

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİKOPENCE ZENGİN MEYVELERDE POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

SİMGE ÇOLAK

KOCAELİ 2024

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİKOPENCE ZENGİN MEYVELERDE POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU

SİMGE ÇOLAK

Doç. Dr. YONCA YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Arda ACEMİ

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Nuray VAROL

Jüri Üyesi, Gazi Üniversitesi

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 24.06.2024

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmasında,

- Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

Bu tez/proje çalışmasının herhangi bir aşaması hiçbir kurum/kuruluş tarafından maddi/alt yapı desteği ile desteklenmemiştir.

Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2022-3190 no'lu proje kapsamında maddi/alt yapı desteği alınarak gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Simge ÇOLAK

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki makale, kitap, tebliğ, lisans, patent gibi çalışmalarda kullanımı, danışmanımın isim hakkı saklı kalmak koşuluyla ve her iki tarafın bilgisi dâhilinde bana ait olacaktır.

Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.

Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir

Simge ÇOLAK

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada likopen içeriği zengin meyvelerde (Karpuz, Kırmızı biber, İncir, Nar, Kan portakalı, Greyfurt, Kızılcık, Kuşburnu, Kudret narı ve Karadut) polifenol oksidaz enziminin taranması, karaduttan polifenol oksidaz enziminin üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenim sürecim boyunca ve bu çalışmada bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, göstermiş olduğu ilgi ve alakasıyla desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a çalışmalarımın gerçekleşmesinde laboratuvar ve cihaz imkanını sunan Prof. Dr. Özlem AKSOY'a, tez çalışma sürecinde bilgilerini ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Arda ACEMİ'ye, tez sürecim boyunca ve her konuda desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen, sabırla her konuda bilgi ve birikimlerini aktarıp yol gösteren kıymetli hocam Arş. Gör. Elif KALE BAKIR'a ve tüm biyoloji bölümü öğretim elemanlarına, her zaman yanımda olup deneylerimde bana yardımcı olan değerli laboratuvar arkadaşlarım Semih IŞIK, Tuğçe KARABULUT, İlayda CANDAN ve Ayşegül YÖRÜK'e teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan ve beni bu günlere getiren sevgili annem Gülfe ÇOLAK'a, ablam Sedef YILMAZ'a, kardeşlerim Gülnur ÇOLAK ve Sinan ÇOLAK'a, her zaman her koşulda beni destekleyip yanımda olan yol arkadaşım Berat SAĞDIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: FYL-2022-3190) Birimine ise şükranlarımı sunarım.

Haziran – 2024

Simge ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ..... | i |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI | ii |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| TABLolar DİZİNİ..... | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ÖZET | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1. Oksidatif Stres..... | 2 |
| 2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri | 3 |
| 2.2. Antioksidanlar | 3 |
| 2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar..... | 4 |
| 2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar | 6 |
| 2.2.3. İlaç Grubu Antioksidanlar | 6 |
| 2.2.4. Vitamin Grubu Antioksidanlar..... | 7 |
| 2.3. Likopen | 7 |
| 2.4. Polifenoller | 9 |
| 2.4.1. Flavonoidler | 10 |
| 2.4.2. Stilbenler | 10 |
| 2.4.3. Lignanlar | 10 |
| 2.4.4. Fenolik Asitler..... | 11 |
| 2.5. Polifenol Oksidazlar..... | 11 |
| 2.6. Likopen İçeren Meyveler..... | 13 |
| 2.6.1. Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai) | 13 |
| 2.6.2. Kırmızı biber (<i>Capsicum annuum</i> L.) | 14 |
| 2.6.3. Kan portakalı (<i>Citrus x sinensis</i> L.) | 15 |
| 2.6.4. Nar (<i>Punica granatum</i> L.)..... | 15 |
| 2.6.5. İncir (<i>Ficus carica</i> L.) | 16 |
| 2.6.6. Greyfurt (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.)..... | 16 |
| 2.6.7. Kudret narı (<i>Momordica charantia</i> L.)..... | 17 |
| 2.6.8. Karadut (<i>Morus nigra</i> L.)..... | 18 |
| 2.6.9. Kuşburnu (<i>Rosa canina</i> L.) | 19 |
| 2.6.10. Kızılcık (<i>Cornus mas</i> L.)..... | 20 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM | 21 |
| 3.1. Kimyasallar ve Cihazlar..... | 21 |
| 3.2. Meyve Örneklerinin Temini | 21 |
| 3.3. Meyve Ham Ekstraktlarının Hazırlanması..... | 21 |
| 3.4. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Saflaştırılması | 22 |
| 3.5. Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivite Tayini | 24 |
| 3.6. Protein Miktar Tayini..... | 25 |
| 3.7. PPO Enziminin Karakterizasyonu | 25 |
| 3.7.1. Molekül Ağırlığının Hesaplanması..... | 25 |
| 3.7.2. Gümüş Boyama | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.7.3. Sıcaklık ve pH'nın Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi | 26 |
| 3.7.4. Substrat Spesifite Analizi | 26 |
| 3.7.5. İnhibitör Analizi | 27 |
| 3.7.6. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi | 27 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 28 |
| 4.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Kaynağı olarak Likopence Zengin Meyvenin Seçimi | 28 |
| 4.2. Karaduttan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması | 29 |
| 4.2.1. Aseton Çöktürme | 29 |
| 4.2.2. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi | 31 |
| 4.2.2.1. Amonyum Sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄ Konsantrasyonunun Belirlenmesi | 31 |
| 4.2.2.2. Ham Enzim Ekstrakt:t-Bütanol Oranının Belirlenmesi | 32 |
| 4.2.2.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Sistem pH'sının Belirlenmesi | 33 |
| 4.3. SDS-PAGE Analizi | 36 |
| 4.4. Karaduttan Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu | 37 |
| 4.4.1. Reaksiyon Sıcaklığının Karadut Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi | 37 |
| 4.4.2. Reaksiyon pH'sının Karadut Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi | 40 |
| 4.4.3. Karadut PPO Enziminin Substrat Spesifitesi | 43 |
| 4.4.4. İnhibitörlerin Karadut PPO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi | 45 |
| 4.4.5. Metal İyonlarının Karadut PPO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi | 46 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 47 |
| KAYNAKLAR | 49 |
| EKLER | 60 |
| KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER | 66 |
| ÖZGEÇMİŞ | 67 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|-------------|--|----|
| Şekil 2.1. | Oksidatif denge | 2 |
| Şekil 2.2. | Antioksidanların sınıflandırılması | 4 |
| Şekil 2.3. | Likopenin Yapısı | 8 |
| Şekil 2.4. | Polifenollerin sınıflandırılması | 9 |
| Şekil 2.5. | Flavonoidlerin sınıflandırılması | 10 |
| Şekil 2.6. | Stilbenlerin yapısı | 10 |
| Şekil 2.7. | Lignanların yapısı | 11 |
| Şekil 2.8. | Fenolik asitlerin yapısı | 11 |
| Şekil 2.9. | Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) | 14 |
| Şekil 2.10. | Kırmızı biber (<i>Capsicum annuum</i>) | 14 |
| Şekil 2.11. | Kan portakalı (<i>Citrus x sinensis</i>) | 15 |
| Şekil 2.12. | Nar (<i>Punica granatum</i>) | 16 |
| Şekil 2.13. | İncir (<i>Ficus carica</i>) | 16 |
| Şekil 2.14. | Greyfurt (<i>Citrus x paradisi</i>) | 17 |
| Şekil 2.15. | Kudret narı (<i>Momordica charantia</i>) | 18 |
| Şekil 2.16. | Karadut (<i>Morus nigra</i>) | 19 |
| Şekil 2.17. | Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>) | 19 |
| Şekil 2.18. | Kızılcık (<i>Cornus mas</i>) | 20 |
| Şekil 3.1. | Aseton ile çöktürme işlemi sırasında kullanılan deneme deseni | 23 |
| Şekil 3.2. | Üçlü-Faz (TPP) oluşum aşamaları | 24 |
| Şekil 4.1. | Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında (w/w) hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları | 32 |
| Şekil 4.2. | Farklı ham ekstrakt/ t-bütanol konsantrasyonlarında (v/v) hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları | 33 |
| Şekil 4.3. | Farklı pH'larda hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları | 34 |
| Şekil 4.4. | Karadut meyvesinden saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü | 36 |
| Şekil 4.5. | Karaduttan saflaştırılan PPO aktivitesi üzerine reaksiyon sıcaklığının etkisi | 37 |
| Şekil 4.6. | Katekol, 4-metilkatekol (4MC), 4-tert-bütilkatekol (4BC) ve Pirogallol substratlarında sıcaklık değişiminin enzim kararlılığına etkisi | 39 |
| Şekil 4.7. | Karaduttan saflaştırılan PPO aktivitesi üzerine reaksiyon pH'sının etkisi | 40 |
| Şekil 4.8. | Katekol 4-metilkatekol (4MC), 4-tert-bütilkatekol (4BC) ve Pirogallol substratlarında pH değişiminin enzim kararlılığına etkisi | 42 |
| Şekil 4.9. | Katekol konsantrasyonunun PPO aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği (A) ve Lineweaver Burk eğrisi (B) | 44 |
| Şekil B.1. | Standart BSA eğrisi | 63 |
| Şekil C.1. | Molekül ağırlık belirlenmesinde kullanılan grafik | 64 |

TABLolar DİZİNİ

| | | |
|-------------|---|----|
| Tablo 2.1. | Enzimatik olmayan antioksidanlar ve reaksiyonları | 6 |
| Tablo 2.2. | Eksojen kaynaklı (İlaç Grubu) antioksidanlar ve reaksiyonları | 6 |
| Tablo 2.3. | Eksojen kaynaklı (Vitamin Grubu) antioksidanlar ve reaksiyonları | 7 |
| Tablo 3.1. | Meyvelerden polifenol oksidaz içeren ham ekstraktların hazırlanmasında kullanılan ekstraksiyon ortamları | 22 |
| Tablo 4.1. | Likopence zengin meyvelerin farklı ekstraksiyon ortamlarından elde edilen özütlerdeki PPO aktivitelerinin karşılaştırılması | 28 |
| Tablo 4.2. | Aseton çöktürme optimizasyonu | 30 |
| Tablo 4.3. | Karadut PPO'sunun TPP ile saflaştırma sonuçları..... | 35 |
| Tablo 4.4. | Farklı kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların moleküler ağırlıkları..... | 37 |
| Tablo 4.5. | Farklı kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların farklı substratlarda ölçülen optimum sıcaklık değerleri (°C)..... | 38 |
| Tablo 4.6. | Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin farklı substratlarda ölçülen optimum pH değerleri | 41 |
| Tablo 4.7. | Karadut PPO enziminin substrat spesifite sonuçları..... | 43 |
| Tablo 4.8. | Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin Km ve Vmax değerleri..... | 45 |
| Tablo 4.9. | İnhibitörlerin karadut PPO enzimi üzerine etkisi | 45 |
| Tablo 4.10. | Metal iyonlarının karadut PPO enzimi üzerine etkisi | 46 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|----------------------|
| cm | : Santimetre |
| g | : Gram |
| g/L | : Gram/Litre |
| L | : Litre |
| M | : Molar |
| mg/mL | : Miligram/Mililitre |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| U | : Unit-Enzim birimi |
| U/g | : Unit/gram |
| μ L | : Mikrolitre |
| % | : Yüzde |
| $^{\circ}$ C | : Santigrat derece |
| = | : Eşittir |

Kısaltmalar

| | |
|---|--|
| BSA | : Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumin) |
| dH ₂ O | : Deiyonize Su |
| dk | : Dakika |
| HCl | : Hidroklorik Asit |
| kDa | : KiloDalton |
| NaOH | : Sodyum Hidroksit |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | : Amonyum Sülfat |
| pH | : Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü) |
| PVP | : Polivinilpirolidon |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| Rpm | : Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı) |
| (v/v) | : Hacim/Hacim |
| (w/w) | : Ağırlık/Ağırlık |
| 4BC | : 4-tert-Bütil katekol |
| 4MC | : 4-Metil katekol |

LİKOPENCE ZENGİN MEYVELERDE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada likopen içeriği zengin meyveler seçilerek polifenol oksidaz (PPO) enzimi aktivitesi bakımından taranması, yüksek PPO içeriğine sahip meyveden düşük maliyette ancak yüksek verimde enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu amaçlandı. Bu amaçla Kocaeli ve Bursa ili yerel pazarlarda yaygın olarak satılan 10 farklı meyve (karpuz, kırmızı biber, incir, nar, kan portakalı, greyfurt, kızılıçık, kuşburnu, kudret narı ve karadut) seçilerek 14 farklı ekstraksiyon ortamından elde edilen ham ekstraktlar PPO aktiviteleri açısından tarandı. Çalışılan meyvelerden sadece karadut meyvesinin sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0), askorbik asit (10 mM), PEG 6000 (%0,5, w/v) ve K₂HPO₄ (50 mM) içeren ekstraksiyon ortamından elde edilen özütte en yüksek PPO aktivitesi (3753 U/mL) tespit edildi. Buradan yola çıkarak, karaduttan PPO enzimi aseton çöktürme ve üçlü faz ayırma yöntemiyle %177 verimle 2,7 kat ilk kez bu çalışmada saflaştırıldı. Enzimin moleküler ağırlığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile 88,59 kDa olarak hesaplandı. Enzimin optimum sıcaklık değeri katekol için 40°C; 4-metil katekol (4MC), 4-bütil katekol (4BC) ve pirogallol için 50 °C olarak belirlendi. Optimum pH değeri 4BC için 8,0; katekol, 4MC ve pirogallol için 7,0 olarak belirlendi. Enzimin monofenolikler üzerinde etkili olmadığı ancak *o*-difenolik ve *p*-difenolik bileşikler okside edebildiği gözlemlendi. Katekol için Km ve Vmax değerleri sırasıyla 17,8 mM ve 2000 µmol/mL/dk olarak bulundu. Askorbik asit, β-merkaptoetanol ve FeSO₄'ün enzim aktivitesini 5 mM konsantrasyonda tamamen inhibe ettiği gözlemlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde likopen içeren ve antioksidan özelliği bulunan karadutun PPO kaynağı olarak kullanılabilmesi ve enzimi düşük maliyetle doğa dostu bir şekilde izole edilebileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karakterizasyon, Likopen, *Morus nigra*, Polifenol Oksidaz, Üçlü Faz Ayırma.

SCREENING AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME IN LYCOPENE-RICH FRUITS

ABSTRACT

The aim of this study was to screen fruits with high lycopene content for the activity of the enzyme polyphenol oxidase (PPO) and to purify and biochemically characterize the enzyme from fruits with high PPO content at low cost and high yield. For this purpose, 10 different fruits (watermelon, red bell pepper, fig, pomegranate, blood orange, grapefruit, cranberry, rose hip, pomegranate and black mulberry) commonly sold in local markets in Kocaeli and Bursa provinces were selected and crude extracts from 14 different extraction media were analyzed for their PPO activity. The highest PPO activity (?? U/mL) was found only in the black mulberry fruit extract obtained from extraction media containing sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0), ascorbic acid (10 mM), PEG 6000 (0.5%, w/v) and K₂HPO₄ (50 mM). On this basis, the PPO enzyme from black mulberry was purified 2.7-fold by acetone precipitation and three-phase separation method for the first time in this study with a yield of 177%. The molecular weight of the enzyme was determined to be 88.59 kDa by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum temperature of the enzyme was determined to be 40 °C for catechol and 50 °C for 4-methylcatechol (4MC), 4-butylcatechol (4BC) and pyrogallol. The optimum pH was determined to be 8.0 for 4BC and 7.0 for catechol, 4MC and pyrogallol. The enzyme was not effective for monophenols but was able to oxidize *o*-diphenolic and *p*-diphenolic compounds. *K_m* and *V_{max}* values for catechol were 17.8 mM and 2000 μmol/mL/min, respectively. Ascorbic acid, β-mercaptoethanol and FeSO₄ completely inhibited the enzyme activity at 5 mM concentration. The evaluation of all results suggests that black mulberry, which contains lycopene and has antioxidant properties, can be used as a source of PPO and the enzyme can be isolated in an environmentally friendly way and at low cost.

Keywords: Characterization Lycopene, *Morus nigra*, Polyphenol Oxidase, Three-Phase Partitioning.

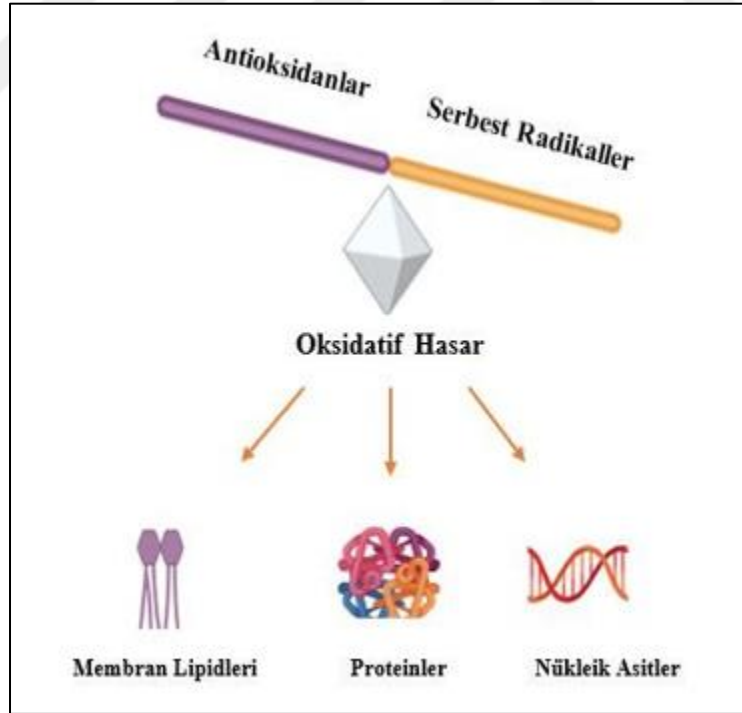
1. GİRİŞ

Petrol, kömür gibi kaynakların kullanımı ile oluşan çevre kirliliği, hava kirliliği, su kirliliği, UV-ışınları ve küresel ısınma günümüzde Dünyada var olan sorunlardan birkaç tanesidir. Buna ek olarak yediğimiz ve içtiğimiz besinlerdeki kimyasallar, kullanılan ilaçlar, sigara ve stres insan vücudunda serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşan serbest radikaller DNA, RNA, lipid ve proteinlerin yapısını bozarak başta kanser olmak üzere kalp damar hastalıklarına, inflamatuvar hastalıklara ve psikolojik rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Serbest radikal oluşumunu engellemek veya oluşan serbest radikalleri temizlemek için antioksidan bakımından zengin bitkisel kaynakların tüketilmesi önerilmektedir. Antioksidanlar serbest radikallerin hücrelerde meydana getirdiği hasarları önleyerek veya zararlı etkilerine karşı hücreleri koruyarak hastalıkları önlemeye katkı sağlamaktadırlar. Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki likopen içeren sebze ve meyveler antioksidan bakımından oldukça zenginlerdir. Antioksidan enzimlerden biri olan polifenol oksidaz enzimi gıda sektörü başta olmak üzere, eczacılık, atık su gideriminde, plastik ve kağıt endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Güray, 2009). Bu çalışmada yerel pazar ve marketlerde satılan likopen içeriği bakımından zengin olan karpuz (*Citrullus lanatus* L.), kırmızı biber (*Capsicum annuum* L.), incir (*Ficus carica* L.), nar (*Punica granatum* L.), kan portakalı (*Citrus x sinensis* L.), greyfurt (*Citrus x paradisi* Macfad.), kızılcık (*Cornus mas* L.), kuşburnu (*Rosa canina* L.), kudret narı (*Momordica charantia* L.) ve karadut (*Morus nigra* L.) seçilerek gıda olarak kullanılan kısımlarından polifenol oksidaz üretimi için alternatif kaynakların belirlenmesi amacıyla taranması, en yüksek polifenol oksidaz aktivitesi gösteren meyve/sebze seçilerek enzimin yüksek verimde saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Buna göre meyve/sebze örneklerinden ham enzim ekstraktların hazırlanması, enzim aktivite analizi ile en yüksek polifenol oksidaz aktivitesi gösteren ekstraktın seçilmesi, ardından uygulaması hızlı, basit ve düşük maliyetli bir teknik olan üçlü faz ayırma yöntemi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve saf enzimin spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerle biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Organizmada hücrel metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinde (ROS) artış ile bunlara karşı serbest radikal temizleyiciler gibi davranan antioksidanlar arasında oluşan dengenin ROS lehine bozulması “oksidatif stres” olarak tanımlanır (Özcan ve diğ., 2015) (Şekil 2.1) Hücre içerisinde normal şartlarda oksidan ve antioksidanlar denge halinde bulunmaktadır. Bu dengenin bozulup oksidatif streste artış meydana gelmesi, hücre ve dokulardaki lipitlere, enzimlere, karbohidratlara, proteinlere ve DNA'ya hasar verebilir. Bunun sonucunda da membran hasarı, DNA, enzimler ve yapısal proteinler gibi moleküllerin parçalanması ve hatta lipit peroksidasyonu ve DNA parçalanmasının neden olduğu hücre ölümü gerçekleşebilir (Beckman ve Ames, 1998). Oksidatif stres başta kanser olmak üzere kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz, nörolojik bozukluklar ve diyabet gibi birçok hastalığın oluşumuna sebep olmaktadır (Özcan ve diğ., 2015).



Şekil 2.1. Oksidatif denge (BioRender ile oluşturuldu)

2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Biyolojik sistemlerde birçok radikal türü olmasına rağmen en çok görülen ve oksijenden oluşan radikaller genel olarak ROS olarak adlandırılmaktadır. ROS'lar, moleküler oksijenin bir kısmının çeşitli enzimatik reaksiyonlar veya mitokondride elektron taşıma zinciri (ETS) boyunca indirgenmesi ile oluşmaktadır (Özcan ve diğ., 2015). ROS'lar hem metabolik süreçler (hücre solunum) hem de çevresel faktörlerin (ilaç toksisitesi, sigara dumanı, UV-ışını, hava kirliliği, alkol gibi) etkisi ile sürekli olarak üretilmektedirler. ROS'lar hem serbest radikalleri hem de serbest radikal olmayan (non-radikal) oksijenli molekülleri içermektedir (Aslankoç ve diğ., 2019).

ROS'ların başlıca radikal türleri; Hidroksil radikali (OH•), Süperoksit radikali (O₂•-), Peroksil radikali (LOO•)'dir. Radikal olmayan (non-radikal) türleri ise; Hipokloröz asit (HOCl), Hidrojen peroksit (H₂O₂), Singlet oksijen (¹O₂)'dir (Çavdar ve diğ., 1997). Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit (O₂•-), singlet oksijen (¹O₂) ve hidroksil radikali (OH) gibi radikal ve radikal olmayan aktifleşmiş oksijen türleri oldukça reaktiftir ve bu da organlarda toksik etkilere yol açmaktadır (Aslankoç ve diğ., 2019).

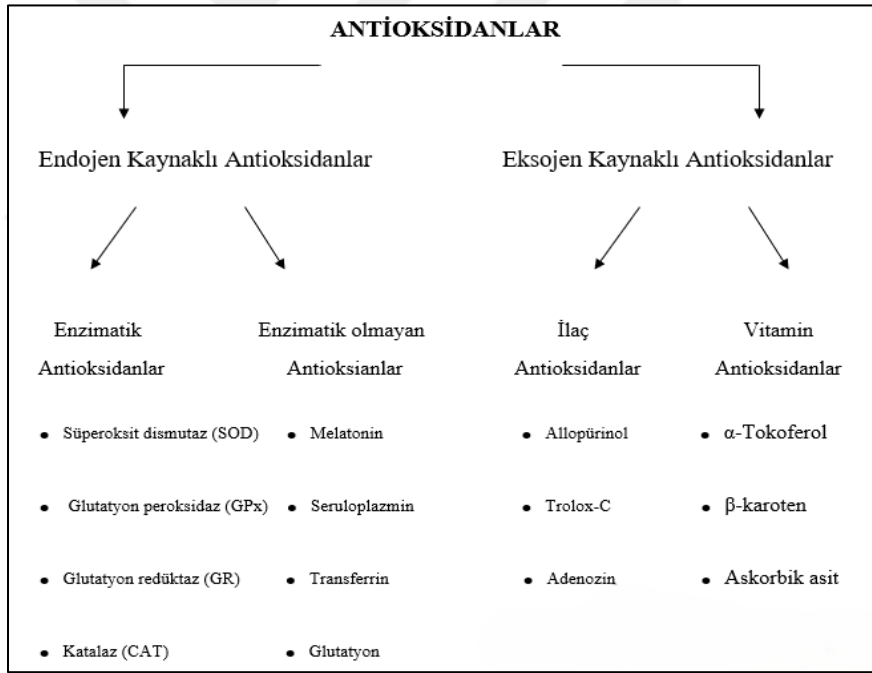
Serbest radikallerin negatif ve pozitif etkileri arasında oluşan bir denge vardır. Bu denge canlı organizmalar için çok önemlidir ve "redoks düzenleme" olarak isimlendirilen mekanizmalar ile bu denge hali elde edilir. Redoks düzenlemesi canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korumaktadır (Valko ve diğ., 2007).

2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar veya antioksidan savunma sistemi, ROS'ların oluşumunu engelleyerek veya bulunan serbest radikalleri temizleyerek bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek için vücutta görev yapan savunma sistemidir (Kahkönen ve diğ., 1999; Karabulut ve Gülay, 2016). Serbest radikallerin fazlasını uzaklaştırmak, hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korumak ve hastalıkları önlemeye katkı sağlamak antioksidanların rolleri arasında gösterilebilir (Pham-Huy ve diğ., 2008) Antioksidanlar gıda oksidasyonunu önleyerek çabuk bozulan ürünlerin bozulmasını da geciktirmektedirler. Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen faktörlerden en önemlileri, kimyasal yapıları, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde

edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001). Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretilbildikleri gibi dışarıdan gıda yolu ile de alınabilmektedir. Gıdaların antioksidan içerikleri gıda maddesinin cinsine, iklime, hasat zamanına, neme, ışığa, muhafaza ortamının ısısına ve gıdanın hazırlanmasına göre değişebilmektedir (Yılmaz, 2010).

Kırmızı renkli meyvelerde bol miktarlarda bulunan antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki grupta toplanırlar (Karataş ve Çöteli, 2016) (Şekil 2.2). Bu antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini sağlayabilmek için serbest radikallerden vücudu korurlar ve serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için kullanılırlar (Sen ve Chakraborty, 2011). Endojen kaynaklı olan antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki alt grupta, eksojen kaynaklı olan antioksidanlar ise vitamin ve ilaç olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).



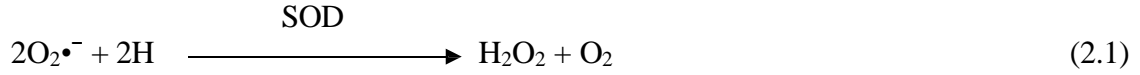
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Karataş ve Çöteli, 2016)

2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik savunma hattını oluşturan endojen kaynaklı enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) bulunur (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Süperoksit Dismutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (Denklem 2.1). Oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) daha sonra, katalaz (CAT) ya da glutatyon peroksidaz (GPx) ile uzaklaştırılır (Chaudiere ve Iliou, 1999)



İnsanlarda süperoksit dismutaz (SOD)'ın üç formu vardır. Bunlar bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz ve ekstraselüler süperoksit dismutaz'dır (Young ve Woodside, 2001).

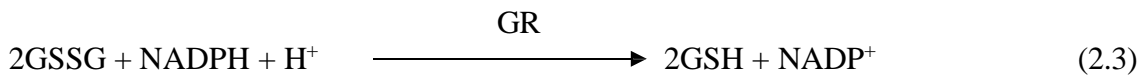
Glutatyon Peroksidaz (GPx) (E.C.1.11.1.4)

Glutatyon peroksidaz enzimi, elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 ve hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Böylece glutatyon okside olur ve glutatyon disülfid (GSSG) meydana gelir (Denklem 2.2) (Reiter ve diğ., 1995). Glutatyon peroksidaz (GPx), H_2O_2 'den kaynaklanan hasara karşı hücre koruması gerçekleştirir ve böylelikle H_2O_2 'den OH'in oluşumunu engeller (Sen ve Chakraborty, 2011).



Glutatyon Redüktaz (GR) (E.C.1.8.1.7)

Glutatyon redüktaz, GPx ile oluşmuş olan okside glutatyon disülfid'in (GSSG) tekrardan indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizlemektedir (Denklem 2.3) (Pektaş, 2009).



Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6)

Katalaz enzimi, H_2O_2 'nin oksijen (O_2) ve suya (H_2O) dönüşümünü katalizlemektedir (Denklem 2.4) (Limón-Pacheco ve Gonsebatt, 2009).



2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Birçok bitkide, hayvansal dokularda ve mikroorganizmalarda bulunan doğal antioksidanlardır (Tablo 2.1) (Görünmezoglu, 2008).

Tablo 2.1. Enzimatik olmayan antioksidanlar ve reaksiyonları (Karabulut ve Gülay, 2016).

| Enzimatik olmayan Antioksidanlar | Reaksiyonları |
|----------------------------------|--|
| Melatonin | Lipofilik özellik gösterir. Hidroksil ve süperoksit radikallerini tutarak doğrudan bir serbest radikal süpürücüsü ve antioksidan etki gösterir. |
| Seruloplazmin | Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demirine (Fe^{+3}) yükseltgeyerek fenton reaksiyonu oluşumunu ve hidroksil radikal oluşumunu engeller. |
| Transferrin | Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonu oluşumunu önler. |
| Glutatyon (GSH) | Bir antioksidan olarak hücrenin redoks durumunu korur, hücre sinyal mekanizmasının düzenler, apoptozda faaliyet gösterir. |
| Ürik asit | Güçlü bir serbest radikal süpürücüdür. |
| Bilirubin | Ömrünü tamamlayan eritrositlerin parçalanmasıyla meydana gelir. Peroksil radikallerini etkileyerek zincir kırıcı etki gösterir, etkili bir antioksidandır. |
| Albumin | Hipokloröz asit (HOCl) oluşmasını katalizler. Albümin plazmadaki en önemli ve en etkili antioksidanlardan biridir. |
| Koenzim Q10 | Serbest radikalleri süpürerek ve lipid, protein peroksidasyonunu baskılayarak bir antioksidan olarak çalışır. |
| Selenyum | ROS oluşumunu GPx aktivitesini artırarak baskılar. |

2.2.3. İlaç Grubu Antioksidanlar

Tablo 2.2. Eksojen kaynaklı (İlaç Grubu) antioksidanlar ve reaksiyonları (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009)

| Eksojen Kaynaklı (İlaç Grubu) Antioksidanlar | Reaksiyonları |
|--|--|
| Allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten | Ksantin oksidaz inhibitörleridir. Süperoksit üretimini inhibe ederler. |

Tablo 2.2. (Devam) Eksojen kaynaklı (İlaç Grubu) antioksidanlar ve reaksiyonları (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009)

| | |
|--|--|
| Adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, steroid olmayan antiinflamatuvarlar | NADPH oksidaz inhibitörleri olarak görev yaparlar. |
| Trolox-C | Vitamin E analogu olarak görev yapar. |
| Mannitol | Enzimatik olmayan serbest radikal toplayıcıdır. Hidroksil radikalini toplar. |

2.2.4. Vitamin Grubu Antioksidanlar

Dışarıdan alınan eksojen kaynaklı antioksidanlar grubunda yer almaktadır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Eksojen kaynaklı (Vitamin Grubu) antioksidanlar ve reaksiyonları (Şener ve Yeğen, 2009)

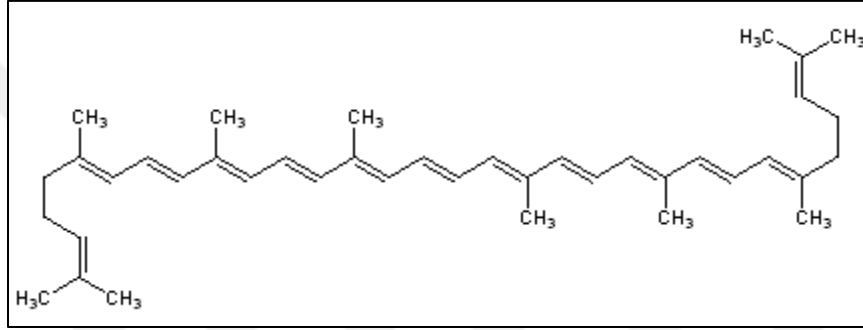
| Eksojen Kaynaklı (Vitamin Grubu) Antioksidanlar | Reaksiyonları |
|---|---|
| α -Tokoferol (Vitamin E) | Hücre zarı fosfolipidlerinde çözünür, böylece peroksidasyonu engeller. Süperoksit ve hidroksil radikallerini indirger. |
| β -karoten (Vitamin A) | Singlet oksijeni bastırır, süperoksit radikalini temizler ve OH•, alkoksil ve peroksil radikalleriyle etkileşerek antioksidan görevi görür. En güçlü singlet O ₂ uzaklaştırıcı olarak bilinen karotenoid likopendir. |
| Askorbik asit (Vitamin C) | Proteine bağlı ferrik demiri indirgeyerek ferröz demire dönüştürür. İnsanlarda sentez edilmediği için diyetle alınması gerekir. |

2.3. Likopen

Doğal pigmentler, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilen yenilebilir renklendirici maddelerdir. Antosiyaninler, karotenoidler ve flavonoidler sarı, turuncu, kırmızı, mavi ve mor dahil olmak üzere birçok farklı renk sağlayan bitki pigmentleridir (Wang ve diğ., 2023). Likopen ise, çeşitli bitkilerde, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan, bulunduğu ortama kırmızı renk veren yağda kolay çözünebilir karotenoid grubu bir pigmenttir (Li ve diğ., 2020). Özellikle domates, karpuz, pembe

greyfurt , kayısı, papaya ,kızılcık ve guava gibi olgun kırmızı meyve ve sebzelerde bulunur. Fakat kuşkonmaz ve maydanoz gibi kırmızı renkte olmayan bazı bitkilerde de likopen bulunmaktadır (Kulawik ve diğ., 2023). İlk olarak 1876 yılında Millardet tarafından domateste keşfedilmiştir (Zhu ve diğ., 2020).

Kimyasal olarak $C_{40}H_{56}$ moleküler formülüne ve 536,86 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir (Ma ve diğ., 2016). Yapısında 2 konjuge olmayan çift bağ ve 11 konjuge çift bağ bulunmaktadır (Şekil 2.3). Likopen görünür ışığı absorbe edebilir ve maksimum dalga boyu (λ_{max}) = 472 nm olan absorpsiyon spektrumuna sahiptir (Wang ve diğ., 2023).



Şekil 2.3. Likopenin Yapısı (URL-1)

Likopen çok güçlü bir antioksidandır; hücreleri oksidatif hasara karşı korur, serbest radikal temizleyicisi olarak davranır, hidrojen peroksiti, nitrojen dioksiti ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırma yeteneğine sahiptir (Khongthaw ve diğ., 2022; Kulawik ve diğ., 2023; Rao ve diğ., 1998). Ayrıca güçlü bir singlet oksijen uzaklaştırıcıdır (Grabowska ve diğ., 2019). Antioksidan özelliklerine ek olarak hücreler arası iletişimi sağladığı da keşfedilmiştir (Rao ve diğ., 1998).

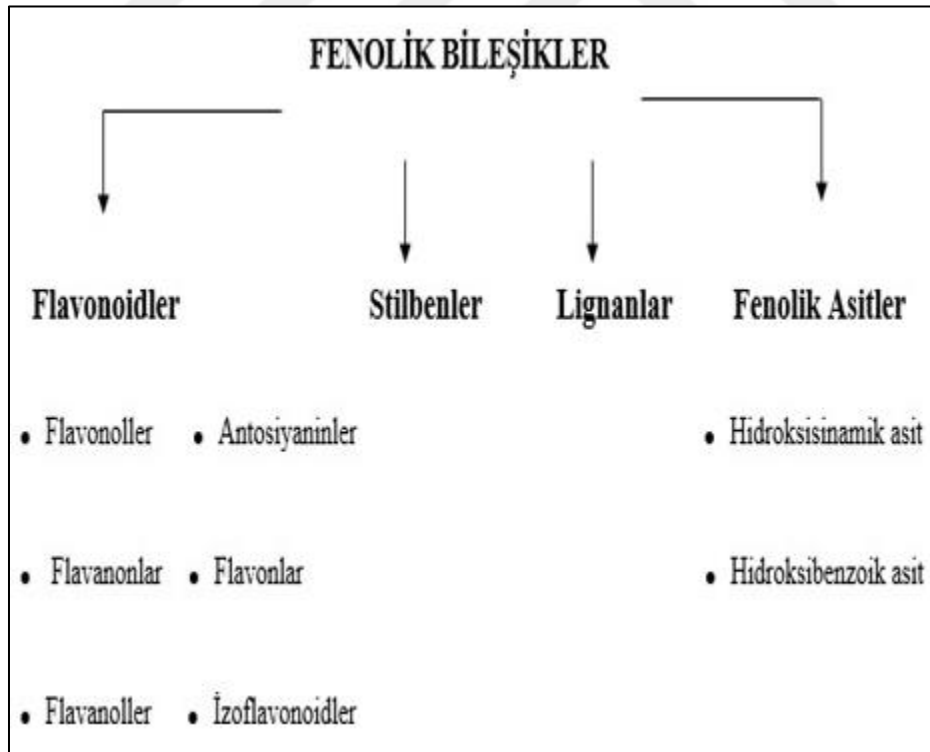
Likopen, ısıya dayanıklı bir karotenoiddir, dolayısıyla besini pişirmek ona zarar vermez; aksine ısı likopeni vücut tarafından daha kolay sindirilebilir hale getirmektedir (Marzocco ve diğ., 2021). Klinik çalışmalar likopen içeren yiyecekleri tüketmenin insan bağışıklığını güçlendirdiğini, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser risklerini önleyebileceğini veya azaltabileceğini göstermektedir (Akinoğlu ve Erdal, 2024). Ayrıca araştırmalar likopenin prostat, akciğer, rahim ve meme kanseri gibi bazı kanser türlerine karşı önleyici etkisi olduğunu da göstermiştir. Likopen, tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek apoptozu indüklemekte ve metastazı önlemektedir (Li ve diğ., 2020). Bir pigment olarak

likopen fonksiyonel gıdalarda, kozmetik sektöründe ve farmasötiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhu ve diğ., 2020).

2.4. Polifenoller

Polifenoller doğada sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda ve diğer bitkilerde bol miktarda bulunan doğal maddelerdir (Wang ve diğ., 2022). Bitkilerin büyüme ve gelişmesi için önemli fitokimyasallardandır. Bitkileri mikroorganizmalara, böceklerle, ultraviyole ışığa ve sıcağa karşı koruyan, bitkilerin çiçek, yaprak, meyve, sap ve kök gibi bölümlerinde bulunan ikincil metabolitlerdir (Alkan ve Rakıcıoğlu, 2020; Kawabata ve diğ., 2019).

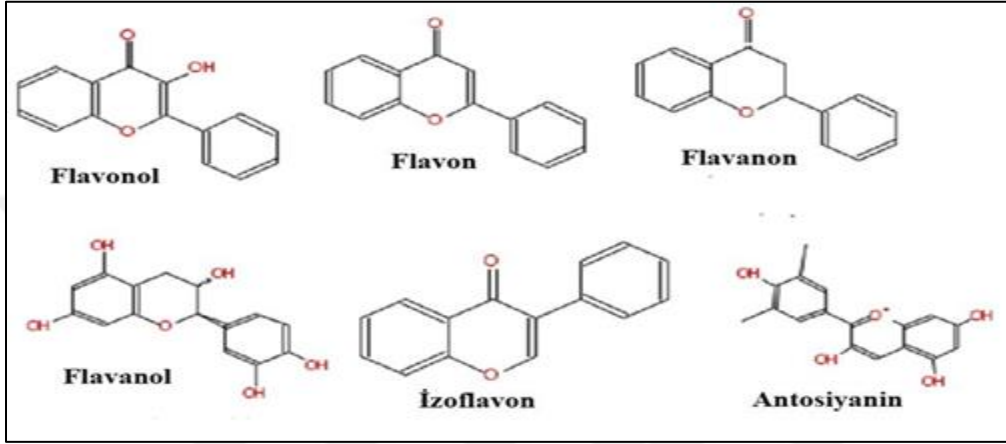
Polifenoller serbest radikal temizleyici, antioksidan, anti-ultraviyole, antibakteriyel ve antitümör gibi aktivitelere sahip olduklarından tıpta, pestisit üretimi ve gıda katkı maddesi gibi çeşitli yerlerde kullanılmaktadırlar (Wang ve diğ., 2022). Yapılarında birden fazla fenol halkası bulunan polifenoller, biyolojik fonksiyonlarına ve kimyasal yapılarına göre flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar olarak dört grup altında incelenmektedir (Şekil 2.4) (Tsao, 2010).



Şekil 2.4. Polifenollerin sınıflandırılması (Alkan ve Rakıcıoğlu, 2020)

2.4.1. Flavonoidler

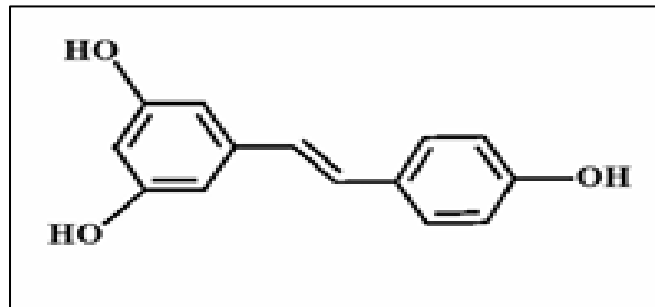
Flavonoidler, kalkan bileşiklerinden türetilen ikincil metabolitler olup genellikle bitkilerde bulunan ancak insan vücudunda sentezlenemeyen antioksidanlardır (Guo ve diğ., 2023). Yapılarındaki heterosiklik halkanın çeşidine göre flavonoller, flavanonlar, flavanoller, flavonlar, antosiyaninler ve izoflavonoidler olmak üzere alt kategoriye ayrılmaktadırlar (Şekil 2.5) (Manach ve diğ., 2004)



Şekil 2.5. Flavonoidlerin sınıflandırılması (Çetin, 2012)

2.4.2. Stilbenler

İki karbon atomu içeren metilen ile birbirlerine bağlanmış, iki fenil halkasından oluşmaktadırlar (Şekil 2.6). Bitkilerde yaralanma ve enfeksiyon sonucu tepki olarak ortaya çıkarlar (Pandey ve Rizvi, 2009). Yapılan çalışmalarda antikanserojen etki sağladıkları belirlenmiştir (Bayır ve diğ., 2019).

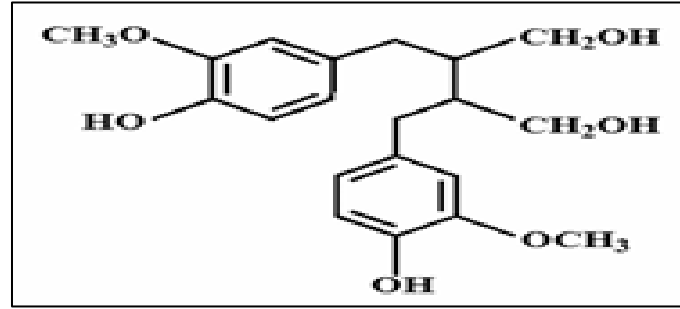


Şekil 2.6. Stilbenlerin yapısı (Pandey ve Rizvi, 2009)

2.4.3. Lignanlar

2,3-dibenzilbütan yapısında olan lignanlar iki sinamik asit dimerizasyonundan

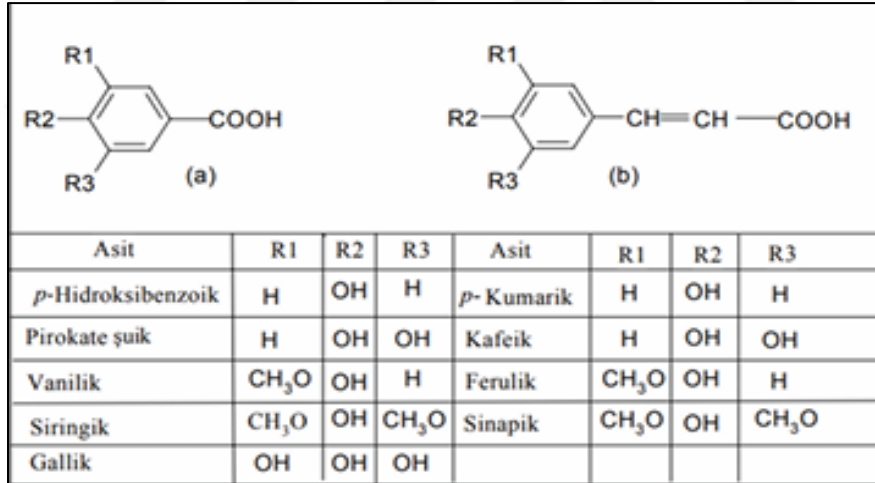
oluşmaktadır (Şekil 2.7). (Adlercreutz ve diğ., 1997). Keten tohumu lignan bakımından en zengin kaynaktır (Bayır ve diğ., 2019).



Şekil 2.7. Lignanların yapısı (Pandey ve Rizvi, 2009)

2.4.4. Fenolik Asitler

Benzoik asit türevleri ve sinnamik asit türevleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.8). Benzoik asit türevlerinin bitkilerdeki konsantrasyonu genellikle azdır fakat bazı kırmızı meyvelerde ve soğanda belirli miktarda bulunmaktadır. Sinnamik asit türevleri kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit ve *p*-kumarik asittir (Bayır ve diğ., 2019).



Şekil 2.8. Fenolik asitlerin yapısı (a): Hidroksibenzoik asit (b): Hidroksisinnamik asit (Atak ve Uslu, 2018)

2.5. Polifenol Oksidazlar

Antioksidan enzimler olarak polifenol oksidazlar (PPO'lar), yüksek oranda fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşikleri oksitler. En önemli fizyolojik etkileri pigmentasyon, kök oluşumu ve çevre koşullarına karşı korumadır. PPO'lar lakkazlar (E.C. 1.10.3.2), katekol oksidazlar (E.C. 1.10.3.1) ve tirozinazlar (E.C. 1.14.18.1) olarak üç grupta

sınıflandırılırlar. Ancak bazen peroksidazlar (E.C. 1.11.1.7) da polifenol oksidazlara dahil edilirler. Peroksidazlar, hidrojen peroksit varlığında fenolik maddeleri oksitleyen enzimlerdir (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Her üç grup önemli ölçüde farklılıklar gösterebilirler de lakkazlar dört bakır atomu içerirken, katekol oksidaz/tirozinazlar iki bakır atomu içerirler. Bakır atomları tüm polifenol oksidazlar için gereklidir (Torelli ve diğ., 2002).

Bilinen en eski enzimlerden biri olan lakkazlar hem *p*-difenol hem de *o*-difenoller üzerinde etkilidirler. Farklı mantarlardan, yüksek bitkilerden, bakterilerden, likenlerden ve böceklerden elde edilebilirler. Bugüne kadar fungal lakkazlarla ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur; ancak bitki lakkazları bir ölçüde göz ardı edilmiştir. Bitki lakkazları ligninin biyosentezi ve polimerizasyonu, uzama ve stres tepkisi ile ilişkilidir. Biyoremediasyonda kullanımlarına ilişkin birçok örnek rapor edilmiştir (Arregui ve diğ., 2019). Tirozinazlar doğada yaygındır. Monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu, ardından difenolün ilgili kinona oksidasyonunu gerçekleştirirler. Tirozinazlar melanin biyosentezinde rol oynarlar. Bitkilerde tanenler, lignin, flavonoidler gibi fenolik polimerlerin üretiminde, bitki hücresi solunumu ve yaraların iyileşmesi sırasında redoks potansiyelinin düzenlenmesinde birincil rolleri vardır. Tirozinazların potansiyel uygulamaları arasında yeni melaninlerin üretilmesi, protein çapraz bağlanması, fenolik biyosensörler, L-DOPA üretimi, fenol ve boya giderimi ve biyokataliz yer alır (Nunes ve Vogel, 2018). Katekol oksidazlar, tirozinazlardan farklı olarak yalnızca *o*-difenollere etki eden enzimlerdir. Bitkilerde kahverengi polifenolik katekol melaninlerin oluşumundan sorumludurlar; böylece zarar görmüş bitki dokularını patojenlere ve böceklere karşı korurlar (Eicken ve diğ., 1999).

PPO'lar birçok sebze ve meyvenin olgunlaşma sırasında ve paketlenme ve işleme gibi hasat sonrası işlemler sırasında esmerleşmesine neden olur. Enzimatik esmerleşme reaksiyonu, doğal fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu nedeniyle meydana gelir ve bu reaksiyon, koyu kahverengi veya siyah pigmentlerin üretilmesiyle sonuçlanır. PPO kaynaklı esmerleşme, gıdaların rengini, lezzetini ve besin değerini olumsuz etkilediğinden, meyve ve sebzelerin kalitesini korumak amacıyla birçok çalışmada aktivitelerinin inhibisyonu çalışılmıştır. Bitki doku kültüründe kullanılan besiyerinde de meydana gelen bu reaksiyona “esmerleşme” adı verilmektedir. Fenoliklerin kültür ortamında birikmesi

genellikle büyümenin inhibisyonu ve *in vitro* kültüre alınan bitkilerin kaybıyla sonuçlanır (Jones ve Saxena, 2013).

Bitki PPO'larının bu istenmeyen etkilerine rağmen, atık su arıtımı, biyosensör üretimi ve Parkinson hastalığı, vitiligo, kanser, fenilketonüri ve bazı *Streptococcus* enfeksiyonları dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisi dahil olmak üzere çok sayıda uygulaması bulunmaktadır. Ayrıca farmasötik açıdan önemli birçok bileşiğin sentezinde de kullanılırlar. PPO'ların gıda endüstrisinde birçok sıcak ve soğuk içeceğin lezzetini iyileştirmede faydalı olduğu da bulunmuştur (Panadere ve Rathod, 2018). Birçok endüstriyel alanda kullanımları nedeniyle küresel pazarda PPO'lara olan talep oldukça yüksektir (Niphadkar ve Rathod, 2015). Ancak yüksek üretim maliyeti ve düşük verimlilik gibi sorunlar, enzim destekli katalizi büyük ölçüde kısıtlamaktadır (Panadere ve Rathod, 2018).

Meyvelerdeki PPO enzimlerinin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar arasında elma (Janovitz-Klapp ve diğ., 1990), mango (Park ve diğ., 1980), yaban mersini (Siddiq ve Dolan, 2017), çilek (Wesche-Ebeling ve Montgomery, 1990), avokado (Moeini Alishah ve diğ., 2023), muz (Yang ve diğ., 2000), kayısı (Derardja ve diğ., 2017) ve beyaz duttan (Arslan ve diğ., 2004) saflaştırılan PPO'ların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi örnek verilebilir. PPO enzimi birçok meyvede çalışılmış olmasına rağmen, bu çalışmada seçilen meyve/sebzeler üzerine herhangi bir yayın henüz bulunmamaktadır.

2.6. Likopen İçeren Meyveler

2.6.1. Karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai)

Karpuz, Kabakgiller (Cucurbitaceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.9). Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde ve dünyanın pek çok yerinde yetişen popüler bir bitkidir. (Solmaz ve diğ., 2016). Şeker, likopen, sitrülün, arginin ve glutatyon gibi birçok önemli besin bileşiği içermektedir (Guo ve diğ., 2020). Karpuzda $13,84 \pm 3,41$ µg/g likopen bulunmaktadır (Karataş ve Çöteli., 2016). Karpuzun kırmızı rengine neden olan ana pigmenttir (Wang ve diğ., 2019). Yapılan çalışmalarda karpuzdaki likopen içeriğinin diğer meyve ve sebzelere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Sirikhet ve diğ., 2021). Karpuz sulu ve lifli yapılıdır, ülkemizde olgunlaşmış meyvesi tüketilmektedir (Beşirli ve

diğ., 2019).



Şekil 2.9. Karpuz (*Citrullus lanatus*) (URL-2)

2.6.2. Kırmızı biber (*Capsicum annuum* L.)

Kırmızı biber, Patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına aittir (Şekil 2.10) (Anaya-Esparza ve diğ., 2021). Tropik ve subtropikal bölgelerde yetişen tek yıllık bir bitkidir. Orta Amerika ve Meksika kökenlidir. Türkiye’de baharat ve sebze olarak tüketilmek için üretimi yapılmaktadır. C ve E vitaminleri, provitamin A, karotenoidler ve çeşitli fenolikler ve flavonoidler açısından zengin bir kaynaktır (Baldemir ve diğ., 2015). Kırmızı biberde 10,8-26,2 µg/g likopen bulunmaktadır (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.10. Kırmızı biber (*Capsicum annuum*) (URL-3)

2.6.3. Kan portakalı (*Citrus x sinensis* L.)

Kan portakalı, Turunçgiller (Rutaceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.11). Subtropik iklime sahip Akdeniz ülkelerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde ise Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nde üretimi yapılmaktadır (Demir ve Koyuncu 2017). Kan portakalını diğer portakallardan ayıran en önemli özellik meyvesinde bulunan etli kısım ve bazen de meyve kabuğunda likopen kaynaklı kırmızı renk pigmenti bulundurmasıdır. Kan portakallarının Tarocco, Moro ve Sanguinello olmak üzere üç farklı çeşidi vardır. Kan portakallarında bol miktarda flavanon, antosiyanin, karotenoid ve C vitamini bulunmaktadır (Çimen ve diğ., 2013). Kan portakalı $0,46 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ likopen içermektedir (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.11. Kan portakalı (*Citrus sinensis*) (URL-4)

2.6.4. Nar (*Punica granatum* L.).

Nar, Kınagiller (Lythraceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.12). Subtropik ve tropik iklime sahip Akdeniz ülkelerinde yetiştirilmektedir (Şimşek ve İkinci, 2017). Türkiye'de ise Güney Doğu Anadolu Bölgesinden Doğu Karadeniz'e kadar hemen hemen her bölgede yetişmektedir (Özkal, 1993). Genellikle taze olarak tüketilse de pekmez ve nar ekşisi, nar suyu, sirke, hayvan yemi, çeşitli içeceklerde ferahlatıcı bir katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Antioksidan özelliği sayesinde kansere karşı koruyuculuk sağlamakta ve kolesterol ile şeker düzeyinin dengelenmesi başta olmak üzere sağlık üzerinde birçok etkisi bulunmaktadır (Şimşek ve İkinci, 2017). Narda bulunan likopen miktarı $21,43 \pm 2,35 \mu\text{g/g}$ 'dır (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.12. Nar (*Punica granatum*) (URL-5)

2.6.5. İncir (*Ficus carica* L.)

İncir, Dutgiller (Moraceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.13) ve ismini Ege Bölgesi'ndeki antik yerleşim yeri Caria'dan almaktadır. Anavatanı Türkiye'dir ve buradan Suriye'ye, Filistin'e, sonrasında ise Ortadoğu'dan Çin ve Hindistan'a yayılmıştır. Türkiye'de taze ve kurutulmuş olarak birçok farklı incir türü yetiştirilmektedir. Kurutularak tüketilen incirler genellikle Ege Bölgesi'nde, taze olarak tüketilen incirler ise Ege Bölgesi dışında üretilmektedir (Gençdağ ve diğ., 2019). İncirin likopen içeriği $0,40 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ 'dir (Karataş ve Çöteli., 2016)



Şekil 2.13. İncir (*Ficus carica*) (URL-6)

2.6.6. Greyfurt (*Citrus x paradisi* Macfad.)

Greyfurt, Turunçgiller (Rutaceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.14).

Anavatanı Karayip adası Barbados'dur. Aslı çok tohumlu ve beyaz renk olan greyfurtun zaman içinde mutasyonlar sonucu farklı renkte (pembe, kırmızı) ve çekirdeksiz çeşitler ortaya çıkmıştır (Seden ve diğ., 2012). Çok güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Genel sağlığı iyileştirdiği, kalp sağlığına iyi geldiği bazı kanser risklerini azalttığı, sindirim sağlığını iyileştirdiği ve bağışıklık sistemi fonksiyonunun iyileştirilmesi başta olmak üzere çok sayıda yararı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca geleneksel tıpta iştah açıcı, ishal önleyici ve balgam söktürücü olarak da kullanılır (Stabrauskiene ve diğ., 2023). Greyfurtun likopen miktarı $40,24 \pm 4,05 \mu\text{g/g}$ 'dır (Karataş ve Çöteli., 2016)



Şekil 2.14. Greyfurt (*Citrus x paradisi*) (URL-7)

2.6.7. Kudret narı (*Momordica charantia* L.)

Kudret narı, Kabakgiller (Cucurbitaceae) familyasının bir üyesidir (Şekil 2.15). Tropik bir bitkidir ve çoğunlukla Doğu Afrika, Asya, Karayip Adaları, Amazon Havzası ve Güney Amerika'da yoğun olarak yetiştirilmektedir. Meyveleri önce yeşil renklidir, olgunlaştıktan sonra turuncu-kırmızı renkli olmaktadır. Gıda olarak tüketilmekte ve tedavi edici olarak da kullanılmaktadır. Tümörlerde, deri hastalıklarında (egzama, uyuz), yaralarda, romatizmada, sıtmada, adet problemlerinde, şeker hastalığında kullanılmaktadır (Akay ve Kararslan, 2012). Likopen miktarı olgunlaşmış meyvede $261.0 + 60.2 \mu\text{g/g}$ 'dır (Rodriguez ve diğ., 1975).



Şekil 2.15. Kudret narı (*Momordica charantia*) (URL-8)

2.6.8. Karadut (*Morus nigra* L.)

Karadut, Dutgiller (Moraceae) familyasına ait bir bitki ürünüdür (Şekil 2.16). Karadutun anavatanı Hindistan ve Japonya'dır. Ilıman ve subtropik iklim bölgelerinde yetişmektedir (Özelçi ve Yiğit 2022). İki ucu basık oval-silindirik şeklindedir ve meyvesi siyahımsı-mor renkli, etli-sulu ve mayhoş tada sahiptir (Özkaya Erkalı ve Dalkılıç, 2016). Karadut antosiyanin, fenolik bileşikler ve potasyum bakımından zengindir (Aşkın ve diğ.,2022). İçerdiği flavonoidler sayesinde antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, anti-kanser, anti-tümör ve anti- radyasyon etkileri gösterir. Ayrıca balgam söktürücü, idrar söktürücü, öksürük giderici, kan şekeri düşürücü ve kusturucu etkileri bulunan tedavi edici bir bitkidir (Feng ve diğ., 2015). Karaduttan hazırlanan ilaçların bademcik iltihabını gidermesi, ağız ve diş yaralarına iyi geldiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Aşkın ve diğ.,2022). Taze olarak ve kurutulularak tüketimi yapılmaktadır. Pekmez, meyve suyu, marmelat, pestil gibi gıda maddeleri yapımında kullanılmaktadır (Sern İkli ve Kadakal, 2020). Karadutta bulunan likopen miktarı $3,30 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$ 'dır (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.16. Karadut (*Morus nigra*) (URL-9)

2.6.9. Kuşburnu (*Rosa canina* L.)

Kuşburnu, Gülgiller (Rosaceae) familyasına ait çalı formunda, kışın yaprağını döken bir bitki ürünüdür (Şekil 2.17). Anavatanı Batı Asya, Anadolu, Kuzey ve Orta Avrupa'dır. C, P, A, B1, B2, E ve K vitaminleri bakımından oldukça zengindir. Anti inflamatuvar etkisinin yanı sıra likopen de içeren bitkisel bir besin kaynağıdır. Osteoartrit, romatoid artrit ve kanser dahil olmak üzere bazı hastalıklarda koruyucu etkileri bulunmaktadır. Çay, pekmez, marmelat, meyve suyu ve yağ yapımında kullanılmaktadır. Kuşburnu yağının kırışıklık önleyici, doku iyileştirici, hücre yenileyici özellikleri bulunmaktadır (Öz ve diğ., 2018). Kuşburnunun likopen içeriği 129 -359 µg/g'dır (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.17. Kuşburnu (*Rosa canina*) (URL-10)

2.6.10. Kızılcık (*Cornus mas* L.)

Kızılcık, Kızılcıkgiller (Cornaceae) familyasından bir bitki ürünüdür (Şekil 2.18). Ülkemizde özellikle sahil yerlerinde, dağlık ve ormanlık alanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Genellikle Karadeniz bölgesinin batı ve orta kesimlerindeki ormanların içinde yetişir. C vitamini ve önemli miktarda antioksidan etkilere sahip olan antosiyaninler bakımından oldukça zengindir. Taze olarak veya kurutulularak tüketimi yapılmaktadır. Reçel, marmelat, meyve suyu ve şarap yapımında kullanılmaktadır (Yalım Kaya ve Canlı 2019). Kızılcıkta bulunan likopen miktarı 4,86 µg/g'dır (Karataş ve Çöteli., 2016).



Şekil 2.18. Kızılcık (*Cornus mas*) (URL-11)

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

Deney çalışmalarında kullanılan kimyasallar genel olarak Merck (Almanya), Sigma (Almanya) ve Biolife (Türkiye) firmalarından satın alındı. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi'nde (SDS-PAGE) kullanılan markör ise Euroclone firmasından satın alındı. SDS-PAGE'de Biorad markasına ait Mini-PROTEAN sistemi kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümler, sıcaklık kontrollü Cary60 UV-VIS (Agilent) spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirildi.

3.2. Meyve Örneklerinin Temini

Meyve örnekleri (karpuz, kırmızı biber, kan portakalı, nar, incir, greyfurt, kudret narı, karadut, kuşburnu ve kıvılcık) Kocaeli ve Bursa İllerindeki çeşitli halk pazarlarından ve marketlerden satın alındı. Meyve örneklerinin yaygın olarak kullanılan kısımları yıkayıp -80°C'de muhafaza edildi.

3.3. Meyve Ham Ekstraktlarının Hazırlanması

Tüm meyveler için 200 gram taze meyve tartıldı ve blender ile ezilerek homojenize edildi. Püre haline gelen meyvelerden 15'er gram tartılarak falcon tüpleri içerisine ayrı ayrı konuldu. Üzerlerine 0,1 M sodyum fosfat tamponundan (pH 7,0) 15 mL eklendi. Bu aşamadan sonra her Falcon için ayrı ekstraksiyon ortamı kullanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm meyveler 14 farklı ekstraksiyon ortamına tabi tutuldu (Tablo 3.1). Ekstraksiyon veriminin artması için kullanılan kimyasallar polivinilpolipirrolidon (PVPP) (%1, w/v), askorbik asit (10 mM), Triton X-100 (%1, v/v), fenilmetilsülfonil florür (PMSF) (2 mM), polietilen glikol (PEG6000, %0,5, w/v) ve dipotasyum fosfattır (50 mM). PVPP ve askorbik asit ortamda bulunan fenolik bileşikleri uzaklaştırmak ya da indirmek için kullanılırken, Triton X-100 zara bağlı olan enzimi çözmek için ekstraksiyon sırasında karışıma eklendi. PMSF, enzim aktivitesini arttırmak için tercih edilirken PEG 6000 PPO'yu inhibe edebilecek özelliğe sahip fenollerini temizlemek amacıyla kullanıldı (Gauillard ve Rich-Forget 1997; Palma-Orozco ve diğ., 2011; Erzenin, 2009).

Hazırlanan solüsyon 1 dk boyunca vortekslendi. Elde edilen homojenat 20 dk 4°C'de bekletildi ve ardından soğukta 10000xg'de de 30 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası

karişım süzülerek altta kalan pelet kısım uzaklaştırılırken üstte kalan sıvı kısımdan ham enzim ekstraktı elde edildi (Navarro ve diğ., 2014).

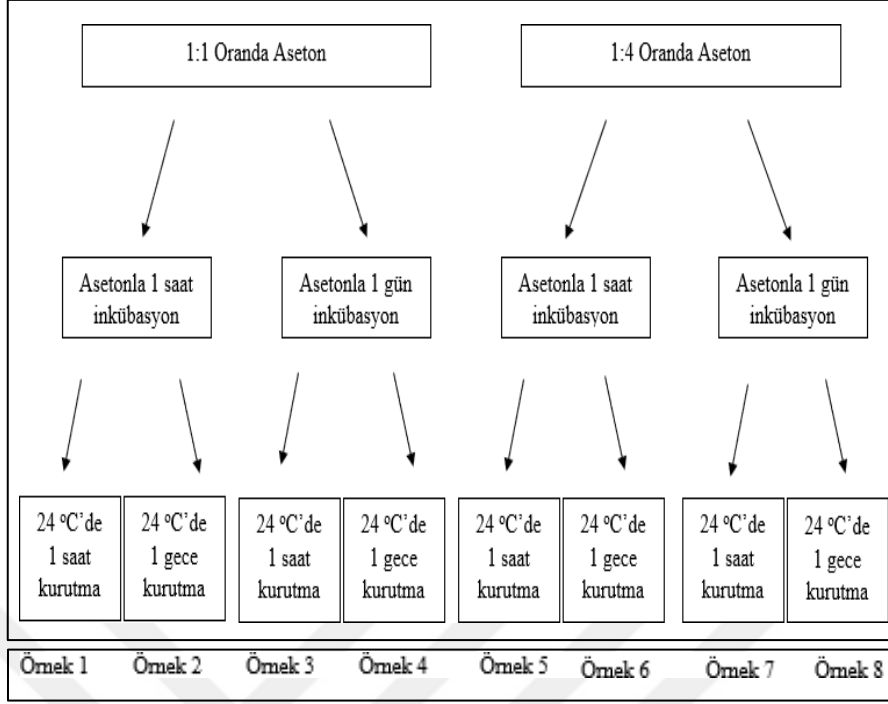
Tablo 3.1. Meyvelerden polifenol oksidaz içeren ham ekstraktların hazırlanmasında kullanılan ekstraksiyon ortamları

| Ekstraksiyon No | Ekstraksiyon Ortam İçeriği* |
|-----------------|--|
| 1 | Sodyum fosfat tamponu |
| 2 | Sodyum fosfat tamponu + PVPP + Triton X-100 |
| 3 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit+ PVPP+ PMSF+ Triton X-100 |
| 4 | Sodyum fosfat tamponu +PVPP |
| 5 | Sodyum fosfat tamponu + Triton X-100 |
| 6 | Sodyum fosfat tamponu + PVPP + PMSF + Triton X-100 |
| 7 | Sodyum fosfat tamponu + PMSF + Triton X-100 |
| 8 | Sodyum fosfat tamponu + PVPP + PMSF |
| 9 | Sodyum fosfat tamponu + PMSF |
| 10 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit |
| 11 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit + Triton X-100 |
| 12 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit + PMSF + Triton X-100 |
| 13 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit + PMSF |
| 14 | Sodyum fosfat tamponu + Askorbik asit + PEG 6000 + K ₂ HPO ₄ |

*Sodyum fosfat tamponu: 100 mM, pH 7,0; Askorbik asit: 10 mM; Triton-X 100: %1, v/v; PMSF: 2 mM; PVPP: %0,1, w/v; PEG6000: %0,5, w/v; K₂HPO₄: 50 mM

3.4. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Saflaştırılması

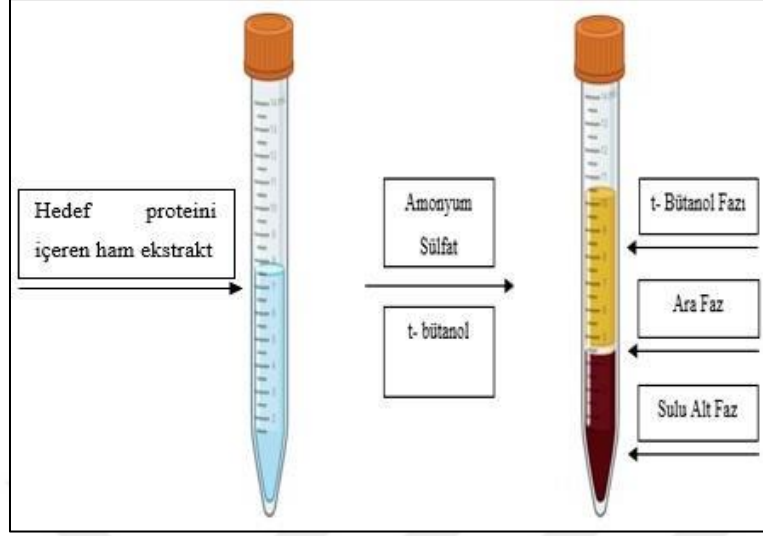
Bölüm 3.3’de verilen metoda göre hazırlanan ham ekstrakt örneklerinden en yüksek polifenol oksidaz enzim içeriğine sahip ham ekstrakta (karaduttan hazırlanan örnek), önce aseton ile çöktürme, ardından üçlü faz ayırma (three-phase partitioning, TPP) yöntemi uygulandı. Bunun için öncelikle 20 mL ham ekstrakt çözeltisi 1:1 ve 1:4 oranda soğuk asetonla 1 saat ve 1 gece olmak üzere -20°C’de inkübasyona bırakıldı (Tao ve diğ., 2013). İnkübasyon sonrası 4°C’de 10000xg’de 20 dk santrifüj edilerek çöktürme işlemi uygulandı. Ardından oluşan pelet oda sıcaklığında (24°C’de) 1 saat ve 1 gece olmak üzere kurumaya bırakıldı (Wong ve diğ., 1970). Aseton öktürme işleminde kullanılan deneme deseni Şekil 3.1’de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Aseton ile çöktürme işlemi sırasında kullanılan deneme deseni

Kuruyan örneklere (Örnek 1 - 8) 12 mL sodyum fosfat tamponu (0,1 M; pH 7,0) eklenerek 1 dk vortekslendi. Hazırlanan solüsyonlardan alınan 2 mL ham enzim ekstraktı, üçlü faz ayırma (TPP) sisteminde kullanıldı. Bunun için, örneklere %20 ila %70 arasında değişen konsantrasyonlarda (%20, %30, %40, %50, %60 ve %70 w/v) amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) eklenerek tamamen çözülünceye kadar vortekslendi. Ardından elde edilen bu karışıma farklı ham enzim ekstakt:t-bütanol oranları (1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0 v/v) olacak şekilde t-bütanol eklemesi yapıldı. Elde edilen karışım 1 dk daha vortekslendi ve sonrasında oda sıcaklığında (24°C'de) 60 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Şekil 2.2'de gösterilen faz ayırımı için 4500xg'de 10 dk santrifüjlenerek üç fazın ayırımı (üst faz: t-bütanolce zengin, ara faz: proteince zengin, alt faz: amonyum sülfatça zengin) gözetildi (Duman ve Kaya, 2014; Alici ve Arabaci, 2016). TPP sonrası beliren orta fazlar 2 mL sodyum fosfat tamponu (0,1 M; pH 7,0) içerisinde çözüldükten sonra orta ve alt fazlarda (tuzlu ortam) polifenol oksidaz aktivite ve protein miktar tayinleri yapıldı. Protein olmasının beklenmediği t-bütanol içeren üst faz bir pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı. TPP'de biyomoleküllerin ayrılmasında seçici olarak rol oynayan parametrelerin (amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:t- bütanol oranı, sistem pH'sı) optimizasyonu ayrıca yapıldı. Ham ekstrakt aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Kontrol için amonyum sülfat, distile su ve t-bütanolden (ham ekstrakt içermeyen) oluşan

“kör” sistem kullanıldı.



Şekil 3.2. Üçlü-Faz (TPP) oluşum aşamaları (BioRender ile oluşturuldu)

Saflaştırma verimi analizinde aşağıda verilen saflaştırma parametreleri hesaplandı ve bu hesaplamalar denklem 3.1, 3.2 ve 3.3'te belirtildi (Ülgüt, 2022).

$$\text{Spesifik aktivite } \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Toplam enzim aktivitesi}}{\text{Toplam protein miktarı}} \quad (3.1)$$

$$\text{Saflaştırma katsayısı} = \frac{\text{Bir fazdaki enzim spesifik aktivitesi}}{\text{Ham ekstrakt spesifik aktivite}} \quad (3.2)$$

$$\text{Aktivite geri kazanım (\%)} = \frac{\text{Bir fazda ölçülen enzim aktivitesi}}{\text{Ham ekstrakt enzim aktivitesi}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.5. Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivite Tayini

PPO enziminin varlığını tespit etmek için 420 nm'de (24 °C) absorbans artışı spektrofotometre (Cary 60, Agilent) kullanılarak ölçüldü. Enzim aktivitesini ölçmek için, örnek küvet 2800 µL sodyum fosfat tamponunda (100 mM, pH 7,0) hazırlanan substrat (katekol) çözeltisi, 200 µL enzim süspansiyonu eklenerek hazırlandı ve kontrol küveti aynı şekilde ancak enzim olmadan hazırlandı. Enzim çözeltisi 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) kullanılarak elde edildi (Erzengin, 2009). Bir ünite enzim, oda sıcaklığında bir dakikada 1 µmol kinon oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır. Enzim aktivite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Ek-A'da verilmiştir.

3.6. Protein Miktar Tayini

Bradford metodu örneklerin protein miktarını belirlemek için kullanıldı (Bradford, 1976). Sığır serum albümini (BSA), standart protein grafiğinin çizilmesinde (Ek-B) kullanılarak 595 nm'de örneklerin protein miktarı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (Erzengin, 2009).

3.7. PPO Enziminin Karakterizasyonu

3.7.1. Molekül Ağırlığının Hesaplanması

TPP sonrası ara fazda gözlenen PPO enziminin saflığını kontrol etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) analizi yapıldı. Bunun için örnekler 15-20 dk 100 °C kaynatılarak denatüre edildi. Daha sonra %0,1 (w/v) SDS içeren %15'lik (w/v) ayırma ve %5'lik (w/v) yükleme jellerinde yürütüldü (Laemmli, 1970). Yürütülen örnekler gümüş boyama metodu kullanılarak boyandı. Molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik Ek-C'de, kullanılan çözeltilerin hazırlanması Ek-A'da verilmiştir.

3.7.2. Gümüş Boyama

Gümüş boyama metodu, Coomassie Brilliant Blue R250 boyasına göre daha yüksek hassasiyet göstermesi sebebiyle uygulandı. Bu teknik ile bant başına 0,1 ng proteine kadar düşük proteinlerin tespiti sağlanmaktadır. Bu boyama ile bazik proteinler asidik proteinlere göre daha verimli bir şekilde boyanmaktadır. Buna göre SDS içeren, %15'lik ayırma (w/v) ve %5'lik (w/v) yükleme jelleri hazırlandı ve örnekler 200 V'da 45 dk yürütüldü (Kaptan, 2004). Yürütme sonrasında jel önce %50 etanol, %12 asetik asit ve %0,05 formaldehit (%37) içeren solüsyon içerisinde 1 gece bekletildi. Solüsyon içerisinde bekletilen jel 3 kez 20'şer dk olacak şekilde %50 etanol ile yıkandı ve %0,02 sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ile 1 dk bekletildi. Sodyum tiyosülfat ile bekleyen jel 3 kez 20 sn olacak şekilde dH_2O ile durulandı. Ardından %0,2 gümüş nitrat (AgNO_3) ve %0,075 formaldehit (%37) içeren solüsyon içerisinde +4 °C'de 20 dk bekletildi. Solüsyon içerisinde bekletilen jel 2 kez 20 sn olacak şekilde dH_2O ile tekrar durulandı. Jel daha sonra %6 sodyum karbonat (Na_2CO_3), %0,05 formaldehit (%37) ve %0,4 mg sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) içeren solüsyon içerisinde bant görünümü oluşuncaya kadar bekletildi. Bant oluşumu gözlemlendiğinde boyamayı durdurmak amacıyla %50 metanol ve

%12 asetik asit içeren solüsyon ile yıkandı. En son olarak jel %50 metanol içeren solüsyon içerisinde saklandı. Tüm çözeltiler için dH₂O kullanıldı ve tiyosülfat içeren çözeltiler hassas bir boyama yapabilmek için taze olarak hazırlandı (Blum ve diğ., 1987).

3.7.3. Sıcaklık ve pH'nın Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sıcaklıktaki değişikliklerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek için, enzim ve substrat çözeltileri (substratlar: 10 mM katekol, 4-metilkatekol (4-MC), 4-tertbütilkatekol (4-BC) ve pirogallol) kullanılarak 30 °C ile 90 °C arasında farklı sıcaklıklara ayarlanmış spektrofotometrede ölçümleri yapıldı (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Termostabilite analizi için, enzim örnekleri 30 °C ile 90 °C arasında farklı sıcaklıklara (30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C) ayarlanmış su banyosunda 1 saat bekletildi. Seçilen bir sıcaklıkta inkübe edilen enzimden her 15 dakikada bir belirli bir miktar alınarak buzda soğutuldu ve enzim aktivitesi belirlendi. Yüzde bağıl aktivite, farklı sıcaklıklardaki enzim aktivitesinin maksimum enzim aktivitesine bölünerek 100 ile çarpılmasına eşittir. Enzimin yüzde kalan aktiviteyi, ısı işlem sonrası enzim aktivitesinin ısı işlem öncesi enzim aktivitesine bölünmesi ve 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

Farklı pH'ların PPO aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için, enzim aktivitesi substrat olarak 10 mM katekol, 4-metilkatekol (4-MC), 4-tertbütilkatekol (4-BC) ve pirogallol kullanılarak 3,0 ila 10,0 arasında değişen farklı pH'larda ölçüldü. pH 3,0-5,0 reaksiyonları için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6,0 ila 7,0 için 100 mM sodyumfosfat tampon çözeltisi, pH 8,0 için 100 mM tris tampon çözeltisi ve pH 9,0-10,0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanıldı. PPO aktivite ölçümleri, pH'nın enzim stabilitesi üzerine etkisini test etmek amacıyla enzim örnekleri pH 3,0-10,0 aralığında (3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 ve 10,0) hazırlanan tampon çözeltilerde 4 °C'de 2 saat bekletilerek yapıldı (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Yüzde bağıl ve kalan aktivite değerleri yukarıda açıklandığı gibi hesaplandı.

3.7.4. Substrat Spesifite Analizi

TPP-ile saflaştırılan enzim örneğinin PPO enzim grubunda olan lakkaz, katekol oksidaz ve tirozinaz enzimlerinden hangisinin özelliklerini taşıdığını belirlemek için enzime özgü substratlar kullanıldı. Bunlar arasında guakol (lakkaz substratı, 465 nm), hidrokinon (lakkaz substratı, 440 nm), katekol (katekol oksidaz substratı, 420 nm), 4-MC (katekol

oksidaz substratı, 420 nm), 4-BC (katekol oksidaz substratı, 410 nm), pirogallol (katekol oksidaz substratı, 475 nm), kafeik asit (katekol oksidaz substratı, 420 nm) ve L-tirozin (tirozinaz substratı, 475 nm) bulunmaktadır. Enzim aktivite deneyleri, sadece substrat değiştirilerek PPO aktivitesi için yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Kinetik parametreleri hesaplamak için katekol substratı 1 mM ila 170 mM konsantrasyon aralığında kullanıldı. Kinetik sabitler Sigmaplot 14.0 (Systat Software Inc.) kullanılarak v vs $[S]$ izlerinin Michaelis-Menten denklemiyle elde edildi (Lineweaver ve Burk, 1934). Tüm analizler sıcaklık kontrollü spektrofotometre (Agilent Cary60) kullanılarak 24 °C'de 100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7,0 içinde üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

3.7.5. İnhibitör Analizi

Askorbik asit, benzoik asit, kojik asit, *p*-kumarik asit, tiyoüre, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), glisin ve β -merkaptolanol gibi kimyasalların inhibitör etkisi karadut PPO'su üzerinde test edildi. Enzim deneyleri standart deney koşulları altında üç substrat, katekol, 4-BC ve 4-MC kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına eklenen inhibitör konsantrasyonları 0,1 ve 5 mM'dır. Yüzde inhibisyon değeri denklem 3.4'e göre hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = \left[1 - \left(\frac{\text{inhibitör varlığında ölçülen PPO aktivite değeri}}{\text{inhibitör yokluğunda ölçülen PPO aktivite değeri}} \right) \right] \times 100 \quad (3.4)$$

3.7.6. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının (CaCl_2 , ZnSO_4 , NiSO_4 , NaCl , MnSO_4 , MgSO_4 , KCl , FeSO_4 ve CuSO_4) PPO aktivitesi üzerine etkisi, substrat olarak katekol, 4-BC ve 4-MC kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0,1 ve 5 mM) her metal iyonunun varlığında enzim aktivitesi ölçülerek incelendi (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Kör küvete substrat ve metal iyonu dahil edildi; ancak enzim çözeltisi dahil edilmedi. Yüzde bağıl aktivite değeri, metal iyonu varlığında ölçülen enzim aktivitesinin metal iyonu olmadan ölçülen enzim aktivitesine bölünmesi ve 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Kaynağı olarak Likopence Zengin Meyvenin Seçimi

Likopen çok güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra anti-kanser özellik de göstermektedir. Ayrıca ısıya dayanıklı bir pigmenttir (Rao ve diğ., 1998; Li ve diğ., 2020; Marzocco ve diğ., 2021; Khongthaw ve diğ., 2022; Kulawik ve diğ., 2023). Buradan yola çıkarak bu çalışmada hem güçlü bir antioksidan olması hem de ısıya dayanıklı olması sebebiyle likopen içeriği yüksek meyveler (karpuz, biber, kan portakalı, nar, incir, greyfurt, kudret narı, karadut, kuşburnu ve kıvılcık), endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere PPO kaynağı olarak test edildi.

Yöntemler bölümünde açıklanan şekilde meyvelerden farklı ekstraksiyon ortamları hazırlanarak elde edilen ekstraktlardan PPO aktivite ölçümleri yapıldı. Tablo 4.1’de gösterildiği gibi likopen miktarı en yüksek olan (261.0 + 60.2 µg/g) kudret narında PPO aktivitesi ölçülen 3 farklı metotta da düşük aktivite gösterdi. Aynı şekilde likopen içeriği yüksek olan kuşburnu meyvesinde de (129 -359 µg/g) PPO aktivitesi ölçülen tek metotta düşük aktivite gösterdi. Bunlara karşın likopen içeriği bakımından daha düşük olan karadut meyvesinde (3,30 ± 0,36 µg/g) ise en yüksek PPO aktivitesi hazırlanan 14 numaralı ekstraksiyon ortamından (0,1 M Sodyum fosfat tamponu pH 7,0; %0,5 PEG 6000; 10 mM askorbik asit; 50 mM K₂HPO₄) elde edilen ham ekstrakt örneğinde ölçüldü. Bu sonuçlara göre likopen içeriğinin PPO aktivitesini etkilemediği gözlemlendi.

Tablo 4.1. Likopence zengin meyvelerin farklı ekstraksiyon ortamlarından elde edilen özütlerdeki PPO aktivitelerinin karşılaştırılması

| Meyve | PPO Aktivite (U/mL) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---------------------|-----|----|----|-----|------|----|-----|----|------|------|----|----|----|
| | Ekstraksiyon No | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| Karpuz | 83 | - | - | - | - | - | - | - | 85 | 60 | - | - | 85 | - |
| Biber | 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | - | - | 13 | - |
| Kan portakalı | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 99 | - | - |
| Nar | - | 42 | 14 | 28 | 106 | 40 | 29 | 23 | 8 | - | 33 | 13 | - | - |
| İncir | 120 | - | - | - | - | - | - | - | 91 | - | - | - | 60 | - |
| Greyfurt | - | - | - | - | - | 1135 | - | - | - | 1019 | 1774 | - | - | - |
| Kudret narı | 88 | - | - | - | - | 95 | - | - | - | - | 116 | - | - | - |
| Karadut | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 37 |
| | | | | | | | | | | | | | | 53 |
| Kuşburnu | - | 455 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Kıvılcık | - | - | - | 41 | - | 66 | - | 123 | - | - | - | - | - | - |

-: Aktivite gözlenmedi. Denemeler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Değerler ortalama ±SD olarak sunuldu.

Yapılan çalışmada PPO aktivitesi 6,10 ve 11 numaralı metotlarda da yüksek aktivite gösterdi. Ekstraksiyon ortamlarında PVPP ve askorbik asit genellikle tercih edilmektedir. Kullanılan bu metotlarda da PVPP ve askorbik asit ortamda bulunan fenolik bileşikleri uzaklaştırmak için, Triton-X 100 zara bağlı olan enzimi zardan çözmek için, PMSF PPO enzim aktivitesini arttırmak için, PEG6000 ise PPO'yu etkisiz hale getirebilecek fenoller bağlamak için kullanıldı (Gauillard ve Rich-Forget 1997; Erzengin, 2009;Palma -Orozco ve diğ., 2011). Literatürde Kudüs enginarı (*Helianthus tuberosus*) (Ziyan ve Pekyardımcı, 2003) ile yapılan çalışmada PPO'nun ekstraksiyonu 0,2 M fosfat tamponu (pH 7.2), % 10 PEG ve 50 mM askorbik asit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde Borago (*Trachystemon orientalis*) (Alici ve Arabaci, 2016) ile yapılan çalışmada 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM Askorbik asit, % 0,5 PVPP ve % 2 Triton X-100 kullanılarak PPO enzim ekstraksiyonu yapılmıştır.

Yukarıda da belirtildiği gibi, en yüksek PPO aktivitesi karadut meyvesinden 14 numaralı ekstraksiyon ortamında ölçüldü. Bu ekstraksiyonda kullanılan kimyasallar Askorbik asit, PEG 6000 ve K₂HPO₄'tür. Literatürde Beyaz dut (*Morus alba*) (Erzengin, 2002) ile yapılan çalışmada 0,5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,3), %0,5 PEG 6000, 10 mM askorbik asit ve 50 mM K₂HPO₄ kullanılarak benzer şekilde PPO ekstraksiyonu yapılmıştır. Iğdır kayısı (*Prunus armeniaca L.*) (Demir ve diğ., 2012) ile yapılan ekstraksiyonda ise 0,5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,3) ile %0,5 PEG kullanılmış ve 567 U/mL enzim aktivitesi bulunmuştur.

En yüksek PPO aktivite değeri (**3753 U/mL**), karadut meyvesinden elde edilen 14 numaralı ekstraksiyonla ölçüldüğü için bundan sonraki PPO saflaştırma ve karakterizasyon denemelerinde bu yöntem ile hazırlanan ham enzim çözeltisi kullanıldı.

4.2.Karaduttan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması

Karadut meyvesinden Bölüm 3.3'de açıklanan şekilde ekstraksiyonla elde edilen ham enzim ekstraktı (3753 U/mL), önce aseton çöktürme işlemi ardından üçlü faz ayırma sistemi kullanılarak ham enzim ekstraktından PPO enzimi iki adımda saflaştırıldı.

4.2.1. Aseton Çöktürme

Şekil 3.1'de gösterilen deneme deseni kullanarak hazırlanan 8 farklı örnekte yapılan

aktivite ölçümleri ve protein miktar analizleri sonunda her bir örnek için saflaştırma parametreleri belirlendi. Tablo 4.2'ye göre Örnek 1, 2, 5 ve 6'da enzimin saflaşmadığı gözlemlendi. Saflaştırma katsayısının 1'in üzerinde olduğu hesaplanan diğer örnekler arasında Örnek 3, 4 ve 8'de aktivite geri kazanım değerleri %100'ün üzerinde bulundu. Örnek 3 ve 4'te saflaştırma katsayılarının birbirine çok yakın olması ve aktivite geri kazanım değerinin Örnek 3'te daha yüksek (%124) olduğunun belirlenmesi üzerine bir sonraki saflaştırma basamağında Örnek 3 kullanıldı.

Tablo 4.2. Aseton çöktürme optimizasyonu

| Örnek No | Spesifik aktivite (U/mg) | Toplam aktivite (U) | Toplam protein (mg) | Saflaştırma katsayısı | % Aktivite geri kazanım | |
|----------|---|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------|
| 1 | Aseton çöktürme süreci 1:1 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 saat inkübasyon→24 °C'de 1 saat kurutma | 869±43 | 6333±317 | 7±0,4 | 0,4±0,02 | 51±3 |
| 2 | 1:1 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 saat inkübasyon→24 °C'de 1 gece kurutma | 652±33 | 680±34 | 1±0,05 | 0,3±0,02 | 5±0,3 |
| 3 | 1:1 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 gün inkübasyon→24 °C'de 1 saat kurutma | 2399±120 | 15423±771 | 6±0,3 | 1,1±0,06 | 124±6 |
| 4 | 1:1 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 gün inkübasyon→24 °C'de 1 gece kurutma | 1492±75 | 14457±723 | 10±0,5 | 1,3±0,07 | 117±5 |
| 5 | 1:4 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 saat inkübasyon→24 °C'de 1 saat kurutma | 2902±145 | 11590±580 | 4±0,2 | 0,7±0,04 | 93±5 |
| 6 | 1:4 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 saat inkübasyon→24 °C'de 1 gece kurutma | 938±2 | 6342±317 | 7±0,4 | 0,4±0,02 | 51±3 |
| 7 | 1:4 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 gün inkübasyon→24 °C'de 1 saat kurutma | 2225±111 | 20491±1025 | 9±0,5 | 1,0±0,05 | 165±8 |
| 8 | 1:1 oranında hazırlanmış aseton içeren çözeltide 1 gün inkübasyon→24 °C'de 1 gece kurutma | 2589±129 | 9853±493 | 4±0,2 | 1,1±0,06 | 79±4 |

*Karadut ham ekstraktının spesifik aktivitesi 2190 U/mg ve toplam protein miktarı 6 mg'dır. Denemeler oda sıcaklığında ve pH 7,0'da üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Değerler ortalama ±SD olarak sunuldu

Aseton gibi organik çözücü ile yapılan saflaştırmada, zara bağlı enzimler çözünmektedir. Çözücü yüzdesindeki değişim, farklı protein türlerinin ayrılması için de kullanılmaktadır (Panadere ve Rathod, 2018). Literatürde şeftali meyvesinde aseton çöktürme ile yapılan

saflaştırmada aktivitede 20 kat daha fazla artış gözlemlenmiştir (Flurkey ve Jen, 1978).

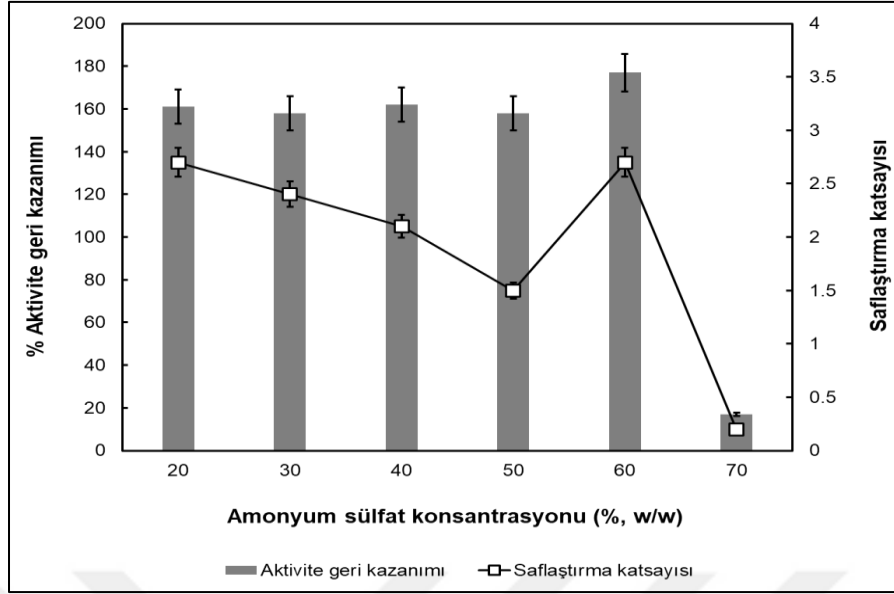
4.2.2. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi

PPO enziminin saflaştırılması için aseton çöktürme sonrası biyomoleküllerin tek bir adımda hızlı ve verimli bir şekilde saflaştırılmasını sağlayan üç fazlı ayırma (TPP) tekniği kullanıldı. TPP'nin PPO saflaştırması için en iyi teknik olmasının nedenleri arasında sistemin kullanımının kolay, çevre dostu, ekonomik olması ve geleneksel kromatografi tekniklerine göre daha az çözücü gerektirmesi sayılabilir. Enzim ekstraksiyonu için modern bir teknik olmasına rağmen, TPP yoluyla PPO saflaştırma çalışmaları oldukça sınırlıdır (Panadare ve Rathod, 2018).

TPP ile PPO enziminin yüksek verimde saflaştırılması için amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt: t-bütanol oranı ve sistem pH'sı ayrıca optimize edildi.

4.2.2.1. Amonyum Sülfat (NH₄)₂SO₄ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) konsantrasyonu, protein çözünlüğünü doğrudan etkilediği için TPP sistemlerindeki kritik parametrelerden biridir. (NH₄)₂SO₄ protein-protein etkileşimlerini kolaylaştırdığından ve protein çökmesine neden olduğundan, hedef proteinin maksimum geri kazanımını elde etmek için konsantrasyonunu optimize etmek gerekir. Birçok raporda (Chew ve diğ., 2019) tavsiye edilen bir konsantrasyon olan %20 (w/w) (NH₄)₂SO₄ kullanılarak denemeler başlatıldı ve %70 (w/w)'e kadar değişen konsantrasyonlar denendi. şekil 4.1 (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonunun %60 (w/w) doygunluğa çıkarılmasının, salting-out etkisiyle saflaştırma katsayısını ve aktivite geri kazanımını arttırdığını göstermektedir. %60 (w/w) (NH₄)₂SO₄ kullanımı en yüksek saflaştırma katsayısı (2,7 kat) ve en yüksek aktivite geri kazanımı (%177) ile sonuşlandı. Bununla birlikte, daha yüksek amonyum sülfat konsantrasyonlarında saflaştırma parametrelerinde görülen düşüşler, daha yüksek tuz konsantrasyonlarında kalıcı protein denatürasyonundan kaynaklı olabilir (Yüzüğüllü Karkuş ve diğ., 2020). Maksimum PPO saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanımı %60 (w/w) (NH₄)₂SO₄ varlığında elde edildiğinden, sonraki deneylerde bu konsantrasyon kullanıldı.



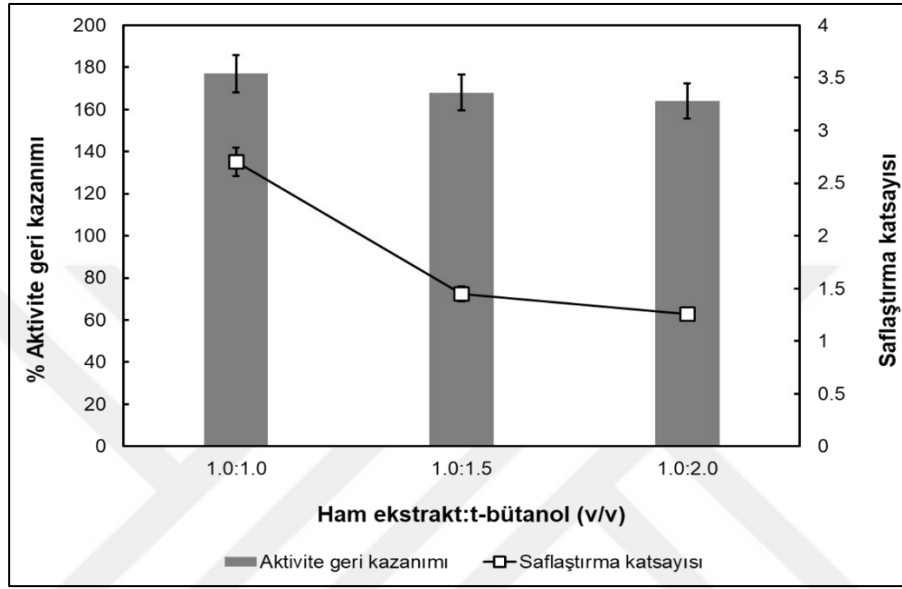
Şekil 4.1. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında (w/w) hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları. TPP deneyleri için, 7506 U toplam aktivite ve 3,75 mg protein içeren 2 mL ham enzim ekstraktı kullanıldı. Ham ekstrakt, %20-70 (w/w) arasında değişen konsantrasyonlarda amonyum sülfat ile konsantre edildi ve ardından eşit hacimde t-bütanol eklendi. Denemeler oda sıcaklığında ve pH 7,0'da üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Değerler ortalama \pm SD olarak sunuldu.

Literatürde proteinlerin TPP kullanılarak saflaştırılmasında %0-80 (w/v) kullanıldığı örnekler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları mürdüm eriği (*Prunus domestica*; Yıldız ve diğ., 2022), Avokado (*Persea americana*; Alishah ve diğ., 2022) ve Barbados kirazı (*Malpighia glabra*; Kumar ve diğ., 2008)'dir.

4.2.2.2. Ham Enzim Ekstrakt:t-Bütanol Oranının Belirlenmesi

t-Bütanolün TPP sistemleri için en iyi polar olmayan ajan olduğu düşünülmektedir çünkü proteinler üzerinde denatüre edici etkisi yoktur. Düşük miktarlardaki t-bütanol, amonyum sülfat ile sinerjik bir etki yaratmak için yetersiz kalabilirken, daha yüksek konsantrasyonların çözeltinin artan viskozitesi nedeniyle moleküller arası etkileşimleri engellemesi muhtemeldir. Bu nedenle, sisteme eklenen t-bütanol hacmi, etkili protein bölünmesini desteklemek için optimize edilmelidir (Chew ve diğ., 2019; Yan ve diğ., 2018). Daha önce yayınlanan raporlarda olduğu gibi, %60 (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varlığında 1,0:1,0 ila 1,0:2,0 (v/v) arasında değişen ham ekstrakt:t-bütanol oranları test edildi. Şekil

4.2'de gösterildiği gibi, en iyi sonuçlar 1:1 (v/v) ham ekstrakt:t-bütanol oranında gözlemlendi. Diğer taraftan, benzer aktivite geri kazanımları 1,0:1,5 ve 1,0:2,0 ekstrakt:t-bütanol oranlarında elde edildi. Ancak saflaştırma katsayısı 1,0:1,0'den itibaren azalan bir profil sergiledi. Genel olarak, 1:1 (v/v) oranının TPP'yi verimli bir şekilde gerçekleştirmek için optimum oran olduğuna inanılmaktadır (Panadare ve Rathod, 2018).



Şekil 4.2. Farklı ham ekstrakt/ t-bütanol konsantrasyonlarında (v/v) hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları. %60'lık (w/w) (NH₄)₂SO₄ ile doyurulmuş ham enzim ekstraktına çeşitli hacimlerde t-bütanol eklendi. Denemeler oda sıcaklığında ve pH 7,0'da üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Değerler ± SD olarak sunuldu.

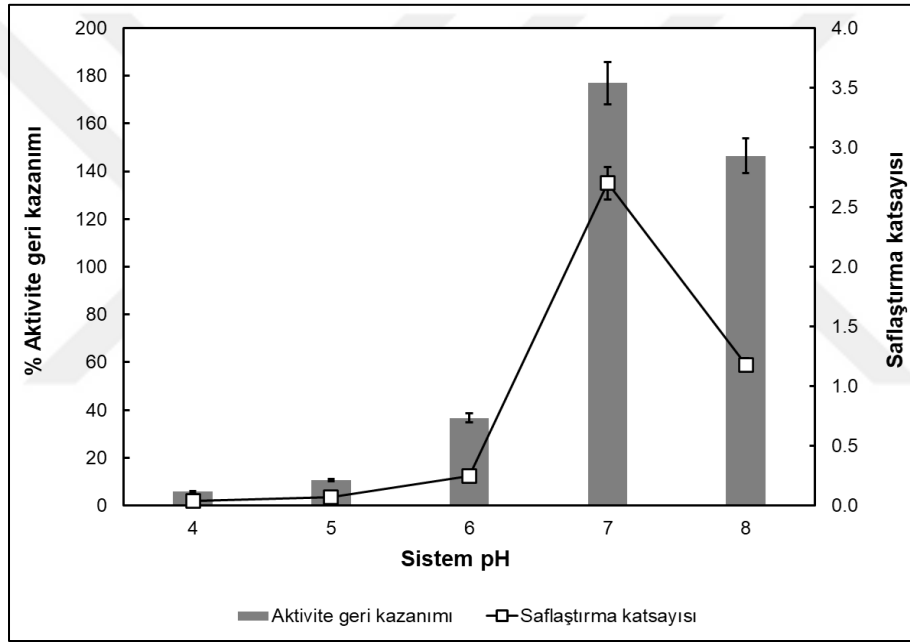
4.2.2.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Sistem pH'sının Belirlenmesi

TPP sisteminin pH'ı da hedef proteinin fazlara ayırımını etkiler. Çünkü pH'daki değişiklikler proteinlerdeki amino asitlerin iyonlaşmasına neden olur ve bu da fazlar ile proteinler arasındaki elektrostatik etkileşimleri etkiler. Sonuç olarak, ilgilenilen proteinin fazlardaki dağılımı değişebilir. TPP sistemlerinde hedef proteinin pI değerini bilmek çok önemlidir, çünkü proteinler spesifik pI değerlerinde çökme eğilimindedir (Chew ve diğ., 2019; Yan ve diğ., 2018).

Bu çalışmada, pH'nın PPO dağılımı üzerindeki etkisi, eşit hacimlerde ham enzim ekstraktı ve t-bütanol varlığında sabit bir amonyum sülfat konsantrasyonunda (%60, w/w) 4,0 ile 8,0 arasındaki pH değerlerinde incelendi. Sıcaklık ve çalkalama süresi de sabit tutuldu.

Şekil 4.3'de gösterildiği gibi, pH 7,0'da en yüksek saflaştırma (2,7 kat) ve en yüksek geri kazanım (%177) gözlemlendi. pH 7,0'ın altında saflaştırma katsayısı 1,0'den düşüktür, yani saflaştırma gerçekleşmemektedir. pH 8,0'da ise enzimin ara fazda dağılımı fazla olup saflaştırmadan söz edilebilir. Ancak pH 7,0'a göre saflaştırma katsayısı daha düşüktür.

TPP sırasında incelenen tüm parametrelerde enzim aktivitesi sırasında %100'ün üzerinde bir artış gözlemlendi. Enzim aktivitesindeki artış, enzim yapısının esnekliğinin artmasından kaynaklı olabilmektedir (Rather ve Gupta, 2013). TPP sırasında bu tür bir aktivasyon, invertaz, proteaz, amilaz, peroksidaz, lakkaz, katalaz, pektinaz, α -galaktosidaz ve tripsin inhibitörü dahil olmak üzere birçok enzim için yaygındır (Chew ve diğ., 2019).



Şekil 4.3. Farklı pH'lerde hazırlanan TPP sistemine ait ara faz sonuçları. Ham enzim ekstraktı %60 (w/w) amonyum sülfat ile konsantre edildikten sonra sistemin pH'ı pH 4,0'dan pH 8,0'a ayarlandı. Daha sonra eşit hacimde t-bütanol eklendi. Denemeler oda sıcaklığında üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Değerler ortalama \pm SD olarak sunuldu.

Bu çalışmada karadut PPO'su pH 7,0'da %60 (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 2 mL t-bütanol ile doyurulmuş 2 mL ham enzim ekstraktından oluşan bir TPP sistemi kullanılarak %177 aktivite geri kazanımı ile 2,7 kat başarılı bir şekilde saflaştırıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Karadut PPO'sunun TPP ile saflaştırma sonuçları

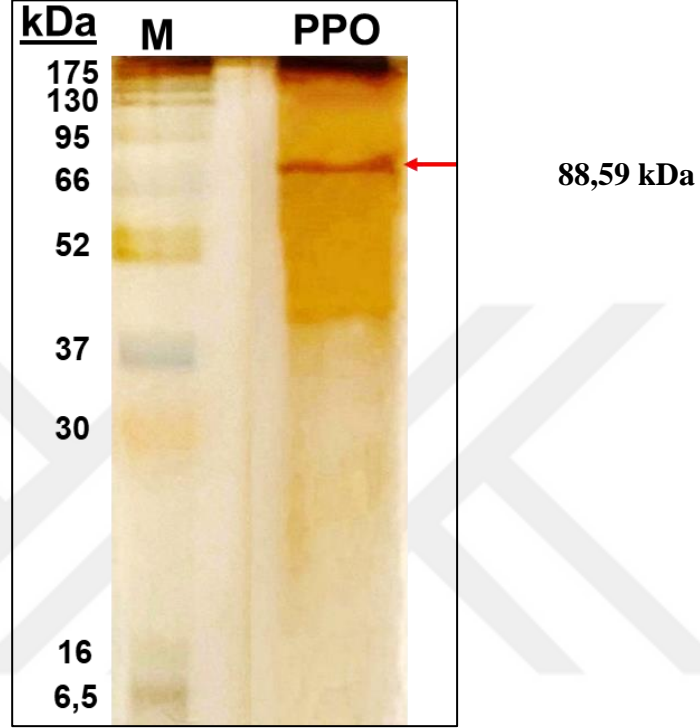
| | Spesifik Aktivite (U/mg) | Toplam Aktivite (U) | Toplam protein (mg) | Saflaştırma katsayısı | Enzim Geri Kazanımı % |
|---------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ham enzim ekstraktı | 2029±81 | 75061±1300 | 37±1 | 1,0 | 100 |
| Asetonla çöktürme | 3043±127 | 71308±3300 | 23±1 | 1,5±0,1 | 95±3 |
| TPP - Orta faz | 5478±191 | 132858±5979 | 24±1 | 2,7±0,2 | 177±10 |

*Değerler ortalama ±SD olarak sunuldu.

TPP aracılığıyla birçok enzimin başarılı bir şekilde saflaştırılması ve karakterize edilmesine ilişkin benzer raporlar literatürde yer almaktadır. Genel olarak, TPP sisteminin istenen proteinleri kromatografik yöntemlerden daha düşük saflaştırma değerleri ile sağlamasına rağmen, ilgilenilen proteinin sistemden aktivite geri kazanımının her zaman diğer tekniklerden daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Yukarıda verilen diğer avantajlarla (uygulamanın kolay ve düşük maliyetli olması, protein kaybını azaltması vb.) birlikte bu özellik, TPP sistemlerini endüstriyel enzimler için ideal hale getirmektedir (Chew ve diğ., 2019). Diğer taraftan, Öte yandan, polifenol oksidazların TPP ile saflaştırılmasına ilişkin literatürde sınırlı sayıda rapor bulunmaktadır (Panadare ve Rathod, 2018). Bugüne kadar TPP ile PPO saflaştırmasının sadece beş örneği rapor edilmiştir (Niphadkar ve diğ., 2015; Alici ve Arabaci, 2016; Saki ve diğ., 2018; Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2020; Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Niphadkar ve diğ. (2015) atık patates kabuğundan PPO'yu 4 °C'de saflaştırmak için TPP kullanmışlardır. 6,3 kat saflaştırma ve %70 aktivite geri kazanımı elde etmişlerdir (Niphadkar ve diğ., 2015). Başka bir çalışmada, hodan PPO'su, iki döngü TPP kullanılarak %68,75 aktivite geri kazanımı ile 3,59 kat saflaştırılmıştır (Alici ve Arabaci, 2016). Saki ve diğ. (2018) yenilebilir mantar *Lepiota procera*'dan PPO'yu alt sulu fazda geri kazanmışlardır. TPP ile 8,4 kat saflaştırma elde edilmiştir (Saki ve diğ., 2018). Yüzügüllü Karakuş ve diğ. (2020), TPP'yi kullanılarak biberiye PPO'sunu 14 kat saflaştırmışlar ve orta fazdan %230 oranında aktivite geri kazanımı sağlanmıştır. Başka bir çalışmada rezene PPO'su %120 aktivite geri kazanımı ile 20 kat saflaştırılmıştır (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021). Meyveye ait bir PPO enziminin TPP ile saflaştırılmasına ait ilk örnek ise bu çalışmadır.

4.3. SDS-PAGE Analizi

TPP ile saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflığının kontrolü SDS-PAGE ile gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası jel, bölüm 3.7.2.'de verildiği üzere gümüş boyama metodu ile boyandı. Jel görüntüsü şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Karadut meyvesinden saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. M: Euroclone molekül ağırlık standartları PPO: TPP sonrası polifenol oksidaz enzim preparatı (200 µg örnek uygulandı)

Literatürde birçok farklı meyveden elde edilen polifenol oksidazların moleküler ağırlıklarının genellikle 31 ila 144 kDa arasında olduğu bildirilmiştir (Panadare ve Rathod, 2018). Polifenol oksidaz enzimlerinin farklı meyve ve bitkilerden saflaştırılmış örneklerinin molekül ağırlıkları, yapıları ve kaynaktan kaynağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Tablo 4.4). Bazı durumlarda araştırmacılar tarafından saptanan birden fazla bandın, aynı kaynaktan farklı PPO formlarının varlığına işaret ettiği gözlemlenmektedir (Cheema ve Sommerhalter, 2015).

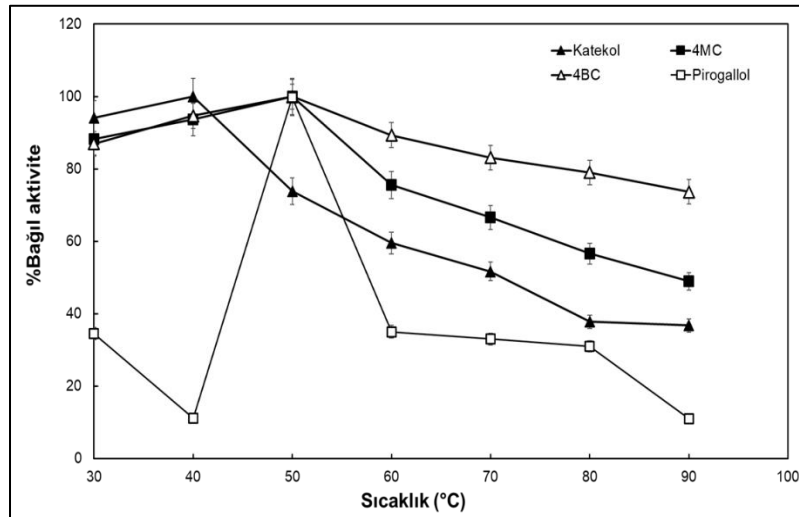
Tablo 4.4. Farklı kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların moleküler ağırlıkları

| Kaynak | Moleküler Ağırlık (kDa) | Referans |
|----------------|-------------------------|------------------------------|
| Mango | 53, 112 ve 144 | Cheema ve Sommerhalter, 2015 |
| Kayısı | 63 | Derardja ve diğ., 2017 |
| İğdir kayısı | 64,8 | Demir ve diğ., 2012 |
| Erik | 65 | Ioniță ve diğ., 2017 |
| Beyaz Dut | 66 | Arslan ve diğ., 2004 |
| Hodan | 80,6 | Alıcı ve Arabacı, 2016 |
| Tadela Hurması | 90 | Benaceur ve diğ., 2019 |

4.4. Karaduttan Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.4.1. Reaksiyon Sıcaklığının Karadut Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

Reaksiyon sıcaklığı, enzimin kinetik davranışını ve reaksiyon ortamındaki oksijen çözünürlüğünü etkileyen önemli bir parametredir. Karadut PPO enzimi için optimum sıcaklık, test edilen substratlardan katekol hariç diğer üç substratta 50°C olarak ölçülürken katekolde 40°C'dir (Şekil 4.5). Enzim 60°C'de katekol, 4MC, 4BC ve pirogallol için aktivitesinin sırasıyla %60, %76, %89 ve %35'ini korurken, 70°C'de enzim bu dört substrat için aktivitesinin sırasıyla %52, %67, %83 ve %33'ünü koruduğu gözlemlendi. 90°C'de bile 4BC'de enzim aktivitesinin %74'ünü korumaktadır; diğer substratlarda ise %11 ila %49'unu koruyabildi.



Şekil 4.5. Karaduttan saflaştırılan PPO aktivitesi üzerine reaksiyon sıcaklığının etkisi (4BC: 4-tert-bütilkatekol, 4MC: 4-metilkatekol)

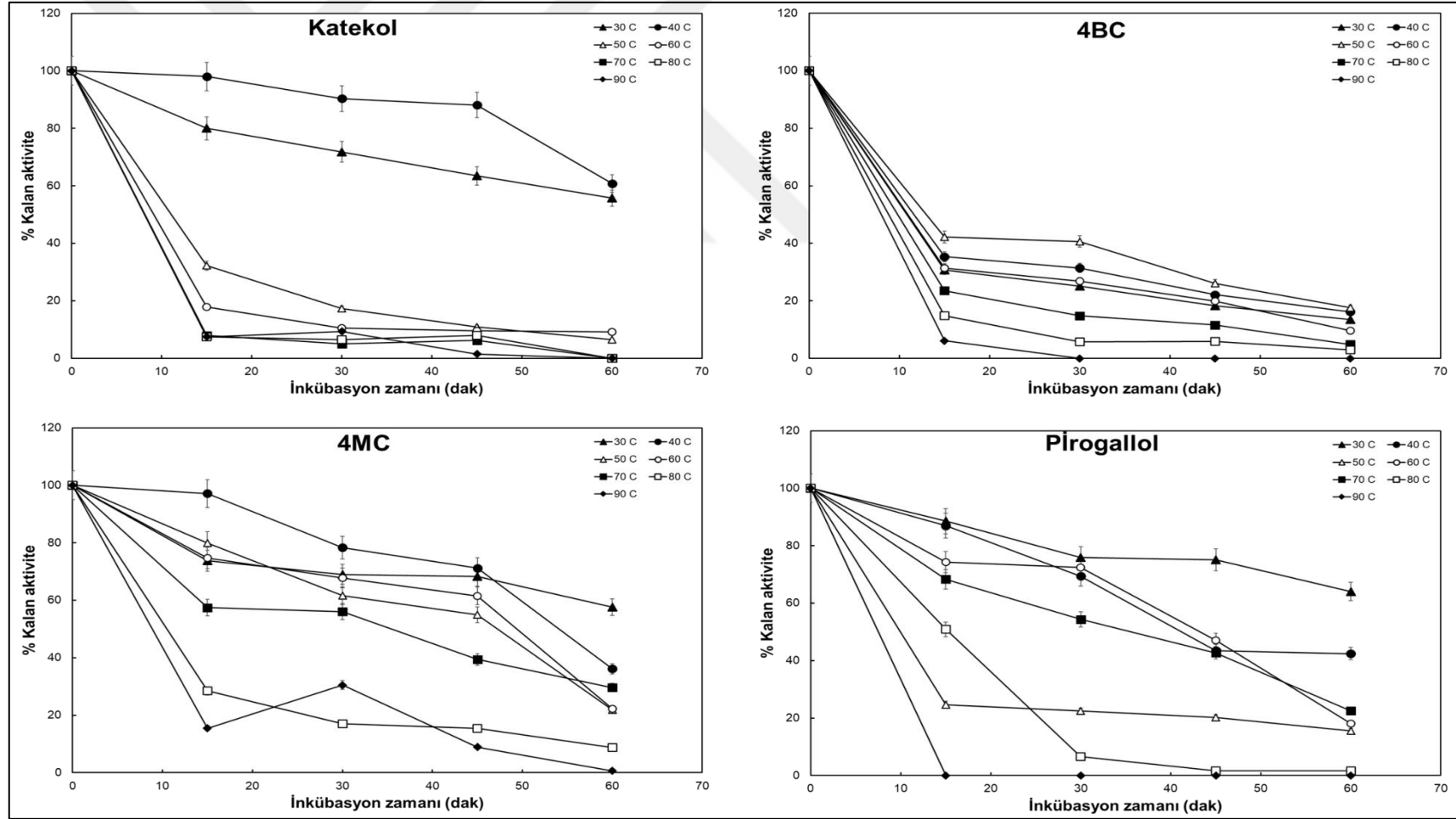
Literatürde farklı birçok meyveden izole edilen polifenol oksidaz enziminin optimum sıcaklık değerleri kaynağa ve substrata bağlı olarak 10°C ile 60°C arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir (Tablo 4.5) (Yüzügüllü Karakuş ve diğ., 2021).

Tablo 4.5. Farklı kaynaklardan elde edilen polifenol oksidazların farklı substratlarda ölçülen optimum sıcaklık değerleri (°C)

| Kaynak | Substrat | Optimum sıcaklık (°C) | Referans |
|----------------|----------|-----------------------|----------------------------|
| Hodan | Katekol | 10 | Alicı ve Arabacı, 2016 |
| Mango | Katekol | 20–70 | Palma-Orozco ve diğ., 2014 |
| Yer elması | Katekol | 20 | Erzengin M., 2009 |
| Erik | Katekol | 25 | Ioniță ve diğ., 2017 |
| Iğdır kayısı | Katekol | 30 | Demir ve diğ., 2012 |
| Altın çilek | Katekol | 40 | Bravo ve Osorio, 2016 |
| Tadela Hurması | Katekol | 40 | Benaceur ve diğ., 2019 |
| Beyaz dut | Katekol | 45 | Arslan ve diğ., 2004 |

Karadut PPO enziminin sıcaklığa karşı dayanıklılığı test edilen substrata göre değişmektedir (Şekil 4.6). Örneğin, 4BC’de uygulanan tüm sıcaklarda enzim aktivitesinde zamana bağlı olarak hızlı bir düşüş kaydedildi. Diğer taraftan katekolde 30°C ve 40°C sıcaklıklarda kararlı bir profil çizerken 4MC’de ve pirogallolde 30°C’de 60 dk kararlıdır. Ayrıca 4MC’de 30°C -60°C aralığında 45 dk’ya kadar aktivitesinin %50’sinden fazlasını korumaktadır. Enzim 90 °C’de 1 saat ısıtıldığında aktivitesinde %100 inhibisyon gözlemlendi.

PPO enzimleri genellikle 80°C’ye kadar kararlılık gösteren termostabil enzimler olarak kabul edilir (Benaceur ve diğ., 2020). Örneğin hodan PPO’sunun, katekol kullanılarak 60°C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin %40’ını koruduğu bildirilmiştir (Alicı ve Arabacı, 2016). Trüf mantarı PPO’su, substrat olarak 4-metilcatekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol kullanılarak 75 °C’de 10 dk inkübasyondan sonra aktivitesinin sırasıyla %51, %46, %38 ve %29’unu korumuştur (Benaceur ve diğ., 2020). Erik PPO’sunun 25-65 °C sıcaklık aralığında stabil olduğu ve 70 °C’de 20 dk ısıtıldıktan sonra aktivitesinin %50’sinin korunduğu bildirilmiştir (Ioniță ve diğ., 2017). Benzer şekilde, karnabahar PPO enzimi 20-50 °C’de kararlıydı ve 80°C’de 10 dk ısıtıldığında aktivitesinin %60’ını korumuştur (Rahman ve diğ., 2012). Stanley eriğinden elde edilen PPO (Siddiq ve diğ., 1992) en yüksek kararlılığını 70°C’de gösterirken, mamey meyvesinden elde edilen PPO 65-70 °C sıcaklık aralığında 30 dk ısıtıldıktan sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Palma-Orozco ve diğ., 2011).

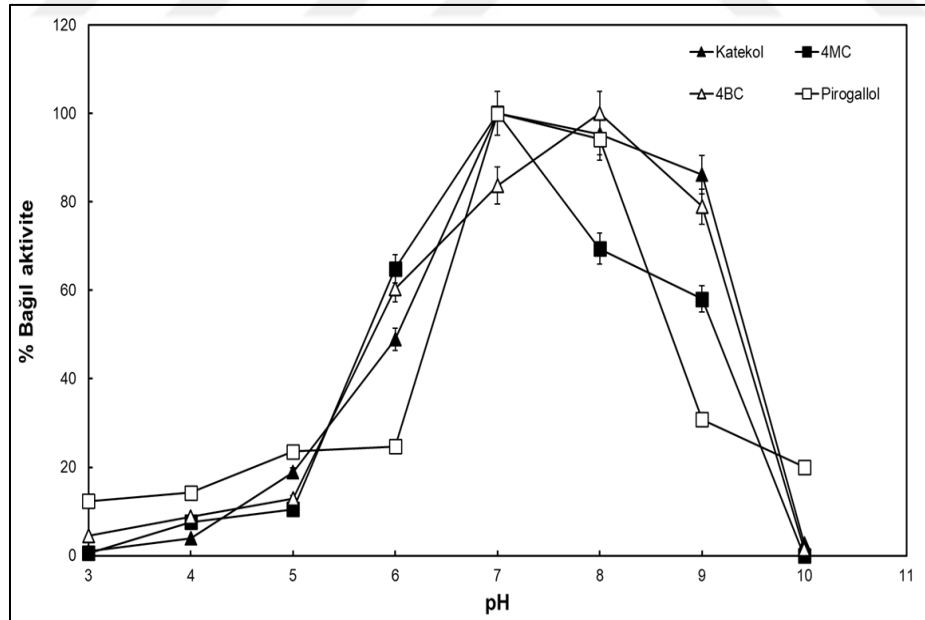


Şekil 4.6. Katekol 4-metilkatekol (4MC), 4-tert-bütilkatekol (4BC) ve Pirogallol substratlarında sıcaklık değişiminin enzim kararlılığına etkisi

4.4.2. Reaksiyon pH'sının Karadut Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi

Reaksiyon pH'sı, enzim aktivitesini etkileyen bir diğer önemli faktördür. Reaksiyon ortamındaki herhangi bir değişiklik, enzimin yüzeyindeki net yükü de değiştirecek ve bu da dolaylı olarak enzimin çözünürlüğünü, çeşitli substratlar/inhibitörler ile bağlanma kabiliyetini ve konformasyonunu etkileyecektir. Enzimler genellikle aşırı pH değerlerinde katlanma nedeniyle aktivitelerini kaybederler (Alici ve Arabaci, 2016). pH etkisi, pH 3,0 ile 10,0 arasında geniş bir aralıkta dört substrata karşı analiz edildi (Şekil 4.7). Sıcaklık değişimine enzim tepkisine benzer şekilde, optimum pH değeri tek substrat hariç diğerlerinde aynı değerde ölçüldü. Buna göre, optimum pH katekol, 4MC ve pirogallol için 7,0, 4BC için 8,0 ölçüldü (Şekil 4.8). Karadut PPO'sunun optimum pH değeri substrat olarak katekol ve pirogallol kullanan hodan PPO'suna benzerlik göstermektedir (Tablo 4.6).

pH 3,0-6,0 ile 9,0-10,0 pH aralıklarında, katalitik aktivite tüm substratların varlığında önemli ölçüde azalmaktadır (Şekil 4.8). Bu inaktivasyon, protein katlanmasının meydana gelmesiyle ifade edilebilir (Alici ve Arabaci, 2016).

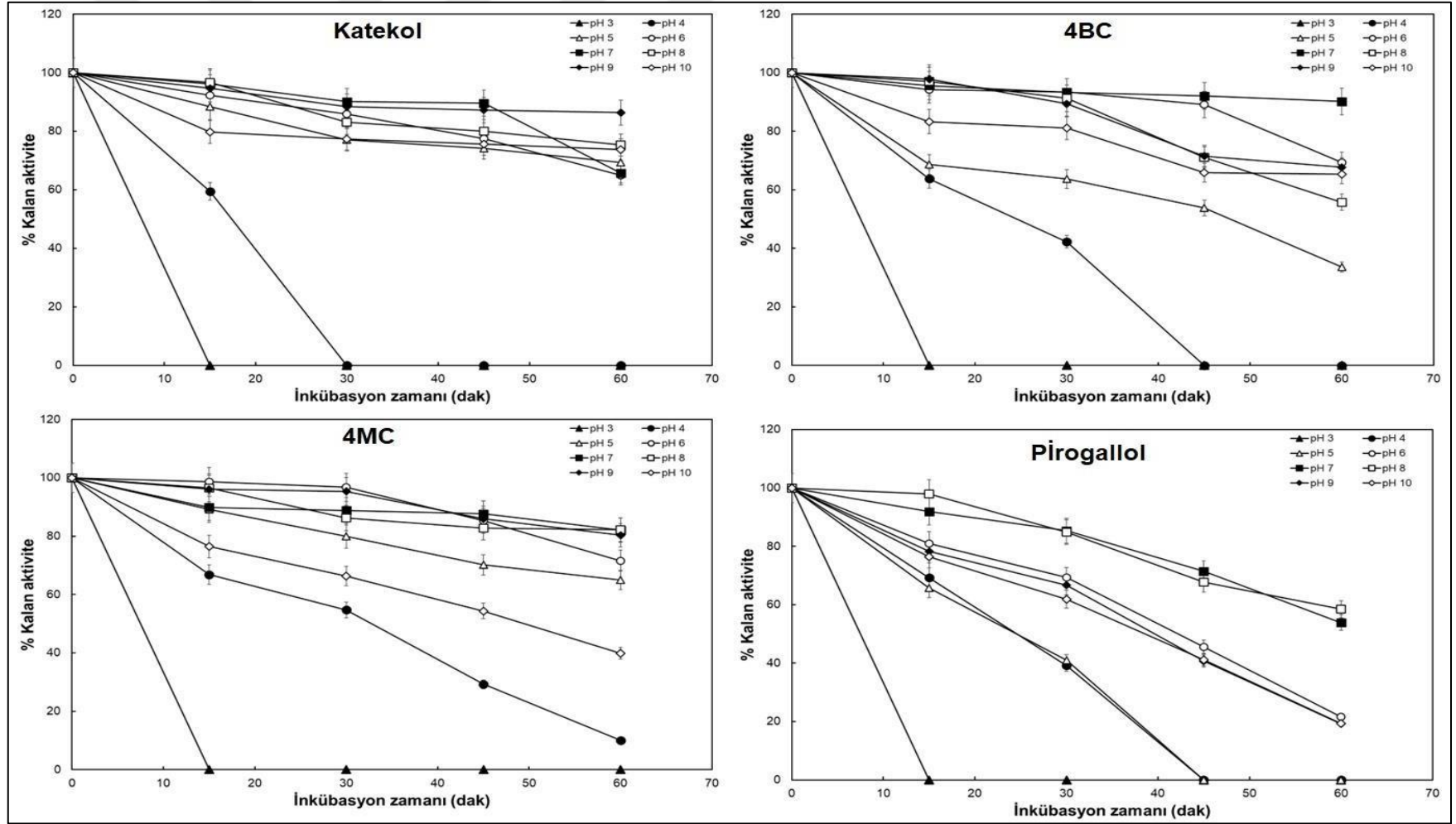


Şekil 4.7. Karaduttan saflaştırılan PPO aktivitesi üzerine reaksiyon pH'sının etkisi (4BC: 4-tert-bütilkatekol, 4MC: 4-metilkatekol)

Tablo 4.6. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin farklı substratlarda ölçülen optimum pH değerleri

| Kaynak | Substrat | Optimum pH | Referans |
|----------------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| Kayısı | Katekol | 4,5 | Derardja ve diğ., 2017 |
| Tadela Hurması | Katekol | 5,0 | Benaceur ve diğ., 2019 |
| Altın çilek | Katekol | 5,5 | Bravo ve Osorio, 2016 |
| Mango | Katekol | 6,0 | Palma-Orozco ve diğ., 2014 |
| Erik | Katekol | 6,0 | Ionița ve diğ., 2017 |
| Beyaz dut | Katekol | 7,0 | Arslan ve diğ., 2004 |
| Yer elması | Katekol | 7,0 | Erzengin M., 2009 |
| Hodan | Katekol | 7,5 | Alıcı ve Arabacı, 2016 |
| | Pirogallol | 7,5 | |

Karadut PPO'sunun pH stabilitesi de enzimlerin 3,0 ile 10,0 arasında değişen pH değerlerinde inkübe edilmesiyle incelendi. Katekol için pH 5,0-10,0 pH aralığında, 4MC için pH 5,0-9,0 aralığında, 4BC için pH 6,0-10,0 aralığında ve pirogallol için pH 7,0-8,0 aralığında önemli katalitik aktivite tespit edildi (Şekil 3.8). Şekilde de görüldüğü gibi pH 5,0'ın altında PPO aktivitesinde gözlenen azalma dikkat çekicidir, bu da enzimin asidik pH'dan ziyade nötr veya alkali pH'da daha kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Katekol 4-metilkatekol (4MC), 4-tert-bütilkatekol (4BC) ve Pirogallol substratlarında pH değişiminin enzim kararlılığına etkisi

4.4.3. Karadut PPO Enziminin Substrat Spesifitesi

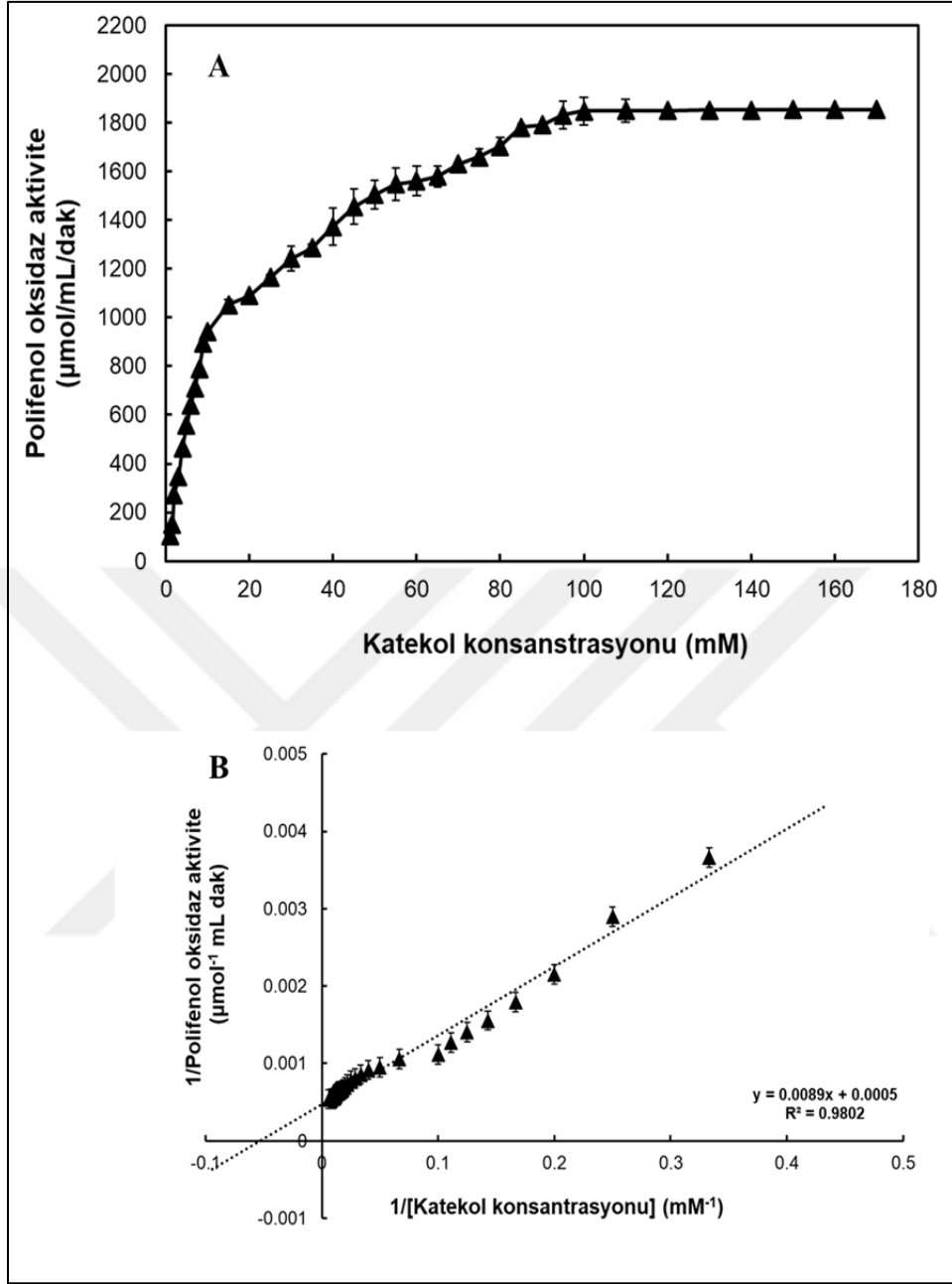
Karadut polifenol oksidaz enziminin farklı kimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre seçilen 8 farklı substrata karşı oksidasyon yeteneği araştırıldı. Buna göre, enzim L-tirozin hariç yedi fenolik substrata karşı aktivite gösterdi (Tablo 4.7). Bu, enzimin *o*-difenoller ve *p*-difenoller üzerinde aktif olduğunu ancak monofenolleri oksitleyemediğini göstermektedir. Çalışma bulgularına benzer olarak hodan (Alici ve Arabaci, 2016), erik (Ioniță ve diğ., 2017) ve altın çilekten (Bravo ve Osorio, 2016) ekstrakte edilen birçok PPO enzimi monofenollere karşı herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Tablo 4.7. Karadut PPO enziminin substrat spesifite sonuçları

| | Polifenol oksidaz aktivite ($\mu\text{mol/mL/dk}$) | |
|---------------------|---|---------------|
| | 10 mM | 100 mM |
| Katekol | 75 \pm 6 | 1454 \pm 25 |
| 4-metil katekol | 158 \pm 17 | 756 \pm 50 |
| 4-tert-bütilkatekol | 836 \pm 50 | 0 |
| Pirogallol | 65 \pm 10 | 101 \pm 20 |
| Guakol | 4 \pm 0.3 | 41 \pm 6 |
| Kafeik asit | 485 \pm 30 | 64 \pm 0 |
| L-tirozin | 0 | 0 |
| Hidrokinon | 34 \pm 5 | 44 \pm 4 |

*Denemeler üç tekrar halinde gerçekleştirildi ve değerler ortalama \pm SD olarak sunuldu.

Tablo 4.7'ye göre en yüksek PPO aktivitesi katekolde gözleendiğinden bu substrat için kinetik sabitler (K_m ve V_{max}) Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934). Enzim, Michaelis Menten kinetiğine uymaktadır (Şekil 4.9A). Enzimin substratına olan afinitesinin bir belirleyicisi olan K_m değeri ve enzimin maksimum hızı (V_{max} değeri), Şekil 4.9B'deki Lineweaver-Burk grafiğinden sırasıyla 17,8 mM ve 2000 $\mu\text{mol/mL/dk}$ olarak bulundu.



Şekil 4.9. Katekol konsantrasyonunun PPO aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği (A) ve Lineweaver Burk eğrisi (B)

Literatürde birçok farklı kaynaktan elde edilen PPO enziminin katekole karşı ilgisini ifade eden K_m değerleri farklılık göstermektedir (Tablo 4.8). Altın çilek ve Tadelâ Hurması ile yapılan çalışmalarda K_m değerleri sırasıyla 30,13 ve 35 mM olarak bulunmuştur. Buna göre karadut polifenol oksidaz enziminin katekole karşı olan ilgisi literatürdeki diğer meyvelerde bulunan polifenol oksidaz enzimlerine göre daha yüksektir (K_m değeri daha düşüktür).

Tablo 4.8. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin Km ve Vmax değerleri

| Kaynak | Km (mM) | Vmax (U/mL/dk) | Referans |
|----------------|---------|----------------|------------------------|
| Yer elması | 6,12 | 4564,75 | Erzengin M., 2009 |
| Yaban mersini | 15 | 2,57 | Siddiq ve Dolan, 2017 |
| Altın çilek | 30,13 | 12,90 | Bravo ve Osorio, 2016 |
| Tadela Hurması | 35 | 2801 | Benaceur ve diğ., 2019 |

4.4.4. İnhibitörlerin Karadut PPO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Substrat olarak katekol, 4MC ve 4BC kullanılarak 0,1 ve 5 mM konsantrasyonlarında sekiz farklı inhibitörün (askorbik asit, benzoik asit, kojik asit, *p*-kumarik asit, tiyöüre, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), glisin ve β -merkaptetanol) karadut PPO aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. Tablo 4.9'a göre 0,1 ve 5 mM konsantrasyonlarında %100 inhibisyon gösteren askorbik asit ve β -merkaptetanol, karadut PPO'su için güçlü inhibitörlerdir. Ayrıca 5 mM'da %100 inhibisyona sebep olan kojik asit, kumarik asit ve thioüre de güçlü inhibitör olarak sayılabilir. Diğer taraftan EDTA ve glisin, 5 mM'da dahi PPO aktivitesinde sırasıyla %21 ve %23 oranında inhibisyon etkisi göstermeleri sebebiyle zayıf inhibitör özelliği göstermektedirler. Literatürde de benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin, askorbik asit kaybı (Derardja ve diğ., 2017), altın çilek (Bravo ve Osorio, 2016), mamey (Palma-Orozco ve diğ., 2011) ve hodan (Alici ve Arabaci, 2016) PPO'ları için etkili inhibitör olarak tanımlanmıştır. β -merkaptetanolün önemli inhibitör etkileri, enzimin 1 mM inhibitör ile muamelesinden sonra kalan aktivite yüzdesinin %10 olarak kaydedildiği İsviçre pazı PPO'su için sunulmuştur (Gao ve diğ., 2009). Erik PPO ile yapılan inhibisyon çalışmalarında en düşük inhibisyon etkisi %17'den daha düşük inhibisyon ile glisin için gözlenmiştir (Ioniță ve diğ., 2017).

Tablo 4.9. İnhibitörlerin karadut PPO enzimi üzerine etkisi

| İnhibitör | Kalan polifenol oksidaz aktivite (%) | | | | | |
|---------------|--------------------------------------|------|----------------------|------|-----------------|------|
| | Katekol | | 4-Tert Bütil Katekol | | 4-Metil Katekol | |
| | 0.1 mM | 5 mM | 0.1 mM | 5 mM | 0.1 mM | 5 mM |
| Askorbik asit | 0 | 0 | 61±2 | 0 | 0 | 0 |
| Benzoik asit | 43±1 | 25±1 | 77±2 | 0 | 61±2 | 56±1 |
| Kojik asit | 79±2 | 0 | 64±1 | 0 | 66±3 | 0 |
| Kumarik asit | 67±1 | 0 | 80±4 | 0 | 64±4 | 0 |
| Thioüre | 66±1 | 0 | 82±2 | 70±1 | 65±1 | 0 |

Tablo 4.9. (Devam) İnhibitörlerin karadut PPO enzimi üzerine etkisi

| | | | | | | |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| EDTA | 94±1 | 79±1 | 75±1 | 75±1 | 79±2 | 78±4 |
| Glisin | 90±5 | 89±2 | 87±3 | 85±2 | 79±5 | 77±1 |
| β-Merkaptoetanol | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Denemeler üç tekrar halinde gerçekleştirildi ve değerler ortalama ±SD olarak sunuldu.

4.4.5. Metal İyonlarının Karadut PPO Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Dokuz metal iyonunun (CuSO₄, MgSO₄, KCl, CaCl₂, ZnSO₄, FeSO₄, NiSO₄, MnSO₄ ve NaCl) karadut PPO aktivitesi üzerindeki etkisi, üç substrat, katekol, 4BC ve 4MC kullanılarak 0,1 ve 5 mM inhibitör konsantrasyonlarında incelendi. Tablo 4.10'a göre, test edilen tüm metal iyonları PPO aktivitesi üzerinde doza bağlı olumsuz etki gösterdiler. Çalışılan metal iyonları arasında, 5 mM'de FeSO₄ başlangıç aktivitesinin %64 kaybıyla en önemli inhibisyonu gösterdi. Literatürde mürdüm eriği ile yapılan çalışmada (Yıldız ve diğ., 2022) 1 mM konsantrasyonda FeSO₄'ün %43,18 enzim inhibisyonu gözlemlendi. Spesifik metal iyonlarının inhibitör/uyarıcı etkisinin enzim kaynakları arasında farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Örneğin bu çalışmada 5mM'da %34 inhibe edici etki gösteren CuSO₄, mürdüm eriği ile yapılan çalışmada (Yıldız ve diğ., 2022) 1 mM konsantrasyonda %219,66 enzim aktivasyonu göstermiştir.

Tablo 4.10. Metal iyonlarının karadut PPO enzimi üzerine etkisi

| Metal İyon | Kalan Polifenol Oksidaz Aktivite (%) | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|-------|----------------------|-------|-----------------|------|
| | Katekol | | 4-Tert Bütıl Katekol | | 4-Metil Katekol | |
| | 0.1 mM | 5 mM | 0.1 mM | 5 mM | 0.1 mM | 5 mM |
| CaCl ₂ | 60±1 | 57±2 | 92±4 | 62±1 | 92±4 | 78±7 |
| ZnSO ₄ | 74±4 | 71±1 | 97±1 | 73±7 | 79±7 | 74±4 |
| NiSO ₄ | 88±8 | 78±2 | 92±4 | 91±1 | 96±5 | 91±5 |
| NaCl | 89±14 | 65±1 | 99±1 | 96±3 | 93±1 | 71±1 |
| MnSO ₄ | 81±1 | 79±2 | 93±1 | 70±3 | 94±4 | 79±6 |
| MgSO ₄ | 84±12 | 70±5 | 93±3 | 92±4 | 90±1 | 86±7 |
| KCl | 89±4 | 84±29 | 97±1 | 85±45 | 91±4 | 81±2 |
| FeSO ₄ | 81±2 | 40±1 | 90±1 | 37±2 | 77±3 | 36±4 |
| CuSO ₄ | 80±1 | 68±3 | 77±3 | 66±6 | 82±4 | 74±4 |

*Denemler üç tekrar halinde gerçekleştirildi ve değerler ortalama ±SD olarak sunuldu.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Besin olarak kullanılan ve likopen içerikleri zengin olan Karpuz (*Citrullus lanatus*), Kırmızı biber (*Capsicum annuum*), İncir (*Ficus carica*), Nar (*Punica granatum*), Kan portakalı (*Citrus x sinensis*), Greyfurt (*Citrus x paradisi*), Kızılcık (*Cornus mas*), Kuşburnu (*Rosa canina*), Kudret narı (*Momordica charantia*) ve Karadut (*Morus nigra*) meyvelerinden elde edilen ham ekstraktlarda 14 farklı ekstraksiyon koşulu çalışılarak PPO enziminin varlığı analiz edildi. 10 farklı meyveden elde edilen ham enzim ekstrakt örneklerinde en yüksek PPO aktivitesine karadut meyvesinin sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0), askorbik asit (10 mM), PEG 6000 (%0,5, w/v) ve K₂HPO₄ (50 mM) içeren karışımdan eldi edildi. Ardından sırasıyla aseton çöktürme ve üçlü faz ayırma tekniği kullanarak PPO enzimi %177 verimle 2,7-kat saflaştırıldı. Enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı ve molekül ağırlığı 88,59 kDa olarak hesaplandı. Enzimin optimum sıcaklık değeri katekol için 40°C, 4BC, 4MC ve pirogallol için 50°C olarak belirlendi. 30°C-60°C sıcaklık aralığında enzimin kararlı olduğu gözlemlendi. Optimum pH değeri ise katekol, 4MC ve pirogallol için pH 7,0, 4BC için pH 8,0 olarak belirlendi. Kararlı olduğu pH aralığı substrata göre değişkenlik göstermekle birlikte katekol ve 4MC için pH 5,0-10,0 arası iken 4BC'de pH 6,0 ve üzeri olarak bulundu. Pirogallolde ise pH 7,0 ve 8,0'de aktivitesinin %50'sinden fazlasını 1 saat süreyle koruduğu tespit edildi. Substrat spesifite analizine göre karadut PPO enzimi *o*-difenolikleri ve *p*-difenolik bileşikleri okside edebilmekte; ancak monofenolleri okside edememektedir. En iyi substratı katekol olup, bunu 4BC ve 4MC takip etmektedir. Katekol için hesaplanan Km ve Vmax değerleri sırasıyla 17,8 mM ve 2000 µmol/mL/dk'dır. En güçlü inhibitörler askorbik asit ve β-Merkaptoetanol'dur. Glisin ve EDTA ise karadut PPO enzimi için zayıf inhibitörlerdir. Test edilen metal iyonları arasında en yüksek inhibisyon FeSO₄ varlığında gözlemlendi; 5 mM konsantrasyonda başlangıç aktivitenin yaklaşık %64'ünün kaybolmasına sebep oldu.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde likopen içeren ve antioksidan özelliği bulunan karaduttan aseton çöktürme ve beraberinde Üçlü Faz Ayırma (TPP) metodu kullanılarak PPO enziminin güvenilir, düşük maliyetli, doğa dostu ve yüksek verimle saflaştırılması endüstriyel kullanım açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Karakterize edilmiş enzimin artan sıcaklık karşısında kullanılan tüm substratlarda aktivitesini kaybetmediği,

ancak enziminin artan sıcaklıklarda stabilitesinin düşük sıcaklıklarda korunduğu gözlemlendi. Ayrıca yapılan pH çalışmalarında enzimin kullanılan tüm substratlarda aktivitesinin pH 7,0 ve pH 8,0 aktif olmasının yanı sıra geniş bir pH aralığında enzimin kararlılığını koruduğu belirlendi. PPO enzim kaynağı olarak karadut güçlü bir adaydır ve enzim uygulaması oldukça kolay ve düşük maliyetli olan iki aşamalı teknikle başarılı bir şekilde saflaştırılabilmektedir. Biyokimyasal özellikleri bu çalışmada detaylı bir şekilde irdelenen karadut PPO'sunun güçlü bir antioksidan olarak farklı kanser hücrelerindeki anti-kanser etkisi gelecekte çalışılabilir. Bu şekilde uygulamada başarılılığı test edilmiş olacaktır.



KAYNAKLAR

- Adlercreutz, H., Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western Diseases. *Annals of Medicine*, 29(2), 95–120.
- Akay, A., Karaarslan, E. (2012). Mikoriza Aşılانmış Kudret Narı (Momordica Charantia) Bitkisine Farklı Dozlarda Fosforlu ve Demirli Gübre Uygulamasının Yaprak Klorofil İçeriğine Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(3), 103-108.
- Akınoğlu, G., Erdal, A. (2024). Doğal Olarak Bulunan Kırmızı Pigment Likopen ve Sağlığa Faydalı Etkileri Üzerine Sistematik Bir Yolculuk. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 7(1), 139-154.
- Alici, E. H., Arabaci, G. (2016). Purification of Polyphenol Oxidase from Borage (Trachystemon orientalis L.) by Using Three-Phase Partitioning and Investigation of Kinetic Properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1051–1056.
- Alkan, Ş.B., Rakıcıoğlu, N. (2020). Demans ve Polifenoller. *Sağlık ve Toplum*, (3).
- Anaya-Esparza, L.M., Villagrán-de la Mora, Z., Vázquez-Paulino, O., Ascencio, F., Villarruel-López, A. (2021). Bell Peppers (Capsicum annum L.) Losses and Wastes: Source for Food and Pharmaceutical Applications. *Molecules*, 26(17), 5341.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C.E., Herrera de Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M.C.N., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A. (2019). Laccases: Structure, Function, and Potential Application in Water Bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 200.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S., Ozensoy, O. (2004). Purification of Mulberry (Morus alba L.) Polyphenol Oxidase By Affinity Chromatography and Investigation of Its Kinetic and Electrophoretic Properties. *Food Chemistry*, 88, 479-484.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Yılmaz, B. (2019). Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü- Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Aşkın, B., Tağı, Ş., Küçüköner, E. (2022). İşleme ve Isıl İşlem Sürecinde Karadut (Morus nigra) Suyunun Antimikrobiyal Aktivitesi, Fizikokimyasal Özellikleri ve Organik Asit Dağılımında Meydana Gelen Değişimler. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(6): 1414- 1422.
- Atak, E., Uslu, M.E. (2018). Fenolik Bileşikler Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 27(3).

- Aydemir, B., Karadağ Sarı, E. (2009) Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2), 56-60.
- Baldemir, A., Köngül, E., Ildız, N., İlgün, S. (2015). Investigations on *Capsicum annuum* L. samples purchased from Kayseri province of Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, 12(3), 1-15.
- Bayır Güneş, A., Aksoy, A.N., Koçyiğit, A. (2019). Fonksiyonel Besinlerden Polifenollerin Sağlıkta Önemi. *Bezmialem Science*, 7(2):157-63.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-81.
- Benaceur, F., Gouzi, H., Meddah, B., Neifar, A., Guergouri, A. (2019). Purification and characterization of catechol oxidase from Tadela (*Phoenix dactylifera* L.) date fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*. 15(125), 1248-1256.
- Beşirli, G., Sönmez, İ., Albayrak, B., Polat, Z., Aras, V., Şimşek, B. (2019). Karpuzda (*Citrullus lanatus*) Organik Tohum Üretim Olanaklarının Araştırılması. *Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi*, 4, 37-42.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bravo, K., Osorio, E., (2016). Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chemistry*, 15(197), 185-190.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yildiz, O., Kolayli, S. (2014). Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(6), 829-835.
- Cerrahoğlu, E., Arabacı, G. (2016). Eflatun Çiçekli Ballıbaba (*Lamium purpureum*) Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu ve İnhibisyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 20(2), 245-250.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Cheema, S., Sommerhalter, M. (2015). Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Ataulfo Mango. *Food Chemistry*, 15(171), 382-387.

- Chew, K.W., Ling, T.C., Show, P.L. (2019). Recent Developments and Applications of Three-Phase Partitioning for The Recovery of Proteins. *Separation & Purification Reviews*, 48(4), 1-13. doi:10.1080/15422119.2018.1427596
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3(4), 92-95.
- Çetin A., (2012). Scolymus Hispanicus L. (Asteraceae)'un In Vitro Antioksidan Özelliklerinin Farklı Metotlar ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 315928.
- Çimen, B., Yeşiloğlu, T., İncesu, M., Yılmaz B. (2013). Nüseller Kökenli Bazı Kan Portakalı Çeşitlerinin Adana Ekolojik Koşullarında Meyve Kalite Özelliklerinin Saptanması. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi* 6(1), 15-20.
- Çınar F., (2018), Murt (Myrtus Communis L.) Meyvesinden Polifenol Oksidaz Ensiminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 520821.
- Demir, H., Çimen, Ç., Çelikezen, F.Ç. (2012). Purification and characterization of polyphenol oxidase enzyme from Iğdır apricot (*Prunus armeniaca L.*). *Bitlis Eren Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2, 22-26.
- Demir, D., Kabak, S., Çağlayan, K. (2023). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase in the Fruits of *Opuntia Ficus-İndica*. *Biology*, 12(10), 1339-1349.
- Demir, G., Koyuncu, F. (2017). Bazı Kan Portakalı Çeşitlerinin Antalya Ekolojik Koşullarında Verim, Kalite ve Pomolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, 4(1), 6-12.
- Derardja, A.E., Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., Rompel, A. (2017). Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8203-8212.
- Dinçer, B., Çolak, A., Aydın, N., Kadioğlu, A., Güner S. (2002). Characterization of Polyphenoloxidase From Medlar Fruits (*Mespilus germanica L.*, Rosaceae). *Food Chemistry*, 77(1), 1-7.
- Duman, Y., Kaya, E. (2014). Purification and Recovery of Invertase From Potato Tubers (*Solanum tuberosum*) by Three Phase Partitioning and Determination of Kinetic Properties of Purified Enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(4), 443-448.
- Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C. (1999). Catechol Oxidase - Structure and Activity. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 677-683.

- Erzengin, M., (2002), Farklı Kaynaklardan Affinite Kromatografisi ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 123505.
- Erzengin, M. (2009). Affinity Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Helianthus tuberosus* L. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 37 (4) 313- 325.
- Feng, R.Z., Wang, Q., Tong, W.Z., Xiong, J., Wei, Q., Zhou, W.H., Yin, Z.Q., Yin, X.Y., Wang, L.Y., Chen, Y.Q., Lai, Y.H., Huang, H.Y., Luo, Q.L., Wang, L., Jia, R.Y., Song, X., Zou, Y.F., Li, L.X. (2015). Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids of *Morus nigra*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(12), 22328- 22336.
- Flurkey, W.H., Jen, J.J. (2006). Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activity in Developing Peach. *Journal of Food Science* 43(6), 1826-1828.
- Gao,Z.J., Han, X.H., Xiao, X.G.(2009). Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Red Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chemistry*,117(2), 342-348.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F. (1997). Polyphenoloxidases from Williams Pear (*Pyrus Communis* L, cv Williams): Activation, Purification and Some Properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 49-56.
- Gençdağ, E., Görgüç, A., Yılmaz, F.M. (2019). Kuru İncirin İşlenmesi, Kalite Problemleri ve Gıda Endüstrisinin Geliştirdiği Yenilikçi Yöntemler. *Akademik Gıda*, 17(3), 378-388.
- Görünmezoğlu Ö., (2008), Kayısı ve İncir Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 216909.
- Grabowska, M., Wawrzyniak, D., Rolle, K., Chomczyński, P., Oziewicz, S., Jurga, S., Barciszewski, J. (2019). Let Food Be Your Medicine: Nutraceutical Properties of Lycopene. *Food Funct.*, 10(6), 3090-3102.
- Guo, S., Sun, H., Xu, Y., Fei, Z. (2020). *Citrullus lanatus*. *Trends in Genetics*, 36(6), 456-457.
- Guo, Y., Li, Z., Chen, F., Chai, Y. (2023). Polyphenols in Oral Health: Homeostasis Maintenance, Disease Prevention, and Therapeutic Applications. *Nutrients*, 15(20), 4384- 4416.
- Güngör K., (2008), Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 214016.

- Güray M.Z., (2009), Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Thermophilic Bacillus sp., Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 251048.
- Ighadora, O.M., Akinloye, O.A. (2018). First Line Defence Antioxidants-Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT) and Glutathione peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287- 293.
- Ioniță, E., Gurgu L., Aprodu, I., Stănciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G., Râpeanu, G. (2017). Characterization, Purification, and Temperature/Pressure Stability of Polyphenol Oxidase Extracted from Plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56, 177-185.
- Jones, A.M.P., Saxena, P.K. (2013). Inhibition of phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLoS One*, 8(10), 1-13.
- Kahköhnen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962.
- Kahveci B., (2019). Kocaeli ilinden Toplanan Bazı Tıbbi Bitkilerde Polifenol Oksidaz Enziminin Taranması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 599063.
- Kaptan Y., (2004). Utilization of Scytalidium Thermophilum Phenol Oxidase in Bioorganic Synthesis, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 153425
- Karabulut, H., Gülay, M. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karataş, F., Çötel, E. (2016). Kırmızı ve Koyu Kırmızı Bazı Meyvelerdeki A, E Vitamini, Beta Karoten ve Likopen Miktarlarının Araştırılması. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 61-66.
- Kaur, C., Kapoor, H.C. (2002). Anti-Oxidant Activity and Total Phenolic Content of some Asian Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153-161.
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., Terao, J. (2019). Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*, 24(2), 370.
- Khongthaw, B., Dulta, K., Chauhan, P.K., Kumar, V., Ighalo, J.O. (2022). Lycopene: A Therapeutic Strategy Against Coronavirus Disease 19 (COVID-19). *Inflammopharmacology*, 30(6), 1955-1976.

- Kulawik, A., Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P. (2023). The Importance of Antioxidant Activity for the Health-Promoting Effect of Lycopene. *Nutrients*, 15(17), 3821-3846.
- Kumar, V.B., Mohan, T.C., Murugan, K. (2008). Purification and Kinetic Characterization of Polyphenol Oxidase from Barbados Cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110(2), 328-33.
- Kumar G. (2018). Principle and Method of Silver Staining of Proteins Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 1853, 231-236.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Li, L., Liu, Z., Jiang, H., Mao, X. (2020). Biotechnological Production of Lycopene by Microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnology*, 104(24), 10307-10324.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E. (2009). The Role of Antioxidants and Antioxidant-Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. *Mutation Research*, 31;674(1-2), 137-147.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–66.
- Ma, T., Deng, Z., Liu, T. (2016). Microbial Production Strategies and Applications of Lycopene and Other Terpenoids. *World J Microbiol Biotechnology*, 32(1), 15-24.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-47.
- Marzocco, S., Singla, R.K., Capasso, A. (2021). Multifaceted Effects of Lycopene: A Boulevard to the Multitarget-Based Treatment for Cancer. *Molecules*, 26(17), 5333.
- Mishra, B.B., Gautam, S., Sharma, A. (2012). Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase (PPO) from Eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chemistry*, 134(4), 1855-1861.
- Moeini Alishah, M., Yıldız, S., Bilen, Ç., Karakuş, E. (2023). Purification and characterization of avocado (*Persea americana*) polyphenol oxidase by affinity chromatography. *Prep Biochemistry Biotechnology*, 53(1), 40-53.
- Navarro, J.L., Tárrega, A., Sentandreu, M.A., Sentandreu, E. (2014). Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Persimmon. *Food Chemistry*, 157, 283- 289.

- Niphadkar, S.S., Rathod, V.K. (2015). Ultrasound-Assisted Three-Phase Partitioning of Polyphenol Oxidase From Potato Peel (*Solanum tuberosum*). *Biotechnol Progress*, 31(5), 1340-1347.
- Nunes, C.S., Vogel, K. (2018). Tyrosinases—Physiology, Pathophysiology, and Applications. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, 403-412.
- Öz, M., Baltacı, C., Deniz, İ. (2018). Gümüşhane Yöresi Kuşburnu (*Rosa canina L.*) ve Siyah Kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia L.*) Meyvelerinin C Vitamini ve Şeker Analizleri. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 284-292.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif Stres ve Hücre İçi Lipit, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özelçi, D., Yiğit, E. (2022). *Morus nigra L.* (Karadut) cv. ‘Ekşi Kara’ ‘nın Mikroçoğaltımı. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(1), 49-56.
- Özkal, N., Dinç, S. (1993). *Punica granatum L.* (Nar) Bitkisinin Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 22(1-2), 39-50.
- Özkaya Erkaleli, Z., Dalkılıç, Z. (2016). UŞAK İli Ulubey İlçesinde Yetişen Karadutların (*Morus nigra L.*) Morfolojik, Fenolojik ve Pomolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1), 89 – 106.
- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A., Dorantes-Alvarez, L., Sampedro, J.G., Nájera, H. (2011). Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry*, 72, 82-88.
- Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N.A., Sampedro, J.G., Nájera, H. (2014). Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9832-9840.
- Panadare, D., Rathod, V. (2018). Extraction and Purification of Polyphenol Oxidase: a Review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 431-437.
- Pandey, K., Rizvi, S. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Pektaş İ., (2009), Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 245516.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.

- Rahman, A.N., Ohta, M., Nakatani, K., Hayashi, N., Fujita, S. (2012). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3673-3678.
- Rao, A.V., Waseem, Z., Agarwal, Sanjiv. (1998). Lycopene Content of Tomatoes and Tomato Products and Their Contribution to Dietary Lycopene. *Food Research International*, 31(10), 737-741.
- Rather, G., M., Gupta, M., N. (2013). Three Phase Partitioning Leads to Subtle Structural Changes in Proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 134-140.
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuña-Castroviejo, D. (1995). A Review of the Evidence Supporting Melatonin's Role As An Antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1-11.
- Rodriguez, D.B., Lee, T.C., Chichester, C.O. (1975). Comparative Study of the Carotenoid Composition, of the Seeds of Ripening *Momordica charantia* and Tomatoes. *Plant Physiology*, 56(5), 626-629.
- Saki, N., Akin N., Alici, E.H., Arabaci, G. (2018). Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Wild Edible Mushroom *Lepiota Procera* Using Three-Phase Partitioning. *International Journal of Food Engineering*, 14, 1-9.
- Seden, K., Dickinson, L., Khoo, S., Back, D. (2010). Grapefruit-Drug Interactions. *Drugs* 70(18), 2373-2407.
- Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *American Chemical Society*, 1-37.
- Sernikli, C., Kadakal, Ç. (2020). Karadut (*Morus nigra*) Suyunda Rutin ve Toplam Fenolik Bileşiklerin Isıl Parçalanma Kinetiği. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24(3): 290-300.
- Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N. (1992). Characterization of Polyphenoloxidase from Stanley Plums. *Journal of Food Science*, 57(5), 1177-1179.
- Siddiq, M., Dolan, K.D. (2017). Characterization of Polyphenol Oxidase from Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 218, 216-220.
- Sirikhet, J., Chanmahasathien, W., Raiwa, A., Kiattisin, K. (2021). Stability Enhancement of Lycopene in *Citrullus lanatus* Extract via Nanostructured Lipid Carriers. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1750-1760.

- Solmaz, İ., Kaçar, Y., Sarı, N., Şimşek, Ö. (2016). Genetic Diversity Within Turkish Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumura & Nakai) Accessions Revealed by SSR and SRAP Markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(3), 407-419.
- Stabrauskiene, J., Marksa, M., Ivanauskas, L., Viskelis, P., Viskelis, J., Bernatoniene, J. (2023). *Citrus × paradisi* L. Fruit Waste: The Impact of Eco-Friendly Extraction Techniques on the Phytochemical and Antioxidant Potential. *Nutrients*, 15(5), 1276- 1297.
- Şener, G., Yeğen, B.Ç. (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 22(3), 5-13.
- Şimşek, M., İkinci, A., (2017). Narın (*Punica granatum* L.) İnsan Sağlığına Etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(4), 494-506
- Tao, Y.M., Yao, L.Y., Qin, Q.Y., Shen, W. (2013). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Bulbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12662-12669.
- Torelli, S., Belle, C., Hamman, S., Pierre J.L. (2002). Substrate Binding in Catechol Oxidase Activity: Biomimetic Approach. *Inorganic Chemistry*, 41(15), 3983–3989.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Türkhan, A., Kaya, E.D., Yılmaz, İ. (2018). Alıç (*Crataegus monogyna*) Meyvesinden Polifenol Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1048-1054.
- URL 1- <https://www.drugfuture.com/chemdata/lycopene.html> (Ziyaret Tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 2- <https://www.bahcetohum.com/karpuz-tohumu-crimson-sweet-bt-096> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 3- <https://en.wikipedia.org/wiki/Capsicum> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 4- <https://fidansepetim.com/urun/3-Yas-Asili-Kan-Portakali-Fidani/129> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 5- <https://tr.wikipedia.org/wiki/Nar> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 6- <https://www.polsgurme.com/incir-receli/> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 7- [://www.lezzet.com.tr/lezzetten-haberler/greyfurt-nasil-secilir#](https://www.lezzet.com.tr/lezzetten-haberler/greyfurt-nasil-secilir#) (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).

- URL 8- <https://www.tohumcenneti.com.tr/urun/dogal-kudret-nari-tohumu-3-tohum> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 9- <https://tazegel.com/urun/karadut> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 10- <https://www.iksirliciftlik.com/blog/icerik/kusburnu-meyvesi-ve-kullanim-alanlari> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- URL 11- <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kızılcık> (Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 24).
- Ülgüt D., (2022). Trabzon Hurması (*Diospyros kaki L.*)'ndan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 760085.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Wang, C., Qiao, A., Fang, X., Sun, L., Gao, P., Davis, A.R., Liu, S., Luan, F. (2019). Fine Mapping of Lycopene Content and Flesh Color Related Gene and Development of Molecular Marker-Assisted Selection for Flesh Color in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Front Plant Science*, 10, 1240.
- Wang, Q., Yang, B., Wang, N., Gu, J. (2022) Tumor Immunomodulatory Effects of Polyphenols. *Front Immunology*, 1-13
- Wang, Y.H., Zhang, R.R., Yin, Y., Tan, G.F., Wang, G.L., Liu, H., Zhuanga, J., Zhang, J., Zhuang, F.Y., Xiong, A.S. (2023). Advances in Engineering the Production of the Natural Red Pigment Lycopene: A Systematic Review from A Biotechnology Perspective. *Journal of Advanced Research*, 46, 31-47.
- Wong, T.C., Luh, B.S., Whitaker, J.R. (1971). Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isozymes of Clingstone Peach. *Plant Physiology*, 48(1), 19-23.
- Yalım Kaya, S., Canlı, D. (2019). Kızılcık Meyvesi ve Kullanılma Potansiyeli. *Dünya Sağlık ve Tabiat Bilimleri Dergisi*, 2(2), 59-65.
- Yan, J.K., Wang, Y.Y., Qiu, W.Y., Ma, H., Wang, Z.B., Wu, J.Y. (2018). Three-Phase Partitioning As An Elegant and Versatile Platform Applied to Nonchromatographic Bioseparation Processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14), 2416- 2431.
- Yıldız, S., Bilen Ç, Karakuş, E. (2022). Purification of damson plum polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of metal effects on enzyme activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(9), 1019-1034.
- Yılmaz, İ. (2010). Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2), 143-153.

- Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-86.
- Yüzügüllü Karakuş, Y., Kahveci, B., Acemi, A., & Koçak, G. (2020). Application of Three-Phase Partitioning to The Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Antioxidant Rosemary. *International Journal Food Engineering*, 16(11), 1-10.
- Yüzügüllü Karakuş, Y., Yıldırım, B., & Acemi, A. (2021). Characterization of Polyphenol Oxidase from Fennel Seeds as a Promising Source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 261-271.
- Zhu, R., Chen, B., Bai, Y., Miao, T., Rui, L., Zhang, H., Xia, B., Li, Y., Gao, S., Wang, X.D., Zhang, D. (2020). Lycopene in Protection Against Obesity and Diabetes: A Mechanistic Review. *Pharmacological Research*, 159, 104966.
- Ziyan, E., Pekyardımcı Ş. (2003). Kudüs Enginarından (*Helianthus tuberosus*) Polifenol Oksidazın Karakterizasyonu. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(2), 217-225



EKLER

Ek-A

Solüsyonların Hazırlanışı

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,0

Sodyum dihidrojen fosfat (Monobazik) 4,83 g

Disodyum fosfat (Dibazik) 3,38 g

Son konsantrasyon 500 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrat Tamponu pH 5,4

Sodyum sitrat (tribazik) 11,70 g

Sitrik asit 0,03 g

Son konsantrasyon 400 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 5,4'e ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,0

Polietilen glikol 6000 0,5 g

Askorbik asit 0,17 g

Dipotasyum Fosfat 8,7 g

Sodyum dihidrojen fosfat (Monobazik) 3,46 g

Disodyum fosfat (Dibazik) 4,94 g

Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrat tamponu pH 3,0

Sodyum sitrat 0,67 g

Sitrik asit 4,35 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 3,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrat tamponu pH 4,0

Sodyum sitrat 2,45 g

Sitrik asit 3,19 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 4,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrat tamponu pH 5,0

Sodyum sitrat 4,24 g

Sitrik asit 2,03 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 5,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu pH 6,0

Sodyum dihidrojen fosfat (Monobazik) 3,42 g

Disodyum fosfat (Dibazik) 0,82 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 6,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,0

Sodyum dihidrojen fosfat (Monobazik) 1,52 g

Disodyum fosfat (Dibazik) 4,08 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 M Tris Tamponu, pH 8,0

Tris 3,02 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 8,0'a ayarlanır.

0,1 M Glisin sodyum hidroksit Tamponu, pH 9,0

Glisin 0,165 g

Sodyum hidroksit 0,011 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 9,0'a ayarlanır.

0,1 M Glisin sodyum hidroksit Tamponu, pH 10,0

Glisin 1,88 g

Sodyum hidroksit 0,64 g

Son konsantrasyon 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 10,0'a ayarlanır.

SDS–PAGE Elektroforez Jeli İçin;

%15 (h/h) Ayırma Jeli

%30 Akrilamid solüsyonu 5 ml

1.5 M Tris-HCl [pH 8.8] 2,5 ml

ddH₂O 2,35 ml

%20 SDS 50 µl

%10 APS 100 µl

TEMED 20 µl

%5 (h/h) Yükleme Jeli

30 Akrilamid solüsyonu 830 µl

0.5 M Tris-HCl [pH 6.8] 630 µl

ddH₂O 3,4 ml

%20 SDS 25 µl

%10 APS 50 µl

TEMED 5 µl

SDS–PAGE Elektroforez Solüsyonları;

10x Running Buffer

Tris 15 g

Glisin 144 g

Son konsantrasyon 500 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

1x Running Buffer

10x buffer 100 mL

SDS 1 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir.

1,5 M Tris HCl Tamponu pH 8,8
Tris 18,15 g
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

0,5 M Tris HCl Tamponu pH 6,8
Tris 6g
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

%10 SDS
SDS 10 g
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

%10 h/h APS (Amonyumpersulfat)
0,1 g APS tartılır 1 mL dH₂O'da çözündürülür.

Gümüş Boyama Solüsyonları;

Fiksasyon
Etanol %50 mL
Asetik asit %12 mL
%37'lik formaldehit %0,05 mL
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

Yıkama
Etanol %50 mL
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

Ön İşlem
Sodyum tiyosülfat %0,02 g
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

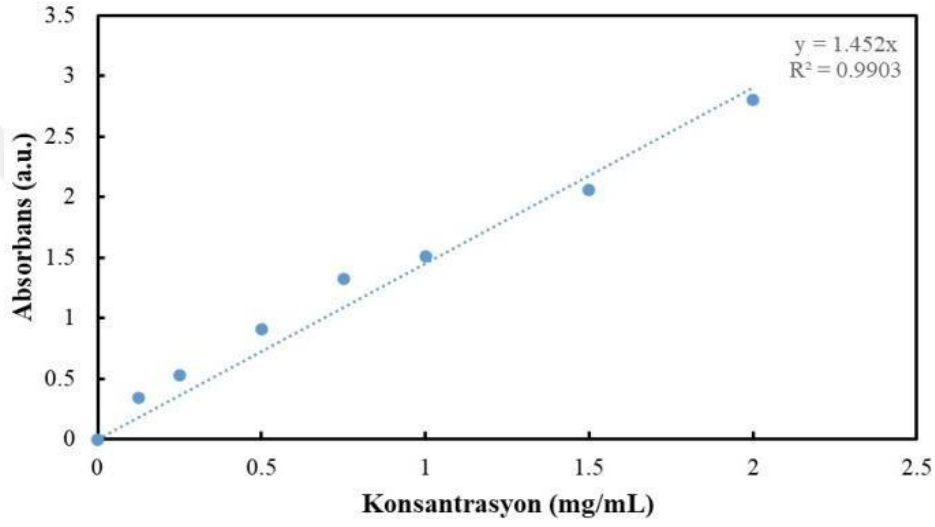
Emdirme (+4°C)
Gümüş nitrat %0,2 g
%37'lik formaldehit %0,075 mL
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

Boyama
Sodyum karbonat %6 g
%37'lik formaldehit %0,05 mL
Sodyum tiyosülfat %0,4 mg
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

Durdurma
Metanol %50 mL
Asetik asit %12 mL
Son konsantrasyon 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

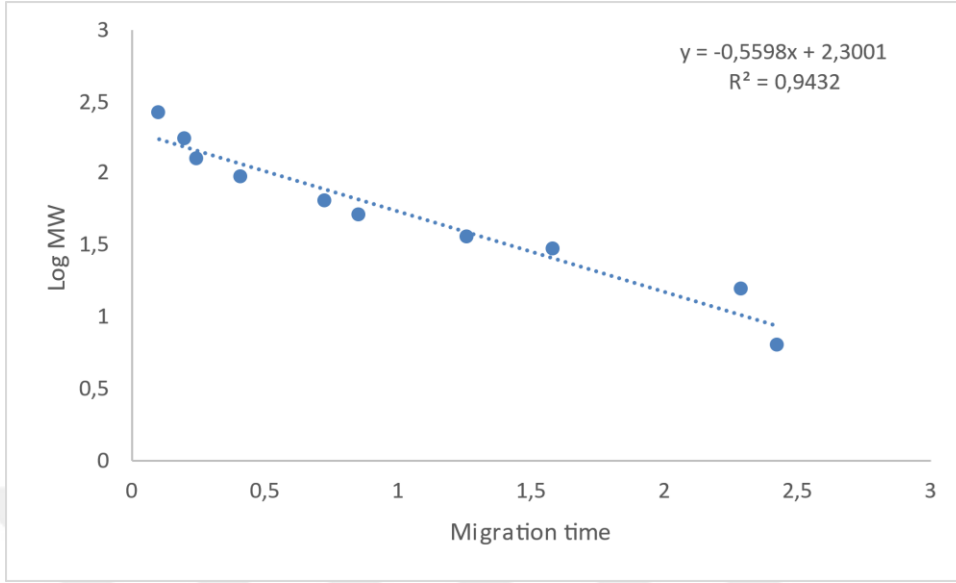
Ek-B

Protein miktarının belirlenmesi için standart protein olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Stok BSA çözeltisi (2 mg/mL) aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde standart protein çözeltileri hazırlandı. Numarlandırılmış olan 2 mL'lik ependorflara, farklı BSA konsantrasyonlarından 100 μ L ve 900 μ L Bradford reaktifi (AppliChem Bradford Ultra Protein Assay) eklendi. 595 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilerek standart eğri oluşturuldu (Şekil E.1).



Şekil B.1. Standart BSA eğrisi

Ek-C



Şekil C.1. Molekül ağırlık belirlenmesinde kullanılan grafik

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Çolak S., Işık S., Yüzügüllü Karakuş Y. (2023). Production and Purification of Laccase from *Trametes versicolor*, *1. International Conference on Frontiers in Academic Research*, Konya, Türkiye, 18-21 Şubat 2023.

Çolak S., Yüzügüllü Karakuş Y. (2023). Screening Of Polyphenol Oxidase Enzyme in Lycopene- Rich Fruits, *V. Uluslararası Tarım, Biyoloji ve Yaşam Bilimleri Konferansı*, Edirne, Türkiye, 18-20 Eylül 2023.



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa/Karacabey’de tamamladı. 2021 yılında Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2021 yılında Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.

