tirozin ve fenil alanine bağlı fonksiyonel grupların bağlanmayı arttırdığı düşünülmektedir.

Peptidlerin Lineweaver -burk enzim kinetikleri incelendiğinde P2 ve P3 monofenolaz aktivitesi üzerinde yarışmalı (kompetitif) inhibisyon modeli sergilemiştir. Ancak difenolaz aktivitesi için inhibisyon türü P2 ve P5 için belirlenememiş, P3, P4 ve P7 için ise un-kompetitif inhibisyon modeline uyduğu bulunmuştur. Enzim inhibisyon kinetikleri özellikle P2 ve P5 için yeniden incelenmesi gereken bir çalışma alanıdır. Bu peptidlerin monofenolaz aktivitesi üzerinden enzimi inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak kinetik modele uygun olmaması peptidlerden mi kaynaklanmakta yoksa deneysel olarak teyit edilmesi gereken bir husus mu var, bu kısım geliştirilmeye açıktır.

Genel olarak peptidlerden elde edilen sonuçlar fikosiyanin içerisinde gizli kalan dizilerin ileriye dönük tirozinaz ve melanogenez düzenleyici peptidleri barındırdığını göstermiştir. İlk defa bir tirozinaz aktivatör peptid bulunması ve literatüre kıyasla ticari olarak kullanılan peptidden daha aktif peptidler elde edilmesi bu alanda mikroalgal proteinlerin sürdürülebilir bir kaynak olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuş ve başarılı, umut vaat edici ve ticarileştirilebilir sonuçlar üretilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında protein yapılı tirozinaz inhibitörlerinin taranmasında 3 farklı model kullanılmıştır. Bunlardan ilki mikroalgal biyokütleden elde edilen protein hidrolizatları, ikincisi saf bir mikroalgal protein olan fikosiyaninden enzimatik hidroliz yoluyla elde edilen hidrolizatların tirozinaz enzim aktivitesine etkisi ve üçüncüsü ise amino asit dizisi bilinen fikosiyaninin *in silico* protein enzimatik hidrolizatları kullanılarak seçilen peptidlerin kimyasal sentez yoluyla üretilmesi ve yine tirozinaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesidir. Genel olarak sonuçlar mikroalgal proteinlerin hücresel tirozinaz inhibisyonu sağlayan potansiyel sürdürülebilir kaynaklar olduğu yönünde olmuştur. Ancak adım adım incelendiğinde biyoaktivite taraması gerçekleştirilen maddenin saflık derecesi arttıkça, tirozinaz inhibisyonuna katkısının da daha net gözlemlendiği saptanmıştır. Buradan çıkan sonuçlar göstermektedir ki,

- Mikroalgal hidrolizatlar mantar tirozinaz inhibisyonuna direkt inhibitör etki göstermemektedir.
- Mikroalgal proteinler gibi fikosiyanin ve fikosiyaninden elde edilen enzimatik hidroliz ürünleri de mantar tirozinaz enzimi üzerinde inhibitör etki göstermemiştir.
- Mikroalgal proteinlerin enzimatik hidrolizatları tirozinaz inhibisyonu ve pigmentasyon kusurlarının fonksiyonel tedavisinde umut verici yeni kaynaklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda bu alan geliştirilmeye ve incelenmeye ihtiyaç duymaktadır.
- Protein hidrolizatlarının tirozinaz inhibisyon kabiliyeti kaynağın amino asit dizisi ve kombinasyonuna, kullanılan proteolitik enzime bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Bu çalışmada görülen odur ki, *S. platensis* *C. vulgaris*'e göre tirozinaz inhibisyonu açısından etkindir.
- P1-P7 peptidlerinden özellikle P2, P3 ve P5 kuvvetli monofenolaz ve difenolaz aktivitesi açısından kuvvetli inhibisyona sahip iken, P4 ve P7 ise monofenolaz aktivitesinin inhibisyonu açısından değerli peptidler olmuştur. P5 peptidi bilinen en etkin tirozinaz inhibisyonu sağlayan peptidler arasına girmiştir. Kojik asitten 7 kat, bilinen ticari peptid tirozinaz inhibisyonundan ise yaklaşık 10 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. P5 peptidinin IC₅₀ değeri 12,12 µM'dır.
- Tirozinaz inhibisyonunda peptidin amino asit dizisi, kombinasyonu, sayısı ve konumu inhibisyon özelliklerini belirleyicidir. Daha önceki literatürlerde de ifade edildiği üzere arjinin içeren peptidler tirozinaz

inhibisyonu yapmaktadır. Özellikle LR kombinasyonları ile C terminal tirozin birimi varlığı yapının güçlü tirozinaz inhibisyonu yapma özelliğine sahip olmasını sağlamaktadır ki P2, P3 ve P5 peptidleri bu özellikleri taşımaktadır.

- P1 ve P7 peptidlerinin her birisinin hücrel tirozinaz enzimi aktivitesine katkısı olduğu gözlenmektedir. Ancak P4 peptidi mantar tirozinaz enziminde inhibisyon etkisi yapmış iken, hücrel tirozinaz enzimini %140 değerine kadar (Doza bağlı olarak) aktive etmiştir. P4'ün bu etkisinin C terminal fenil alanin biriminin tirozinaz enzimi substrat analogu olması ve yapıda dizi ortasında yer alan tirozin birimi varlığı neticesinde inhibisyon etki yerine aktivasyon yarattığı yönünde olmuştur. P1 ve P6 peptidlerinin mantar tirozinaz inhibisyon etkisinin olmaması ya da yetersiz olmasına rağmen hücrel tirozinaz inhibisyonu ve melanin miktarında azalmalar ile sonuçlanması göstermiştir ki bu peptidler ya mantar tirozinaz enziminin aksine hücrel tirozinaz enzime bağlanabilmektedir ya da sinyal yolları üzerinden tirozinaz enzimi inhibisyonunu dolaylı olarak sağlamaktadır.
- P4 (RYVTYAVF) peptidi mikroalgal kaynaklardan tirozinaz aktivasyonu yapan ilk peptittir ve başarılı sonuçlar vermiştir.
- Tez çalışması kapsamında bulunan peptidler mikroalgal protein ve peptid ürünlerinin tirozinaz enzimin ve melanogenez üzerinde etkisini ortaya koyan ilk çalışma olma niteliğindedir.

Literatürde yer alan peptid bazlı tirozinaz inhibitörleri sayısı oldukça azdır ve hidrolizatların etkisi açısından bakıldığında ise referans olarak kullanılabilecek birkaç kaynak bulunmaktadır. Mikroalgal proteinler de dahil olmak üzere konvansiyonel protein kaynaklarından elde edilen enzimatik protein hidrolizatlarının biyoaktif peptid olarak kullanıldığı çalışmalar hızlanmış olsa da melanogenez üzerine etkisi daha görece yeni bir alandır. Bilinen çalışmalar göstermiştir ki peptidlerin tirozinaz inhibitör etkisi rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Amino asit yapısı, yapıda bulunan amino asit kombinasyonları, dizi uzunluğu ve amino asitlerin C-terminal, N-terminal uçlardaki konumları tirozinaz inhibitör etkiye direkt müdahil olmaktadır. Schurinhk et al. (2007) göstermiştir ki tirozinaz bağlanması sağlayan peptidler ile tirozinaz inhibisyonu yapan peptidler arasında da farklılık görünmektedir. Bu alanda yapılan en kapsamlı çalışma olduğu için pek çok tirozinaz inhibisyonu gösteren peptid aramasında referans kaynak olarak kullanılmaktadır. Örneğin; peptid içerisinde var olan arjinin ve eşlik eden fenil alanin amino asitleri tirozinaz bağlanması açısından güçlüdür. Ancak yapıda

var olan, özellikle arjinine bağılı valin alanin ve lizin kombinasyonları tirozinaz inhibitörü olma özelliğini arttırmaktadır. C- terminal tirozin varlığı yine inhibitör etki göstermektedir. Bunun nedeni de tirozinin tirozinaz enzimi substratı olmasından kaynaklanmaktadır (Chen et al., 2006; Hsiao et al., 2014; Lee et al., 2014; Lien et al., 2014; Udenigwe et al., 2009).

Genel olarak tez kapsamında elde edilen sonuçlar göstermiştir ki mikroalgal protein hidrolizatları güvenilir ve sürdürülebilir tirozinaz inhibitörleri olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle elde edilen bulgular aydınlatıcı bir ön çalışma ve tarama olma niteliği taşımaktadır.

Bulgular ve sonuçlar değerlendirildiğinde öneriler aşağıda ifade edilmiştir;

- Bu çalışmada mikroalgal proteinlerden hidrolizatların boyut fraksiyonlaması sonucu elde edilen örnekler ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle ileri saflaştırma yöntemleri kullanılarak inhibisyona neden olan peptid ya da peptidlerin dizilemesi sonucu inhibisyona neden olan nihai peptid yapısı hakkında bilgi sahibi olunması yapılacak ilk öneridir.
- Hidrolizatların mantar tirozinaz enziminde inhibisyona neden olmaması ancak hücresel tirozinaz aktivitesini inhibe etmesi göstermiştir ki direkt inhibisyona kıyasla hücre sinyal yolları üzerinden inhibisyon aktivite gösterme olasılığı bulunmaktadır. Hidrolizatların p38, CREB, MITF, iNOS, MAPK, ERK, GSK3 β gibi hücresel sinyalizasyon üzerine etkisi olup olmadığı araştırılabilir.
- Bazı inhibitörlerin melanozom transferine ve melanin sekresyonuna da inhibitör etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle yine hidrolizatların inhibisyon metabolizmasının incelenmesi için de bu gibi denemeler gerçekleştirilebilir. Özellikle fikosiyanın hidrolizatlarında tirozinaz inhibisyonuna uyumlu melanin inhibisyonu gözlenmemiş olması bu öneriyi destekler niteliktedir.
- Saf peptid dizisine ulaşıldığında kimyasal sentez ile saf peptidin tirozinaz enzimine ve melanin üretimine etkisi incelenebilir. Bilinmektedir ki evrensel tirozinaz inhibitörleri dahi sinerjistik etki göstermektedir. Mikroalgal hidrolizatların da içerisinde bulunan diğer moleküller ve peptid protein yapıları neticesinde sinerjistik bir inhibisyon yapıp yapmadığı incelenmelidir. Özellikle bu sinerjistik etki var olan ve klinik olarak kanıtlanmış tirozinaz inhibitörleri ve anti melanojenik maddeler ile ya da

tirozinaz ve melanogenez inhibitör etkisi olan diğer mikroalgal ürünler ile birlikte formülasyon yoluyla ortaya çıkabilir. Mikroalgal ürünlerin bir arada kullanılması mavi biyoekonomiye ve aynı zamanda mikroalgal ürünlerin de geliştirilmesine ciddi ölçüde katkılar sağlayacak niteliktedir.

- Peptidlerin stabilitesi ve topikal uygulamalarda cilt bariyerinden geçebilir olması özellikle formülasyon çalışmalarında dikkat edilen bir husus olmaktadır. Bu nedenle peptidlerin emülsiyon, niozom, çeşitli biyopolimerik ajanlar ile enkapsülasyon, lipozom gibi enkapsülasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile emilim, yararlanım, stabilite ve aktivite çalışmalarının da gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu konu ile alakalı özellikle P4 ve P5 peptidleri için hem hiperpigmentasyon hem de hipopigmentasyonu temsilen başlangıç çalışmaları planlanmaya geçilmiştir.
- Antioksidan aktivite gösteren peptidlerin hücrel olarak da antioksidan yanıtı ne derece etkilediğinin çalışılması antioksidan metabolizma ile melanin sentezi arasında ilişkiyi ortaya koyacaktır.
- Peptid dizileri açığa çıkarıldığında *in silico* veri tabanları ve yazılımlar kullanılarak peptidlerin bağlanma karakteristiklerinin de incelenmesi yeni peptid tasarımlarının geliştirilmesinde kılavuz olarak kullanılabilir.
- Protein hidrolizatların yara iyileştirici özelliği ve immün yanıtı etkisi de kozmesötik formülasyonlar için kullanılabilecek başka fonksiyonlarının olup olmadığını açığa koyacak niteliktedir. Tek bir ürünün multifonksiyonel etkisi daha avantajlı olmaktadır.

Tez konusundan bağımsız olduğu düşünülebilir ancak mikroaglerin proteom veri tabanlarından özellikle tirozinaz inhibisyonu yapabilecek biyoaktif peptidlerin taranması bu alanın genişlemesini ve değer kazanmasını sağlayacaktır. Çünkü cilt her ne olursa olsun bireylerin dış dünya ile temas ettiği en geniş organdır. Bu nedenle bu yapının sağlıklı olması ve bütünselliği bedenin fizyolojik ve psikolojik olarak rahatlamasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Malek, Z.A., Ruwe, A., Kavanagh-Starner, R., Kadekaro, A.L., Swope, V., Haskell-Luevano, C., Koikov, L., Knittel, J.J., 2009.** α -MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 635–644pp. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00598.x>
- Abu Ubeid, A., Zhao, L., Wang, Y., Hantash, B.M., 2009.** Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2242–2249pp. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.124>
- Admassu, H., Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Zhao, W., 2018.** Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties. *J. Food Sci.* 83, 6–16pp. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14011>
- Agrawal, S., Adholeya, A., Barrow, C.J., Deshmukh, S.K., 2018.** Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals. *Phytochem. Lett.* 23, 15–20pp. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.11.003>
- Aguilar-Toalá, J.E., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A.M., 2019.** Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides* 122, 170170pp. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2019.170170>
- Ali, H.M., El-Gizawy, A.M., El-Bassiouny, R.E.I., Saleh, M.A., 2016.** The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chem.* 192, 879–885pp. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.100>
- Ali, S.A., Choudhary, R.K., Naaz, I., Ali, A.S., 2015.** Understanding the Challenges of Melanogenesis: Key Role of Bioactive Compounds in the Treatment of Hyperpigmentory Disorders 2. <https://doi.org/10.4172/2376-0427.1000223>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ali, S.A. and Naaz, I.**, 2018, Biochemical aspects of mammalian melanocytes and the emerging role of melanocyte stem cells in dermatological therapies, International journal of Health Sciences, 12(1): 69-76pp.
- Andrade, B.B., Cardoso, L.G., Assis, D. de J., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., da Cunha Lima, S.T.**, 2019. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. Bioresour. Technol. 284, 340–348pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.144>
- Apt, K.E., Behrens, P.W.**, 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. J. Phycol. 35, 215–226pp. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520215.x>
- Aslanbay Guler, B., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S.S., Imamoglu, E.**, 2019. Comparison of different photobioreactor configurations and empirical computational fluid dynamics simulation for fucoxanthin production. Algal Res. 37, 195–204pp. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.019>
- Awuor, O.L., Edward Kirwa, M., Betty, M., Jackim, M.F.**, 2017. Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Dagaa (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties. Ind. Chem. 03. <https://doi.org/10.4172/2469-9764.1000122>
- Azam, M.S., Choi, J., Lee, M.S., Kim, H.R.**, 2017a. Hypopigmenting effects of brown algae-derived phytochemicals: A review on molecular mechanisms. Mar. Drugs 15. <https://doi.org/10.3390/md15100297>
- Azam, M.S., Joung, E.J., Choi, J., Kim, H.R.**, 2017b. Ethanolic extract from *Sargassum serratifolium* attenuates hyperpigmentation through CREB/ERK signaling pathways in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. J. Appl. Phycol. 29, 2089–2096pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1120-8>
- Bagherzadeh, K., Shirgahi Talari, F., Sharifi, A., Ganjali, M.R., Saboury, A.A., Amanlou, M.**, 2015. A new insight into mushroom tyrosinase inhibitors: Docking, pharmacophore-based virtual screening, and molecular modeling studies. J. Biomol. Struct. Dyn. 33, 487–501.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Balcos, M.C., Kim, S.Y., Jeong, H., Yun, H., Baek, K.J., Kwon, N.S., Kim, D.,** 2014. Docosahexaenoic acid inhibits melanin synthesis in murine melanoma cells in vitro through increasing tyrosinase degradation. *Nat. Publ. Gr.* 1, 489–495pp. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.174>
- Barka, A., Blecker, C.,** 2016. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 20, 427–436pp.
- Becker, E.W.,** 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210pp. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2006.11.002>
- Bellei, B., Flori, E., Izzo, E., Maresca, V., Picardo, M.,** 2008. GSK3 β inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cell. Signal.* 20, 1750–1761pp. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.001>
- Bellei, B., Maresca, V., Flori, E., Pitisci, A., Larue, L., Picardo, M.,** 2010. P38 Regulates Pigmentation Via Proteasomal Degradation of Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 285, 7288–7299pp. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070573>
- Benemann, J.R.,** 1997. CO₂mitigation with microalgae systems. *Energy Convers. Manag.* 38, 475–479pp.
- Bilodeau, M.L., Greulich, J.D., Hullinger, R.L., Bertolotto, C., Ballotti, R., Andrisani, O.M.,** 2001. BMP-2 stimulates tyrosinase gene expression and melanogenesis in differentiated melanocytes. *Pigment Cell Res.* 14, 328–336pp. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140504.x>
- Bleakley, S., Hayes, M.,** 2017. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6, 33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Boissy, R.E., Visscher, M., deLong, M.A.,** 2005. DeoxyArbutin: A novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp. Dermatol.* 14, 601–608pp. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.00337.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borowitzka, M.A.**, 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743–756pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Borowitzka, M.A.**, 1992. Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4, 267–279pp. <https://doi.org/10.1007/BF02161212>
- Buono, S., Langellotti, A.L., Martello, A., Rinna, F., Fogliano, V.**, 2014. Functional ingredients from microalgae. *Food Funct.* 5, 1669–1685pp. <https://doi.org/10.1039/c4fo00125g>
- Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M.T.H., Ather, A., Khan, K.M., Torrens, F., Rotondo, R.**, 2007. Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification and experimental in vitro assays. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 1370–1381pp. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.01.026>
- Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S.H.**, 2011a. Inhibitory effects of Sargassum polycystum on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 137, 1183–1188pp. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.050>
- Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S.H.**, 2011b. Inhibitory effects of Sargassum polycystum on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.050>
- Chang, T.S.**, 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440–2475pp. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Chauvy, R., Meunier, N., Thomas, D., De Weireld, G.**, 2019. Selecting emerging CO2 utilization products for short- to mid-term deployment. *Appl. Energy* 236, 662–680pp. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.11.096>
- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., Bertolotto, C.**, 2010. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 27–40pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, M.J., Liu, J.R., Sheu, J.F., Lin, C.W., Chuang, C.L.,** 2006. Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 19, 905–908pp. <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.905>
- Chen, Q.X., Kubo, I.,** 2002. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4108–4112pp. <https://doi.org/10.1021/jf011378z>
- Choi, H.R., Kang, Y.A., Lee, H.S., Park, K.C.,** 2016. Disulfanyl peptide decreases melanin synthesis via receptor-mediated ERK activation and the subsequent downregulation of MITF and tyrosinase. *Int. J. Cosmet. Sci.* 38, 279–285pp. <https://doi.org/10.1111/ics.12291>
- Cian, R.E., Martínez-Augustin, O., Drago, S.R.,** 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Res. Int.* 49, 364–372pp. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.003>
- Costa, J.A.V., Moro, G.M.B., De Moraes Vaz Batista Filgueira, D., Corsini, E., Bertolin, T.E.,** 2017. The Potential of Spirulina and Its Bioactive Metabolites as Ingested Agents for Skin Care. *Ind. Biotechnol.* 13, 244–252pp. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0010>
- Cui, H.X., Duan, F.F., Jia, S.S., Cheng, F.R., Yuan, K.,** 2018. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of seed oils from *torreya grandis* Fort. ex Lindl. *Biomed Res. Int.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5314320>
- Cullen, A., Pearson, L.A., Mazmouz, R., Liu, T., Soeriyadi, A.H., Ongley, S.E., Neilan, B.A.,** 2019. Heterologous expression and biochemical characterisation of cyanotoxin biosynthesis pathways. *Nat. Prod. Rep.* <https://doi.org/10.1039/c8np00063h>
- D'Mello, S.A.N., Finlay, G.J., Baguley, B.C., Askarian-Amiri, M.E.,** 2016. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–18pp. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Da Silva, A.P., De Silva, N.F., Andrade, E.H.A., Gratieri, T., Setzer, W.N., Maia, J.G.S., Da Silva, J.K.R.,** 2017. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. *PLoS One* 12, 1–17pp. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175598>
- da Silva, J.D.F., Correa, A.P.F., Kechinski, C.P., Brandelli, A.,** 2018. Buffalo cheese whey hydrolyzed with Alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple. *J. Food Sci. Technol.* 55, 3731–3738pp. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3303-y>
- Deviram, G., Mathimani, T., Anto, S., Ahamed, T.S., Ananth, D.A., Pugazhendhi, A.,** 2020. Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. *J. Clean. Prod.* 253, 119770pp. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119770>
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., MacHat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., Vitova, M.,** 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 179–185pp. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1811-9>
- Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L.B., Roy, A., Barbosa, M.J.,** 2013. Food commodities from microalgae. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 169–177pp. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.09.012>
- Dv, A.,** 2018. Melanogenesis Inhibitors 924–931pp. <https://doi.org/10.2340/00015555-3002>
- Ejike, C.E.C.C., Collins, S.A., Balasuriya, N., Swanson, A.K., Mason, B., Udenigwe, C.C.,** 2017. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends Food Sci. Technol.* 59, 30–36pp. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.10.026>
- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., Zhang, X.,** 2014a. Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222pp. <https://doi.org/10.1021/jf502420h>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., Zhang, X.,** 2014b. Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222pp. <https://doi.org/10.1021/jf502420h>
- Farishian, R.A., Whittaker, J.R.,** 1980. Phenylalanine lowers melanin synthesis in mammalian melanocytes by reducing tyrosine uptake: Implications for pigment reduction in phenylketonuria. *J. Invest. Dermatol.* 74, 85–89pp. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12519975>
- Feng, L., Shi, N., Cai, S., Qiao, X., Chu, P., Wang, H., Long, F., Yang, H., Yang, Y., Wang, Y., Yu, H.,** 2018. De Novo Molecular Design of a Novel Octapeptide That Inhibits in Vivo Melanogenesis and Has Great Transdermal Ability. *J. Med. Chem.* 61, 6846–6857. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00737>
- Fernandes, M.S., Kerkar, S.,** 2017. Microorganisms as a source of tyrosinase inhibitors: a review. *Ann. Microbiol.* 67, 343–358pp. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1261-7>
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J.,** 2014. Nutraceutical properties of phycocyanin. *J. Funct. Foods* 11, 375–392pp. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.10.011>
- Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J., Flurkey, W.H.,** 2008. Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: Potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4760–4768pp. <https://doi.org/10.1021/jf800109a>
- Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F.S.C., Cui, S.,** 2005. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7408–7414pp. <https://doi.org/10.1021/jf051258h>
- Fu, C., Hung, T., Chen, J., Su, C., Wu, W.,** 2010. Bioresource Technology Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction 101, 8750–8754pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.100>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gammone, M.A., Riccioni, G., D’Orazio, N.,** 2015. Carotenoids: Potential allies of cardiovascular health? Food Nutr. Res. 59, 1–11pp. <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.26762>
- Gillbro, J.M., Olsson, M.J.,** 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. Int. J. Cosmet. Sci. 33, 210–221pp. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x>
- Graells, J., Vinyals, A., Figueras, A., Llorens, A., Moreno, A., Marcoval, J., Gonzalez, F.J., Fabra, A.,** 2004. Overproduction of VEGF165 concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. J. Invest. Dermatol. 123, 1151–1161pp. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23460.x>
- Gupta, S., Sharma, A.K., Shastri, V., Madhu, M.K., Sharma, V.K.,** 2017. Prediction of anti-inflammatory proteins/peptides: An insilico approach. J. Transl. Med. 15, 1–11pp. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1103-6>
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Oral, İ., Öncel, S.Ş., Elibol, M.,** 2020. Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds, in: IFMBE Proceedings. pp. 267–272pp. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7_41
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Gebeloğlu, İ.K., Öncel, S.Ş., Elibol, M.,** 2019. Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. Health Technol. (Berl). <https://doi.org/10.1007/s12553-019-00388-3>
- Hacker, S.M.,** 2017. Common disorders of pigmentation Common disorders of pigmentation When are more than cosmetic cover-ups required. 5481. <https://doi.org/10.1080/00325481.1996.11946143>
- Hao, S., Li, S., Wang, J., Zhao, L., Zhang, C., Huang, W., Wang, C.,** 2018a. Phycocyanin Reduces Proliferation of Melanoma Cells through Downregulating GRB2/ERK Signaling. J. Agric. Food Chem. 66, 10921–10929. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b0349>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hao, S., Li, S., Wang, J., Zhao, L., Zhang, C., Huang, W., Wang, C.,** 2018b. Phycocyanin Reduces Proliferation of Melanoma Cells through Downregulating GRB2/ERK Signaling. *J. Agric. Food Chem.* 66, 10921–10929pp. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03495>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K.,** 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1037–1047pp. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2009.11.004>
- Hayes, M., Skomedal, H., Skjånes, K., Mazur-Marzec, H., Toruńska-Sitarz, A., Catala, M., Isleten Hosoglu, M., García-Vaquero, M.,** 2017. Microalgal proteins for feed, food and health. *Microalgae-Based Biofuels Bioprod.* 347–368pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00015-7>
- Hemalatha, M., Sravan, J.S., Min, B., Venkata Mohan, S.,** 2019. Microalgae-biorefinery with cascading resource recovery design associated to dairy wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 284, 424–429pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.106>
- Heo, S.J., Ko, S.C., Cha, S.H., Kang, D.H., Park, H.S., Choi, Y.U., Kim, D., Jung, W.K., Jeon, Y.J.,** 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol. Vit.* <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.013>
- Hsiao, N.W., Tseng, T.S., Lee, Y.C., Chen, W.C., Lin, H.H., Chen, Y.R., Wang, Y.T., Hsu, H.J., Tsai, K.C.,** 2014. Serendipitous discovery of short peptides from natural products as tyrosinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 3099–3111pp. <https://doi.org/10.1021/ci500370x>
- Hu, S., Fan, X., Qi, P., Zhang, X.,** 2019. Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *J. Funct. Foods* 56, 333–341pp. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.03.024>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, L., Ma, H., Li, Y., Li, S.,** 2012. Antihypertensive activity of recombinant peptide IYPR expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 83, 15–20pp. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.004>
- Huntley, M.E., Redalje, D.G.,** 2007. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. <https://doi.org/10.1007/s11027-006-7304-1>
- Ischia, M., Wakamatsu, K., Cicoira, F., Mauro, E. Di, Garcia-borron, J.C., Ghanem, G., Kenzo, K., Meredith, P., Pezzella, A., Santato, C., Sarna, T., Simon, J.D., Zecca, L., Zucca, F.A. and Napolitano, A. and Ito, S., n.d.** 2015, Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications, *International Federation of Pigment Cell Societies Society For Melanoma Research Pigment Cell Melanoma Res.* 28; 520–544pp. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12393>.
- Ischia, M., Wakamatsu, K., Briganti, S., Kovacs, D., Meredith, P., Pezzella, A., Sarna, T., Simon, J.D. and Ito, S., n.d.** 2013, Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols, *International Federation of Pigment Cell Societies Society For Melanoma Research Pigment Cell & Melanoma Res.* 26; 616–633pp. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12121>.
- Ishihara, A., Ide, Y., Bito, T., Ube, N., Endo, N., Sotome, K., Maekawa, N., Ueno, K., Nakagiri, A.,** 2018. Novel tyrosinase inhibitors from liquid culture of *Neolentinus lepideus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 22–30pp. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1415125>
- Ishikawa, M., Kawase, I., Ishii, F.,** 2007. Combination of Amino Acids Reduces Pigmentation in B16F0 Melanoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 677–681pp. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.677>
- Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M.,** 2017. Improvement of medium composition and cultivation conditions for growth and lipid production by *Cryptocodinium cohnii*. *Rom. Biotechnol. Lett.* 22, 13086–13095pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iwaniak, A., Darewicz, M., Mogut, D., Minkiewicz, P.,** 2019. Elucidation of the role of in silico methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. *J. Funct. Foods* 61, 103486pp. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103486>
- Jang, J.Y., Kim, H.N., Kim, Y.R., Choi, Y.H., Kim, B.W., Shin, H.K., Choi, B.T.,** 2012. Aqueous fraction from *Cuscuta japonica* seed suppresses melanin synthesis through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in B16F10 cells. *J. Ethnopharmacol.* 141, 338–344pp. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.043>
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K.,** 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 42, 840–846pp. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>
- Jin, Y., Yan, J., Yu, Y., Qi, Y.,** 2015. Screening and identification of DPP-IV inhibitory peptides from deer skin hydrolysates by an integrated approach of LC–MS/MS and in silico analysis. *J. Funct. Foods* 18, 344–357pp. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.07.015>
- Jung, S., Kim, D.H., Son, J.H., Nam, K., Ahn, D.U., Jo, C.,** 2012. The functional property of egg yolk phosvitin as a melanogenesis inhibitor. *Food Chem.* 135, 993–998pp. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.113>
- Kajiwara, T., Matsui, K., Akakabe, Y., Murakawa, T., Arai, C.,** 2006. Antimicrobial browning-inhibitory effect of flavor compounds in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 18, 413–422pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9046-6>
- Kang, H.S., Kim, H.R., Byun, D.S., Son, B.W., Nam, T.J., Choi, J.S.,** 2004. Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1226–1232pp. <https://doi.org/10.1007/BF02975886>
- Kang, K.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Karadeniz, F., Kim, D., Kim, S.K.,** 2012. Antioxidant peptides from protein hydrolysate of microalgae *navicula incerta* and their protective effects in Hepg2/CYP2E1 cells induced by ethanol. *Phyther. Res.* 26, 1555–1563pp. <https://doi.org/10.1002/ptr.4603>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kang, K.H., Ryu, B.M., Kim, S.K., Qian, Z.J.,** 2011. Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Sci. Biotechnol.* 20, 183–191pp. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0025-6>
- Kang, S.J., Choi, B.R., Lee, E.K., Kim, S.H., Yi, H.Y., Park, H.R., Song, C.H., Lee, Y.J., Ku, S.K.,** 2015. Inhibitory effect of dried pomegranate concentration powder on melanogenesis in B16F10 melanoma cells; involvement of p38 and PKA signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 24219–24242pp. <https://doi.org/10.3390/ijms161024219>
- Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., Nomura, M.,** 1998. Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 145–147pp. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.145>
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., Ballotti, R., Bertolotto, C.,** 2002. Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 33690–33697pp. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202939200>
- Khazi, M.I., Demirel, Z., Dalay, M.C.,** 2018. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *J. Appl. Phycol.* 30, 1513–1523pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1398-1>
- Kim, D.-S.,** 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* 116, 1699–1706pp. <https://doi.org/10.1242/jcs.00366>
- Kim, H., Choi, H., Ph, D., Kim, D., Ph, D., Park, K.,** 2012. Topical Hypopigmenting Agents for Pigmentary Disorders and Their Mechanisms of Action 24, 1–6pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, S.S., Kim, M.J., Choi, Y.H., Kim, B.K., Kim, K.S., Park, K.J., Park, S.M., Lee, N.H., Hyun, C.G.,** 2013. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 617–622pp. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60125-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60125-2)
- Kim, Y.J., Uyama, H.,** 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1707–1723pp. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
- Kim, Y.M., Yun, J., Lee, C.K., Lee, H., Min, K.R., Kim, Y.,** 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 277, 16340–16344pp. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200678200>
- Ko, S.-C., Kang, N., Kim, E.-A., Kang, M.C., Lee, S.-H., Kang, S.-M., Lee, J.-B., Jeon, B.-T., Kim, S.-K., Park, S.-J., Park, P.-J., Jung, W.-K., Kim, D., Jeon, Y.-J.,** 2012. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochem.* 47, 2005–2011pp. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.015>
- Ko, S.C., Kim, D., Jeon, Y.J.,** 2012. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2294–2302pp. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.022>
- Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G.,** 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* 6, 52–63pp. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.09.002>
- Kono, M., Dunn, I.S., Durda, P.J., Butera, D., Rose, L.B., Haggerty, T.J., Benson, E.M., Kurnick, J.T.,** 2006. Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in the Regulation of Human Melanocytic Antigen Expression. *Mol. Cancer Res.* 4, 779–792pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kose, A., Oncel, S.S.,** 2016. Biohydrogen production from microalgae: An enzyme perspective, Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4_9
- Kose, A., Oncel, S.S.,** 2015. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. Biotechnol. Reports 6, 137–143pp. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2015.02.005>
- Kose, Ayse, Ozen, M.O., Elibol, M., Oncel, S.S.,** 2017. Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga Chlorella vulgaris and cyanobacterium Spirulina platensis as a nutritional supplement. 3 Biotech 7, 1–7pp. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0832-4>
- Kubglomsong, S., Theerakulkait, C.,** 2014. Effect of rice bran protein extract on enzymatic browning inhibition in potato puree. Int. J. Food Sci. Technol. 49, 551–557pp. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12336>
- Kubglomsong, S., Theerakulkait, C., Reed, R.L., Yang, L., Maier, C.S., Stevens, J.F.,** 2018. Isolation and Identification of Tyrosinase-Inhibitory and Copper-Chelating Peptides from Hydrolyzed Rice-Bran-Derived Albumin. J. Agric. Food Chem. 66, 8346–8354pp. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01849>
- Kubo, I., Chen, Q.X., Nihei, K.I.,** 2003. Molecular design of antibrowning agents: Antioxidative tyrosinase inhibitors. Food Chem. 81, 241–247pp. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00418-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00418-1)
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Kubo, Y., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T., Haraguchi, H.,** 2000. Molecular design of antibrowning agents. J. Agric. Food Chem. 48, 1393–1399pp. <https://doi.org/10.1021/jf990926u>
- Kumar, D., Wattal, D.,** 2014. Extraction and purification of C-phycoerythrin from Spirulina 19, 184–188pp. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, S., Cheng, J., Guo, W., Ali, K.A., Song, Y.,** 2019. Self-rotary propellers with clockwise/counterclockwise blades create spiral flow fields to improve mass transfer and promote microalgae growth. *Bioresour. Technol.* 286, 121384pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121384>
- Kwak, S.Y., Choi, H.R., Park, K.C., Lee, Y.S.,** 2011. Kojic acid-amino acid amide metal complexes and their melanogenesis inhibitory activities. *J. Pept. Sci.* 17, 791–797pp. <https://doi.org/10.1002/psc.1404>
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y.,** 2012. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *J. Funct. Foods* 4, 403–422pp. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.008>
- Lee, H.S., Shin, K.H., Ryu, G.S., Chi, G.Y., Cho, I.S., Kim, H.Y.,** 2012. Synthesis of small molecule-peptide conjugates as potential whitening agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* 33, 3004–3008pp. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.9.3004>
- Lee, S.H., Kang, S.M., Sok, C.H., Hong, J.T., Oh, J.Y., Jeon, Y.J.,** 2015. Cellular activities and docking studies of eckol isolated from *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyceae) as potential tyrosinase inhibitor. *Algae* 30, 163–170pp. <https://doi.org/10.4490/algae.2015.30.2.163>
- Lee, S.J., Park, S.G., Chung, H.M., Choi, J.S., Kim, D.D., Sung, J.H.,** 2009. Antioxidant and anti-melanogenic effect of the novel synthetic hexapeptide (SFKLRY-NH₂). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 15, 281–286pp. <https://doi.org/10.1007/s10989-009-9189-9>
- Lee, Y.-C., Hsiao, N.-W., Tseng, T.-S., Chen, W.-C., Lin, H.-H., Leu, S.-J., Yang, E.-W., Tsai, K.-C.,** 2014. Phage Display-Mediated Discovery of Novel Tyrosinase-Targeting Tetrapeptide Inhibitors Reveals the Significance of N-Terminal Preference of Cysteine Residues and Their Functional Sulfur Atom. *Mol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1124/mol.114.094185>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leupold, M., Hindersin, S., Gust, G., Kerner, M., Hanelt, D.,** 2013. Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris* , *Scenedesmus obliquus* , and *Chlamydomonas reinhardtii* 485–495pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9882-5>
- Levy-Ontman, O., Huleihel, M., Hamias, R., Wolak, T., Paran, E.,** 2017. An anti-inflammatory effect of red microalga polysaccharides in coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 264, 11–18pp. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.017>
- Li, G.H., Le, G.W., Liu, H., Shi, Y.H.,** 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.* 11, 281–287pp. <https://doi.org/10.1177/1082013205056781>
- Li, L., and Steffens J.C.** 2002, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. 2:239–247pp., doi: 10.1007/s00425-002-0750-4.
- Lien, C.Y., Chen, C.Y., Lai, S.T., Chan, C.F.,** 2014. Kinetics of mushroom tyrosinase and melanogenesis inhibition by N -acetyl-pentapeptides. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/409783>
- Liu, Y.Y., Su, X.R., Liu, S.S., Yang, S.S., Jiang, C.Y., Zhang, Y., Zhang, S.,** 2017. Zebrafish phosvitin-derived peptide Pt5 inhibits melanogenesis via cAMP pathway. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 517–525pp. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0306-3>
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F.,** 2012. Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 378–398pp. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x>
- López, C.V.G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F.G.A., Bustos, C.S., Chisti, Y., Sevilla, J.M.F.,** 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 7587–7591pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K.,** 2016. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.* 109, 282–296pp. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.01.025>
- Marini, A., Farwick, M., Grether-Beck, S., Brenden, H., Felsner, I., Jaenicke, T., Weber, M., Schild, J., Maczkiewitz, U., Köhler, T., Bonfigli, A., Pagani, V., Krutmann, J.,** 2012. Modulation of skin pigmentation by the tetrapeptide PKEK: In vitro and in vivo evidence for skin whitening effects. *Exp. Dermatol.* 21, 140–146pp. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01415.x>
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S.,** 2005. Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 197–201pp. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>
- Mayfield, S.P., Franklin, S.E.,** 2005. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae 23, 1828–1832pp. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.013>
- Meredith, P., Sarna, T.,** 2006. The physical and chemical properties of eumelanin. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00345.x>
- Mistry, A.N., Ganta, U., Chakrabarty, J., Dutta, S.,** 2019. A review on biological systems for CO₂ sequestration: Organisms and their pathways. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 38, 127–136pp. <https://doi.org/10.1002/ep.12946>
- Momtaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., Lall, N.,** 2008. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.006>
- Morris, H.J., Almarales, A., Carrillo, O., Bermúdez, R.C.,** 2008. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 99, 7723–9pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morris, H.J., Bermúdez, R.C., Fontaine, R., Llauradó, G., Carrillo, O. V., Alonso, M.E., Almarales, Á., Borges, L., Quintana, M.M., Hernández, M.,** 2009. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with the potentialities in immunonutrition. *Biotechnol. Apl.* 26, 162–165pp.
- Mourelle, M.L., Gómez, C.P., Legido, J.L.,** 2017. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics* 4. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>
- Nakchum, L., Kim, S.M.,** 2016. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 46, 123–130pp. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.995808>
- Newton, R.A., Cook, A.L., Roberts, D.W., Leonard, J.H., Sturm, R.A.,** 2007. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2216–2227pp. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700840>
- Ngo, D.H., Vo, T.S., Ryu, B.M., Kim, S.K.,** 2016. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.* 51, 1622–1628pp. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.006>
- Nicolaidou, E., Katsambas, A.D.,** 2014. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. *Clin. Dermatol.* 32, 66–72pp. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2013.05.026>
- Nie, H., Liu, L., Yang, H., Guo, H., Liu, X., Tan, Y., Wang, W., Quan, J., Zhu, L.,** 2017. A Novel Heptapeptide with Tyrosinase Inhibitory Activity Identified from a Phage Display Library. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 219–232pp. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2208-3>
- Ochiai, A., Tanaka, S., Imai, Y., Yoshida, H., Kanaoka, T., Tanaka, T., Taniguchi, M.,** 2016a. New tyrosinase inhibitory decapeptide: Molecular insights into the role of tyrosine residues. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 607–613pp. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.010>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ochiai, A., Tanaka, S., Tanaka, T., Taniguchi, M.**, 2016b. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* 79, 2545–2551pp. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00449>
- Ochoa-Méndez, C.E., Lara-Hernández, I., González, L.M., Aguirre-Bañuelos, P., Ibarra-Barajas, M., Castro-Moreno, P., González-Ortega, O., Soria-Guerra, R.E.**, 2016. Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* 240, 76–84pp. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.001>
- Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Nguyen, V.-T., Jung, W.-K., Ko, S.-C., Kim, G., Jang, C.H., Park, W.S., Choi, I.-W., Qian, Z.-J.**, 2015. A novel peptide purified from the fermented microalga *Pavlova lutheri* attenuates oxidative stress and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Process Biochem.* 50, 1318–1326pp. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.007>
- Oncel, S., Kose, A.**, 2014. Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity. *Bioresour. Technol.* 151, 265–270pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.076>
- Oncel, S.S., Kose, A., Faraloni, C., Imamoglu, E., Elibol, M., Torzillo, G., Sukan, F.V.**, 2014. Biohydrogen production using mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*: The effects of light intensity and illumination patterns. *Biochem. Eng. J.* 92, 47–52pp. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.019>
- Oncel, S.S., Kose, A., Faraloni, C., Imamoglu, E., Elibol, M., Torzillo, G., Vardar Sukan, F.**, 2015. Biohydrogen production from model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: A simulation of environmental conditions for outdoor experiments. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 7502–7510pp. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.121>
- Onuh, J.O., Girgih, A.T., Aluko, R.E., Aliani, M.**, 2014. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* 150, 366–373pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ovando, C.A., Carvalho, J.C. de, Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V.T., Soccol, C.R.,** 2018. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review. *Food Rev. Int.* 34, 34–51pp. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1210632>
- Park, K.C., Huh, S.Y., Choi, H.R., Kim, D.S.,** 2010. Biology of melanogenesis and the search for hypopigmenting agents. *Dermatologica Sin.* 28, 53–58pp. [https://doi.org/10.1016/S1027-8117\(10\)60011-0](https://doi.org/10.1016/S1027-8117(10)60011-0)
- Patil, S., Sistla, S., Jadhav, J.,** 2016. Interaction of small molecules with human tyrosinase: A surface plasmon resonance and molecular docking study. *Int. J. Biol. Macromol.* 92, 1123–1129pp. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.043>
- Pereira, L.,** 2018. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algotherapy, and Thalassotherapy, *Cosmetics*. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.-H.,** 2017a. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov. Today* 22, 282–298pp. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2016.09.016>
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.-H.,** 2015. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* 25, 775–788pp. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1039985>
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.H.,** 2017b. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell. Signal.* 40, 99–115pp. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.004>
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., Jung, S.H.,** 2018. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *J. Med. Chem.* 61, 7395–7418. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00967>
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G.,** 2017. Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 248–254pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Plensdorf, S., General, L., Family, H., Residency, M., Livieratos, P.M., Healthcare, M.F., Dada, M.N., Hospital, N.A.,** 2017. Pigmentation Disorders: Diagnosis and Management.
- Pongkai, P., Saisavoey, T., Sangtanoo, P., Sangvanich, P., Karnchanatat, A.,** 2017. Effects of protein hydrolysate from chicken feather meal on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. Food Sci. Biotechnol. 26, 1199–1208pp. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0186-z>
- Prakot, P., Chaitanawisuti, N., Karnchanatat, A.,** 2015. In vitro anti-tyrosinase activity of protein hydrolysate from spotted babylon (*Babylonia areolata*). Food Appl. Biosci. J. 3, 109–120pp.
- Prakot, P., Chaitanawisuti, N., Sangtanoo, P., Saisavoey, T., Karnchanatat, A.,** 2018. Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates from Spotted Babylon Snails on Tyrosinase and Melanogenesis. J. Aquat. Food Prod. Technol. 27, 811–829pp. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1499687>
- Pulz, M.O., Gross, W.,** 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae 635–648pp. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rahnamaeian, M., Vilcinskas, A.,** 2015. Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 8847–8855pp. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6926-1>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., Carvalho, I.S.,** 2016. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. Crit. Rev. Microbiol. 42, 394–405pp. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.957640>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R.,** 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. Crit. Rev. Microbiol. 34, 77–88pp. <https://doi.org/10.1080/10408410802086783>
- Rao, A.R., Sindhuja, H.N., Dharmesh, S.M., Sankar, K.U., Sarada, R., Ravishankar, G.A.,** 2013. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga haematococcus pluvialis. J. Agric. Food Chem. 61, 3842–3851pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rasmussen, B., Fletcher, I.R., Brocks, J.J., Kilburn, M.R.,** 2008. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455, 1101–1104pp. <https://doi.org/10.1038/nature07381>
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E.,** 2002. Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17, 207–218pp. <https://doi.org/10.1080/14756360210000010923>
- Revskeya, E., Chu, P., Howell, R.C., Schweitzer, A.D., Bryan, R.A., Harris, M., Gerfen, G., Jiang, Z., Jandl, T., Kim, K., Ting, L.M., Sellers, R.S., Dadachova, E., and Casadevall, A.** 2012, Compton Scattering by Internal Shields Based on Melanin-Containing Mushrooms Provides Protection of Gastrointestinal Tract from Ionizing Radiation, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 27 (9): 570-6 pp.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N.,** 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 92, 394–404pp. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Roh, J.S., Han, J.Y., Kim, J.H., Hwang, J.K.,** 2004. Inhibitory Effects of Active Compounds Isolated from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds for Melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1976–1978pp. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1976>
- Różanowska, M., Sarna, T., Land, E.J., Truscott, T.G.,** 1999. Free radical scavenging properties of melanin: Interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 518–525pp. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00234-2)
- Sae-leaw, T., Benjakul, S.,** 2019. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 85, 1–9pp. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.003>
- Safi, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C.,** 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Res.* 3, 61–65pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Samarakoon, K., Jeon, Y.-J.,** 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Res. Int.* 48, 948–960pp. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.03.01>
- Samarakoon, K.W., O-Nam, K., Ko, J.Y., Lee, J.H., Kang, M.C., Kim, D., Lee, J.B., Lee, J.S., Jeon, Y.J.,** 2013. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. *J. Appl. Phycol.* 25, 1595–1606pp. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9994-6>
- Sano, T., Kaya, K.,** 1996. Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *J. Nat. Prod.* 59, 90–92pp. <https://doi.org/10.1021/np9600210>
- Schurink, M.,** 2007. Peptides as inhibitors of lipooxygenase and tyrosinase, *Chemistry*. <https://doi.org/978-90-8504-845-9>
- Schurink, M., van Berkel, W.J.H., Wichers, H.J., Boeriu, C.G.,** 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* 28, 485–495pp. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>
- Sepulveda, C., Gómez, C., El Bahraoui, N., Acién, G.,** 2019. Comparative evaluation of microalgae strains for CO₂ capture purposes. *J. CO₂ Util.* 30, 158–167pp. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.02.004>
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S.,** 2011. Bioactive peptides: A review. *Int. J. Bioautomation* 15, 223–250pp. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Sheih, I.C., Wu, T.K., Fang, T.J.,** 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.* 100, 3419–3425pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.014>
- Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K.,** 2000. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4- substituted resorcinols: Structure-activity investigations. *Planta Med.* 66, 11–15pp. <https://doi.org/10.1055/s-2000-11113>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shimoda, H., Tanaka, J., Shan, S.J., Maoka, T.,** 2010. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1137–1145.
- Singh, J., Dhar, D.W.,** 2019. Overview of carbon capture technology: Microalgal biorefinery concept and state-of-the-art. *Front. Mar. Sci.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00029>
- Smit, N., Vicanova, J., Pavel, S.,** 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 5326–5349pp. <https://doi.org/10.3390/ijms10125326>
- Solano, F.,** 2014. Melanins : Skin Pigments and Much More — Types , Structural Models , Biological Functions , and Formation Routes 2014.
- Somers, M.D., Quinn, J.C.,** 2019. Sustainability of carbon delivery to an algal biorefinery: A techno-economic and life-cycle assessment. *J. CO2 Util.* 30, 193–204pp. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.01.007>
- Song, Y.S., Balcos, M.C., Yun, H.Y., Baek, K.J., Kwon, N.S., Kim, M.K., Kim, D.S.,** 2015. ERK activation by fucoidan leads to inhibition of melanogenesis in Mel-Ab cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 19, 29–34pp. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.1.29>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A.,** 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96pp. <https://doi.org/10.1263/JBB.101.87>
- Swalwell, H., Latimer, J., Haywood, R.M., Birch-Machin, M.A.,** 2012. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 626–634pp. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.11.019>
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R.,** 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, 5892–5896pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.088>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tan, R., Wang, F., Fan, C., Zhang, X.,** 2018. Function suppresses B16F10 melanoma lung metastasis by autophagy induction 6179–6186pp. <https://doi.org/10.1039/c8fo01617h>
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., and Montemurro, C.** 2017, Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects, *Int. J. Mol. Sci.*, 18: 377 pp.
- Tchorbanov, B., Bozhkova, M.,** 1988. Enzymatic hydrolysis of cell proteins in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents 10, 233–238pp.
- Tejano, L.A., Peralta, J.P., Yap, E.E.S., Panjaitan, F.C.A., Chang, Y.W.,** 2019. Prediction of bioactive peptides from *chlorella sorokiniana* proteins using proteomic techniques in combination with bioinformatics analyses. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071786>
- Thomas, N.V., Kim, S.K.,** 2013. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Mar. Drugs* 11, 146–164pp. <https://doi.org/10.3390/md11010146>
- Tseng, T.S., Tsai, K.C., Chen, W.C., Wang, Y.T., Lee, Y.C., Lu, C.K., Don, M.J., Chang, C.Y., Lee, C.H., Lin, H.H., Hsu, H.J., Hsiao, N.W.,** 2015. Discovery of Potent Cysteine-Containing Dipeptide Inhibitors against Tyrosinase: A Comprehensive Investigation of 20 × 20 Dipeptides in Inhibiting Dopachrome Formation. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6181–6188pp. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01026>
- Ubeid, A.A., Do, S., Nye, C., Hantash, B.M.,** 2012. Potent low toxicity inhibition of human melanogenesis by novel indole-containing octapeptides. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 1481–1489pp. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.003>
- Udenigwe, C.C.,** 2016. Towards rice bran protein utilization: In silico insight on the role of oryzacystatins in biologically-active peptide production. *Food Chem.* 191, 135–138pp. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.043>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Udenigwe, C.C., Lin, Y.S., Hou, W.C., Aluko, R.E.,** 2009. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Funct. Foods* 1, 199–207pp. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.00>
- Udenigwe, C.C., Okolie, C.L., Qian, H., Ohanenye, I.C., Agyei, D., Aluko, R.E.,** 2017. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.001>
- Ursu, A.V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., Michaud, P.,** 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 157, 134–139pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>
- Vachtenheim, J., Borovanský, J.,** 2010. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF. *Exp. Dermatol.* 19, 617–627pp. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x>
- Videau, P., Wells, K.N., Singh, A.J., Gerwick, W.H., Philmus, B.,** 2016. Assessment of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 as a Heterologous Expression Host for Cyanobacterial Natural Products: Production of Lyngbyatoxin A. *ACS Synth. Biol.* 5, 978–988. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00038>
- Vo, T.-S., Ryu, B., Kim, S.-K.,** 2013. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *J. Funct. Foods* 5, 1336–1346pp. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.001>
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F.O.I.S.,** 1998. Microalgal biomarkers : A review of recent research developments 29pp.
- Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C.,** 2005. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 24, 629–641pp. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0004-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q.,** 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707–718pp. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, H.-M.D., Chen, C.-C., Huynh, P.,** 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresour. Technol.* 184, 355–362pp. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.12.001>
- Wang, J., Cheng, W., Liu, W., Wang, H., Zhang, D., Qiao, Z., Jin, G., Liu, T.,** 2019. Field study on attached cultivation of *Arthrospira* (Spirulina) with carbon dioxide as carbon source. *Bioresour. Technol.* 283, 270–276pp. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.099>
- Wang, L.X., Qian, J., Zhao, L.N., Zhao, S.H.,** 2018. Effects of volatile oil from ginger on the murine B16 melanoma cells and its mechanism. *Food Funct.* 9, 1058–1069pp. <https://doi.org/10.1039/c7fo01127j>
- Wang, X., Zhang, X.,** 2012. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresour. Technol.* 126, 307–313pp. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.09.059>
- Waseem, M., Kumar, S., Kumar, A.,** 2018. Bioactive peptides. *Second. Metab. Funct. Food Components Role Heal. Dis.* 259–287pp. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Westerhof, W.,** 2006. The discovery of the human melanocyte 183–193pp. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00313.x>
- Wijesekara, I., Qian, Z.J., Ryu, B., Ngo, D.H., Kim, S.K.,** 2011. Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 44, 703–707pp. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.022>
- Wu, L.C., Lin, Y.Y., Yang, S.Y., Weng, Y.T., Tsai, Y.T.,** 2011. Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. *J. Biomed. Sci.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-74>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xiao, Y., Liu, Y., Wang, G., Hao, Z., An, Y.,** 2010. Simulated microgravity alters growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). *Toxicon* 56, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.026>
- Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., Lin, L.,** 2019. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.103pp>
- Yang, G., Cozad, M.A., Holland, D.A., Zhang, Y., Luesch, H., Ding, Y.,** 2018. Photosynthetic Production of Sunscreen Shinorine Using an Engineered Cyanobacterium. *ACS Synth. Biol.* 7, 664–671pp. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00397>
- Yang, J.K., Lee, E., Hwang, I.J., Yim, D., Han, J., Lee, Y.S., Kim, J.H.,** 2018. β -Lactoglobulin Peptide Fragments Conjugated with Caffeic Acid Displaying Dual Activities for Tyrosinase Inhibition and Antioxidant Effect. *Bioconjug. Chem.* 29, 1000–1005pp. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00050>
- Yoon, N.Y., Eom, T.K., Kim, M.M., Kim, S.K.,** 2009. Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4124–4129pp. <https://doi.org/10.1021/jf900006f>
- Yuan, X.H., Yao, C., Oh, J.H., Park, C.H., Tian, Y.D., Han, M., Kim, J.E., Chung, J.H., Jin, Z.H., Lee, D.H.,** 2016. Vasoactive intestinal peptide stimulates melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells via CREB/MITF/tyrosinase signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 336–342pp. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.105>
- Zhang, F., Kearns, S.L., Orr, P.J., Benton, M.J., Zhou, Z., Johnson, D., Xu, X., Wang, X.,** 2010. Fossilized melanosomes and the colour of Cretaceous dinosaurs and birds. *Nature* 1, 4–7pp. <https://doi.org/10.1038/nature08740>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, Ying, Chen, R., Zuo, F., Ma, H., Zhang, Yanchun, Chen, S.,** 2016. Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. *Int. Dairy J.* 53, 37–44pp.
- Zhou, J., Shang, J., Ping, F., Zhao, G.,** 2012. Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *J. Ethnopharmacol.* 143, 639–647pp.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.030>
- Zhou, P., Yang, C., Ren, Y., Wang, C., Tian, F.,** 2013. What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chem.* 141, 2967–2973pp.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.140>
- Zhu, K., Zhou, H., Qian, H.,** 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* 41, 1296–1302pp.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029>
- Zhu, L.,** 2015. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1376–1384pp.
<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.09.040>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M.T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Saboury, A.A.,** 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34, 279–309pp.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmam kapsamında özverim ve mesleğime olan tutumum ile azmim için kendime teşekkür ediyorum. Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, lisans diploma tezimden bu yana beni her konuda yüreklendiren, çözüm üreten ve desteğini her zaman memnuniyetle hissettiğim sevgili danışman hocam Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL'e teşekkür ediyorum. Hem bilimsel hem akademik hem de yaşam hakkında bu süreçte bana kattıkları, destekleri ve dayanışması paha biçilemez olmuştur. Sevgili Prof. Dr. Murat ELİBOL, tüm akademik hayatımda büyük destekçim olmuş ve yardımlarını hiçbir zaman esirgememiştir, teşekkür ediyorum. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü kurucusu, sevgili Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Lise yıllarımdan beri sürdürmüş olduğum yaşam bilimlerine olan heves ve istek, Ege Biyomühendislik Bölümü'nde bir yön bulmuş ve şekil almıştır.

Doktora tezim benim için hayatımda çok büyük bir dönüm noktası oldu. Gerçeklik ile hayali, mümkünler ile başarılabilirliği sınıdığım ve tecrübe ettiğim bir dönem idi. Bu dönemde yanımda olan biricik ailem, annem Hasibe KÖSE ve babam Adnan KÖSE'ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Sevgili ailemin vermiş olduğu destek paha biçilemez. Bu süreçte karşılaştığım sevgili Min Jin COURIER, desteğin sanıyorum beni ayakta tutan, kendimi ve kim olduğumu anlamama yardım eden cinsten idi. Teşekkür ediyorum en içten duygularıyla.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Fulya ERSOY, Kazım Cihan CAN, sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU, Ceren GÜRLEK, Çağla YARKENT, İzel ORAL, Başak TUĞCU, Yunus ÇELİK ve Barış ERDOĞAN'a; staj deneyimleri süresince tez çalışmama destekleri dokunan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğrencileri Yağmur KORU, Selime ÖZAKYOL ve Öznuur KAYMAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bilimsel bilgi birikimini çekinmeden paylaşan sevgili Dr. Zeliha DEMİREL, Dr. Öğr. Üyesi Bahar SOĞUTMAZ ÖZDEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Ozan KARAMAN, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN; *Spirulina platensis* kuru biyokütlesini sağlayan EGERT'e, laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan sevgili Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ, Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR; sevgili Tuncay ÜLKÜ ve Ege Biyomühendislik Bölümü ailesine teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmam

boyunca kullandığım B16-F10 melanoma hücre hatlarını nazikçe bizimle paylaşan sevgili Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamı gerçekleştirmek için finansal destek sağlayan TÜBİTAK ve Ege Üniversitesine çok teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresinde ERASMUS+ Öğrenim hareketliği kapsamında laboratuvarında çalışmamı sağlayan ve bana yeni moleküler biyoloji tekniklerini öğreten sevgili Dr. Thomas JACOBS ve Dr. Jonas BLOMME'ye; ERASMUS+ hareketliliğinden yararlanmamı sağlayan Ulusal Ajansa da teşekkürlerimi sunuyorum.

Sevgili Berrak EREN'e çok kıymetli destekleri, dayanışması ve dostluğu için teşekkür ederim ve minnettarım. Son olarak sevgili Min Jin COURIER'e, bir kez daha, her zaman akılcı çözümler ürettiği, sevgi ve desteğini her ne koşulda olursa olsun sunduğu için sonsuz teşekkür ederim.

06/04/2020

İmzası

Ayşe KÖSE

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı -soyadı	Ayşe KÖSE
Doğum yeri ve tarihi	06.02.1989, TÜRKİYE
Uyruğu	TÜRKİYE
Adres	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, BZ05, 35100, TÜRKİYE
GSM	+905076535786
E-mail	aykoseay@gmail.com, ayse.kose@ege.edu.tr



EĞİTİM BİLGİLERİ		
PhD 2015-2020	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD	Tez konusu: Mikroalgal Proteinlerden Peptid Yapılı Tirozinaz İnhibitörlerinin Elde Edilmesi ve Potansiyel İnhibitör Aktivitelerinin İncelenmesi Danışman: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL
Yüksek Lisans 2011-2014	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD	Tez konusu: Mikroalgal Enzimatik Hidrolizatların Besinsel ve İmmunostimulant Özelliklerinin İncelenmesi Danışman: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL
Lisans 2006-2011	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Ortalama: 3.54/4.00	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> 'dan mikroalgal biyodizel eldesi Danışman: Prof. Dr. Murat ELİBOL

İŞ DENEYİMLERİ		
Zorunlu Yaz Stajı, 2010	Şap Enstitüsü, Ankara/ TÜRKİYE	• Hayvan doku kültürü Lab. • Viral aşı üretimi Lab. • Şap aşısı üretimi alt akım işlemleri Lab. • Aşı kontrol Lab.
Araştırma Görevlisi 2013-	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü	Mikroalgal Biyoproses Laboratuvarı
Misafir Araştırmacı (29 Şubat- 25 Mart 2016)	Medical Research Center (MRC-GHF) College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Güney Kore	Doğal bitki ekstraktlarının HepG2 hücrelerine etkisinin incelenmesi
ERASMUS+ Eğitim hareketliliği	Gent Üniversitesi VIB-Plant Systems Biology (PSB)	Development of CRISPRbased molecular toolkit for model Seaweed <i>Ulva mutabilis</i>

(12 Şubat- 11 Temmuz 2018)		
Misafir Araştırmacı (Ağustos- Eylül, 2019)	Genetics and Physiology of Microalgae, UR InBios, Department of Biology	Understanding the autophagy pathways in microalgae <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

TEMEL ARAŞTIRMA ALANLARI

- Mikroalgler ve siyanobakteriler (İzolasyon, pürifikasyon, ekstraksiyon)
- Mikroalgal biyoproses
- Biyoreaktör / fotobiyoreaktör tasarımı, ölçrk büyütme
- Mikroalglerden nütrisötik ve farmasötik eldesi
- Mikroalglerden peptid bazlı terapötiklerin eldesi
- Tirozinaz inhibitörleri
- Melanoma

İLGİ ALANLARI

- Biyoproses mühendisliği
- Algal biyoprosesler
- Peptid terapötikler
- Mikroalgal biyoteknoloji
- Metabolik mühendislik

PROJELER

1. Biofuel production from microalgae species with additional Carbon dioxide feed, National Scientific Foundation of Turkey, TEYDEB Industrial Joint Research Project with TUPRAS, 3110072, 2011/2014.
2. From laboratory to outdoors: microalgal biohydrogen production in photobioreactors, Joint Research Project with CNR (Italy), National Scientific Foundation of Turkey, TUBITAK, 111M609, 2011/2014.
3. Determination of immunological and nutritional properties of microalgal enzymatic hydrolysates, Ege University Research Project, 12-MUH-058, 2011/2014.
4. Optimization of microalgal oil production and investigation of production and scale up processes in panel photobioreactors from laboratory to outdoors, National Scientific Foundation of Turkey, 114M053, 2014/2015.

5. Utilization of immobilized microalgae cultures for sustainable microalgal biohydrogen production, Ege University Research Project, 14-MUH-047, 2014/2016
6. Exploring the potential bioactive molecules from microalgae and understanding of their gene regulations (ALGACTIVE), KONNECT Mobility Research project with Ege University (Turkey), Korea Daegu Haany University (Korea), Liege University (Belgium), 2016/2019.
7. Optimization of a bioreactor design with low shear forces and low gravity mixing through prototype and formation of 3D spheroids using model HepG2 cell line, TUBITAK, 118M596, 2019-2021.
8. Tyrosinase inhibitors from microalgal peptides, TUBITAK, 119Z039, 2019-2020, PhD Thesis Project.

YAYINLAR

1. Oncel S., **Kose A.**, 2014, "Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity", Bioresource Technology, 151: 265-270.
2. **Kose A.**, Oncel S., 2014, "Biohydrogen production from engineered microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*", Advances in Energy Research, Vol. 2, No. 1,1-9.
3. Oncel SS., **Kose A.**, Faraloni C., Imamoglu E., Elibol M., Torzillo G., Vardar Sukan F., 2014, "Biohydrogen production using mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*: The effects of light intensity and illumination patterns", Biochemical Engineering Journal 92 (2014) 47–52.
4. **Kose A.**, and Oncel S.S. 2015. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. Biotechnology Reports, 6, 137–143.
5. Oncel S.S., **Kose A.**, Faraloni C., Imamoglu E., Elibol M., Torzillo G., Vardar Sukan F. 2015. Biohydrogen production from model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: A simulation of environmental conditions for outdoor experiments. International Journal of Hydrogen Energy.
6. **Köse A.**, Oncel S.S., 2016. Microalgal Biotechnology Ethics and Intellectual Property Rights, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi 18(52), 116-127.
7. Oncel S.S., **Köse A.**, 2016, Photobioreactors For Sustainable Buildings, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 18(52), 77-88.

8. **Kose A.**, Oncel S.S., 2017. Algae as a promising resource for biofuel industry Facts and challenges, International Journal of Energy Research, 41:924–951.
9. **Kose A.**, Ozen M.O., Elibol M., Oncel S.S., 2017, Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Spirulina platensis* as a nutritional supplement, 3Biotech, DOI: 10.1007/s13205-017-0832-4.
10. Canbay E., **Kose A.**, Oncel S.S., 2018, Photobiological hydrogen production via immobilization: understanding the nature of the immobilization and investigation on various conventional photobioreactors, 3Biotech, DOI: 10.1007/s13205-018-1266-3.
11. Gürlek, C., Yarkent, Ç., **Köse, A.**, Tuğcu, B., Gebeloğlu, I.K., Öncel, S.Ş., Elibol, M., 2019, Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential, Health and Technology, DOI: 10.1007/s12553-019-00388-3
12. Mutaf, T., Oz, Y., **Kose, A.**, Elibol, M., Oncel, S.S., 2019, The effect of medium and light wavelength towards *Stichococcus bacillaris* fatty acid production and composition, Bioresource Technology, DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121732.
13. Cetmi, S.D., Renkler, N.Z., **Kose, A.**, Celik, C., Oncel, S.S., 2019, Preparation of electrospun polycaprolactone nanofiber mats loaded with microalgal extracts, Engineering in Life Sciences, DOI: 10.1002/elsc.201900009.
14. Gürlek, C., Yarkent, Ç., **Köse, A.**, Oral, İ., Öncel, S.Ş., Elibol, M., 2020, Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds (Conference Paper), IFMBE Proceeding, 73: 267-272, International Conference on Medical and Biological Engineering in Bosnia and Herzegovina, CMBEBIH 2019; Banja Luka; Bosnia and Herzegovina.

KİTAP BÖLÜMLERİ

1. Oncel S., **Kose A.**, Faraloni C. 2015. Genetic Optimization of Microalgae for Biohydrogen Production. In: Handbook of Marine Microalgae, Ed: Kim, S.K., Biotechnology Advances, Academic Press, 384-404.
2. Oncel S., **Kose A.**, Vardar F., Torzillo G. 2015. From Ancient Tribes to Modern Societies, Microalgae Evolution from a Simple Food to an Alternative Fuel Source. In: Handbook of Marine Microalgae, Ed: Kim, S.K., Biotechnology Advances, Academic Press, 127-144.
3. **Kose, A.**, Oncel, S.S. 2015. Biohydrogen production from microalgae: An enzyme perspective. In: Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective. SPRINGER.

4. Oncel, S.S., **Kose, A.**, Senyay-Oncel, D., 2015. Façade integrated photobioreactors for building energy efficiency. In: Start-up Creation: The Smart Eco-efficient Built Environment, Woodhead Publishing Series, ELSEVIER.
5. Gürlek, C., Yarkent, Ç., Oral, I., **Köse, A.**, Öncel, S. Ş. 2019. Nutraceutical Aspects of Microalgae Will Our Future Space Foods Be Microalgae Based? Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals Volume I Food, Health and Nutraceutical Applications (pp.175-181), Florida: CRC, New York.
6. **Köse, A.**, Remacle, C., Kim, Y. W., Öncel, S. Ş., Elibol, M. 2019. Bioactive Metabolites Genetic Regulation and Potential Market Implications. Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals Volume I Food, Health and Nutraceutical Applications (pp.269-274), Florida: CRC, New York.
7. **Köse, A.**, Öncel S.S. 2019. Biohydrogen Production, Encyclopedia of Sustainability Science and Technology Series. Springer, London/Berlin, 2019

ULUSAL VE ULUSLARARASI BİLDİRİLER

1. [ORAL] Oncel S., **Kose A.**, Vardar Sukan F., Faraloni C., Torzillo G., “Effect of light intensity and illumination on hydrogen production by mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*”, BioH₂, 2013, Montreal, CANADA.
2. [ORAL] **Kose A.**, Oncel S., “Biohydrogen production from engineered microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*”, ANBRE13, 2013, Seoul, KOREA.
3. [ORAL] Oncel S., **Kose A.**, Vardar Sukan F., Faraloni C., Torzillo G., Imamoğlu E., Elibol M., “Hydrogen production by mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*”, VI. International Bioengineering Congress “Human Welfare”, 2013, Kusadası, Izmir, TURKEY.
4. [POSTER] **Kose A.**, Oncel S., Elibol M., “Biological Properties of Microalgal Enzymatic Hydrolysates from *Chlorella vulgaris* SAG 211.11b”, WCCE9&APCCHE 2013, 2013, Seoul, KOREA.
5. [POSTER] **Kose A.**, Oncel S., Elibol M., “Biological Properties of Microalgal Enzymatic Hydrolysates from *Chlorella vulgaris* SAG 211.11b”, VI. International Bioengineering Congress “Human Welfare”, 2013, Kusadası, Izmir, TURKEY.
6. [ORAL] Oncel S., **Kose A.**, Vardar Sukan F., Faraloni C., Torzillo G., Imamoglu E., Elibol M., “Biohydrogen production from model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: A simulation of environmental conditions for outdoor experiments”, ICCE2014, 2014, İstanbul, TURKEY.

7. **[POSTER]** Oncel S., **Kose A.**, “Immobilization as a tool for sustainable biohydrogen production by model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*”, ICCE2014, 2014, İstanbul, TURKEY.
8. **[ORAL]** **Kose, A.**, Oncel S., “Intellectual property rights on microalgal bio-products and microalgal bioprocessing: Challenges, opportunities and ethical issues”, 7th International Bioengineering Congress (BEC2015), 2015, Izmir, TURKEY.
9. **[ORAL]** Oncel, S., **Kose, A.**, “From photobioreactors to green walls: microalgae as a green volunteer for energy efficient buildings and a design element in architecture”, 7th International Bioengineering Congress (BEC2015), 2015, Izmir, TURKEY.
10. **[POSTER]** Çetmi, Ş.D., Renkler, N.Z., **Kose, A.**, Çelik, C., SENDEMİR-URKMEZ, A., Oncel, S., “Utilization of Microalgal Extracts for Construction of Tissue Scaffolds with Electrospinning Techniques”, 7th International Bioengineering Congress, 2015, Izmir, TURKEY.
11. **[POSTER]** Gürlek, C., Yarkent, Ç., **Köse, A.**, Oral, İ., Öncel, S.Ş., Elibol, M., 2020, Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds, International Conference on Medical and Biological Engineering in Bosnia and Herzegovina, CMBEBIH 2019; Banja Luka, Bosnia and Herzegovina.

REFERANSLAR

- Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, ssoncel@yahoo.com
- Prof. Dr. Murat ELİBOL, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, elibol.murat@gmail.com
- Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN, Sabancı Üniversitesi, Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (SUNUM), faziletvardar@sabanciuniv.edu
- Dr. Thomas JACOBS, Ghent University, VIB-PSB, Plant Genome Editing Group, thomas.jacobs@psb.vib-ugent.be

EKLER

Ek 1. *In silico* fikosiyanin peptidlerinin BIOPEP veri tabanında elde edilen hidrolizat ürünleri

Enzim		Hidroliz ürünleri amino asit dizisi
Trypsin	β	MFDAFTK- VVSQADTR - GEMLSTAQIDALSQMVAESNK- R- LDVNR - ITSNASTIVSNAAR - SLFAEQPQLIAPGGNAYTSR- R- MAACL - DMEIILR - YVTVAVFAGDASVLEDR - CLNGLR - ETYLALGTPGSSVAVGVGK- MKEAALAIVNDPAGITPGDCSALASEIASYFDR- ACAAVS
	α	MK- TPLTEAVSIADSQGR - FLSSTEIQVAFGR - FR - QAK- AGLEAAK- ALTSK- ADSLISGAAQAVYNK- FPYTTQMGPNYAADQR - GK- DK- CAR - DIGYYLR - MVTYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINR- TFELSPSWYIEALK- YIK- ANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS
Chymotrypsin	β	M- F- DAF- TKVVSQADTRGEM - L- STAQIDAL- SQM- VAESN- KRL - DAVN- RITSN - ASTIVSN- AARSL - F- AEQPQL- IAPGGN- AY - TSRRM - AACL- RDM - EIL- RY - VTY - AVF- AGDASVL- EDRCL - N- GL- RETY - L- AL- GTPGSSVAVGVGKM- KEAAL- AIVN- DPAGITPGDCSA- ASEIASY- F- DRACAAVS
	α	M- KTPL- TEAVSIADSQGRF - L- SSTEIQVAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVY - N- KF- PY - TTQM- QGPN- AADQRGKDKCARDIGY - Y- L- RM - VTY - CL- IAGGTGPM- DEY - L- IAGIDEIN- RTF - EL- SPSW- Y- IEAL- KY - IKAN- H- GL- SGDAATEAN- SY- L- DY - AIN- AL- S
Pepsin	β	MF- DAF- TKVVSQADTRGEM - L- STAQIDAL- SQMVAESNKRL - DAVNRITSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQ- IAPGGNAYTSRRMAACL- RDMEII - RYVTVAVF - AGDASVL- EDRCL - NGL- RETYL - AL- GTPGSSVAVGVGKMKEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASYF- DRACAAVS
	α	MKTPL- TEAVSIADSQGRF - L- SSTEIQVAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVYNKF- PYTTQMGPNYAADQRGKDKCARDIGYYL - RMVTYCL - IAGGTGPMDEYL- IAGIDEINRTF - EL- SPSWYIEAL- KYIKANHGL- SGDAATEANSYL- DYAINAL- S
Pankreatik elastase	β	MFDA- FT- KV- V- S- QA- DT- RG - EML- S- T- A- QI- DA- L- S- QMV- A- ES- NKRL - DA- V- NRI - T- S- NA- S- T- I- V- S- NA- A- RS - L- FA- EQPQL- I- A- PG- G- NA- Y- T- S- RRMA - A- CL- RDMEI - I- L- RY - V- T- Y- A- V- FA- G- DA- S- V- L- EDRCL - NG- L- RET - Y- L- A- L- G- T- PG- S- S- V- A- V- G- V- G- KMKEA- A- L- A- I- V- NDPA- G- I- T- PG- DCS- A- L- A- S- EI- A- S- - FDRA - CA- A- V- S-
	α	MKT- PL- T- EA- V- S- I- A- DS- QG- RFL - S- S- T- EI- QV- A- FG- RFRQA - KA- G- L- EA- A- KA- L- T- S- KA- DS- L- I- S- G- A- A- QA- V- Y- NKFPY - T- T- QMQG- PNY - A- A- DQRG - KDKCA- RDI - G- Y- Y- L- RMV - T- Y- CL- I- A- G- G- T- G- PMDEY - L- I- A- G- I- DEI- NRT - FEL- S- PS- WY - I- EA- L- KY - I- KA- NHG- L- S- G- DA- A- T- EA- NS- Y- L- DY - A- I- NA- L- S
Subtilisin	β	MF- DAF- TK- V- VS- QADTRGEM - L- STAQIDAL- S- QM- VAES- NKRL - DA- VNRITS - NAS- TI- VS- NAARS - L- F- AEQPQL- IAPGGNAY - TS- RRMAACL - RDMEIIL - RY - VTY - A- VF- AGDAS- VL- EDRCL - NGL- RETY - L- AL- GTPGS- S- VA- VG- VGKMKEAAL- AI- VNDPAGITPGDCS- AL- AS- EIAS- Y- F- DRACAA - VS
	α	MKTPL- TEA- VS- IADS- QGRF - L- S- S- TEIQ- VAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TS- KADS- L- IS- GAAQA- VY- NKF- PY - TTQMGPNY- AADQRGKDKCARDIGY - Y- L- RM - VTY - CL- IAGGTGPMDEY - L- IAGIDEINRTF - EL- S- PS- W- Y- IEAL- KY - IKANHGL- S- GDAATEANS- Y- L- DY - AINAL- S
Proteina se K	β	M- F- DAF- TKV- V- SQADTRGEM - L- STAQI- DAL- SQM- V- AESNKRL - DAV- NRI - TSNASTI- V- SNAARSL - F- AEQP- QL- I- AP- GGNAY- TSRRM - AACL- RDM - EI- I- L- RY - V- TY - AV- F- AGDASV- L- EDRCL - NGL- RETY - L- AL- GTP- GSSV- AV- GV- GKM- KEAAL- AI- V- NDP- AGI- TP- GDCSAL- ASEI- ASY - F- DRACAAV - S
	α	M- KTP- L- TEAV- SI- ADSQGRF - L- SSTEI- QV- AF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- I- SGAAQAV- Y- NKF- P- Y- TTQM- QGP- NY - AADQRGKDKCARDI - GY - Y- L- RM - V- TY - CL- I- AGGTGP- M- DEY - L- I- AGI- DEI- NRTF - EL- SP- SW- Y- I- EAL- KY - I- KANHGL- SGDAATEANSY - L- DY - AI- NAL- S
V8 protease	β	MFDAFTKVVSQADTRGE- MLSTAQIDALSQMVAE- SNKRLDAVNRTSNASTIVSNAARSLFAE- QPQLIAPGGNAYTSRRMAACLRDME- IILRYVTVAVFAGDASVLE- DRCLNGLRE - TYLALGTPGSSVAVGVGKMKE- AALAIVNDPAGITPGDCSALASE- IASYFDRACAAVS
	α	MKTPLTE- AVSIADSQGRFLSSTE - IQVAFGRFRQAKAGLE - AAKALTSKADSLISGAAQAVY - NKFPYTTQMGPNYAADQRGKDKCARDIGYYLRMVTYCLIAGGTGPMDE - YLIAGIDE - INRTFE - LSPSWYIE- ALKYIKANHGLSGDAATE- ANSYLDYAINALS
Thermolysin	β	M- FD- A- FTK- V- VSQ- ADTRGEM - LST- AQ- ID- A- LSQM- V- AESNKR - LD- A- VNR - ITS- N- AST- I- VSN- A- ARS - L- F- AEQPQ- L- I- APGGN- A- YTSRRM - A- AC- LRDME - I- I- LR - Y- VT- Y- A- V- F- AGD- AS- V- LEDRC - LNG- LRET - Y- L- A- LGTPGSS- V- A- VG- VGKMKE- A- A- L- A- I- VNDP- AG- ITPGDCS- A- L- ASE- I- AS- Y- FDR - AC- A- A- VS
	α	MKTP- LTE- A- VS- I- ADSQGR - F- LSSTE- IQ- V- A- FGR - FRQ- AK- AG- LE- A- AK- A- L- TSK- ADS- L- ISG- A- AQ- A- V- YNK- FP- YTTQMGP- N- Y- A- ADQRGKDKC - ARD - IG- Y- Y- LRM - VT- YC- L- I- AGGTGPMDE- Y- L- I- AG- IDE- INRT - FE- LSPSW- Y- IE- A- LK- Y- IK- ANHG- LSGD- A- ATE- ANS- Y- LD- Y- A- IN- A- LS
pAPAI N	β	MF- D- AF- T- KVV- S- Q- ADT- R- G- EML- ST- A- QID- AL- S- QMV- AESNKR - L- D- AVNR - IT- SN- AST- IVSN- A- AR - SL- F- AE- QP- QL- I- APG- G- N- AYT- SR - R- M- A- ACL- R-

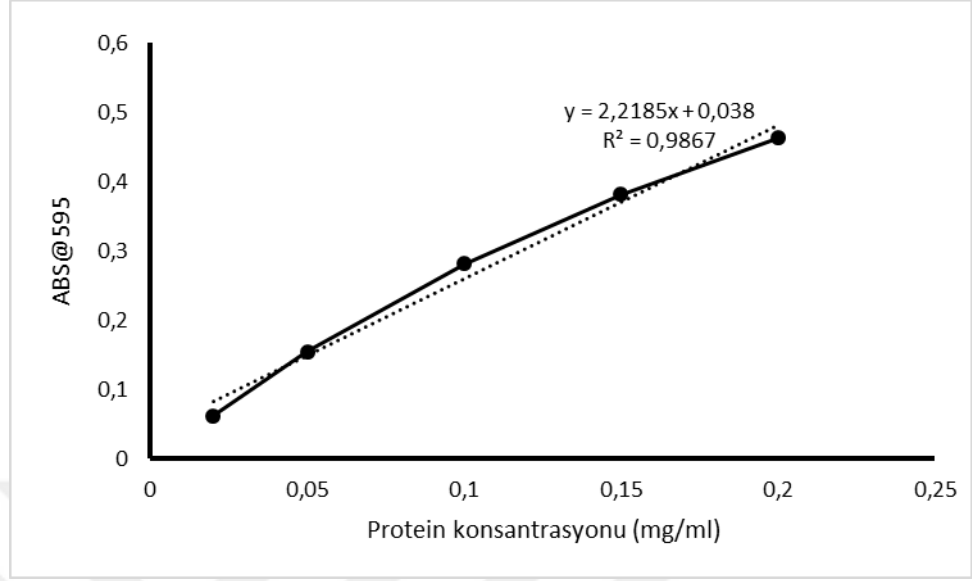
		DMEIIL- R- YVT- Y- AVF- AG- D- ASVL- EDR - CL- NG- L- R- ET- YL- AL- G- T- PG- SSV- AVG- VG- KMKE- A- AL- AIVNDP- AG- IT- PG- DCS- AL- ASEI- ASYF- DR - AC- A- AVS
	α	MKT- PL- T- E- AVSI- ADS- QG- R- F- L- SST- EI- Q- AF- G- R- F- R- Q- AK- AG- L- E- A- AK- AL- T- SK- ADSL- ISG- A- A- Q- AVYNKF- PYT- T- QM- QG- PNY - A- AD- QR - G- KDKC- AR - DIG- YYL- R- MVT- YCL- I- AG- G- T- G- PMDEYL- I- AG- IDEINR - T- F- EL- SPSWYIE- AL- KYIK- ANHG- L- SG- D- A- AT- E- ANSYL- DY- AIN- AL- S
Bromelain	β	MF- DA- F- T- KV- V- S- QA- DT- R- G- EML- S- T- A- QIDA- L- S- QMV- A- ES- NKR - L- DA- V- NR - IT- S- NA- S- T- IV- S- NA- A- R- S- L- F- A- EQPQL- IA- PG- G- NA- YT- S- R- R- MA- A- CL- R- DMEIIL- R- YV- T- YA- V- F- A- G- DA- S- V- L- EDR - CL- NG- L- R- ET- YL- A- L- G- T- PG- S- S- V- A- V- G- V- G- KMKEA- A- L- A- IV- NDPA- G- IT- PG- DCS- A- L- A- S- EIA- S- YF- DR - A- CA- A- V- S
	α	MKT- PL- T- EA- V- S- IA- DS- QG- R- F- L- S- S- T- EIQV- A- F- G- R- F- R- QA- KA- G- L- EA- A- KA- L- T- S- KA- DS- L- IS- G- A- A- QA- V- YNKF- PYT- T- QMQG- PNYA- A- DQR - G- KDKCA- R- DIG- YYL- R- MV- T- YCL- IA- G- G- T- G- PMDEYL- IA- G- IDEINR - T- F- EL- S- PS- WYIEA- L- KYIKA- NHG- L- S- G- DA- A- A- T- EA- NS- YL- DYA- INA- L- S
Plasmin	β	MFDAFTK- VVSQADTR - GEMLSTAQIDALSQMVAESNK- R- LDAVNR - ITSNASTIVSNAAR - SLFAEQPQLIAPGGNAYTSR- R- MAACLR - DMEIILR - YVTYAVFAGDASVLEDR - CLNGLR- ETYLALGTPGSSVAVGVGK- MK- EAALAIVNDPAGITPGDCSALASEIASYFDR- ACAAVS
	α	MK- TPLTEAVSIADSQGR - FLSSTEIQVAFGR - FR - QAK- AGLEAAK- ALTSK- ADSLISGAAQAVYNK- FPYTTQMGPNYAADQR - GK- DK- CAR - DIGYYLR - MVTYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINR- TFELSPSWYIEALK- YIK- ANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS
Ficin	β	MF- DAF- TK- VVS- QADTR - G- EML- S- TAQIDAL- S- QMVAES- NK- R- L- DAVNR - ITS- NAS- TIVS- NAAR - S- L- F- AEQPQL- IAPG- G- NAY- TS- R- R- MAACLR- R- DMEIIL- R- Y- VTY- AVF- AG- DAS- VL- EDR - CL- NG- L- R- ETY- L- AL- G- TPG- S- S- VAVG- VG- K- MK- EAAL- AIVNDPAG- ITPG- DCS- AL- AS- EIAS- Y- F- DR - ACAAVS
	α	MK- TPL- TEAVS- IADS- QG- R- F- L- S- S- TEIQVAF- G- R- F- R- QAK- AG- L- EAAK- AL- TS- K- ADS- L- IS- G- AAQAVY - NK- F- PY - TTQM- QG- PNY- AADQR - G- K- DK- CAR - DIG- Y- Y- L- R- MVTY - C- IAG- G- TG- PMDEY - L- IAG- IDEINR - TF- EL- S- PS- WY - IEAL- K- Y- IK- ANH- G- L- S- G- DAATEANS- Y- L- DY- AINAL- S
Chatepsin G	β	M- F- DAF- TKVVSQADTRGEM - L- STAQIDAL- SQM- VAESNKRL - DAVNRITSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQL- IAPGGNAY- TSRRM - AACLR- RDM - EIL- RY - VTY- AVF- AGDASVL- EDRCL - NGL- RETY - L- AL- GTPGSSVAVGVGKM- KEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASY- F- DRACAAVS
	α	M- KTPL- TEAVSIADSQGRF - L- SSTEIQVAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVY - NKF- PY - TTQM- QGPNY - AADQRGKDKCARDIGY - Y- L- RM - VTY - CL- IAGGTGPM- DEY- L- IAGIDEINRTF - EL- SPSWY- IEAL- KY - IKANHGL- SGDAATEANSY - L- DY - AINAL- S
Clostripain	β	MFDAFTKVVVSQADTR - GEMLSTAQIDALSQMVAESNK- LDAVNR - ITSNASTIVSNAAR - SLFAEQPQLIAPGGNAYTSR- R- MAACLR - DMEIILR - YVTYAVFAGDASVLEDR - CLNGLR- ETYLALGTPGSSVAVGVGKMKEAALAIVNDPAGITPGDCSALASEIASYFDR- ACAAVS
	α	MKTPLTEAVSIADSQGR - FLSSTEIQVAFGR - FR - QAKAGLEAAKALTSKADSLISGAAQAVYNKFPYTTQMGPNYAADQR- GKDKCAR - DIGYYLR - MVTYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINR- TFELSPSWYIEALKYIKANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS
Chymase	β	MF- DAF- TKVVSQADTRGEM - L- STAQIDAL- SQMVAESNKRL - DAVNRITSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQ- IAPGGNAY - TSRRMAACL - RDMEIIL - RY - VTY- AVF- AGDASVL- EDRCL - NGL- RETY - L- AL- GTPGSSVAVGVGKMKEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASY - F- DRACAAVS
	α	MKTPL- TEAVSIADSQGRF - L- SSTEIQVAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVY - NKF- PY - TTQM- QGPNY - AADQRGKDKCARDIGY - Y- L- RMVTY - CL- IAGGTGPMDEY - L- IAGIDEINRTF - EL- SPSW- Y- IEAL- KY - IKANHGL- SGDAATEANSY - DY - AINAL- S
Leukocyte elastase	β	MFDA- FT- KV- V- S- QA- DT- RGEM - L- S- T- A- QI- DA- L- S- QMV- A- ES- NKRL - DA- V- NRI - T- S- NA- S- T- I- V- S- NA- A- RS - L- FA- EQPQL- I- A- PGGNA- YT- S- RRMA - A- CL- RDMEI - I- L- RYV - T- YA- V- FA- GDA- S- V- L- EDRCL - NGL- RET - YL- A- L- YF- PGS- S- V- A- V- GV- GKMKEA- A- L- A- I- V- NDPA- GI- T- PGDCS- A- L- A- S- EI- A- S- YFDRA - CA- A- V- S
	α	MKT- PL- T- EA- V- S- I- A- D- QGRFL - S- S- T- EI- QV- A- FGRFRQA - KA- GL- EA- A- KA- L- T- S- KA- DS- L- I- S- GA- A- QA- V- YNKF- PYT- T- QMQGPNYA- A- DQRGKDKCA - RDI - GYYL- RMV - T- YCL- I- A- GGT- GPMDEYL- I- A- GI- DEI- NRT - FEL- S- PS- WYI- EA- L- KYI- KA- NHGL- S- GDA- A- T- EA- NS- YL- DYA- I- NA- L- S
Metridin	β	MF- DAF- TKVVSQADTRGEM - L- STAQIDAL- SQMVAESNKRL - DAVNRITSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQ- IAPGGNAY - TSRRMAACL - RDMEIIL - RY - VTY- AVF- AGDASVL- EDRCL - NGL- RETY - L- AL- GTPGSSVAVGVGKMKEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASY - F- DRACAAVS
	α	MKTPL- TEAVSIADSQGRF - L- SSTEIQVAF- GRF - RQAKAGL - EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVY - NKF- PY - TTQM- QGPNY - AADQRGKDKCARDIGY - Y- L- RMVTY - CL- IAGGTGPMDEY - L- IAGIDEINRTF - E- SPSW- Y- IEAL- KY - IKANHGL- SGDAATEANSY - L- DY - AINA- S
Oligopeptidase B	β	MFDAFTK- VVSQADTR - GEMLSTAQIDALSQMVAESNK- R- LDAVNR - ITSNASTIVSNAAR - SLFAEQPQLIAPGGNAYTSR- R- MAACLR - DMEIILR - YVTYAVFAGDASVLEDR - CLNGLR- ETYLALGTPGSSVAVGVGK- MK- EAALAIVNDPAGITPGDCSALASEIASYFDR- ACAAVS
	α	MK- TPLTEAVSIADSQGR - FLSSTEIQVAFGR - FR - QAK- AGLEAAK- ALTSK- ADSLISGAAQAVYNK- FPYTTQMGPNYAADQR - GK- DK- CAR - DIGYYLR -

		MVTYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINR- ANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS	TFELSPSWYIEALK- YIK-
Prolyl Oligope ptidase	α	MKTPL- LTEAVSIADSQGRFLSSTEIQVAFGRFRQAKAGLEAAKALTSKADSLISGAAQAVYNKFP- YTTQMGP- MDEYLIAGIDEINRTFELSP- SWYIEALKYIKANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS	NYAADQRGKDKCARDIGYYLRMTYCLIAGGTGP-
	β	MFDAFTKVVSQADTRGEMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDAVNRTSNASTIVSNAARSLFAEQ P- QLIAP- GGNAYTSRRMAACLRDMEILRYVTYAVFAGDASVLEDRCNLGLRETYLALGTP- GSSVAVGVGKMKEAALAVNDP- AGITP- GDSCALASEIASYFDRACAAVS	
Oligope ptidase F	α	MKTPL- TEAVSIADSQGRF- L- SSTEIQVAF- GRF- RQAKAGL- EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVYNKF- PYTTQMGPNYAADQRGKDKCARDIGYYL- RMVTYCL- IAGGTGPMDEYL- IAGIDEINRTF- EL- SPSWYIEAL- KYIKANHGL- SGDAATEANSYL- DYAINAL- S	
	β	MF- DAF- TKVVSQADTRGEML- STAQIDAL- SQMVAESNKRL- DAVNRTSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQL- IAPGGNAYTSRRMAACL- RDMEIIL- RYVTYAVF- AGDASVL- EDRCL- NGL- RETYL- AL- GTPGSSVAVGVGKMKEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASYF- DRACAAVS	
Pepsin pH>2	α	M- K- T- PL- T- E- A- VS- IA- D- SQ- G- RF- L- SST- E- IQ- VA- F- G- RF- RQ- A- K- A- G- L- E- - A- A- K- A- L- T- SK- A- D- SL- ISG- A- A- Q- A- VY- N- K- F- PY- T- T- Q- M- Q- - G- PN- Y- A- A- D- Q- RG- K- D- K- CA- RD- IG- Y- Y- L- RM- VT- Y- CL- IA- G- - T- G- PM- D- E- Y- L- IA- G- ID- E- IN- RT- F- E- L- SPSWY- IE- A- L- K- Y- IK- - A- N- HG- L- SG- D- A- A- T- E- A- N- SY- L- D- Y- A- IN- A- L- S	
	β	M- F- D- A- F- T- K- V- VSQ- A- D- T- RG- E- M- L- ST- A- Q- ID- A- L- SQ- M- VA- E- SN- K- RL- D- A- VN- R- IT- SN- A- ST- I- VSN- A- A- RSL- F- A- E- Q- PQ- L- IA- PG- G- N- A- Y- T- SRRM- A- A- CL- RD- M- E- I- IL- RY- VT- Y- A- VF- A- G- D- A- S- VL- E- D- RCL- N- G- L- RE- T- Y- L- A- L- G- T- PG- SS- VA- VG- K- M- K- E- A- A- L- A- I- VN- D- PA- G- IT- PG- D- CSA- L- A- SE- IA- SY- F- D- RA- CA- A- VS	
Chymos in	α	Kesim yok	
	β		
Thermo lysin	α	MKTP- LTE- A- VS- I- ADSQGR- F- LSSTE- IQ- V- A- FGR- FRQ- AK- AG- LE- A- AK- A- LTSK- ADS- L- ISG- A- AQ- A- V- YNK- FP- YTTQMGP- N- Y- A- ADQ- R- G- K- DK- C- AR- VT- YC- L- I- AGGTGPMDE- Y- L- I- AG- IDE- INRT- FE- LSPSW- Y- IE- A- LK- Y- IK- ANHG- LSGD- A- ATE- ANS- Y- LD- Y- A- IN- A- LS	
	β	M- FD- A- FTK- V- VSQ- ADTRGEM- LST- AQ- ID- A- LSQM- V- AESNKR- LD- A- VNR- ITS- AST- I- VSN- A- ARS- L- F- AEQPQ- L- I- APGGN- A- YTSRRM- A- AC- LRDME- I- I- LR- Y- VT- Y- A- V- AGD- AS- V- LEDRC- LNG- LRET- Y- L- A- LGTPGSS- V- A- VG- VGKMKE- A- A- L- A- IVNDP- AG- ITPGDCS- A- L- ASE- I- AS- Y- FDR- AC- A- A- VS	
Chymot rypsin C	α	M- KTP- L- TE- AVSIADSQ- GRFL- SSTE- IQ- VAFGRFRQ- AKAGL- E- AAKAL- TSKADSL- ISGAAQ- AVY- N- KFP- Y- TTQ- M- Q- GP- N- Y- AADQ- R- G- K- DK- C- AR- VT- YC- L- I- AGGTGPMDE- Y- L- I- AG- IDE- IN- RTFE- L- SP- SW- Y- IE- AL- KY- IKAN- HGL- SGDAATE- AN- SY- L- DY- AIN- AL- S	
	β	M- FDAFTKVVSQ- ADTRGE- M- L- STAQ- IDAL- SQ- M- VAE- SN- KRL- DAVN- RITSN- ASTIVSN- AARSL- FAE- Q- P- Q- L- IAP- GGN- AY- TSRRM- AACL- RDM- E- IIL- RY- VTY- AVFAGDASVL- E- DRCL- N- GL- RE- TY- L- AL- GTP- GSSVAVGVGKM- KE- AAL- AIVN- DP- AGITP- GDSCAL- AS- IASY- FDRACAAVS	
Calpain 2	α	MK- T- PL- T- E- AV- SI- AD- SQ- G- R- FL- S- ST- EI- Q- V- AFG- R- FR- Q- AK- AG- L- E- A- AK- AL- T- SK- AD- SL- I- SG- A- AQ- AVYNK- FPYT- T- Q- MQ- G- PNY- A- ADQ- R- G- K- DK- C- AR- DIG- YYL- R- MVT- YCL- I- AG- G- T- G- PMDEYL- I- AG- IDEINR- T- FEL- SP- SWYIE- AL- K- YIK- ANHG- L- SG- D- A- AT- E- AN- SYL- DY- AIN- AL- S	
	β	MFD- AFT- K- VV- SQ- ADT- R- G- EML- ST- AQ- ID- AL- SQ- MV- AE- SNK- R- L- D- AVNR- IT- SN- A- ST- IV- SN- A- AR- SL- F- AEQ- PQ- L- I- APG- G- N- AYT- SR- R- M- A- A- C- R- DMEIIL- R- YVT- Y- AVF- AG- D- A- SVL- EDR- CL- NG- L- R- ET- YL- AL- G- T- PG- S- SV- AVG- VG- K- MK- E- A- AL- AIVNDP- AG- IT- PG- DC- S- AL- A- SEI- A- SYFDR- AC- A- AV- S	
Proteina se P1 (lacto pin)	α	MKT- P- L- TEAV- SIAD- S- Q- GRF- L- S- STEI- Q- V- AFGFR- Q- AKAG- L- EAAKA- L- T- SKAD- S- L- I- SGAA- Q- AV- YNK- P- YTT- Q- M- Q- G- P- NYAAD- Q- R- G- K- DK- C- AR- VT- YC- L- I- AGGTG- P- MDEY- L- IAGIDEINRTF- L- S- P- SWYIEA- L- KYIKANHG- L- SGDAATEAN- SY- L- DYAINA- L- S	
	β	MFDAFTKV- V- S- Q- ADTRGEM- L- STA- Q- IDA- L- S- Q- MV- AE- SNKR- L- DAV- NRIT- SNA- STIV- SNAAR- S- L- FAE- Q- P- Q- L- IA- P- GGNAYT- SRRMAAC- L- RDMEIIL- RYV- TYAV- FAGDA- SV- L- EDRCL- L- NG- L- RETY- L- A- L- GT- P- G- S- SV- AV- GV- GKMKEAA- L- AIV- ND- P- AGIT- P- GDC- SA- L- A- SEIA- SYFDRACAAV- S	
Cocolysi n	α	MKTP- LTE- AVS- I- ADSQGR- F- LSSTE- IQV- A- FGR- FRQ- AK- AG- LE- A- AK- A- LTSK- ADS- L- ISG- A- AQ- AV- YNK- FP- YTTQMGP- N- Y- A- ADQ- R- G- K- DK- C- AR- VT- YC- L- I- AGGTGPMDE- Y- L- I- AG- IDE- INRT- FE- LSPSW- Y- IE- A- LK- Y- IK- ANHGLSGD- A- ATE- ANS- Y- LD- Y- A- IN- A- LS	
	β	M- FD- A- FTKVVSQ- ADTRGEM- LST- AQ- ID- A- LSQM- V- AESNKR- LD- AVNR- ITS- ASTIVSN- A- ARS- L- F- AEQPQ- L- I- APGGN- A- YTSRRM- A- AC- LRDME- I- I- LR- YVT- Y- AV- F- AGD- ASV- LEDRC- LNG- LRET- Y- L- A- LGTPGSSV- AVGVGKMKE- A- A- L- A- IVNDP- AG- ITPGDCS- A- L- ASE- I- AS- Y- FDR- AC- A- AVS	
Ginger protease (zingipa in)	α		
	β	Kesim yok	

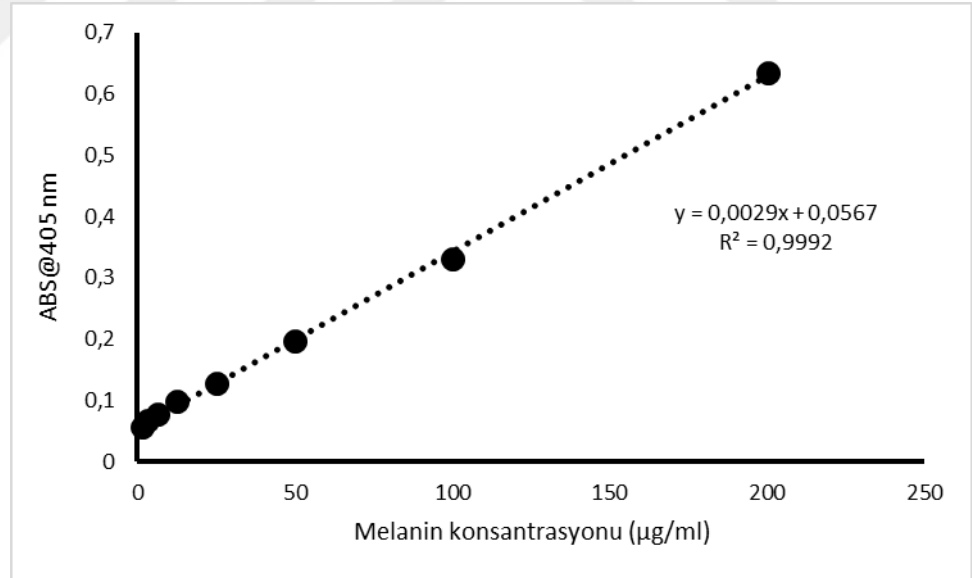
Thrombin	α	MKTPLTEAVSIADSQGRFLSSTEIQVAFGRFRQAKAGLEAAKALTSKADSLISGAAQAVYNKF PYTTQM-QGPNYAADQR- GKDKCARDIGYYLRMVITYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINRTFELSPSWYIEALKYIKANHGLS GDAATEANSYLDYAINALS
	β	MFDAFTKVVSQADTR- GEMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDAVNRTSNASTIVSNAAR- SLFAEQPQLIAPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYAVFAGDASVLEDRLNGLRETYLAL GTPGSSVAVGVGKMKEAALAIVNDPAGITPG DCSALASEIASYFDR- ACAAVS
Pancreatic elastase II	α	M- KTPL- TEAVSIADSQGRF- L- SSTEIQVAF- GRF- RQAKAGL- EAAKAL- TSKADSL- ISGAAQAVYNKF- PYTTQM- QGPNYAADQRGKDKCARDIGYYL- RM- VTYCL- IAGGTGPM- DEYL- IAGIDEINRTF- EL- SPSWYIEAL- KYIKANHG- SGDAATEANSYL- DYAINAL- S
	β	M- F- DAF- TKVVSQADTRGEM- L- STAQIDAL- SQM- VAESNKRL- DAVNRTSNASTIVSNAARSL- F- AEQPQL- IAPGGNAYTSRRM- AACL- RDM- EIIL- RYVTYAVF- AGDASVL- EDRCL- NGL- RETYL- AL- GTPGSSVAVGVGKM- KEAAL- AIVNDPAGITPGDCSAL- ASEIASYF- DRACAAVS
Glutamyl endopeptidase II	α	MKTPLTE- A- VSIADSQGRFLSSTEIQVAFGRFRQAKAGLE- AAKALTSKADSLISGAAQ- VYNKF-PYTTQM-QGPNYAADQRGKDKCARDIGYYLRMVITYCLIAGGTGPMDEYLIAGIDEINR TFELSPSWYIE- ALKYIKANHGLSGDAATE- ANSYLDYAINALS
	β	MFDAFTKVVSQADTRGEMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDA- VNRTSNASTIVSNAARSLFAEQPQLIAPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYA- VFAGDASVLEDRLNGLRETYLALGTPGSSVA- VGVGKMKE- AALAIVNDPAGITPGDCSALASEIASYFDRACAA- VS
Glycyl endopeptidase	α	MKTPLTEAVSIADSQ- RFLSSTEIQVAFG- RFRQAKAG- LEAAKALTSKADSLISG- AAQAVYNKF-PYTTQM-QG- PNYAADQRG- KDKCARDIG- YYLRMVITYCLIAG- G- TG- PMDEYLIAG- IDEINRTFELSPSWYIEALKYIKANHG- LSG- DAATEANSYLDYAINALS
	β	MFDAFTKVVSQADTRG- EMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDAVNRTSNASTIVSNAARSLFAEQPQLIAPG- G- NAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYAVFAG- DASVLEDRLNGL- LRETYLALG- TPG- SSVAVG- VG- KMKEAALAIVNDPAG- ITPG- DCSALASEIASYFDRACAAVS
Xaa-Pro dipeptidase	α	MKTPLTEAVSIADSQGRFLSSTEIQVAFGRFRQAKAGLEAAKALTSKADSLISGAAQAVYNKF- PYTTQM-QG- PNYAADQRGKDKCARDIGYYLRMVITYCLIAGGTG- PMDEYLIAGIDEINRTFELS- PSWYIEALKYIKANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS
	β	MFDAFTKVVSQADTRGEMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDAVNRTSNASTIVSNAARSLFAEQ PQLIA- PGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYAVFAGDASVLEDRLNGLRETYLALGTPGSSVAVG VGKMKEAALAIVNDPAGITPGDCSALASEIAFDRACAAVS
V-8 protease pH=7.8	α	MKTPLTE- AVSIAD- SQGRFLSSTE- IQVAFGRFRQAKAGLE- AAKALTSKAD- SLISGAAQAVYNKF-PYTTQM-QGPNYAAD- QRGKD- KCARD- IGYYLRMVITYCLIAGGTGPM- E- YLIAGID- E- INRTFE- LSPSWYIE- ALKYIKANHGLSGD- AATE- ANSYLD- YAINALS
	β	MFD- AFTKVVSQAD- TRGE- MLSTAQID- ALSQMVAE- SNKRLD- AVNRTSNASTIVSNAARSLFAE- QPQLIAPGGNAYTSRRMAACLRD- ME- IILRYVTYAVFAGD- ASVLE- D- RCLNGLRE- TYLALGTPGSSVAVGVGKMKE- AALAIVND- PAGITPGD- CSALASE- IASYFD RACAAVS

****Kırmızı işaretli peptid dizileri R, L/R, R/F+V/A/L kombinasyonu içerenler, yeşil renkli peptidler ise C terminal tirozin bulunduranlar**

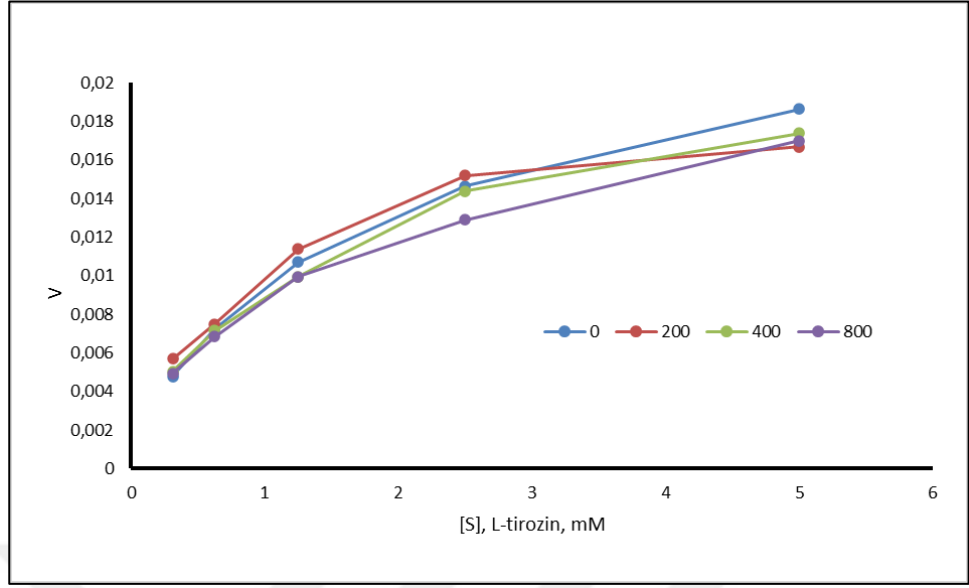
Ek 2. Bradford protein tayini standart doğru denklemi



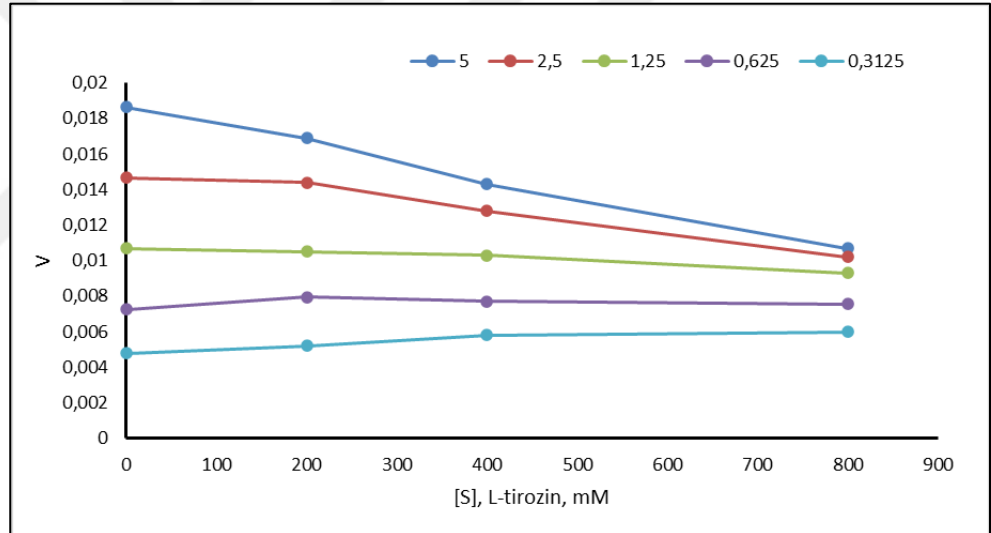
Ek 3. Sentetik melanin standart doğru denklemi



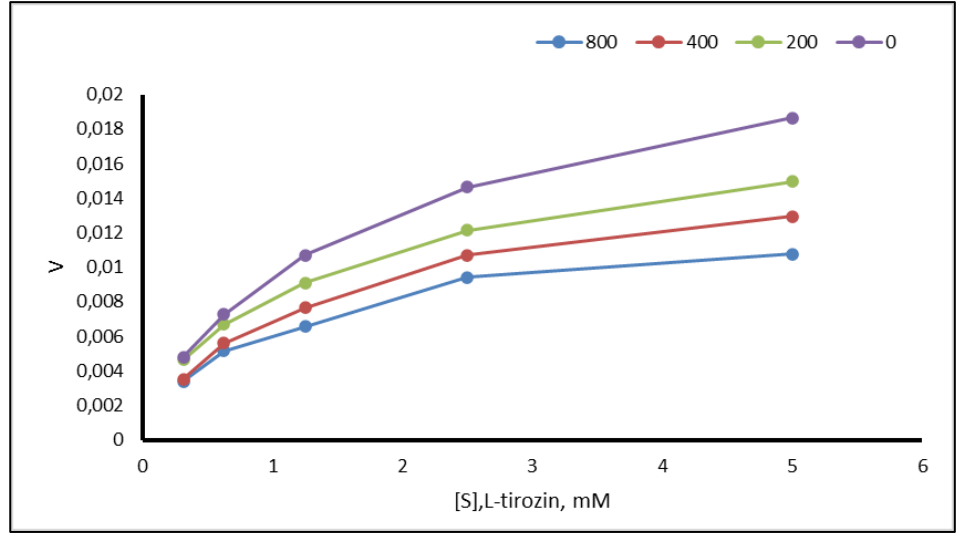
Ek-4 Sentetik peptidler Michelis-Menten Grafikleri



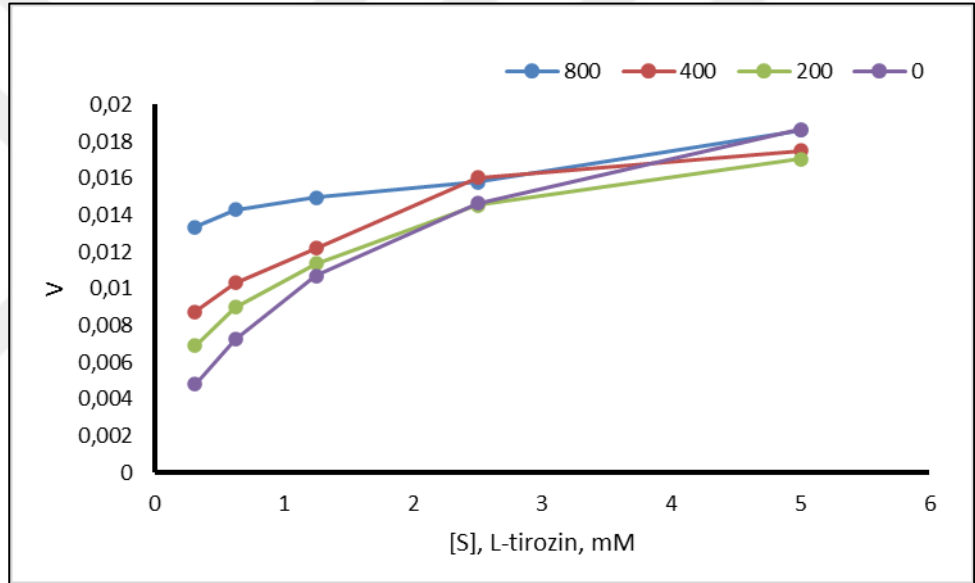
Ek 4.1 P2, monofenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



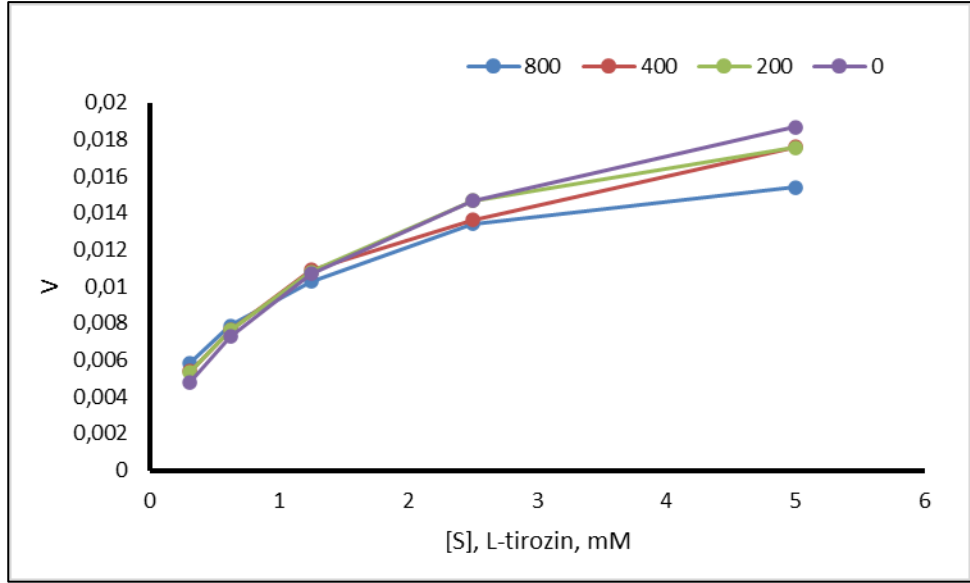
Ek 4.2 P3, monofenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



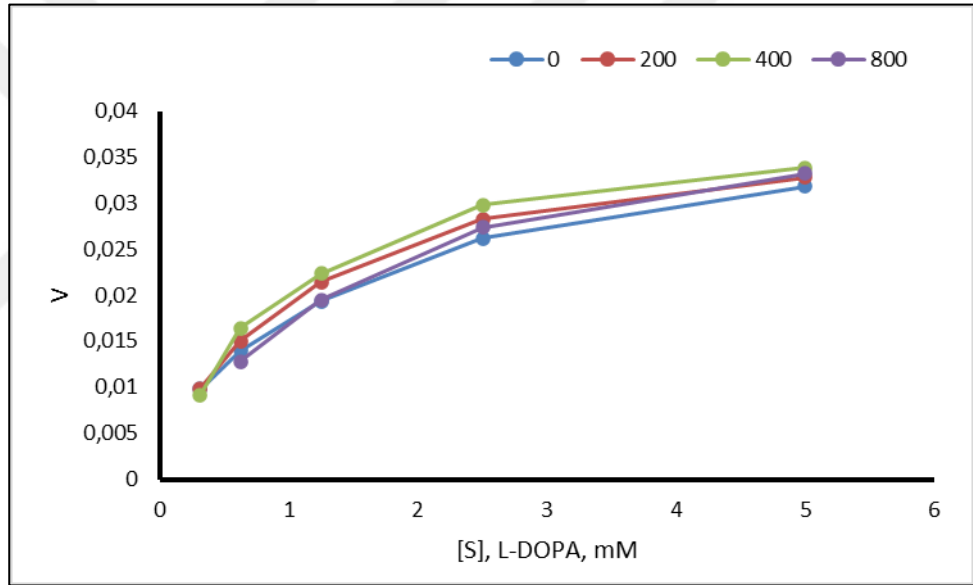
Ek 4.3 P4, monofenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



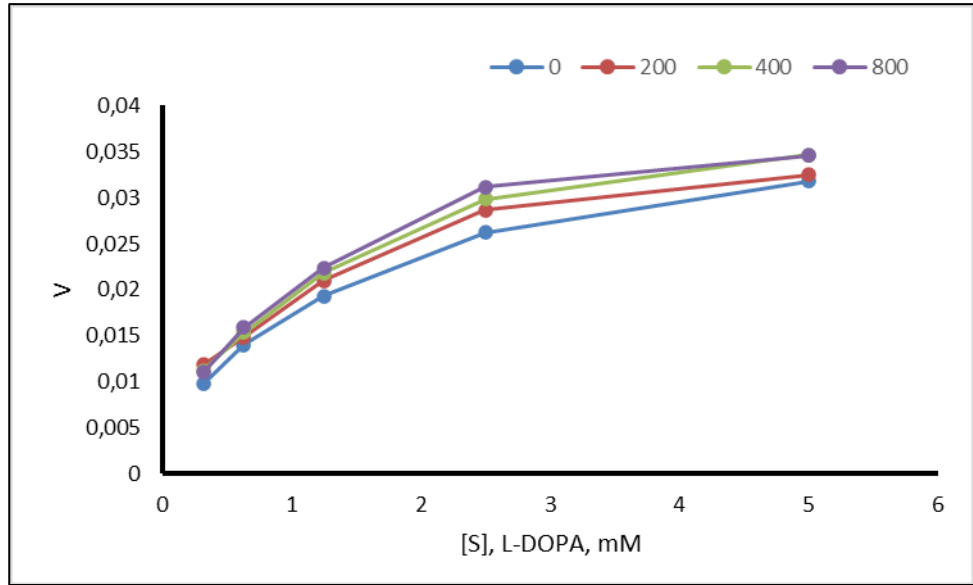
Ek 4.4 P5, monofenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



Ek 4.5 P7, monofenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



Ek 4.6 P2, difenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği



Ek 4.7 P3, difenolaz aktivitesi, doza bağılı Michelis-Menten kinetikleri grafiği