

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUŞMULA (*MESPILUS GERMANICA*) POLİFENOL  
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Ayşin ÇAVDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Programı

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN

Eş-Danışman  
Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Temmuz, 2023

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUŞMULA (*MESPİLUS GERMANİCA*) POLİFENOL OKSİDAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Ayşin ÇAVDAR tarafından hazırlanan tez çalışması 20.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Eş-Danışman

**Jüri Üyeleri**

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN, Danışman  
Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye  
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

---

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Muşmula (*Mespilus germanica*) Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ayşin ÇAVDAR

İmza

*Aileme  
ve  
biricik eşime*



## TEŐEKKÜR

---

Laboratuvar çalıŐmalarımın tamamında benimle birlikte emek veren sevgili Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi iğdem Bilen'e,  
Tez çalışmam süresince tavsiyelerini, destek ve bilgi birikimini benimle paylaşan; sevgili EŐ Danışmanım Prof. Dr. Emine KARAKUŞ'a,  
ÇalıŐmalarımıza aynı dönemde baŐladığım laboratuvar çalışma arkadaŐım Eren ÖZDEMİR'e,  
Hayatımın tamamında, ellerini hep bulduğum annem Nurgöl DOĞAN ve babam Engin DOĞAN'a, kardeŐlerim Aylin ve Onur DOĞAN'a, güzel kızlarım HayriŐ ve Nazlı'ya ve son olarak kalbimin içi sevgilim hayatı birlikte yürüdüğüm canım eŐim Metin ÇAVDAR'a teŐekkür ederim.

Ayşin ÇAVDAR

# İÇİNDEKİLER

|  |             |
|--|-------------|
| <b>SİMGE LİSTESİ</b>   | <b>vii</b>  |
| <b>KISALTMA LİSTESİ</b>  | <b>viii</b> |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>ÖZET</b>  | <b>x</b>    |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>xii</b>  |
| <b>1 GİRİŞ</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Literatür Özeti . . . . .  | 1           |
| 1.2 Tezin Amacı . . . . .  | 1           |
| 1.3 Hipotez . . . . .  | 2           |
| <b>2 GENEL BİLGİ</b>   | <b>3</b>    |
| 2.1 Muşmula ( <i>Mespilus germanica</i> ) Meyvesinin Özellikleri . . . . .   | 3           |
| 2.2 PFO Enzimi . . . . .   | 4           |
| 2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri . . . . .   | 7           |
| <b>3 DENEYSEL KISIM</b>  | <b>14</b>   |
| 3.1 Araştırmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar . . . . .  | 14          |
| 3.2 Araştırmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması . . . . .  | 18          |
| 3.3 Muşmuladan ( <i>Mespilus germanica</i> ) PFO Enziminin Kısmen (KSP) Saflaştırılarak Elde Edilmesi . . . . .  | 22          |
| 3.4 Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması . . . . .   | 24          |
| 3.5 Bradford Yöntemi ile Enzim Miktarının Tayini . . . . .   | 26          |
| 3.6 Muşmula PFO Enziminin Aktivitesi . . . . .   | 26          |
| 3.7 Muşmula PFO Enzimi Karakterizasyon Çalışmaları . . . . .   | 27          |
| 3.8 Muşmula PFO Enziminin Kinetik Sabitlerinin ( $K_M$ , $V_{max}$ ) Belirlenmesi ve %Verim, Spesifik Aktivite ve Saflaştırma Derecesinin Hesaplanması | 27          |
| 3.9 Muşmula PFO Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Saflık Kontrolünde Kullanılan Elektroforetik Yöntemler . . . . .                         | 28          |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>4 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>       | <b>31</b> |
| 4.1 Sonuçlar . . . . .           | 31        |
| 4.2 Öneriler . . . . .           | 43        |
| <b>KAYNAKÇA</b>                  | <b>44</b> |
| <b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b> | <b>50</b> |



## SİMGE LİSTESİ

---

|                    |                  |
|--------------------|------------------|
| EU                 | Enzim ünitesi    |
| g                  | gram             |
| kDa                | kilodalton       |
| $K_M$              | Michaelis sabiti |
| M                  | Molar            |
| mg                 | miligram         |
| mM                 | milimolar        |
| pH                 | Hidrojen gücü    |
| $V_o$              | İlk andaki hız   |
| $V_{max}$          | Maksimum hız     |
| $\mu\text{g}$      | mikrogram        |
| $\mu\text{L}$      | mikrolitre       |
| $^{\circ}\text{C}$ | santigrad derece |

## KISALTMA LİSTESİ

---

|          |                               |
|----------|-------------------------------|
| KBM G250 | Koomassie Brilliant Mavi G250 |
| KBM R250 | Koomassie Brilliant Mavi R250 |
| PFO      | Polifenol Oksidaz             |
| PEG      | Polietilen Glikol             |
| POD      | Peroksidaz                    |
| SDS      | Sodyum Dodesil Sülfat         |
| SORS     | Süper Oksit Radikal Süpürme   |
| SSA      | Sığır serum albümin           |
| TEMED    | Tetrametiletildiamin          |
| UV       | Morötesi                      |

## ŞEKİL LİSTESİ

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 2.1  | PFO enziminin katalizlediği kararar oluşum reaksiyonu [13] . . . . .  | 4  |
| Şekil 2.2  | Monofenolaz aktivitesi [19] . . . . .   | 6  |
| Şekil 2.3  | Difenolaz aktivitesi [19] . . . . .   | 6  |
| Şekil 2.4  | Afinite Kromatografisinin çalışma prensibi [47] . . . . .   | 10 |
| Şekil 2.5  | Elektroforez Düzenegi . . . . .   | 12 |
| Şekil 3.1  | Ham ekstrakta istenmeyen madde ve yabancı maddelerin santrifüj ile uzaklaştırılması . . . . .   | 23 |
| Şekil 3.2  | Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası enzim çökeleği . . . . .  | 24 |
| Şekil 3.3  | Diyaliz işlemi ile tuzun uzaklaştırılması . . . . .   | 24 |
| Şekil 4.1  | Katekol, 4-metil katekol, pirogallol ve kafeik asit için optimum tampon çözelti konsantrasyonuna (M=0.1M) karşılık enzim aktivite [U/(mL*dk)] grafiği . . . . . | 32 |
| Şekil 4.2  | Katekol için tampon çözelti konsantrasyonuna (M) karşılık enzim aktivite [U/(mL*dk)] grafiği . . . . .  | 33 |
| Şekil 4.3  | Katekol için optimum pH değerine karşılık enzim aktivite [U/(mL*dk)] grafiği . . . . .  | 34 |
| Şekil 4.4  | Katekol için optimum sıcaklık (°T) değerine karşılık enzim aktivite [U/(mL*dk)] grafiği . . . . .   | 35 |
| Şekil 4.5  | Sefaroz 4B-L-tirozin- p amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi elüsyon grafiği . . . . .  | 36 |
| Şekil 4.6  | Sefaroz 6B-L-tirozin- p-amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi yıkama ve elüsyon grafiği . . . . .  | 37 |
| Şekil 4.7  | Protein miktarının ölçülmesinde kullanılan standart doğru 1 . . . . .   | 38 |
| Şekil 4.8  | Protein miktarının ölçülmesinde kullanılan standart doğru 2 . . . . .   | 38 |
| Şekil 4.9  | Muşmula ( <i>Mespilus germanica</i> ) PFO enziminin (a) Native-PAGE elektroforez görüntüsü (b) SDS-PAGE elektroforez görüntüsü . . . . .                        | 39 |
| Şekil 4.10 | Katekol substratı için Lineweaver Burk grafiği . . . . .  | 40 |
| Şekil 4.11 | Muşmula PFO enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi [U/(mL*dk)] ve % enzim aktivitesi grafiği . . . . .   | 43 |

# Muşmula (*Mespilus germanica*) Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Ayşin ÇAVDAR

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN

Eş-Danışman: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını gerçekleştiren polifenol oksidaz (PFO) enzimleri, oksidasyon tepkimelerini katalizlemektedir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları, meyve ve sebzelerin içeriğinde bulunan fenolik maddelerin PFO enzimi katalizörlüğünde o-kinonlara hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonları ile sağlanmaktadır. Hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonlarından sonra o-kinonların enzimatik olmayan oksidasyonu ve polimerizasyonu sonucunda melanoidinler oluşur. Gerçekleşen bu reaksiyonlar sebebi ile ürünlerde esmerleşme meydana gelmektedir. *Mespilus germanica* muşmula, sağlık yararları sebebi ile ticari pazar değeri kazanmış bir meyvedir. İçeriğinde bulunan antioksidan ve mineral özellikleri sebebi ile enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında *Mespilus germanica* muşmulanın saflaştırılması amacıyla ilk olarak, %0-80 amonyum sülfat ile çöktürme işlemi yapılmıştır, ardından diyaliz işlemi ile kısmen safsızlıklardan uzaklaştırılan polifenol oksidaz enzim ekstraktı (KSP enzimi) elde edilmiştir. Elde edilen KSP enziminin en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu optimum reaksiyon koşullarının tespit edilebilmesi amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin kafeik asit, katekol, progallol ve 4-metil katekol substratları ile ilk olarak optimum substratı tespit edilmiş ve bu substrat üzerinde çalışılarak, optimum konsantrasyon, optimum pH ve optimum sıcaklık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar için elde edilen optimum koşullar katekol substratı için sırasıyla 0.1M/ pH:6.8/ 15°C; olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum substratı için  $V_{max}$  ve  $K_M$  kinetik sabitleri ise sırasıyla; 12542.46 EU ve 2.5 mM olarak

hesaplanmıştır.

Çalışmanın devamında ise, kısmen safsızlık içeren KSP enzim özütü Sefaroz 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit ve Sefaroz 6B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite jelleri ile saflaştırılmıştır. Elde edilen PFO enziminin saflık kontrolü ve molekül kütlesinin tespit edilebilmesi amacıyla doğal jel elektroforezi (NATIVE PAGE) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi uygulanmıştır. Muşmula PFO diyaliz numunesinde SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 40 kDa ve 35 kDa'da iki bant gözlenirken, Native-PAGE ile 40 kDa ve 70 kDa'da iki bant elde edilmiştir. Dolayısıyla muşmulada molekül ağırlıkları 40 kDa ve 35 kDa'luk özdeş iki alt birim içeren 70 kDa olan iki PFO izoenzim olabileceği şeklinde yorum yapılmıştır. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan örnekler için ise Native-PAGE 'de yaklaşık 40 kDa civarında tek bant gözlendiğinden, muşmula PPO izoformlarından birinin afinite kromatografisi ile saflaştırıldığı yorumu yapılmıştır. Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit ve Sefaroz-6B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite jelleri kullanılarak saflaştırılan *Mespilus germanica* PFO enzimi için sırasıyla 53,96 ve 7,26 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Polifenol oksidaz, *Mespilus germanica*, saflaştırma, karakterizasyon

# Purification and Characterization of Medlar (*Mespilus germanica*) Polyphenol Oxidase Enzyme

Ayşin ÇAVDAR

Department of Chemistry  
Master of Science Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Çiğdem BİLEN

Co-supervisor: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Polyphenol oxidase (PPO) enzymes, which perform enzymatic browning reactions, catalyze oxidation reactions. Enzymatic browning reactions are provided by hydroxylation and oxidation reactions of phenolic substances to o-quinones catalyzed by PFO enzyme in fruits and vegetables. As a result of non-enzymatic oxidation and polymerization of o-quinones, melanoidins are formed in dark colorful products. *Mespilus germanica* medlar was used as a source of enzymes due to the benefits it provides for human consumption, its commercial value and rich antioxidant and antiradical properties in this study.

In the first part of the study, the PPO enzyme extract of *Mespilus germanica* medlar, which was partially purified by precipitation with (0-80) % ammonium sulfate and dialysis, respectively, was obtained. Following, characterization studies were carried out in order to determine the optimum reaction conditions in which maximum enzyme activity was observed. Optimum substrate was determined by using catechol, 4-methyl catechol, progallol and caffeic acid substrates. Optimum concentration, optimum pH and optimum temperature studies were performed in the presence of optimum substrate. The optimum conditions were determined for catechol as 0.1M/ pH:6.8/ 15°C, respectively.  $V_{max}$  and  $K_M$  kinetic constants of the enzyme for catechol were calculated as 12542.46 EU and 2.5 mM, respectively.

In the following step, *Mespilus germanica* PPO extract was purified with Sepharose 4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid and Sepharose 6B-L-tyrosine-p-amino benzoic

acid affinity gels, respectively. While bands of medlar PPO dialysis samples were observed at approximately 40 kDa and 35 kDa in SDS-PAGE, two bands were obtained at 40 kDa and 70 kDa which is a homodimer that each one is 35 kDa in Native-PAGE. Therefore, it was interpreted that it could be two PPO isoenzymes with molecular weights of 40 and 70 kDa in medlar. Since a single band of approximately 40 kDa was observed in Native-PAGE for the samples purified by affinity chromatography, it was interpreted that one of the medlar PPO isoforms was purified by affinity chromatography. For *Mespilus germanica* PPO enzyme purified by using Sepharose-4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid and Sepharose-6B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid affinity gels, 53.96 and 7.26-fold purification degrees were achieved, respectively.

**Keywords:** Polyphenol oxidase, *Mespilus germanica*, purification, characterization



### 1.1 Literatür Özeti

Polifenol oksidaz (PFO) enzimi, depolama koşullarında kesme ve ezme sonucunda sebze ve meyvelerde esmerleşme reaksiyonuna neden olur. Bu nedenle gıdaların renk, tat ve besin değerlerinde istenmeyen değişiklikler meydana gelmektedir [1]. PFO, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunun ve o-difenollerin de kinonlara oksidasyonunun reaksiyonlarını katalizler [2]. Bu çalışmada Bursa ilinden temin edilen muşmula meyvesinden PFO enzimi saflaştırılmıştır. Enzim kaynağı olarak seçilen muşmula, insan tüketiminde bir meyve olması ve ticari pazar değerine sahip olması sebebiyle tercih edilmiştir, ayrıca içerdiği zengin antioksidan ve antiradikal özellikler ve bunun yanında yüksek oranda fenolik madde içermesi sebebi ile meyve ve sebzelerde bulunan PFO içeriğinin incelenmesi ve araştırılması için saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları önem kazanmıştır [3] [4].

Bu tez çalışmasında PFO enzimi, muşmula meyvesinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Literatürde PFO enziminin muşmuladan afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına rastlanmamıştır. Proteinler afinite kromatografisi vasıtasıyla bir basamakta kompleks bir karışımdan kolaylıkla ve yüksek saflaştırma katsayısında izole edilebilirler [5]. Çünkü afinite kromatografisi, saflaştırılmak istenen proteinin matriks adı verilen sabit bir faza kovalent olarak immobilize edildiği ve saflaştırılmak istenen proteine spesifik ve ilgili proteinin tersinir bağlandığı bir tekniktir. [6]. Bu sebeple çalışmada ileri bir saflaştırma tekniği olan afinite kromatografisi ile çalışılmıştır.

### 1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı muşmula meyvesinde (*Mespilus germanica*) bulunan PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmalarının yapılmasıdır.

### 1.3 Hipotez

Muşmula (*Mespilus germanica*) PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması, elde edilen sonuçların literatürdeki farklı meyve ve sebzelerde bulunan PFO enzimleriyle karşılaştırılması hedeflenmiştir.



### 2.1 Muşmula (*Mespilus germanica*) Meyvesinin Özellikleri

Muşmula gülgiller altfamilyasında bulunan bir meyve türüdür. Küçük boyutludur ve yüzeyi hafif tüylüdür. Tatlı, fakat aynı zamanda az miktarda ekşi bir lezzeti vardır. Ağaçlarda yetişir. Muşmula meyvesi sıcak iklimlere daha uygun olmakla birlikte dünya genelinde bir çok yerde yetişir. Muşmula ağacının yetiştiği bölgenin iklim şartları ve ağaç bakımının da etkisi olmakla beraber 8 metreye kadar büyüyebilirler. [7] [8].

#### 2.1.1 Muşmulanın (*Mespilus germanica*) Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Muşmulanın meyveleri kahverengi-kırmızımsı renktedir. Yaprakları koyu yeşil ve iridir, yaklaşık 8–15 cm uzunluğunda ve 3–4 cm genişliğindedir[9]. Muşmula, *Rosaceae* familyasından *Mespilus germanica* L.'nin meyvesidir. Muşmula (*Mespilus germanica* L.) meyvesinin son derece zengin antioksidan ve antiradikal özellikleri olduğu gözlenmiştir. Olgunlaşmış muşmula meyvelerinde fruktoz ve glukoz, linoleik asit, palmitik asit, malik asit ve sitrik asit gibi organik asitler, aspartat ve glutamat gibi aminoasitler, potasyum ve uçucu bileşenler yüksek seviyelerde tespit edilmiştir [10]. Yapılan başka bir çalışmada ise muşmula meyvesinin kalsiyum, fosfor, magnezyum ve demir açısından zengin olduğu tespit edilmiştir[11]. Yapılan diğer bir çalışmada ise muşmula meyvesinin olgunlaşma sürecine ait besin değerindeki değişiklikler incelenmiş ve belirlenen tüm mineral bileşikleri içinde en fazla potasyum içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır [3].

#### 2.1.2 Muşmulanın (*Mespilus germanica*) Önemi ve Faydaları

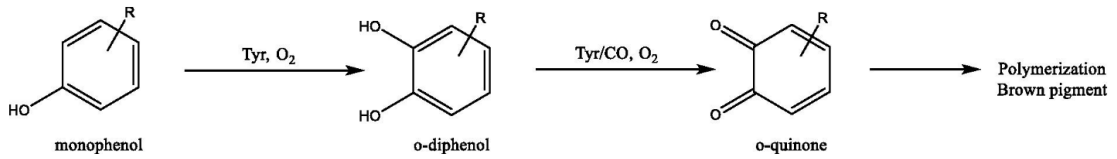
Muşmula meyvesi fenolikler, antosiyaninler, organik asitler ve mineraller gibi çok zengin biyoaktif bileşik kaynaklarıdır. Muşmula meyvesi besin maddesi olarak marmelat, reçel ve jöle yapımında kullanılmaktadır. Muşmula meyvesi ayrıca kabızlık tedavisinde, idrar söktürücü olarak, böbrek ve mesane taşlarını atmak için kullanılır [10].

### 2.1.3 Muşmulanın (*Mespilus germanica*) Sağlık ve Endüstriyel Alanlardaki Yeri

Muşmula meyvesinin sağlık açısından bir çok faydası gözlenmiştir. Bağışıklık sisteminin güçlenmesinde etkisi olan C vitamini bakımından zengindir. C vitamini açısından zengin olması sebebi ile de enfeksiyonlarla mücadele etmeye yardımcı olur. Bağırsak hareketlerini artırarak sindirim sisteminin düzenli çalışmasında yarar sağlar. Yapraklarından çay yapılan muşmula meyvesi böbrek sorunları yaşayan bireylerde oldukça yararlıdır. Vücuttaki toksinleri atmaya yardımcı olur. İçerdiği A vitamini sayesinde göz sağlığını korur. Düşük kalorili bir meyvedir, bu özelliği sayesinde şeker hastalığı olan bireylerin de tüketebileceği bir meyvedir [10].

## 2.2 PFO Enzimi

PFO (EC: 1.14.18.1) oksidoredüktaz sınıfında bulunan bir enzimdir. Birçok bitki, hayvan, bakteri ve bazı mantarlarda yaygın olarak bulunur, kofaktörü bakırdır. [1]. PFO aynı zamanda tirozinaz, katekoloksidaz, polifenolaz, katekolaz, fenolaz, o-difenoloksidaz, mono ve kresolaz olarak da bilinir [12].



Şekil 2.1 PFO enziminin katalizlediği kararma oluşum reaksiyonu [13]

Şekil 2.1’de gösterildiği gibi ilk basamak monofenollerin tirozinaz enzimi tarafından difenollere hidroksilasyonudur, ikinci basamak ise difenollerin katekolaz enzimi tarafından o-kinonlara oksidasyonudur. Her iki reaksiyon da oksijen gerektirir, oluşan o-kinonlar aminoasit ve proteinler ile kahverengi kompleks polimerler oluştururlar, verilen bu reaksiyon PFO’nun katalizlediği kararma reaksiyonudur [13] [14].

### 2.2.1 PFO Enziminin Yapısı ve Önemi

PFO’lar üç grup altında toplanmaktadır. Bunlar; lakkazlar, katekol oksidazlar ve tirozinazlardır [15]. Lakkazlar, p-difenoller üzerinde oldukça etkilidirler. Tirozinazlar monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu gerçekleştirirler. Tirozinazlar bitkisel kaynaklarda kararmaya neden olduğu için bitki dokularında yoğun olarak bulunan bir enzimdir. Katekol oksidazlar, böcekler ve patojenlere karşı zarar görmüş bitki dokularını korurlar. Polifenoller ve o-difenoller üzerinde etkilidir. Bitkilerde kahverengi polifenolik katekol melaninlerin oluşmasını sağlarlar [16]. PFO aktivitesi ile bitkinin strese karşı direnci arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır. PFO

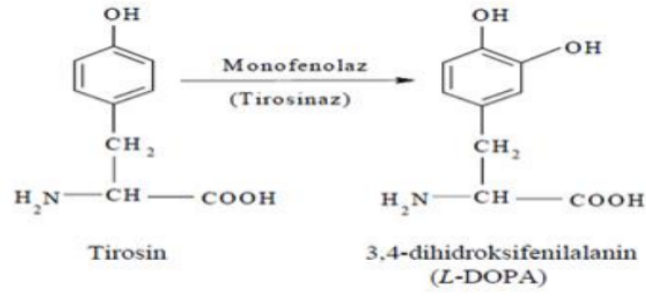
aktivitesi yüksek olan patates türlerinin, hastalıklara karşı savunma mekanizmasının diğer türdeki patateslere göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. PFO'ların bu etkiyi sentezledikleri kinonların protein veya diğer fenolik yapılarla çapraz bağlanması sonucu fiziksel engeller oluşturmasıyla veya kinonların çapraz bağlanması sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini azaltabilecek antioksidan özelliklerin artmasına bağlı olarak oksidatif stresi azaltması ile gösterebileceği anlaşılmıştır [17] [18].

### 2.2.2 PFO Enziminin Katalitik Mekanizması

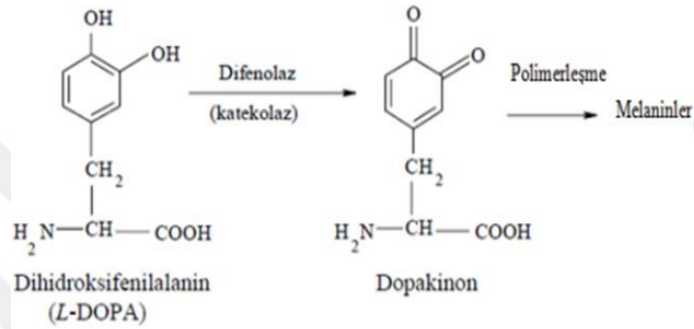
PFO enziminin katalizlediği reaksiyon mekanizmaları;

- Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyon reaksiyonu
- O-difenollerin o-kinonlara oksidasyon reaksiyonu
- Metoksi ile yer değiştirmiş polifenollerin oksidasyonu

PFO enzimi tarafından katalizlenen monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin reaksiyon şemaları aşağıda verilmiştir. ( Şekil 2.2) (Şekil 2.3) [19].



**Şekil 2.2** Monofenolaz aktivitesi [19]



**Şekil 2.3** Difenolaz aktivitesi [19]

Patates, üzüm, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantarda bulunan PFO enzimi her 2 aktiviteyi de göstermektedir. Ancak mango, muz, çay yaprağı, tütün yaprağı, armut gibi meyve ve bitkilerden elde edilen PFO enziminin monofenollerle reaksiyon göstermediği ortaya çıkmıştır. Bu türler sadece katekolaz aktivitesi göstermektedir [20].

### 2.2.3 PFO Enziminin Substratları

Meyveler ve sebzeler çeşitli fenolik bileşiklere sahiptir. Bitkiler, yapılarında buldukları fenollerin tamamını kullanamazlar. PFO enzimi de substrat spesifikliğine sahip olduğundan, bulunduğu kaynağa göre farklı özellikler gösterir. [21].

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, bitkinin türü, büyüme koşulları, hasat edilmesi, depolanması sırasında maruz kaldığı çevresel faktörlere ve olgunlaşma derecesine göre çeşitlilik göstermekte olup bitkinin renginde, tadında da farklılıklar meydana getirmektedir [22]. PFO'nun meyve ve sebzelerde en yaygın bulunan substratları klorojenik asit ve türevleri, flavonoid tipi fenoller ve basit fenollerdir. Flavonoidler bitkilerin çiçek, tohum, yaprak, meyve gibi bir çok bölümünde bulunurlar. [23]. Klorojenik asit, PFO'nun en yaygın substratıdır. Klorojenik asitin izomerleri olan

izoklorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudo klorogenik asit PFO enziminin doğal substratlarıdır. [21].

#### **2.2.4 PFO Enziminin Sağlık ve Endüstriyel Alanlardaki Yeri**

PFO enzimi sağlık ve endüstriyel anlamda pek çok fayda sağlamaktadır. Çeşitli endüstrilerde oluşan atık suların fenollerin uzaklaştırılmasında kullanılan PFO'nun aynı zamanda substrat özgüllüğü sayesinde çok düşük substrat konsantrasyonunda etkili şekilde çalışabilen hassas biyosensörlerin geliştirilmesini uygun hale getirmektedir. PFO gıda endüstrisinde ise ekmek, kuru meyve, çay, kakao ve kahve üretiminin kalitesinin korunması amacıyla da kullanılmaktadır [1].

PFO'nun sağlık alanında da bir çok yararı vardır. Parkinson hastalığı ve lösemi tedavisinde çeşitli kullanımları bulunmaktadır, aynı zamanda ilaç endüstrisinde morfinin kodeinden ayrımını sağlamak için PFO immobilize elektrotlar kullanılmıştır [24].

#### **2.2.5 Muşmulada Bulunan PFO Enzimi**

Muşmula meyvesinin olgunlaşması sırasında ve olgunlaşma sonrasında hızlı enzimatik esmerleşme gösterdiği ve muşmula meyvelerinde farklı PFO izoformlarının bulunduğu gözlenmiştir. Hasat zamanı, mevsim, meyve olgunluğu ve olgunlaşma sırasındaki genotip farklılıklarının muşmula meyvesinde PFO izoformlarının dağılımı, aktivitesi, karakterizasyonu ve fenoliklerinde önemli etkilere neden olduğu sonucuna varılabilir [25]. Bu etkilerin daha net olarak aydınlatılabilmesi amacıyla da PFO enziminin muşmuladan saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bölüm 2.3'de çalışmamızda kullanılan saflaştırma yöntemlerine değinilmiştir.

### **2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri**

Protein gibi makromoleküller, gıda, biyoteknoloji, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde önemli bir ürün sınıfı oluşturmaktadır. Verimli ve hızlı protein saflaştırma yöntemleri geliştirmeye yönelik artan ihtiyaç, bu alanda araştırma ve büyümeyi gerektirmektedir. Protein saflaştırma yöntemlerindeki ilerlemeler sayesinde herhangi bir proteinin şu anda saflaştırılabileceği makul bir şekilde beklenebilir. Bununla birlikte, protein üretim maliyeti, son derece yüksek olmaya devam etmektedir. Yöntemlerin anlaşılması ve deneysel koşulların optimizasyonu, tüm düzenleyici gereksinimleri karşılarken üretim maliyetlerini en aza indirmek imalat sanayi için kritik hale gelmektedir. Spesifik ve etkili materyal ve yeni saflaştırma yöntemlerinin gelecekte yeni ve farklı proteinlerin saflaştırılabilmesine rehberlik etmesi beklenmektedir. [26].

Proteinler tek bir basamakta saflaştırılamazlar. Bir proteini istenilen saflık derecesinde elde edebilmek için birden fazla saflaştırma basamağına ihtiyaç duyulur. Karışım içinde bulunan bir proteinin spesifik olarak elde edilebilmesi için proteini yakinen tanımak, yapısal özelliklerini bilerek uygun saflaştırma metodunu uygulamak gerekir. Bir proteine ait saflaştırma basamaklarından biri, başka bir proteinin denatüre olmasına sebep olabilir [26].

Proteinler kararlı yapıda değildirlerdir. Proteinlerin kararlılığı bir çok çevresel koşula, kimyasal yapı ve yapısal özelliklerine bağlı olarak azalabilir. Bu sebeple protein ayırma işlemleri uygulanırken tüm bu faktörler değerlendirilerek ayırma yapılmalıdır. Saflaştırma adımlarını iki gruba ayırmak mümkündür :[27] [28]

1. Ön Ayırma Yöntemleri
2. Kromatografik Yöntemler

### 2.3.1 Ön Ayırma Yöntemleri

Ön ayırma yöntemi, saflaştırılmak istenen proteinin bulunduğu kaynaktan koparılmasıdır. Ön ayırma işleminde proteinler için belli bazı yöntemler kullanılır. Bunlardan biri ortamın pH'ını değiştirmektir. Diğer yöntem ise çöktürme yapmaktır . Çöktürme işleminde tuzlar, organik polimerler ya da organik çözücüler kullanılabilir [29] [30]. Çöktürme yönteminde kullanılan en iyi ajanlar ,  $SO_4^{2-}$  ,  $CH_3COO^-$  ,  $K^+$  ,  $Cl^-$  ,  $PO_4^{3-}$  ,  $Br^-$  ,  $NO_3$  ,  $ClO_3^-$  ,  $NH_4^+$  ,  $Na^+$  şeklinde sayılabilir. Çöktürme işleminde kullanılacak ajan seçimini doğru yapabilmek ve yöntemden iyi sonuç alabilmek için, proteinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyi bilmek, çözeltide bulunan diğer maddelerin özellikleri hakkında da bilgi sahibi olmak gerekir. Bu yöntem hidrofobik etkileşime dayanır. Katyonlar çözeltideki hidrofobik etkiyi artırarak, hidrofobik yüzeylerin birleşmesini ve proteinlerin çökmesini, anyonlar ise hidrofobik etkiyi azaltarak proteinlerin çözeltide kalmasını kolaylaştırırlar. Çöktürme işleminin yavaş yapılması, istenmeyen maddelerin çökmesini engelleyerek elde edilen maddenin daha saf olmasını sağlar [31].

### 2.3.2 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışım içinde bulunan bileşikleri saflaştırmak veya ayırmak için kullanılır. Birbirinden farklı ve karışmayan iki fazın arasındaki dağılımı yoluyla ayırma sağlar. Fazlardan biri sabit diğeri ise hareketlidir. [28].

Kromatografi özetle proteinlerin ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimlerine ve faz çeşitliliğine göre olmak üzere 3 grupta sınıflandırılır [32].

Ayrılma mekanizmasına göre: Adsorpsiyon, Dağılma, İyon değişim, Jel filtrasyon, ve Afinite kromatografisi yöntemleri uygulanır.

Uygulama biçimine göre: Düzlemsel ve Kolon kromatografisi yöntemleri uygulanır.

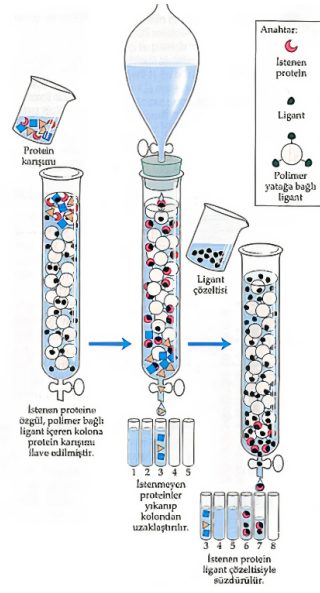
Faz çeşitliliğine göre: Sıvı ve Gaz kromatografisi yöntemleri uygulanır.

Yapılan çalışmada, saflaştırma yöntemi olarak afinite kromatografisi seçilmiştir ve bölüm 2.3.2.1’de afinite kromatografisi hakkında bilgi verilmiştir.

### **2.3.2.1 Afinite Kromatografisi**

Proteinler genellikle çöktürme, ortamda pH ve iyonik şiddet değişikliği, çözücü ve polimer maddeler yardımı ile ayrılırlar. Ancak zamanla daha hızlı, basit ve yüksek saflaştırma katsayısına ulaşmak için yöntemler aranmıştır. Bu arayış neticesinde molekülleri biyolojik özelliklerine göre ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden biri afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi ile protein saflaştırma yapılabilmektedir, bunun yanında, protein ayırma ve protein zenginleştirme işlemleri de uygulanmaktadır. Molekülleri biyolojik fonksiyon özelliklerine göre ayırmayı sağlayan afinite kromatografisinin bir çok türü vardır. İyon değişim afinite kromatografisi, hidrofobik afinite kromatografisi, metal şelasyon afinite kromatografisi, DNA afinitesi, lektin afinitesi, antikor afinite kromatografisi gibi bir çok afinite yöntemi vardır. Yöntem çeşitliliği sayesinde, protein, vitamin, enzim, karbonhidrat gibi bir çok molekülün saflaştırma işlemi yapılabilmektedir [33–35].

Afinite kromatografisi hedef proteinin, spesifik ligand ile etkileşmesi yoluyla ayrılmasını sağlayan çok etkili bir kromatografik yöntemdir. Bu yöntem yüksek seçicilik sağlar ve kullanımı kolaydır. Bu yüzden saflaştırmak istenen kaynak pek çok farklı yöntemle göre daha yüksek saflaştırma sağlanarak elde edilir. Afinite kromatografisi saflaştırmak istenen proteini bağlamak için tasarlanmış olan ligandın immobilizasyonuna dayanmaktadır, Sabit ve mobil faz kısımları bulunur. Sabit faz katı yada sıvı olabilmektedir. Ligand sabit fazda bulunur ve protein ile etkileşimi sağlanarak tutunması hedeflenir. [33, 36–45]. Ligand ve saflaştırmak istenen protein arasında, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri olmaktadır. Ligand ile etkileşen proteinin ayrılması için ortamın iyonik kuvveti, pH değeri değiştirilebilir, ya da yarışmacı bir ligand kullanılarak protein ortamdan koparılarak saflaştırılabilir [35, 46]. Kolondan koparılmak istenen proteinin kolondan ayrımı sırasında bileşiği denatüre etmemeli , bileşiğin spesifik aktivitesinde ve fonksiyonel özelliklerinde değişime neden olunmamalıdır [28].



**Şekil 2.4** Afinite Kromatografisinin çalışma prensibi [47]

Şekil 2.4'te gösterilen resim ile afinite kromatografisinin çalışma mekanizması anlatılmıştır.

Afinite kromatografisi, başarılı bir ayırımı sağlanabilmesi için ligandın matrikse uygun bir şekilde seçilmesini gerektiren bir kromatografi yöntemidir. Ligand seçiminde seçici olmak, kolon içinde bulunan proteinin ayırımının sorunsuz bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak için çok önemlidir [48]. Bir çok ligand biyolojik yapıda olmasına rağmen, ayırım için biyolojik yapıda olmayan moleküller de tercih edilebilmektedir. Bu moleküller, biyolojik yapısına bakılmaksızın yüksek spesifiklikte veya genel amaçlı olarak iki gruba ayrılır. Yüksek Spesifiklikteki ligandlar, tamamen hedef bileşiğe yöneliktir ve bu şekilde bağlanırlar. Genel amaçlı kullanılan ligandlar daha çok, birbiriyle yakın grupta bulunan moleküllere bağlanarak benzer özelliklere sahip bileşiklere hedef alırlar. [28]. Bu kromatografi yönteminde yaygın olarak kullanılan ligandlar Tablo 2.1'de belirtilmiştir.

**Table 2.1** Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar [28]

| Ligand Çeşidi                 | Ligand                             | Tutulan Bileşik   |
|-------------------------------|------------------------------------|---|
| Yüksek spesifikteki ligandlar | Nükleik asitler                    | DNA'ya bağlanan proteinler,<br>Tamamlayıcı nükleik asitler,<br>RNA'ya bağlanan proteinler |
|                               | Enzim inhibitörleri ve kofaktörler | Enzimler  |
|                               | Antikorlar                         | İlaçlar, proteinler, peptitler, hormonlar,<br>virüsler                                    |
| Genel Ligandlar               | Lektinler                          | Glikoproteinler, polisakkaritler, şekerler<br>glikolipidler                               |
|                               | Sentetik boyalar                   | Dehidrogenazlar, kinazlar   |
|                               | A proteini ve G proteini           | Bozulmamış antikorlar   |
|                               | Boronatlar                         | Kateşoller, glikoproteinler, polisakkaritler  |
|                               | Metal şelatlar                     | Metal bağlayıcı aminoasitler, proteinler,<br>peptitler                                    |

### 2.3.3 Elektroforez

Elektroforez, ortamın pH'ına bağlı olarak (+) veya (-) yükle yüklenen proteinlerin bir elektrik alanında ayrılmasını sağlar. Bu ayrılım, biyomoleküllerin büyüklükleri ve elektriksel yükleri tarafından yönlendirilir. Elektriksel alanda bulunan negatif yüklü tanecikler anoda doğru, pozitif yüklü tanecikler ise katoda doğru hareket ederler. Elektriksel alanda gerçekleşen harekette molekülün kimyasal yapısı, şekli ve büyüklüğü çok önemlidir. Elektroforez, güvenli, hızlı ve etkili bir ayırma için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, nükleik asitler, proteinler, amino asitler ve peptitler gibi yüklü moleküllerin analizinde kullanılabilir. Yüklenmiş tanecikler yük ve büyüklük özelliklerine bağlı olarak hareket ederler. Yüklü moleküllerin hareketine yalnızca yük ve sürtünme etki eder [49] [50].

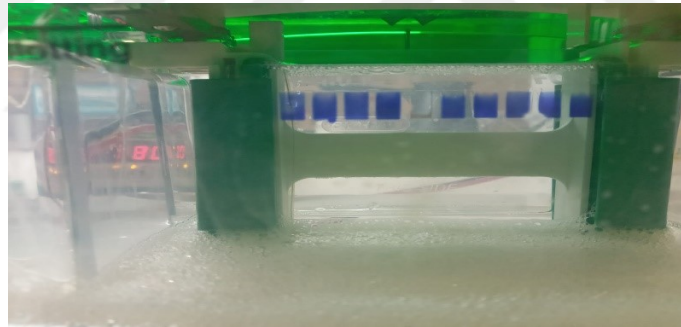
Elektroforezin kullanım alanları aşağıdaki gibidir:

- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık belirlenmesinde
- Molekül kütlesinin belirlenmesi
- Enzim izozimlerinin belirlenmesi
- Saflık kontrolü yapılması

Protein yapılarının aminoasit içerikleri, konformasyonları ve büyüklükleri birbirlerinden farklıdır, dolayısı ile içerdikleri net yükler de farklıdır. Elektroforezde proteinlerin hareketi, proteinlerin içerdikleri bu net yükler sayesinde belirlenir. [49].

Elektroforez Çeşitleri; Kağıt ve selüloz asetat elektroforezi, Agaroz jel elektroforezi, Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), İnce tabaka elektroforezi olmak üzere bir dizi farklı materyal kullanılır. Agaroz ve poliakrilamid, yapıları benzemese de gözenekli jeller oluşturan destek matriksleridir. Agarozun gözenekleri geniş olduğu için daha çok molekül kütlesi büyük olan protein ve molekül kütlesi büyük olan nükleik asitlerin ayırımını yapar. Küçük gözenekli jeller olan poliakrilamidler, çeşitli protein ve oligonükleotitlerin ayrılmasında kullanılır. [49].

Poliakrilamid jeller akrilamid ve bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulmaktadır. Tepkime vinil katılımlı polimerizasyondur ve polimerizasyonun alkali pH' da etkinliği yüksektir. Oksijenin varlığı poliakrilamidin polimerizasyon oluşumunu zorlaştırmaktadır. Polimerizasyon oluşumu kimyasalların saflığı, monomer ve reaksiyon başlatıcı maddelerin derişimleri, sıcaklık gibi faktörler etkilemektedir. Reaksiyon amonyum persülfat aracılığıyla başlatılır. Ayrıca jel yapımında kullanılan N,N,N',N'- tetrametiletildiamin (TEMED) ve amonyum persülfat jel oluşumu için gereken serbest radikal üretimini sağlamaktadır [51]. Bu kimyasallar kullanılarak ve proteinleri yüklemek üzere hazırlanan bir elektroforez jel örneği aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5** Elektroforez Düzenegi

PAGE elektroforezi serum proteinlerini 20'den fazla bileşene ayırabilmektedir. Poliakrilamid, polimerizasyon sağlanmadan önce içeriğinde değişiklik yapılarak jel gözenek boyutunun kolaylıkla değiştirilebildiği inert bir destek materyalidir. PAGE yöntemi ile doğal proteinlerin ayırımı sağlanabilir, bunun yanında sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak da proteinlerin denatürasyonu gerçekleştirilerek molekül kütlesi belirlenmesi amacı ile kullanılabilir. [52].

Elektroforez yöntemi genellikle molekülün saflık kontrolünü yapmak ve molekül ağırlığını tespit etmek amacı ile kullanılır. Elektroforez yönteminde deterjan olarak çoğunlukla SDS kullanılır. Bunun nedeni, SDS'in proteinlerin bir çoğuna molekül ağırlığı oranında, iki amino asite bir molekül SDS olacak şekilde bağlanır. SDS proteinlere bağlanarak şekillerinde değişiklik meydana getirir. Çoğu protein benzer

şekilde değişikliğe uğrar. Bu sayede SDS temelli elektroforez işleminde protein yapıları ayrımlarını sadece molekül ağırlığına göre gerçekleştirir. Küçük polipeptit yapılar daha hızlı yer değiştirirler. Elektroforez sonunda proteinler, proteine bağlanırken jelle bağlanmayan Coomassie blue (mavisi) boyasıyla görüntülenirler. Bu sayede saflaştırılan proteinin tespiti sağlanmış olur [52].



# 3

## DENEYSEL KISIM

### 3.1 Araştırmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar

#### 3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

##### 3.1.1.1 Enzim Saflaştırmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Materyaller

Enzim saflaştırılmasında kullanılan kimyasallar maddeler aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3.1).

**Table 3.1** Enzim saflaştırılmasında kullanılan maddeler

| Madde/ Materyal Adı/<br>Formül                              | Kullanım Amacı   | Firma/ CAS No               |
|---|--|-----------------------------|
| Potasyum fosfat dibazik,<br>$K_2HPO_4$                      | Ekstraksiyon ve diyaliz<br>tampon çözeltilerinin<br>hazırlığında kullanılmıştır.                                 | Sigma Aldrich/<br>7758-11-4 |
| Polietilen glikol (PEG) /<br>$HO(C_2H_4O)_nH$               | Ekstraksiyon tampon çözeltisi<br>hazırlığında kullanılmıştır.  | Merck® /<br>25322-68-3      |
| Sodyum hidroksit / NaOH                                     | Çalışma süresi boyunca<br>hazırlanan çözeltilerin<br>pH'larının ayarlanmasında ve<br>kontrolünde kullanılmıştır. | Merck® /<br>1310-73-2       |
| Koomassie brillant mavi<br>R-250/ $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ | Elektroforez basamağında<br>renklendirme çözeltisinde<br>kullanılmıştır.   | Sigma Aldrich/<br>6104-59-2 |
| 2-Merkaptoetanol /<br>$HSCH_2CH_2OH$                        | SDS-PAGE elektroforezinde<br>numune tampon çözeltisi<br>bileşeni olarak kullanılmıştır.                          | Merck® /<br>60-24-2         |
| L-Askorbik asit / $C_6H_8O_6$                               | Estraksiyon tamponunda<br>enzimin tersinir inhibitörü<br>olarak kullanılmıştır                                   | Sigma Aldrich/<br>50-81-7   |

**Table 3.1** Enzim saflaştırılmasında kullanılan maddeler(devamı)

| <b>Madde/ Materyal Adı/<br/>Formül</b>   | <b>Kullanım Amacı</b>   | <b>Firma/ CAS No</b>        |
|--|---|-----------------------------|
| Amonyum sülfat / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | Enzimin çöktürülmesi amacı ile kullanılmıştır.  | Sigma Aldrich/<br>7783-20-2 |
| Akrilamid/bis-akrilamid, %30 / $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ / $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ | PAGE yönteminde elektroforez jeli hazırlığında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır       | Sigma Aldrich/<br>A3574     |
| N,N,N',N' – tetrametiletilendiamin/<br>$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$                                     | Elektroforez jeli hazırlığında polimer oluşumunu hızlandırmak amacı ile kullanılmıştır      | Sigma Aldrich/<br>110-18-9  |
| Glisin/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$  | SDS-PAGE elektroforezinde yürütme tampon çözeltisinde kullanılmıştır.                       | Sigma Aldrich/<br>56-40-6   |
| Koomassie brillant mavi G250/ $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}$                                 | Proteinlerin kantitatif tayininde Bradford çözeltisinde kullanılmıştır                      | Merck/<br>6104-58-1         |
| Amonyum persülfat/<br>$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  | Elektroforez jeli hazırlığında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır               | Sigma Aldrich/<br>7727-54-0 |
| Sodyum dodesil sülfat /<br>$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$   | PAGE elektroforezinde enzimi denatüre edici, anyonik deterjan olarak olarak kullanılmıştır. | Sigma Aldrich/<br>151-21-3  |
| Gliserol Çözeltisi/<br>$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$                                 | Numune tampon çözeltisinde kullanılmıştır.  | Sigma Aldrich/<br>56-81-5   |
| Bromfenol Mavisini/<br>$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$                               | Elektroforez işlemlerinde renklendirme çözeltilerinde kullanılmıştır.                       | AFG Bioscience/<br>115-39-9 |
| Metanol/ $\text{CH}_3\text{OH}$  | SDS-PAGE elektroforezinde renk açma çözeltisinde kullanılmıştır                             | Tekkim/ 67-56-1             |
| Asetik Asit, 80%/ $\text{CH}_3\text{COOH}$   | SDS-PAGE elektroforezinde renk açma çözeltisinde kullanılmıştır                             | Tekkim/ 64-19-7             |

**Table 3.1** Enzim saflaştırılmasında kullanılan maddeler(devamı)

| <b>Madde/ Materyal Adı/ Formül</b> | <b>Kullanım Amacı</b>  | <b>Firma/ CAS No</b>                                   |
|------------------------------------|--|--|
| Tris-BASE/ $C_4H_{11}NO_3$         | SDS-PAGE elektroforezinde tampon çözelti olarak kullanılmıştır             | Sigma Aldrich/ 77-86-1                                 |
| Sukroz/ $C_{12}H_{22}O_{11}$       | Native PAGE elektroforezinde renklendirme çözeltisi olarak kullanılmıştır. | Biyokimya araştırma laboratuvarından temin edilmiştir. |
| Diyaliz Membranı                   | Enzim saflaştırılmasında diyaliz işleminin gerçekleştirildiği materyal.    | Isolab   |
| Afinite Kromatografi Kolonu        | Enzim saflaştırılmasında afinite kolon materyali                           | Sigma Aldrich  |

### 3.1.1.2 Jel Sentezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Jel sentezinde kullanılan kimyasallar maddeler aşağıda gösterilmiştir. (Tablo 3.2).

**Table 3.2** Jel sentezinde kullanılan kimyasal maddeler

| <b>Madde/ Materyal Adı/ Formül</b>            | <b>Jel Sentezinde Kullanım Amacı</b>                        | <b>Firma/ CAS No</b>     |
|---|---|--------------------------|
| Siyanojen bromür/ CNBr                        | Destek materyalinin aktifleştirilmesi amacı ile kullanıldı. | Sigma Aldrich/ 506-68-3  |
| Sodyum bikarbonat/ $NaHCO_3$                  | Yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.                         | Sigma Aldrich/ 144-55-8  |
| Sefaroz-4B                                    | Stok karışımı olarak kullanıldı.                            | Sigma Aldrich/ 9012-36-6 |
| 4-Aminobenzoik asit/<br>$H_2NC_6H_4CO_2H$     | PFO enzim ligandı olarak kullanıldı.                        | Sigma Aldrich/ 100536    |
| L-Tirozin/<br>$4-(HO)C_6H_4CH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Uzantı kolu olarak kullanıldı.                              | Sigma Aldrich/ 60-18-4   |
| Sefaroz-6B                                    | Stok karışımı olarak kullanıldı.                            | Sigma Aldrich/ 9012-36-6 |
| Sodyum Nitrit/ $NaNO_2$                       | Ligand çözeltisi bileşeni olarak kullanıldı.                | Sigma Aldrich/ 7632-00-0 |

### 3.1.1.3 Enzim Karakterizasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Enzim karakterizasyonunda kullanılan kimyasallar maddeler aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3.3).

**Table 3.3** Enzim karakterizasyonunda kullanılan kimyasal maddelerin temin edildikleri firma ve Cas Numaralar

| Madde/ Materyal Adı/ Formül   | Enzim Karakterizasyonunda Kullanım Amacı   | Firma/ CAS No              |
|---|--|----------------------------|
| Kafeik Asit/<br>(HO) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CH=CHCO <sub>2</sub> H                    | PFO enziminin aktivatörü olarak kullanıldı.  | Sigma Aldrich/<br>331-39-5 |
| 4-Metil katekol/<br>CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -1,2-(OH) <sub>2</sub>                  | PFO enziminin aktivatörü olarak kullanıldı.  | Sigma Aldrich/<br>452-86-8 |
| Pirogallol / C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OH) <sub>3</sub>  | PFO enziminin aktivatörü olarak kullanıldı.  | Sigma Aldrich/<br>87-66-1  |
| 1,2-Dihidroksibenzen (Katekol)<br>≥ %99 saflıkta/<br>C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(OH) <sub>2</sub> | PFO enziminin aktivatörü olarak kullanıldı   | Sigma Aldrich/<br>452-86-8 |
| Di Sodyum Hidrojen Fosfat<br>Dihidrat/ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O               | Saflaştırma ve karakterizasyon basamaklarında aktivite ve dengeleme tampon çözeltileri olarak kullanıldı | Merck®/<br>10028-24-7      |

### 3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların isimleri, marka ve kullanım amaçları ile birlikte Tablo 3.4' te verilmiştir.

**Table 3.4** Araştırmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları

| Cihazın Adı                  | Cihazın Markası                                   | Kullanım Amacı  |
|------------------------------|---|---|
| pH Metre                     | Thermo Scientific                                 | Çözeltilerin pH ayarlaması ve pH kontrollerin yapılması amacı ile kullanıldı. |
| Elektroforez Sis-temi        | Bio-Rad   | SDS-PAGE ve Native elektroforez işlemlerinde kullanıldı.                      |
| Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı | ARE Heating magnetic stirrer,<br>VELP Scientifica | Tüm çözeltilerin karıştırılmasında ve gerekli ısıtma işlemlerinde kullanıldı. |
| Vortex Karıştırıcı           | DLab MX-S   | Çözeltilerin karıştırılması amacıyla kullanıldı.                              |

**Table 3.4** Araştırmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları (devamı)

| <b>Cihazın Adı</b>         | <b>Cihazın Markası</b>                 | <b>Kullanım Amacı</b>   |
|----------------------------|--|---|
| Hassas Terazı              | Daihan Turkey                          | Tüm katı maddelerin tartımı için kullanıldı.  |
| Otomatik Pipet             | Isolab                                 | 0.5-1000 µg hacminde sıvı maddelerin ölçümü için kullanıldı.                                      |
| UV-VIS Spektro-fotometresi | Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer-2600 | Tüm kinetik ölçümlerde görünür bölgede gerçekleşen reaksiyonlarda dedektör amacı ile kullanıldı.  |
| Termometre                 | Isolab                                 | Optimum sıcaklık çalışmasında sıcaklık değerinin görüntülenebilmesi için kullanıldı               |
| Santrüfuj                  | Beckman Coulter Allegra X-30R          | Enzimin saflaştırma basamaklarında kullanıldı.  |
| El Blenderı                | Arnica Orbital                         | Enzim saflaştırma sürecinde ekstraksiyon basamağında enzim homojenatı oluşturmak için kullanıldı. |
| Saf Su Cihazı              | Elga                                   | Distile su tedariginde kullanıldı   |

## **3.2 Araştırmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

### **3.2.1 Enzim Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

- Ekstraksiyon tampon çözeltisi: Son hacim 300 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşenler  $1 \times 10^{-1}$  M  $K_2HPO_4$  (5,2254 g), 1,5 g PEG ve  $1 \times 10^{-2}$  M askorbik asit (0.528 g) miktarlarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 7.3'e ayarlandı.
- Diyaliz tampon çözeltisi: Son hacim 1 L olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşenler 5 mM  $K_2HPO_4$  (0.87 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.3'e ayarlandı.

### **3.2.2 Optimum Koşul Ölçümlerinde Kullanılan Substrat Çözeltilerinin Hazırlanması**

- Katekol Çözeltisi: Son hacim 1 mL olacak şekilde ilgili tampon ile çözüldü. Bileşen  $1 \times 10^{-1}$  M Katekol (0.0110 g) miktarda tartıldı.

- 4-Metil Katekol Çözeltisi: Son hacim 1 mL olacak şekilde ilgili tampon ile çözüldü. Bileşen  $1 \times 10^{-1}$  M 4-Metil katekol (0.0124 g) miktarda tartıldı.
- Pirogallol Çözeltisi: Son hacim 1 mL olacak şekilde ilgili tampon ile çözüldü. Bileşen  $1 \times 10^{-1}$  M Pirogallol (0.0126 g) miktarda tartıldı.
- Kafeik Asit Çözeltisi: Son hacim 1 mL olacak şekilde ilgili tampon ile çözüldü. Bileşen  $1 \times 10^{-1}$  M Kafeik Asit (0.0180 g) miktarda tartıldı

### 3.2.3 Optimum Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Belirlenmesi için Kullanılan Tampon Çözeltiler

Optimum tampon çözelti konsantrasyonunun belirlenebilmesi için 25'er mL  $5 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-2}$  M,  $2 \times 10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-2}$  M,  $1 \times 10^{-1}$  M,  $2 \times 10^{-1}$  M,  $3 \times 10^{-1}$  M Di Sodyum Hidrojen Fosfat Dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) tampon çözeltileri hazırlanmıştır.

- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.0222 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $1 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.0445 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $2 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.0890 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $5 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.2225 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $1 \times 10^{-1}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.4450 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $2 \times 10^{-1}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.8890 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Tampon Çözelti: Son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen  $3 \times 10^{-1}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.3350 g) miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.

### 3.2.4 Optimum pH Değerinin Belirlenmesi için Hazırlanan Tampon Çözeltiler

PFO'nun optimum pH değerinin belirlenebilmesi için sırasıyla 4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.3-6.8-6.9-7.0-7.2-7.5-8.0-8.5 pH değerlerine sahip  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tampon çözeltileri hazırlandı.

### 3.2.5 Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi için Hazırlanan Tampon Çözeltiler

PFO'nun optimum sıcaklık değerinin belirlenebilmesi için sırasıyla  $4^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ - $15^\circ\text{C}$ - $25^\circ\text{C}$ - $37^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ - $50^\circ\text{C}$ - $60^\circ\text{C}$ - $70^\circ\text{C}$  sıcaklık değerlerine sahip  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tampon çözeltileri hazırlandı.

### 3.2.6 Afinite Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Tampon Çözeltiler

- 1. Yıkama Çözeltisi:  $1 \times 10^{-1}$  M  $\text{NaHCO}_3$  tampon çözeltisi için son hacim 500 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen (4.2005g)  $\text{NaHCO}_3$  miktarda tartıldı. 1 M NaOH ile pH 10'a ayarlandı.
- 2. Yıkama Çözeltisi:  $2 \times 10^{-1}$  M  $\text{NaHCO}_3$  tampon çözeltisi için son hacim 500 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen (4.2005 g)  $\text{NaHCO}_3$  miktarda tartıldı. 1 M NaOH ile pH 8.8'e ayarlandı.
- 3. Yıkama Çözeltisi:  $1 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tampon çözeltisi için son hacim 500 mL olacak şekilde distile su ile çözelti hazırlandı. Bileşen (0.8899 g)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  miktarda tartıldı. 1 M HCl ile pH 6.0 'ya ayarlandı.
- 4M NaOH çözeltisi: 16g NaOH tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü.
- Uzantı Kolu Çözeltisi: (4,1 mM) L-Tirozin 0,015g tartıldı ve 20 mL 1.yıkama çözeltisinde çözüldü.
- Spesifik Ligand Çözeltisi: (18mM) p-aminobenzoik asit 25 mg tartılarak 10 mL 1M HCl ile çözüldü. (72 mM) sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ )  $0^\circ\text{C}$ 'de 5mL distile suda çözüldü. Hazırlanan sodyum nitrit 75 mg p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla ilave edildi.

### 3.2.7 Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma İşleminde Kullanılan Tampon Çözeltiler

- Dengeleme ve Yıkama Tampon Çözeltisi:  $5 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Son hacim 1L olacak şekilde (8.8995 g) tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 5'e ayarlandı.

- Elüsyon Tampon Çözeltisi:  $5 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 1M NaCl Son hacim 500 mL olacak şekilde sırasıyla 4.4498 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ve 29.22 g NaCl tartıldı ve distile suda çözüldü. 1M HCl ile pH7'ye ayarlandı.

### 3.2.8 Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Bradford Çözeltisi

50 mL %95'lik etanol içerisinde öncelikle 100 mg Koomassie Brilliant Mavi (KBM) G250 çözüldü, ardından çözeltiye 112 mL %85'lik fosforik asit ilave edilerek 1 L'ye seyreltilti.

### 3.2.9 SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- 1.5 M Tris-BASE: Son hacim 50 mL olacak şekilde (9.0855 g) Tris-BASE tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8.8'e ayarlandı.
- %10 SDS Çözeltisi: 1 mL distile su içinde 0.1 g SDS çözüldü.
- %10 Amonyum Persülfat Çözeltisi: 1 mL distile su içinde 0.1 g amonyum persülfat çözüldü.
- 0.5 M Tris-BASE: Son hacim 50 mL olacak şekilde (3.0285 g) Tris-BASE tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
- Yürütme Tampon Çözeltisi: 1.5 g 0,02M Tris-BASE, 7.2 g 0,19M glisin ve 0.5 g  $3,5 \times 10^{-3}$ M SDS tartıldı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.
- Hızlı Boyama Çözeltisi: 0.0015 g KBM G250 tartılarak 2,5 mL asetik asitte çözüldü ve distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.
- Hızlı Yıkama Çözeltisi: 25 mL asetik asit distile su ile 250 mL'ye seyreltilti.
- Boyama Çözeltisi Sabitleyici: Bantların net gözlenebilmesi amacıyla jelin hızlı boyama çözeltisinde bekletilmesinden önce sabitleyici boyama çözeltisi kullanıldı. Bu amaçla 2,5 mL asetik asit ve 6,25 mL izopropanol eklenerek distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

### 3.2.10 Native-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- Alt Elektroforez Tankı Tampon Çözeltisi: Son hacim 1 L olacak şekilde 63 mM Tris-BASE için 7.63 g Tris-BASE tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.5'a ayarlandı.

- Üst Elektroferez Tankı Tampon Çözeltisi: 37.6 mM Tris-BASE, 40 mM glisinden oluşur. Son hacim 1 L olacak şekilde 4,56 g Tris-BASE ve 3 g glisin tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8.9'a ayarlandı.
- %10 Amonyum Persülfat Çözeltisi: 1 mL distile su ile 0.1 g amonyum persülfat çözüldü.
- Ayırma Jeli Tampon Çözeltisi: Son hacim 100 mL olacak şekilde 947 mM Tris-BASE için 11.47 g Tris-BASE tartıldı ve distile suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı.
- Ayırma Jeli Monomer Çözeltisi: %30 Akrilamid-bis-akrilamid çözeltisi
- Sükroz Boya Çözeltisi: 5 g sükroz ve 0.01 g bromfenol mavisi tartılarak 10 mL içerisinde çözüldü.

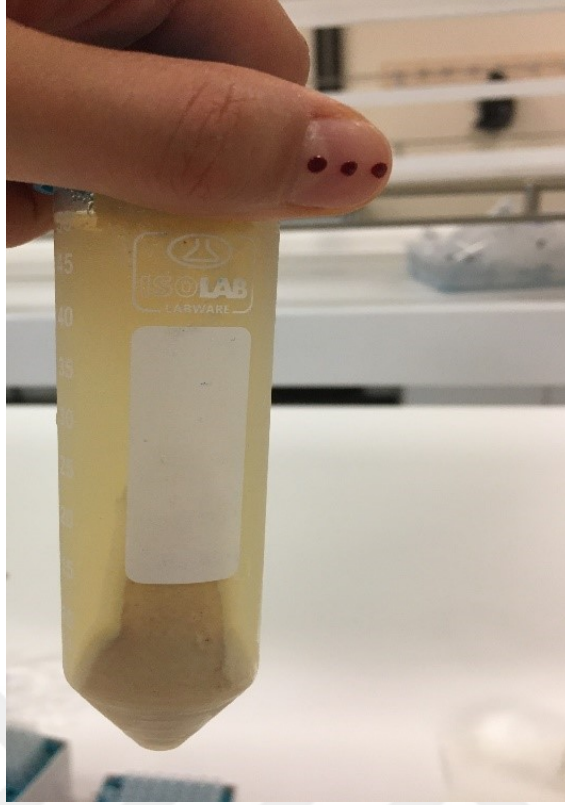
### 3.3 Muşmuladan (*Mespilus germanica*) PFO Enziminin Kısmen (KSP) Saflaştırılarak Elde Edilmesi

Bu çalışmada saflaştırılmak istenen enzim için kaynak olarak muşmula meyvesi tercih edilmiştir. Deney boyunca kullanılan meyvenin tamamı tek bir yerden temin edilmiş olup Türkiye'nin Bursa iline aittir. Saflaştırma işleminin ilk basamağı olan ham ekstrakt hazırlık aşamasında muşmula meyvesinin aktivite kaybı yaşamaması için meyve +4 °C'de muhafaza edildi. Analiz için muhaza edilen muşmula meyvesinin çekirdekleri ayrılarak 150 g tartıldı ve hazırlanan 300 mL ekstraksiyon tampon çözeltisine ilave edildi. Ev tipi blender ile homojenizasyonu gerçekleştirildi. Homojenizasyon aşamasında blender beher içinde sabit kalacak şekilde parafilm ile sarılarak aktivite kaybına sebep olan oksijen ile temas minimuma indirildi. Numunenin süzülmesi için renksiz iki katlı tülbent kullanıldı. Süzme işlemi sonunda homojen formda ekstrakt elde edilmiş oldu. Elde edilen ekstrakt falkon tüplere dolduruldu (Şekil 3.1). İçerdiği selüloz ve liflerden arındırılması amacı ile +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonunda yabancı madde, selüloz ve lifler çökelek kısmında bulunurken enzim süpernatant kısma alınarak saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere ayrıldı.

#### 3.3.1 (*Mespilus germanica*) KSP Enziminin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi

Amonyum Sülfat ile çöktürme yapılması için gerekli olan amonyum sülfat miktarı ham ekstraktın santrifüj sonrası hacmine bakılarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır. (3.1)

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = [1,77 \times V \times (S2 - S1)] / 3.54 - S2 \quad (3.1)$$



**Şekil 3.1** Ham ekstratta istenmeyen madde ve yabancı maddelerin santrifüj ile uzaklaştırılması

V: süpernatant hacmi

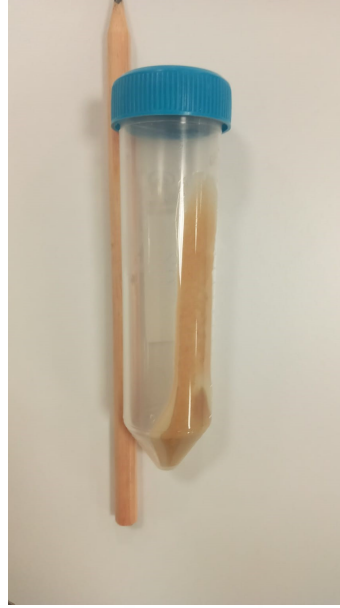
S1: 1/mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1/istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Ham ekstrattan elde edilen enzim homojenatını saflaştırmaya devam etmek amacıyla, amonyum sülfat ile proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Bu işlem  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buz banyosu içinde yapıldı. Enzimin bulunduğu kabı ışıktan korumak amacı ile folyo kullanıldı, oksijen temasını kesmek için de parafilm ile sarıldı, böylece aktivite kaybı en aza indirilmiş oldu. Çöktürme işleminde istenmeyen proteinlerin çökmesine fırsat vermemek adına amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi. Tuz ilavesi yapılan tüm süreç boyunca ekstrakt manyetik karıştırıcı ile sürekli olarak karıştırıldı. Son tuz ilavesi yapıldıktan sonra minimum 30 dk daha karışım sağlandı ve 70 dakika boyunca  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  10.000 rpm'de santrifüje alındı. (Şekil 3.2)

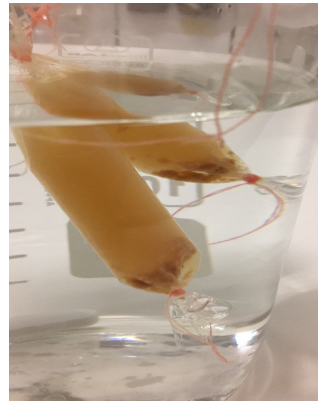
### **3.3.2 (*Mespilus germanica*) KSP Enziminin Diyaliz Edilmesi**

Santrifüj sonrası çökelek, minimum miktarda ilave edilen diyaliz tampon çözeltisi ile çözüldü. Çözülen numune içerisinde fazla tuz ve PFO enzimi bulunmaktadır. Fazla tuzu ve safsızlıkları gidermek amacı ile diyaliz işlemi yapıldı [53]. Öncelikle, elde



**Şekil 3.2** Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası enzim çökeleği

edilen süpernatant miktarına uygun uzunlukta diyaliz torbası kesildi ve bir ucu ip ile sıkıca bağlandı. Açık olan kısımdan çözülünen numune dolduruldu ve bu kısım da ip ile sıkıca bağlandı. 1 litre diyaliz tamponu içerisine yerleştirildi (Şekil 3.3 ). Diyaliz işlemi +4 °C’de manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı. Diyaliz tamponunun, ilk değişimi 30 dk ve ikinci değişimi 12 saat sonra yapıldı. Toplam 16 saat süren diyaliz işlemi tamamlandı. Elde edilen diyaliz numunesi diğer analiz süreçlerinde kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı.



**Şekil 3.3** Diyaliz işlemi ile tuzun uzaklaştırılması

### **3.4 Afinité Kromatografisi ile Enzimin Safılaştırılması**

Afinite Kromatografisinde katı destek materyali olarak kullanılmak üzere Sefaroz 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit ve Sefaroz 6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit jelleri bölüm 3.4.1 ’ de belirtilen basamaklara göre sentezlendi.

### 3.4.1 Afinite jel sentezi

+4 °C'de saklanan sefaroze 4B maddesinden 10 mL alındı. Sefaroz 4B, etanol içerisinde saklandığı için soğuk distile su ile dekante edildi. Aynı işlem 4 defa tekrarlandı. Alınan Sefaroz 4B üzerine eşit hacimde distile su ilave edildi. Sefaroz 4B üzerinde bulunan hidroksil gruplarını, -OCN haline getirerek aktifleştirmek için , uygun ortam ısı sağlanarak yaklaşık 4 g (denge konsantrasyonu 72 mM) CNBr eklendi. Bu etkileşim sırasında ortam pH'ı sürekli düştüğü ve reaksiyon pH 11'de gerçekleştiği için düşen pH değerini 11'e getirmek amacıyla ortama sürekli 4M NaOH ilavesi yapıldı. CNBr ile sefaroze 4B etkileşiminden sonra fazla CNBr ; hazırlanmış olan pH 10,  $1 \times 10^{-1}$ M NaHCO<sub>3</sub> yıkama çözeltisi ile yıkandı. Yıkama sonrasında tirozin çözeltisi eklendi ve 4M NaOH ile pH 9.5'e sabitlenerek 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmasının ardından bir gece +4 °C'de bırakıldı. Jel, buchner hunisi üzerinde, 1 L soğuk distile su ile yıkandı. Yıkama işlemine 100 mL 0,2M pH:8,8 NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi ile (2. yıkama çözeltisi) devam edildi. Yıkanan jel 40 mL 2.yıkama çözeltisi içerisine alındı. Hazırlanan spesifik ligand çözeltisi bekletilmeden üzerine ilave edildi, pH'ı 9.5'a ayarlanan çözelti diazolama reaksiyonunun tamamlanması için 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda hazırlanan jel süzgeç kağıdına alındı ve sırasıyla 1L distile su, 200 mL,  $1 \times 10^{-2}$ M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6 tampon çözeltisi ile (3. yıkama çözeltisi) yıkandı. Yıkanan jel süzgeç kağıdından alınarak,  $1 \times 10^{-2}$ M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6 tampon çözeltisi içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmek üzere buzdolabına kaldırıldı. Aynı işlemler Sefaroz 6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit jel sentezi için de tekrar edildi.

### 3.4.2 Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Sentezlenen Sefaroz 4B ve 6B jelleri kolona yüklendi. Numuneyi kolona yüklemeye önce jeli dengelemek amacı ile hazırlanmış olan (0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O pH:5) dengeleme tamponundan geçirildi. Bu işleme jel dengelenene kadar devam edildi. Jelin dengelendiğini anlamak için UV-vis spektrofotometrede 280 nm'de protein absorbans değerinin 0.02 altına düşmesi beklendi. İstenilen absorbans değeri görüldükten sonra 10 mL diyaliz numunesi kolona yüklendi. Numune içerisinde bulunan enzimin jelde bulunan ligandına tutunmasını sağlamak adına yüklenen numunenin akış hızı 10 saniyede 1 damla olacak şekilde ayarlandı. Jeli kurutmadan kolon içinde bulunan tüm diyaliz numunesi kolondan akıtıldı, bu sayede enzim ligandına tutunmuş oldu. PFO dışında liganda tutunan diğer proteinleri ayırmak için kolona yıkama tampon çözeltisi (0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O pH:5) uygulandı. Dengeleme basamağında olduğu gibi UV-vis spektrofotometrede 280 nm'de ölçüm alındı ve protein absorbans değerinin 0.02 altına düşmesi beklendi. Absorbans değeri 0.02'nin altına düştükten sonra son olarak hazırlanan (0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1M NaCl pH:7) elüsyon tampon çözeltisi kolona yüklendi, ortamın pH değeri değiştirilerek

kolondan ayrılan *Mespilus germanica* PFO enziminin saflaştırılması sağlandı.

### 3.5 Bradford Yöntemi ile Enzim Miktarının Tayini

Bradford yöntemi, karışım içinde olan bir proteinin, protein konsantrasyonunun hesaplanması amacı ile uygulanan yöntem çeşididir. Kolay ve hassas bir yöntemdir. Teknik olarak asidik pH'a sahip bir ortamda, protein varlığında KBM G-250 boyasının, absorbans kaymasıyla oluşan ölçümüne dayanan tayin yöntemidir [54]. Absorbansta meydana gelen kayma, kırmızı forma sahip olan boyanın, bağlanan protein sebebi ile renginin maviye dönmesi ile gerçekleşir. KBM G-250 boyası eşlenmemiş elektronlarını proteine vererek proteinin sahip olduğu hidrofobik kısımları açığa çıkarır. Bu sırada bu kısımlar van der Waals kuvvetlerinin etkisi ile KBM G-250'nin apolar kısımlarına bağlanır ve meydana gelen mavi yapıyı kuvvetlendirir. Protein miktarındaki artış oranı ile mavi renkteki renk yoğunluğu orantılı olarak artar. Oluşan mavi yapının maksimum dalga boyu 595 nm'de verilir. [52]. Bradford yöntemi ile enzim miktarı tayini için deneysel kısım 3.2.8'de belirtilen KBM çözeltisi hazırlandı. Bradford çözeltileri için 595nm'de UV-vis spektrofotometrede ölçüm alındı ve protein miktarının belirleneceği sığır serum albümininden (SSA) protein çözeltileri hazırlandı. Bunun için, SSA çözeltisinden (1mg/1mL) tüplere ayrı ayrı 0.59µg/mL-19.61µg/mL konsantrasyon aralığında toplam hacim 5.1mL olacak şekilde her bir tüpe 5mL KBM G-250 reaktifi ilave edildi ve vorteks yardımı ile karışım homojen hale getirildi. Standart doğru ve ön saflaştırma basamakları için 100µL distile su ve afinite sonucunda elde edilen elüsyon tüpleri için ise aynı hacimde elüsyon tampon çözeltisi içerisine ayrı ayrı 5mL KBM G-250 boyası ilavesi edilerek bu çözeltiler kör çözeltileri olarak kullanıldı. 10 dk zamanlayıcı ayarlanarak, reaktif kör çözeltisine karşı standart çözeltiler ve konsantrasyonu bilinmeyen enzim çözeltisi için 595nm'de absorbans ölçümleri alındı. Standart çözelti absorbanslarına karşılık gelen standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak standart doğru grafiği oluşturuldu. Grafikte okunan absorbansa denk gelen protein miktarları bulundu. Okunan standart doğru grafiğinden  $y=mx+n$  eşitliğinde  $y$  yerine *Mespilus germanica* PFO enziminin absorbans değeri yazıldı ve bu değere karşılık gelen protein miktarı ( $x$ ) hesaplanmış oldu.

### 3.6 Muşmula PFO Enziminin Aktivitesi

PFO enziminin aktivitesi sırasıyla  $1 \times 10^{-1}$ M katekol, 4-metil katekol, progallol ve kafeik asit kullanılarak PFO aktivite metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edildi . Aktivite ölçümü için aktivite tamponu, substrat ( $1 \times 10^{-1}$ M) ve enzim çözeltilerinden sırasıyla 2410µL/390µL/200µL eklenerek 420nm'de kör çözeltiye karşı absorbansda bir dakikada meydana gelen değişim ölçüldü [55]. PFO enzimi için

1 enzim Ünitesi (1EU), reaksiyonun gerçekleştiği küvette 1 dakika süresinde oluşan 0,001'lik absorbans artışı olarak tanımlandı. [56] Toplam 3mL'lik reaksiyon hacminde kullanılan enzim miktarı 0,2mL olduğundan, enzim çözeltisi 15 kat seyreltilmiş oldu. Bu seyrelme faktörü aktivite hesabında çarpım faktörü olarak dikkate alındı.

### 3.7 Muşmula PFO Enzimi Karakterizasyon Çalışmaları

Muşmula meyvesi KSP enziminin optimum koşullarının belirlenmesi amaçlanarak optimum substratı belirlendi. Bunun için 0.1 M PFO aktivite tampon ve substrat çözeltileri 13mM denge konsantrasyonlarında hazırlanarak sırasıyla tampon/substrat/enzim 2410µL/390µL/200µL hacimlerde reaksiyon küvetine ilave edilerek 420nm'de ölçümler yapıldı. Buradan optimum substrat belirlendikten sonra sırasıyla ( $5 \times 10^{-3}$  M- $5 \times 10^{-1}$  M) aralığında 8 farklı tampon çözelti konsantrasyonu, (4-8,5) pH aralığında 13 farklı pH'da tampon çözelti ve ( $4^{\circ}\text{C}$ - $70^{\circ}\text{C}$ ) sıcaklık aralığında 9 farklı sıcaklıkta tampon çözelti ile çalışıldı. Optimum koşulların çalışıldığı her bir kısımda bir önceki optimum koşul basamağında elde edilen optimum sonuç dikkate alınarak ilerlendi. Belirlenen optimum tampon konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değerlerindeki tampon çözelti hazırlanarak, saflaştırma tablosu oluşturulmasında ve farklı zaman aralıkları için enzim depolama ölçümünde aktivite tamponu olarak kullanıldı.

### 3.8 Muşmula PFO Enziminin Kinetik Sabitlerinin ( $K_M$ , $V_{max}$ ) Belirlenmesi ve %Verim, Spesifik Aktivite ve Saflaştırma Derecesinin Hesaplanması

Saflaştırılan PFO enziminin Lineweaver-Burk grafiğini çizebilmek için 420nm'de PFO'nun farklı substrat konsantrasyonlarında yapılan aktivite ölçümüne ait sonuçlar,  $1/V$  (U/dk) ve  $1/[S]$  (M) değerleri kullanıldı. Elde edilen doğrunun X ve Y eksenleri kesişim noktasından enzimin kinetik sabitleri hesaplandı. Enzim aktivitesi spesifik aktivite ile açıklanır. Toplam proteinin mg başına, belirli şartlar altında ve belirli bir sürede enzim tarafından oluşturduğu ürün miktarıdır [57]. Bu yüzden saflaştırma basamağının hesaplanması için toplam hacim, enzim özütünün ilgili basamaktaki 1mL'deki enzim aktivite değeri ve toplam protein miktarları hesaplandı. Elde edilen verilerle % verim ve saflaştırma derecesini gösteren bir tablo oluşturuldu. Oluşturulan tablo sonuçlar kısmında Bölüm 4.1.7 de gösterilmiştir. Enzim özütünün bulunduğu basamağa ait toplam aktivitesinin toplam protein miktarına oranı hesaplanarak spesifik aktivite değeri bulundu. Verim hesaplamasında ise, ilgili saflaştırma basamağına ait toplam aktivite miktarı, ham enzim özütünün toplam aktivite

değerine bölünerek yüzde hesaplaması yapıldı ve % verim sonucuna ulaşıldı. Verim hesaplamasında her basamak başlangıç basamağı referans alınarak değerlendirildi. Saflaştırma derecesi hesaplanırken ise, her basamakta hesaplanan spesifik aktivite sonucu ilk basamakta hesaplanan spesifik aktivite sonucuna bölünerek bulundu.

### 3.9 Muşmula PFO Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Saflık Kontrolünde Kullanılan Elektroforetik Yöntemler

Molekül ağırlığı ve saflık kontrolünü sağlamak için SDS-PAGE ve Native-PAGE metodları uygulandı.

#### 3.9.1 SDS-PAGE jel elektroforezi

KSP enzim özütünün molekül kütlesini belirlemek amacı ile SDS-PAGE Jel Elektroforezi yapılmıştır.

**Table 3.5** Elektroforezde kullanılan ayırma jeli bileşenleri ve miktarları [58]

| SDS-PAGE Elektroforezi Ayırma Jeli Bileşenleri | Miktarı  |
|--|----------|
| Akrilamid/Bisakrilamid(%30) çözeltisi          | 2.37 mL. |
| Distile su                                     | 2.87 mL  |
| (1,5 M) (pH:8.8) Tris-HCl tampon çözeltisi     | 1.8 mL   |
| %10'luk SDS çözeltisi: 0.1g SDS/1 mL           | 70 µL    |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin)      | 4 µL     |
| %10'luk Amonyum persülfat (APS)0.1 g APS/1 mL  | 110 µL   |

Bu işlem için ilk olarak elektroforez düzeneğine ait plakalar temizlendi ve sabitlenerek arasına yukarıda (Tablo 3.5) belirtilen miktarlarda olabildiğince hızlı hazırlanan ayırma jeli yüklendi. Jel yüklemesi yapılan plakalar elektroforez tankına yerleştirilerek, plakalar tamamen içinde kalacak şekilde yürütme tampon çözeltisi ile dolduruldu. Bu işlemlerden sonra Tablo 3.6'da belirtilen bileşen miktarları ile hazırlanan numune tampon çözeltisi ile elektroforez yapılacak örnekler 1:1 oranında karıştırıldı. Numune tampon çözeltisinde bulunan  $\beta$ -merkaptotanol yardımıyla enzimdeki disülfid bağları parçalandı ve ardından bu karışım 5 dakika boyunca 100 °C'de ısıtılarak denatüre edildi.

**Table 3.6** SDS-PAGE numune tampon çözeltisi bileşenleri [58]

| <b>Numune Tampon Çözeltisinin Bileşenleri</b> | <b>Miktarı</b> |
|---|----------------|
| Bromfenol mavisi                              | 0.01 g         |
| 0,5M Tris-BASE (pH=6,8) tampon çözeltisi      | 2.5 mL         |
| %10'luk SDS çözeltisi, %(w/v)                 | 4 mL           |
| $\beta$ -merkaptoetanol                       | 1 mL           |
| Distile Su                                    | 0.5 mL         |
| Gliserol                                      | 2 mL           |

100°C'de denatüre olan ve numune tampon çözeltisi ilave edilen enzim çözeltisinden 30  $\mu$ L alınarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Alt elektroforez tankına ise yürütme tampon çözeltisi eklendi, ve akım ilk 30 dk 80W, devam eden tüm süre boyunca 150W'a ayarlanarak devam edildi. Elektroforez tankından çıkarılan jel sabitleyici boyama çözeltisi içerisine konuldu.

### 3.9.2 Native-PAGE Jel Elektroforezi

Afinite kromatografisi yoluyla saflaştırılan ve diyaliz yöntemi ile kısmen saflaştırılan PFO enziminin alt birim veya birimleri olup olmadığını kontrol etmek amacıyla Native-PAGE uygulanmıştır. Bunun için ilk olarak elektroforez plakaları arasına Tablo 3.7'de belirtilen %15 T, %5 Cbis ayırma jeli bileşenleri olabildiğince hızlı hazırlanarak yüklendi.

**Table 3.7** Native-PAGE işleminde kullanılan ayırma jeli bileşenleri [58]

| <b>%15 T, %5 Cbis Ayırma Jeli Bileşenleri</b> | <b>Miktarı</b> |
|---|----------------|
| Monomer Çözeltisi                             | 3.75 mL        |
| Ayırma Jeli Tampon Çözeltisi                  | 2.5 mL         |
| Amonyum persülfat                             | 250 $\mu$ L    |
| TEMED   | 20 $\mu$ L     |
| Distile Su 2.5 mL                             | 2.5 mL         |

Tablo 3.7'de belirtilen Monomer Çözeltisi: %30 Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi ve Ayırma Jeli Tampon Çözeltisi 947mM Tris-BASE, 0,289N HCl, pH:8,5 konsantrasyon ve belirtilen pH'larda hazırlanarak kullanılmıştır.

Plakalar arasına yüklenen Native-PAGE jeli polimerleştikten sonra üst tank ve alt tank tamponları dolduruldu. Sükroz çözeltisi enzim çözeltileri ile 1:3 oranında karıştırıldı ve oluşan kuyucuklara yüklendi.

Akım ilk 30 dk 80W, devam eden tüm süre boyunca 150W'a ayarlanarak devam edildi. Elektroforez tankından çıkarılan jel renklendirme için optimum koşullarında hazırlanmış  $1 \times 10^{-1}$  M katekol çözeltisi içerisine konuldu.



### 4.1 Sonuçlar

#### 4.1.1 Muşmula (*Mespilus germanica*) PFO Enziminin Kısmen (KSP) Saflaştırılarak Elde Edilmesi

Metod 3.3.1.'de anlatıldığı gibi ilk santrifüj işlemi yapılan ham ekstraktın, selüloz, lif ve istenmeyen safsızlıklarının çökelek oluşturularak uzaklaştırılması ile elde edilen süpernatant hacmi 250 mL olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu süpernatant hacmi çöktürme için gerekli amonyum sülfat miktarı hesabında kullanılmıştır.

Aynı işlemler tekrar edilmiş ve Metod 3.3.1.'de belirtildiği üzere ilk santrifüj işlemi yapılan ham ekstraktın, selüloz, lif ve istenmeyen safsızlıklarının çökelek oluşturularak uzaklaştırılması ile elde edilen süpernatant hacmi 290 mL olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu süpernatant hacmi çöktürme için gerekli amonyum sülfat miktarı hesabında kullanılmıştır.

250 mL ve 290 mL süpernatant hacimleri ile yapılan amonyum sülfat ile çöktürme işlemlerinden sonra elde edilen çökelek minimum hacimde çözülerek diyaliz yapılmış, diyaliz işlemi sonunda ise 10'ar mL KSP enzimi elde edilmiştir. Elde edilen 10'ar mL hacimlerindeki KSP enzimleri sırasıyla Sefaroz-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit ve Sefaroz-6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jelleri ile yapılan afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır.

##### 4.1.1.1 (*Mespilus germanica*) KSP Enziminin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi

250 mL ve 290 mL olarak ölçülen süpernatant hacimleri içinde bulunan enzimin çöktürülmesi için gerekli amonyum sülfat miktarları Metod 3.3.1.'de belirtilen formüle göre hesaplanmış ve amonyum sülfat miktarları Sefaroz 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit ve Sefaroz 6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit jelleri ile yapılan iki ayrı saflaştırma için sırasıyla 129,20 g ve 149,87 g olarak bulunmuştur.

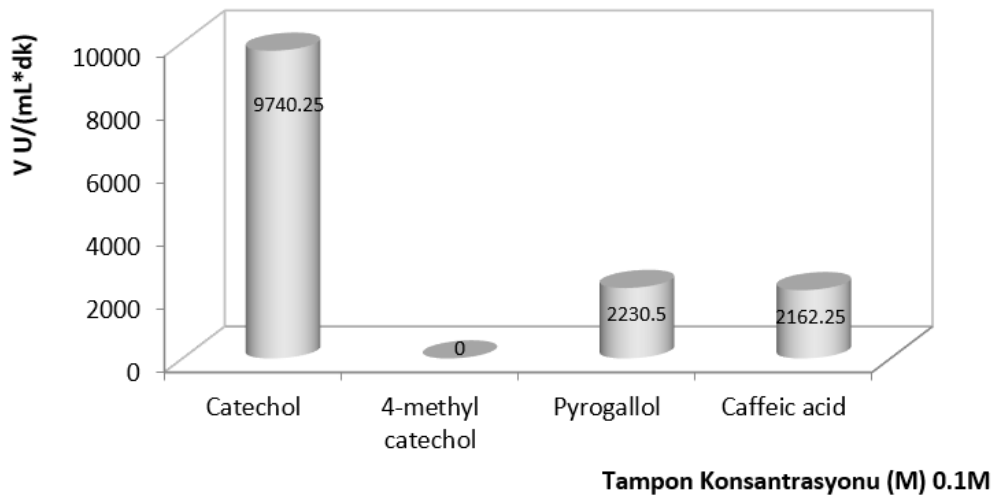
#### 4.1.1.2 (*Mespilus germanica*) KSP Enziminin Diyaliz Edilmesi

Amonyum sülfat ile yapılan çöktürme işlemi sonrasında elde edilen çökelek Metod 3.3.2'de belirtildiği şekilde çözülerek elde edilen enzim özütleri ayrı ayrı diyalize yüklenmiştir. Diyaliz sonrası hacimler 12 mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen 12 mL örnekler içerisinde 10'ar mL alınarak ayrı ayrı Sefaroz 4B-L tirozin-p-aminobenzoik asit ve Sefaroz 6B-L tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jelleri ile saflaştırılmak üzere kullanılmıştır.

#### 4.1.2 Muşmula (*Mespilus germanica*) KSP Enzime İlişkin Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

*Mespilus Germanica* PFO enzimi optimum koşul analizlerinde substrat küvet denge konsantrasyonu: 13mM ayarlanarak UV-Vis Spektrofotometrede 420 nm'de, enzimin substrat ile 1 dakikalık ilişkisine dayalı olarak ölçüm yapıldı. Enzimin karakterizasyon çalışmalarının yapılması amacıyla sırasıyla optimum substrat türünün belirlenmesi, optimum tampon çözelti konsantrasyonunun belirlenmesi, optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi adımları uygulanmıştır. Her bir basamak için bir önceki deneyde bulunan optimum değer sonucu dikkate alındı.

##### 4.1.2.1 PFO Enziminin Optimum Substratının Belirlenmesi

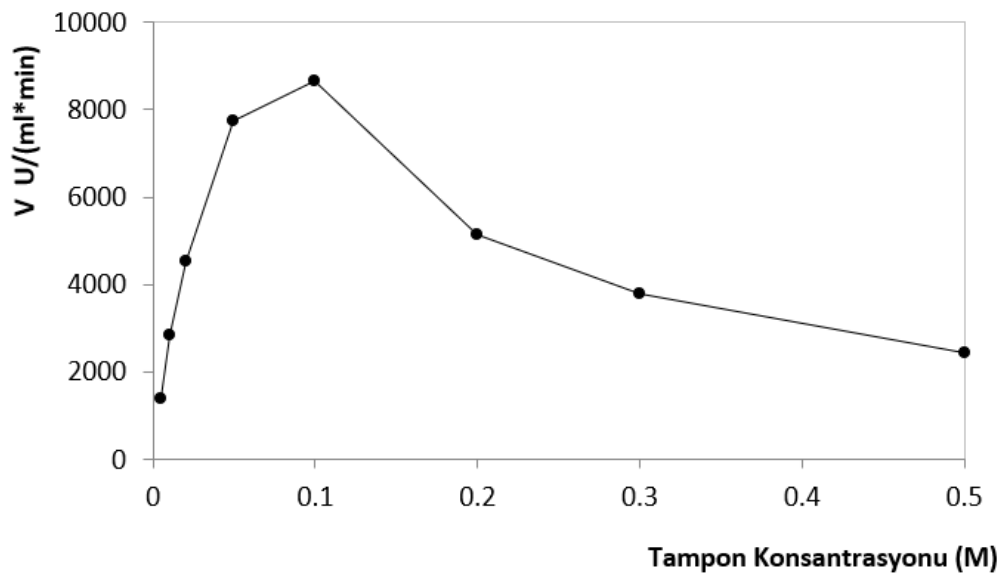


**Şekil 4.1** Katekol, 4-metil katekol, pirogallol ve kafeik asit için optimum tampon çözelti konsantrasyonuna (M=0.1M) karşılık enzim aktivite [U/(mL\*dk)] grafiği

Şekil 4.1 incelendiğinde *Mespilus germanica* PFO enziminin katekol, pirogallol, 4-metil katekol ve kafeik asit substratları için inceleme yapılmıştır. Her substrat

fosfat tamponunda 0,1 M pH:6.8 çözülerek stok substrat konsantrasyonu: 0,1M alınarak aktiviteler karşılaştırılmıştır. Grafik sonucuna göre katekol substratının diğer substratlara göre çok daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Substratlar arasındaki bu aktivite farkı optimum tampon çözelti konsantrasyonu belirlenirken pH 6.8'de çalışma yapılması ve katekol substratının optimum pH değerinde olması ile ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmalardan birinde Peng ve arkadaşları mor patatesten ekstrakte edilmiş PFO için optimum substratı katekol, farklı bir çalışmada Kaya ve arkadaşları üzümünden ekstrakte edilmiş PFO için optimum substratı 4-metil katekol, bir diğer çalışmada ise Kim ve arkadaşları ginsengden ekstrakte edilmiş PFO için optimum substratı pirogallol olarak belirlemişlerdir [59–61]. Literatür sonuçlarına bakıldığında, Muşmula PFO enziminin patates ile aynı optimum substrata sahip olması ile birlikte, üzüm ve ginsengden farklı optimum substrat özelliklerine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç ile enzimin bulunduğu kaynağa göre farklı özellikler gösterdiği görülmüştür.

#### 4.1.2.2 PFO Enziminin Optimum Tampon Konsantrasyonunun Belirlenmesi



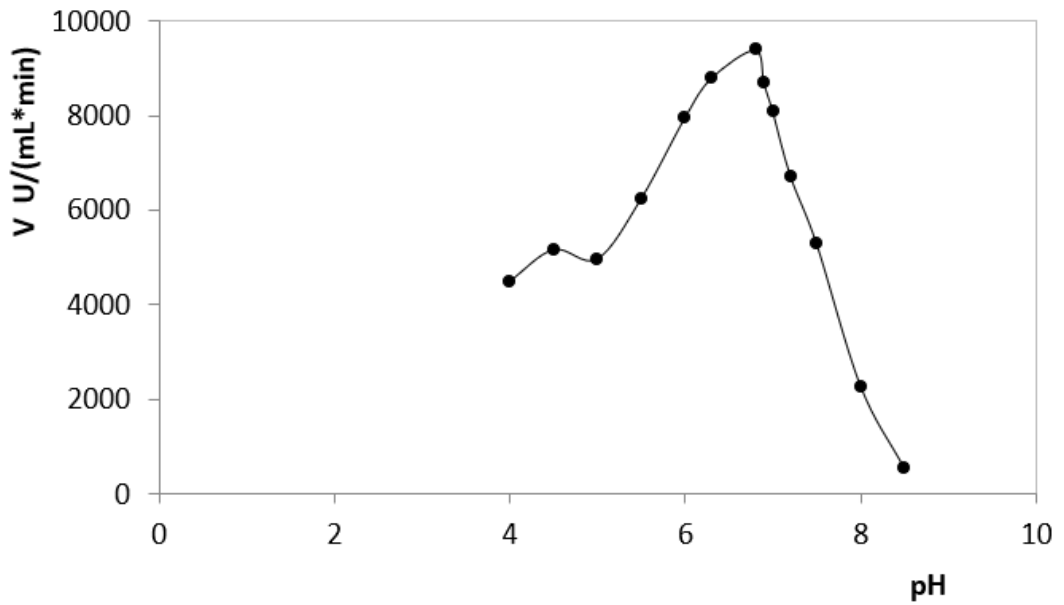
Şekil 4.2 Katekol için tampon çözelti konsantrasyonuna(M) karşılık enzim aktivite [U/(mL\*dk)] grafiği

Şekil 4.2 incelendiğinde Metod 3.7'de belirtildiği gibi *Mespilus germanica* PFO enziminin katekol substratının farklı tampon çözelti konsantrasyonlarında aktivite değerleri için karşılaştırma yapıldığı görülmektedir. Yapılan karşılaştırmada katekol substratı en yüksek aktiviteyi 0.1 M konsantrasyonda göstermiştir. Yapılan benzer çalışmalardan birinde Zhang ve arkadaşları karidesten ekstrakte edilmiş PFO için optimum tampon konsantrasyonunu 0.05 M olarak belirlemiştir [62]. Bulunan

optimum konsantrasyon ve optimum substrat sonucu üzerinden devam edilerek optimum pH çalışmaları yapılmıştır.

#### 4.1.2.3 PFO Enziminin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

4.1.2.1 ve 4.1.2.2'de belirlenen optimum substrat ve optimum tampon konsantrasyonu üzerinden devam edilerek katekol substratı 0,1M konsantrasyonda hazırlanmış ve Metod 3.7'de belirtildiği gibi *Mespilus germanica* PFO enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.3.'de verilmiştir.



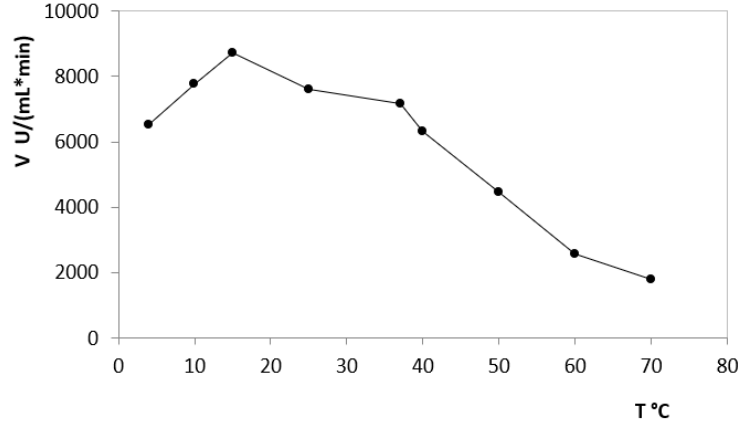
Şekil 4.3 Katekol için optimum pH değerine karşılık enzim aktivite [U/(mL\*dk)] grafiği

*Mespilus Germanica* PFO enziminin katekol için optimum pH değeri 6.8 olarak belirlendi. PFO'nun optimum pH değeri enzim kaynağına göre pH 4.0 - pH 7.0 arasında değişmektedir [63]. Yapılan ölçümlerde katekol aktivitesi pH 6.8'de 9388.5 U/(mL\*dk) olarak ölçülmüştür. Katekol substratı pH 6.8'de diğer pH değerlerine göre daha yüksek aktivite göstermiştir. (Şekil 4.3) Literatürde yapılan benzer çalışmalara bakıldığında, Peng ve arkadaşları tarafından mor patatesten ekstrakte edilmiş PFO'nun optimum pH değeri 6.0, Zhang ve arkadaşları tarafından karidesten ekstrakte edilmiş PFO'nun optimum pH değeri 7.5, Kaya ve arkadaşları tarafından üzümünden ekstrakte edilmiş PFO'nun optimum pH değeri 5.0, Kim ve arkadaşları tarafından ginsengden ekstrakte edilmiş PFO'nun optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir [59–62]. Yapılan çalışmalardan, muşmula PFO enziminin optimum pH değerinin literatür

sonuçları ile uyum içinde olması ile birlikte enzim kaynağına göre farklılık gösterdiği görülmüştür.

#### 4.1.2.4 PFO Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Metod 3.7'de belirtildiği gibi PFO enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.4'deki gibi özetlenmiştir.

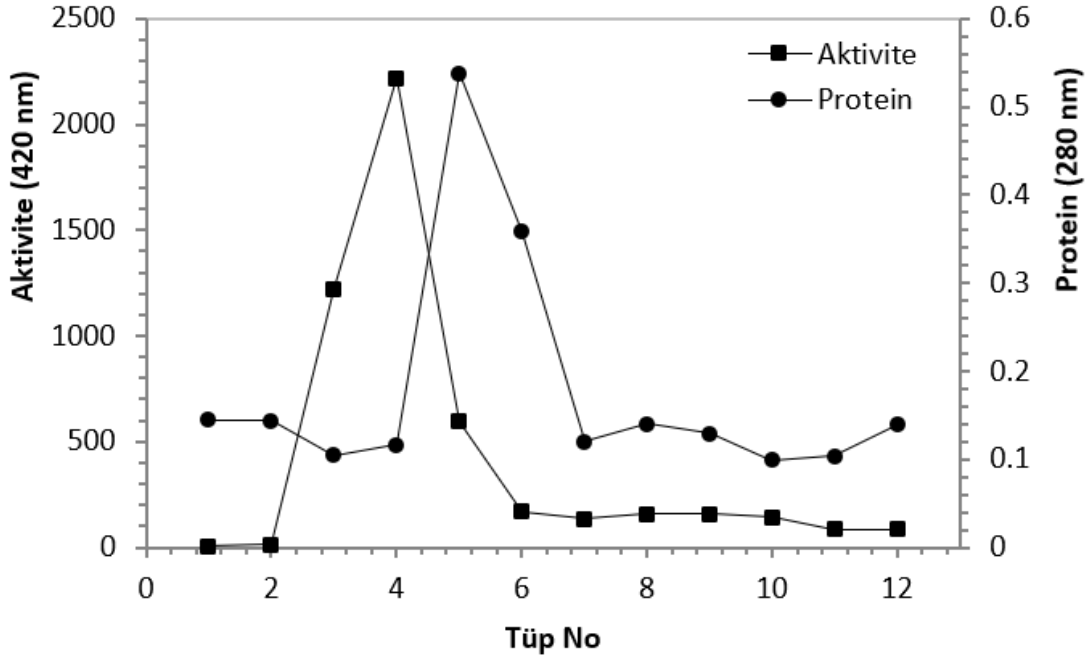


Şekil 4.4 Katekol için optimum sıcaklık (°T) değerine karşılık enzim aktivite [U/(mL\*dk)] grafiği

Şekil 4.4.'e göre *Mespilus germanica* PFO enziminin katekol için optimum sıcaklık değeri 15°C olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre katekol substratının optimum sıcaklığında 8731.5 U/(mL\*dk) aktivite göstererek diğer sıcaklıklardan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Literatürde yapılmış bazı çalışmalara bakıldığında Peng ve arkadaşları mor patatesten ekstrakte edilmiş PFO için optimum sıcaklık değerini 35°C, Zhang ve arkadaşları karidesten ekstrakte edilmiş PFO için optimum sıcaklık değerini 35°C, Kaya ve arkadaşları üzümünden ekstrakte edilmiş PFO için optimum sıcaklık değerini 30°C, Kim ve arkadaşları ginsengden ekstrakte edilmiş PFO için optimum sıcaklık değerini 20°C olarak belirlemişlerdir [59–62]. Deneysel sonuçlar değerlendirildiğinde, patates ve karidesin sahip olduğu optimum sıcaklık değeri, muşmula ve ginsenge göre yüksektir. Enzimin özelliklerinin bulunduğu kaynağa göre değişkenlik göstermesi ile birlikte yetiştiği ortam sıcaklığının ve çevresel faktörlerinde enzim üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

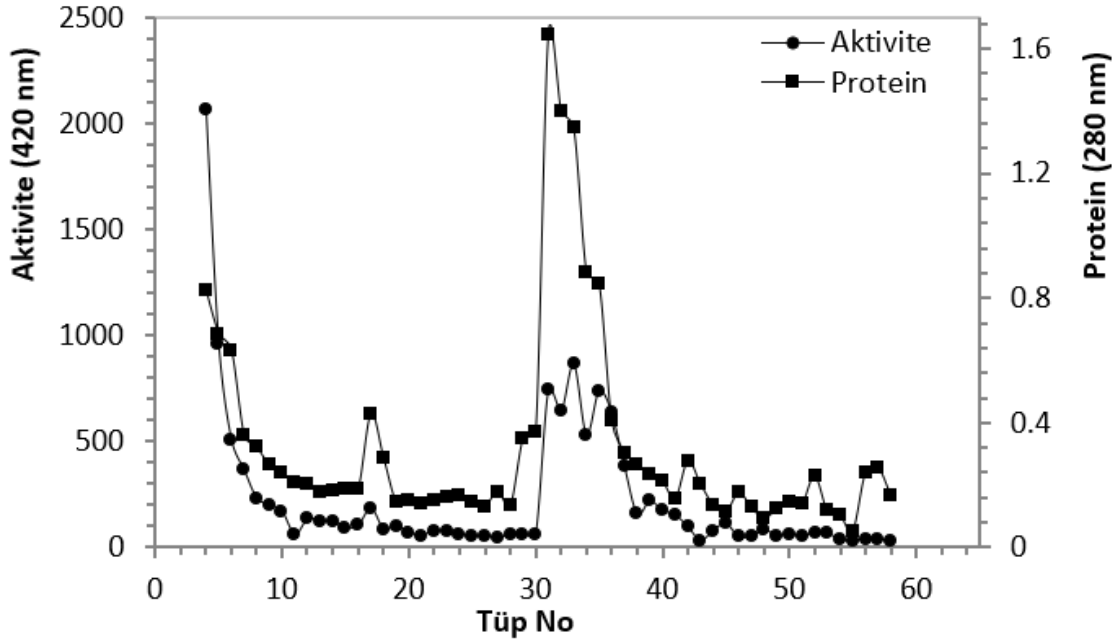
#### 4.1.3 Afinitive Kromatografisi ile PFO Enziminin Saflaştırılması

Metod 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde afinitive kromatografisi ile saflaştırma yapıldı. Jel olarak Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli kullanıldı. Elde edilen veriler grafiğe aktarıldı (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** Sefaroz 4B-L-tirozin- p amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi elüsyon grafiği

Elüsyon tampon çözeltisi uygulanarak kolondan toplanan 3 ve 4 numaralı tüplerde diğer tüplere göre daha yüksek aktivite olduğu görüldü. (Şekil 4.5). Yüksek aktiviteye sahip olan 3 ve 4 numaralı tüpler metod 3.5'e göre mevcut PFO protein miktarını belirlemek ve metod 3.9'a göre enzimin saflığını kontrol etmek için kullanıldı. Bu işlemlerin sonuçları incelendiğinde elektroforezde tek bant veren, düşük proteine karşılık yüksek aktivite gösteren PFO enziminin muşmuladan saflaştırıldığı tespit edilmiş oldu. Yine Metod 3.4.2'ye göre afinite kromatografisi ile saflaştırma yapıldı. Jel olarak sefaroz-6B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli kullanıldı. Elde edilen veriler grafiğe geçirildi. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 Sefaroz 6B-L-tirozin- p-amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi yıkama ve elüsyon grafiği

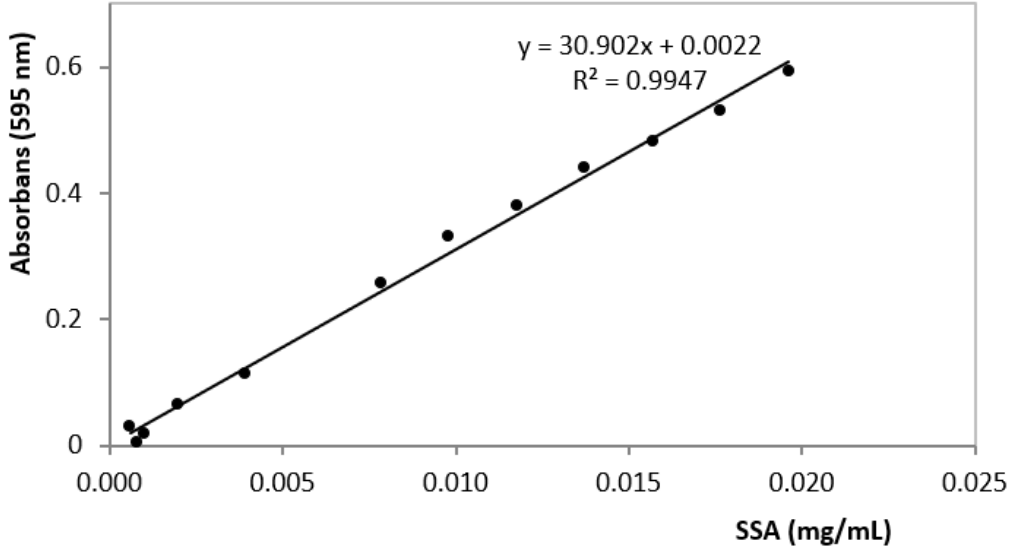
Yıkama işlemi 28. tüpte sonlandırılarak 29. tüpte elüsyon toplama aşamasına geçilmiştir. Grafikte elüsyon sonrası enzim aktivitesinin yüksek çıkması, PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırıldığının göstergesidir.

#### 4.1.4 Muşmula PFO Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

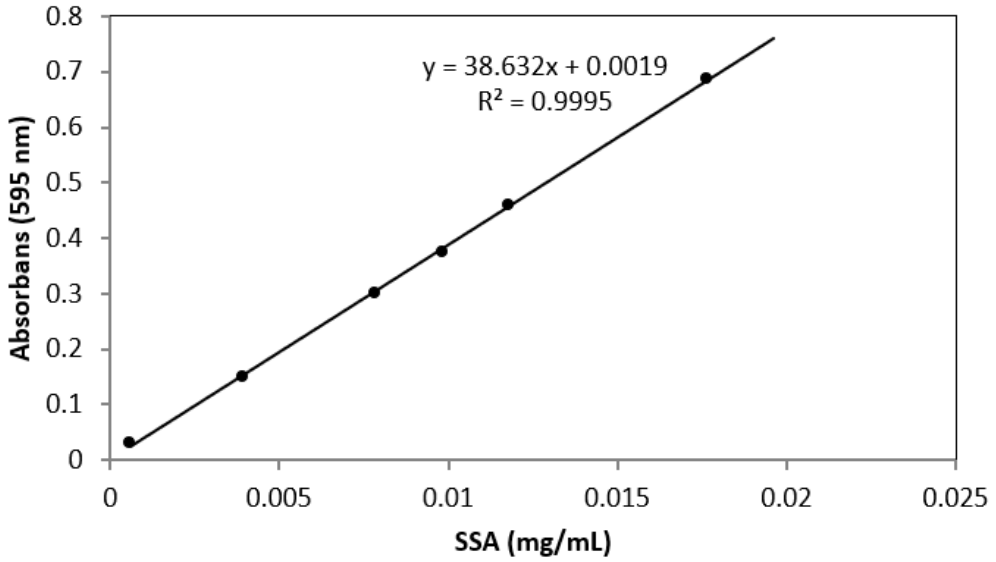
Metod 3.6.'da belirtildiği üzere PFO enzim aktivitesi tespit edildi. Sefaroz 4B ve Sefaroz 6B jellerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim numuneleri için sırasıyla ham ekstrakt eldesi, amonyum sülfat ile çöktürme (0-80) % ve afinite kromatografisi işlemleri uygulanmıştır. Bu saflaştırma işlemleri baz alındığında her bir basamakta elde edilen mL'deki aktivite değerleri Sefaroz 4B ve Sefaroz 6B saflaştırma tabloları için sırasıyla;  $604,5 \text{ U} \times \text{mL}^{-1} \times \text{dk}^{-1}$  (EU)/4651,5 EU/2220 EU ve 246 EU/8613 EU/864 EU olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.5 Bradford Yöntemi ile (*Mespilus germanica*) PFO Enziminin Protein Miktarının Belirlenmesi

Metod 3.5'e göre çizilen SSA miktarına karşılık absorbans grafiği aşağıda verilmiştir. (Şekil 4.7) (Şekil 4.8) Aynı metotta verildiği üzere Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan *Mespilus germanica* PFO enziminin protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 4.7 Protein miktarının ölçülmesinde kullanılan standart doğru 1



Şekil 4.8 Protein miktarının ölçülmesinde kullanılan standart doğru 2

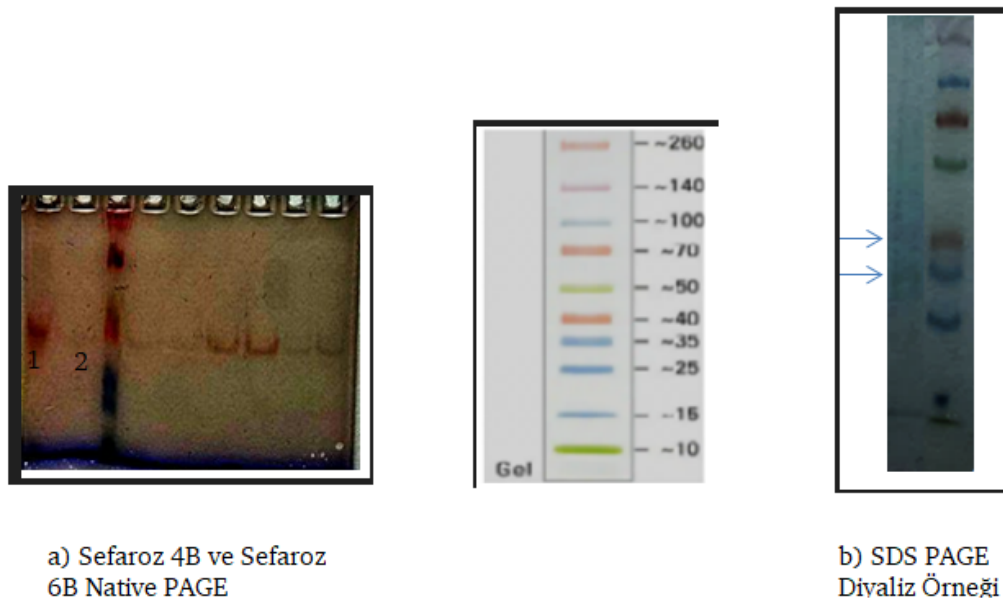
Bu amaçla elde edilen  $y=30.902x + 0.0022$  doğru denklemi Sefaroz 4B saflaştırma tablosunda, elde edilen  $y=38.632x + 0.0019$  doğru denklemi ise Sefaroz 6B saflaştırma tablosunda kullanılmıştır.

#### 4.1.6 SDS-PAGE Jel Elektroforezi ve Native-PAGE Elektroforezi ile Enzimin İncelenmesi

PFO molekül ağırlığı ürüne göre değişkenlik göstermekle birlikte 27 kDa ile 144 kDa arasında değişmektedir [1]. Diyaliz numunesinde SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 40 kDa ve 35 kDa civarında iki bant gözlenmiştir (Şekil 4.9.b). Farklı kaynaklardan

elde edilmiş PFO enzimlerinin elektroforez sonuçlarına bakılınca, hurmada 37 kDa, mantarda 67 kDa, enginarda 116 kDa, kahvede 45-67 kDa, elmada 57 kDa olduğu görülmüştür [64–68].

Muşmuladan elde edilen PFO enziminin molekül ağırlığı literatür sonuçları ile kıyaslandığında *Mespilus Germanica* PFO'nun molekül ağırlığının hurma, mantar, kahve, elma ve enginardan farklı olmakla birlikte literatür ile uyum içindedir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9** Muşmula (*Mespilus germanica*)PFO enziminin (a) Native-PAGE elektroforez görüntüsü (b) SDS-PAGE elektroforez görüntüsü

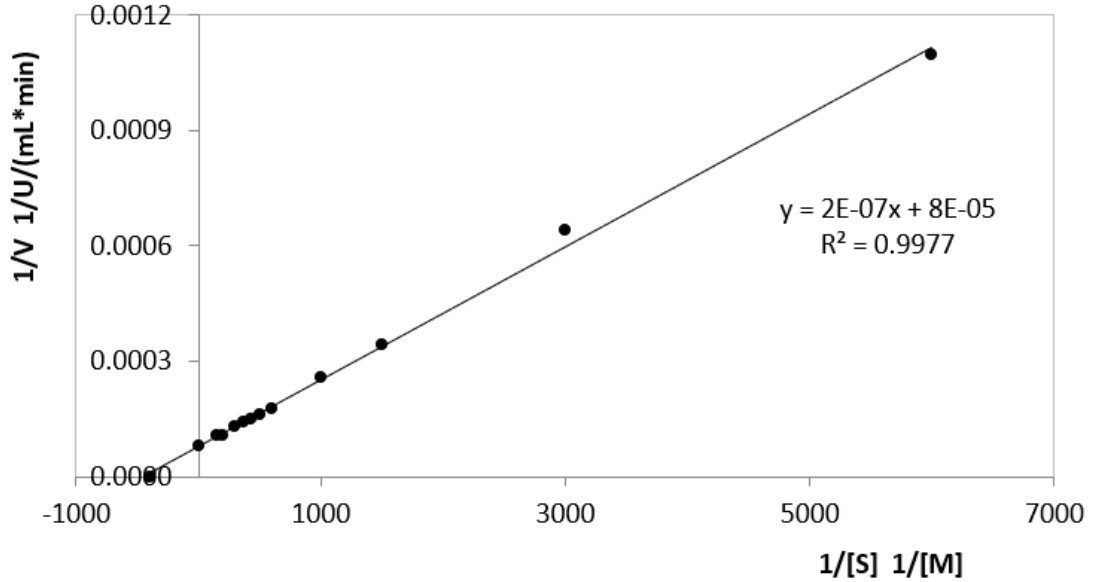
Yukarıdaki şekilde (a) olarak gösterilen Native PAGE elektroforez görüntüsünde 1 ile işaretlenen kuyuda diyaliz numunesi, 2 ile işaretlenen kuyuda Sefaroz 6B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve yine aynı görselde işaretlenmiş olarak gösterilen kuyuların tamamında ise Sefaroz 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri bulunmaktadır. Yine yukarıda (b) olarak gösterilen SDS PAGE elektroforez görüntüsünde görüntülenen işaretli bantların tamamı diyaliz numunesine ait enzim çözeltisidir. PFO enzimi bulunduğu kaynağa göre farklı özelliklere sahip olabilir. İzoenzimler halinde bulunabilir veya tek alt birime de sahip olabilirler [31, 69–77]. Karakterizasyon çalışması yapılırken muşmuladan kısmen saflaştırılmış PFO enziminin alt birim çeşitliliğine bağlı olası farklı izoformlarını tespit etmek amacı ile Native-PAGE yapılmıştır. Deney sonucunda elde edilen veriler incelenerek diyaliz PFO enziminin yaklaşık 40 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki bant oluşumu gözlenmiştir. Afinite kromatografisi ile 4a ve 4b afinite jelleri kullanılarak

saflaştırılan PFO enzimi için ise Native-PAGE 'de yaklaşık 40 kDa civarında tek bant gözleendiğinden, muşmula PFO izoformlarından 40 kDa molekül ağırlığına sahip enzim izoformunun afinite kromatografisi ile saflaştırıldığı yorumu yapılmıştır. Dolayısıyla afinite kromatografisi ile saflaştırılan örneklerde tek bant oluşumu gözlenebilmiştir (Şekil 4.9.a)

#### 4.1.7 (*Mespilus germanica*) PFO Enziminin Kinetik Sabitleri ( $K_M$ , $V_{max}$ )

##### % Verimi, Spesifik Aktivitesi ve Saflaştırma Derecesinin Hesaplanması

Bölüm 4.1.2'de tespit edilen optimum koşullar sonucunda muşmula PFO enziminin optimum substratı olan katekolün Metod 3.8.'de belirtildiği gibi kinetik sabitleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Katekol substratı için çizilen grafik aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Katekol substratı için Lineweaver Burk grafiği

*Mespilus germanica* PFO enziminin optimum substratı olan katekol için  $V_{max}$  değeri 12542.46 EU/(mL\*dk),  $K_M$  değeri ise 2.5 mM olarak hesaplandı.  $K_M$ , Michaelis sabitidir ve enzimin substrata olan ilgisini gösterir,  $K_M$  değerinin düşük olması enzimin substratına bağlanma gücünün fazla olduğunu göstermektedir.  $V_{max}$  değeri enzimin maksimum hızını temsil eder ve yüksek  $V_{max}$  değeri enzimin yüksek katalitik etkinliğe sahip olduğunu gösterir. [47]. PFO enzimi için  $K_M$  değerleri genellikle 1-10 mM aralığındadır. [78]. Yapılan benzer çalışmalarda Sarsenova ve arkadaşları mantar PFO enziminin katekol substratı için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 1,67 mM ve 833,33 U/mL, Kaya ve arkadaşları üzüm PFO enziminin 4-metil katekol substratı için  $K_M$  ve

V<sub>max</sub> değerlerini sırasıyla 4.8 mM ve 2000,0 EU/ mL bulmuşlardır [60], [78]. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde muşmula PFO enziminin katekole olan ilgisinin literatür sonuçları ile uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Metod 3.8'e göre saflaştırma basamakları için toplam protein miktarları, spesifik aktivite değerleri, % verim sonucu ve saflaştırma dereceleri hesaplanmıştır. Sefaroz 6B-L-tirozin-p aminobenzoik asit afinite jeli ile yapılan saflaştırmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 4.1'de yer almaktadır.

**Table 4.1** Sefaroz 6B-L-tirozin- p amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi sonucu hazırlanan saflaştırma tablosu

| Saflaştırma Basamağı | Hacim (mL) | Aktivite (U/mL *dk) | Toplam Aktivite (U) | Protein (mg/ mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg protein) | Verim (%) | Saflaştırma Derecesi |
|----------------------|------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|
| Ham ekstrakt         | 290        | 246                 | 71340               | 0.002353         | 0.6823              | 104548.6                         | 100       | 1                    |
| A.S. Çöktürmesi      | 25         | 8613                | 215325              | 0.012715         | 0.3178              | 677397                           | 301.8293  | 6.479251             |
| Sefaroz 6B (5)       | 2          | 864                 | 1728                | 0.001138         | 0.0022              | 759455                           | 2.422204  | 7.264130             |

Tablo 4.1 incelendiğinde Sefaroz 6B-L-tirozin-p aminobenzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisinde *Mespilus Germanica* PFO enziminin saflaştırma derecesi 7,26 kat bulunmuştur. (Tablo 4.1) Yapılan benzer bir çalışmada Yıldız ve arkadaşları mürdüm eriği PFO enzimini Sefaroz 6B jeli ile 10,2 kat saflaştırmışlardır [58]. Deneysel sonuca bakarak mürdüm eriği PFO enziminin Sefaroz 6B jeline muşmula PFO enziminden daha ilgili olduğunu ancak iki kaynakta bulunan PFO enziminin de Sefaroz 4B jeline daha seçici olduğu anlaşılmıştır.

Sefaroz 4B-L-tirozin-p aminobenzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi sonucu hazırlanan saflaştırma tablosu Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Table 4.2** Sefaroz 4B-L-tirozin- p amino benzoik asit jeli ile yapılan afinite kromatografisi sonucu hazırlanan saflaştırma tablosu

| Saflaştırma Basamağı | Hacim (mL) | Aktivite (U/mL *dk) | Toplam Aktivite (U) | Protein (mg/ mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg protein) | Verim (%) | Saflaştırma Derecesi |
|----------------------|------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|
| Ham ekstrakt         | 250        | 604.5               | 151125              | 0.0038           | 0.9509              | 158913.3                         | 100       | 1                    |
| A.S. Çöktürmesi      | 68         | 4651.5              | 316302              | 0.0089           | 0.6088              | 519481.9                         | 209.2983  | 3.2689               |
| Sefaroz 4B (4)       | 2          | 2220                | 4440                | 0.0002           | 0.0005              | 8575305                          | 2.937965  | 53.9621              |

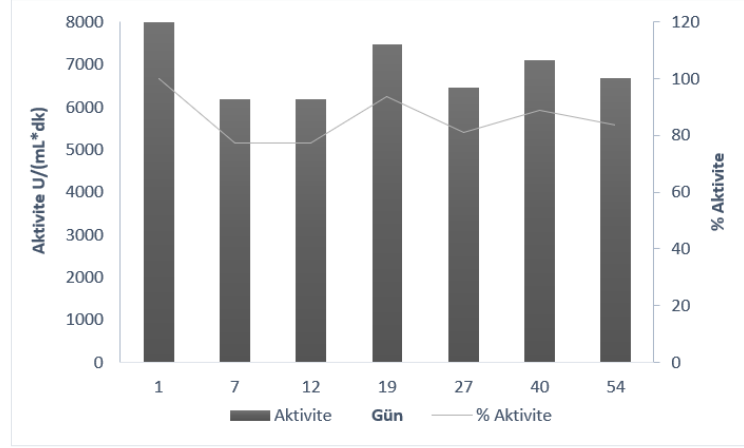
Tablo 4.2.'ye bakıldığında *Mespilus germanica* PFO enziminin saflaştırma derecesi 53,96 kat bulunmuştur. Saflaştırma basamakları incelendiğinde toplam protein miktarı azalmış spesifik aktivite değeri ise artmıştır. İncelenen veriler göz önünde bulundurulduğunda uygulanan saflaştırma metodunda *Mespilus germanica* PFO enziminin Sefaroz 4B-L-tirozin-P-aminobenzoik asit afinite jeline karşı ilgisinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmalardan birinde Atasever ve arkadaşları PFO enzimini Sefaroz 4B jeli kullanarak erikten saflaştırmış ve yaklaşık 65 kat saflaştırma derecesi elde etmişler, yapılan benzer çalışmalardan bir diğerinde Ergün ve arkadaşları PFO enzimini Sefaroz 4B jeli kullanarak muzdan saflaştırmış ve yaklaşık 105 kat saflaştırma derecesi elde etmiştir. Başka bir çalışmada ise Kaya ve arkadaşları Sefaroz 4B jeli kullanarak üzümde PFO enzimini yaklaşık 61 kat saflıkta elde etmiştir [60] [79] [80].

Sefaroz 6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit jeli ile yapılan saflaştırmada saflaştırma katsayısının düşük olmasının nedeni saflaştırma işlemi sırasında elde edilen PFO enziminin konformasyonunda değişiklik meydana gelmesi [81] bu değişikliğin de aktivitede düşüğe sebep olabileceği düşünülebilir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde *Mespilus germanica* PFO enziminin matriks olarak Sefaroz 4B'ye Sefaroz 6B'den daha ilgili olduğu görülmüştür.

#### **4.1.8 Muşmula PFO Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Depolama kararlılığının belirlenmesi amacı ile yaklaşık 2 ay süre ile bölüm 4.1.2'de belirtilen optimum koşullar içinde PFO enziminin aktivite kararlılığı incelenmiştir. Yapılan ölçümler Şekil 4.11'de zamana bağlı aktivite ve % aktivite olmak üzere grafikte açıklanmıştır.

Şekil 4.11'deki grafik incelendiğinde Muşmula PFO enziminin aktivitesi inceleme yapılan süre boyunca +4 °C'de az miktarda aktivite kaybı göstererek yüksek miktarda da aktivitesini korumuştur. Bu gözlem sonucunda Muşmula PFO enziminin uygun şartlarda depolamaya elverişli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.11 Muşmula PFO enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi [U/(mL\*dk)] ve % enzim aktivitesi grafiği

## 4.2 Öneriler

Bu tez çalışmasında ilk amaç muşmulada bulunan PFO enzimini Afinite kromatografisi ile saflaştırmak ve saflaştırılan enzimi karakterize etmektir. Enzimin varlığı afinite kromatografisi ile saflaştırılan çözelti ve KSP enzim özütüne ait çözelti kullanılarak elektroforetik yöntemlerle tespit edilmiştir. Enzimin molekül ağırlığı belirlenmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Enzimin molekül ağırlığını belirlemek için yapılan SDS-PAGE ve Native-PAGE elektroforezlerinde PFO diyaliz numunesi için sırasıyla, 40 kDa- 35 kDa ve 40 kDa - 70 kDa hizasında iki bant oluşumu gözlenirken, Native-PAGE 'de afinite PFO enzimleri için 40 kDa civarında tek bant oluşumu gözlenebilmiştir. Muşmulada bulunan PFO enziminin substratı olan katekolün diğer substratlara göre çok daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüş ve diğer kinetik çalışmaların devamı için katekol substratının en uygun substrat olduğu kararına varılmıştır. Çalışmanın devamındaysa ulaşılan saflaştırma katsayıları göz önüne alındığında Sefaroz 6B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jelinin PFO enzim saflaştırmasına uygun bir afinite jeli olabileceği ve farklı kaynaklardan elde edilecek olan PFO enzimi saflaştırmalarında da kullanılabileceği görülmüştür. Çalışmanın son kısmında PFO enzimi için yaklaşık 2 aylık süre boyunca depolama kararlılığı incelenmiş ve veriler grafik üzerinden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda depolama ölçümlerinden *Mespilus germanica* PFO enziminin yüksek stabiliteye sahip olması nedeniyle endüstriyel önem arz eden bir enzim olarak, biyosensör ve ileri immobilizasyon proseslerinde tercih edilmesine ve kullanımına olanak sağlayacaktır, ayrıca muşmula PFO enzimini +4 °C ve daha düşük sıcaklıklarda saklamanın PFO enzim aktivitesi göz önüne alındığında uygun olduğu görülmektedir.

- [1] D. Panadare, V. K. Rathod, "Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 14, pp. 431–437, 2018.
- [2] C. Queiroz, M. L. Mendes Lopes, E. Fialho, V. L. Valente-Mesquita, "Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control," *Food reviews international*, vol. 24, no. 4, pp. 361–375, 2008.
- [3] O. Rop *et al.*, "Effect of five different stages of ripening on chemical compounds in medlar (*mespilus germanica l.*)," *Molecules*, vol. 16, no. 1, pp. 74–91, 2010.
- [4] J. Gruz, F. A. Ayaz, H. Torun, M. Strnad, "Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*mespilus germanica l.*) fruit at different stages of ripening," *Food Chemistry*, vol. 124, no. 1, pp. 271–277, 2011.
- [5] D. S. Hage, "Affinity chromatography: A review of clinical applications," *Clinical chemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 593–615, 1999.
- [6] M. Urh, D. Simpson, K. Zhao, "Affinity chromatography: General methods," *Methods in enzymology*, vol. 463, pp. 417–438, 2009.
- [7] D. Diler, Y. Leblebiciler, "Muşmula (*mespilus germanica l.*) özütü biyokatalizörlüğünde gümüş nanopartikül (agnp) sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmaları," *Bilim Armonisi*, vol. 3, no. 1, pp. 17–23,
- [8] H. Haciseferoğulları, M. Özcan, M. H. Sonmete, O. Özbek, "Some physical and chemical parameters of wild medlar (*mespilus germanica l.*) fruit grown in turkey," *Journal of Food Engineering*, vol. 69, no. 1, pp. 1–7, 2005.
- [9] M. Yolmeh, A. Sadeghi Mahoonak, "Characterization of polyphenol oxidase and peroxida se from iranian medlar (*mespilus germanica l.*) fruit," 2018.
- [10] İ. Gülçin, F. Topal, S. B. Ö. Sarikaya, E. Bursal, G. Bilsel, A. C. Gören, "Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*mespilus germanica l.*)," *Records of Natural Products*, vol. 5, no. 3, p. 158, 2011.
- [11] S. Ercisli *et al.*, "Phytochemical and antioxidant characteristics of medlar fruits (*mespilus germanica l.*)," *Journal of Applied Botany and Food Quality*, vol. 85, no. 1, p. 86, 2012.
- [12] Ş. Pekiyardımcı, "Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisi uygulamaları," *Gıda*, vol. 17, no. 3, 1992.
- [13] M.-A. McLarin, I. K. Leung, "Substrate specificity of polyphenol oxidase," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 55, no. 3, pp. 274–308, 2020.

- [14] L. Vámos-Vigyázó, N. F. Haard, "Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 15, no. 1, pp. 49–127, 1981.
- [15] A. M. Mayer, E. Harel, "Polyphenol oxidases in plants," *Phytochemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 193–215, 1979.
- [16] C. Eicken, B. Krebs, J. C. Sacchettini, "Catechol oxidase—structure and activity," *Current opinion in structural biology*, vol. 9, no. 6, pp. 677–683, 1999.
- [17] P. Castanera, J. Steffens, W. Tingey, "Biological performance of colorado potato beetle larvae on potato genotypes with differing levels of polyphenol oxidase," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 22, pp. 91–101, 1996.
- [18] P. Kovacic, "Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: Clinical implications," *Medical hypotheses*, vol. 69, no. 3, pp. 510–516, 2007.
- [19] İ. Yavru, "Karayemiş (*prunus laurocerasus* l.) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşmaya bağlı olarak bazı organik madde miktarları ile polifenol oksidaz aktivitesindeki değişimlerin araştırılması," *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi) Trabzon*, 1997.
- [20] G. P. Zemel, "Low ph inactivation of polyphenoloxidase," Ph.D. dissertation, University of Florida, 1989.
- [21] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—a review," *Journal of functional foods*, vol. 18, pp. 820–897, 2015.
- [22] R. Yoruk, M. R. Marshall, "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review 1," *Journal of food biochemistry*, vol. 27, no. 5, pp. 361–422, 2003.
- [23] J. Whitaker *et al.*, "Principles of enzymology for the food sciences.," *Principles of enzymology for the food sciences.*, 1972.
- [24] A. Kamal, M. Gasmalla, H. Alyousef, "Efficient methods for polyphenol oxidase production," *Int J Nutr Food Sci*, vol. 4, pp. 656–659, 2015.
- [25] F. Ayaz, O. Demir, H. Torun, Y. Kolcuoglu, A. Colak, "Characterization of polyphenoloxidase (ppo) and total phenolic contents in medlar (*mespilus germanica* l.) fruit during ripening and over ripening," *Food chemistry*, vol. 106, no. 1, pp. 291–298, 2008.
- [26] N. E. Labrou, "Protein purification: An overview," *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*, pp. 3–10, 2014.
- [27] M. Anson, "Protein denaturation and the properties of protein groups," in *Advances in protein chemistry*, vol. 2, Elsevier, 1945, pp. 361–386.
- [28] Ü. İ. Konak, İ. Turhan, M. Certel, "Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması," *Akademik Gıda*, vol. 12, no. 2, pp. 79–87, 2014.
- [29] A. Mayer, E. Harel, "A laccase-like enzyme in peaches," *Phytochemistry*, vol. 7, no. 8, pp. 1253–1256, 1968.

- [30] M. Gao, N. Li, J. Zhang, P. Yang, X. Zhang, "The study of three extraction methods for pre-separation and enrichment: Application to the complex proteome separation in rat liver," *Separation and purification technology*, vol. 52, no. 1, pp. 170–176, 2006.
- [31] J.-C. Janson, *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- [32] A. Ünlü, *Kromatografik yöntemler*. [Online]. Available: <https://bys.trakya.edu.tr/file/open/20607229>.
- [33] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, no. 1-3, pp. 199–240, 2001.
- [34] M. Wilchek, I. Chaiken, "An overview of affinity chromatography," *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, pp. 1–6, 2000.
- [35] D. S. Hage, J. Cazes, *Handbook of affinity chromatography*. CRC Press, 2005.
- [36] E. L. Rodriguez *et al.*, "Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years," *Journal of Chromatography B*, vol. 1157, p. 122332, 2020.
- [37] F. Richard-Forget, P. Goupy, J. Nicolas, "New approaches for separating and purifying apple polyphenol oxidase isoenzymes: Hydrophobic, metal chelate and affinity chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 667, no. 1-2, pp. 141–153, 1994.
- [38] C. Öztürk, M. Aksoy, Ö. İ. Küfrevioğlu, "Purification of tea leaf (*camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 14, pp. 31–38, 2020.
- [39] J. E. Schiel, R. Mallik, S. Soman, K. S. Joseph, D. S. Hage, "Applications of silica supports in affinity chromatography," *Journal of separation science*, vol. 29, no. 6, pp. 719–737, 2006.
- [40] E. L. Pfaunmiller, M. L. Paulemond, C. M. Dupper, D. S. Hage, "Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 405, pp. 2133–2145, 2013.
- [41] M. Firer, "Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography," *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 49, no. 1-3, pp. 433–442, 2001.
- [42] S. R. Narayanan, "Preparative affinity chromatography of proteins," *Journal of Chromatography A*, vol. 658, no. 2, pp. 237–258, 1994.
- [43] M. Linhult, S. Gulich, S. Hober, "Affinity ligands for industrial protein purification," *Protein and peptide letters*, vol. 12, no. 4, pp. 305–310, 2005.
- [44] M. Moeini Alishah, S. Yıldız, Ç. Bilen, E. Karakuş, "Purification and characterization of avocado (*persea americana*) polyphenol oxidase by affinity chromatography," *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 53, no. 1, pp. 40–53, 2023.
- [45] M. Wilchek, T. Miron, "Thirty years of affinity chromatography," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 41, no. 1-3, pp. 263–268, 1999.

- [46] D. S. Hage, R. Matsuda, "Affinity chromatography: A historical perspective," *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, pp. 1–19, 2015.
- [47] D. L. Nelson, M. M. Cox, "Lehninger biyokimyanın İlkeleri, çeviri editörü: Prof," *Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık*, 2005.
- [48] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, "Selective enzyme purification by affinity chromatography," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 61, no. 2, pp. 636–643, 1968.
- [49] Ş. Pekyardımcı, *Elektroforez: Elektroforez çeşitleri ve teknikleri, sds ile molekül kütlesi tayini*. [Online]. Available: [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4444/mod\\_resource/content/0/11.%20hafta.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4444/mod_resource/content/0/11.%20hafta.pdf).
- [50] S. Hjertén, "Free zone electrophoresis," *Chromatographic reviews*, vol. 9, no. 2, pp. 122–219, 1967.
- [51] H. Ahmed, *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*. CRC press, 2017.
- [52] N. J. Kruger, "The bradford method for protein quantitation," *The protein protocols handbook*, pp. 17–24, 2009.
- [53] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, "Recent advances on protein separation and purification methods," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 284, p. 102 254, 2020.
- [54] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [55] J. Ponting, M. Joslyn, *et al.*, "Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts," *Arch. Biochem.*, vol. 19, pp. 47–63, 1948.
- [56] J. C. Espin, M. Morales, R. Varón, J. Tudela, F. Garcíacanoas, "A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase," *Analytical biochemistry*, vol. 231, no. 1, pp. 237–246, 1995.
- [57] R. K. Scopes, "Enzyme activity and assays," *e LS*, 2001.
- [58] S. Yıldız, Ç. Bilen, E. Karakuş, "Purification of damson plum polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of metal effects on enzyme activity," *Preparative Biochemistry Biotechnology*, vol. 52, no. 9, pp. 1019–1034, 2022.
- [59] X. Peng, C. Du, H. Yu, X. Zhao, X. Zhang, X. Wang, "Purification and characterization of polyphenol oxidase (ppo) from water yam (*dioscorea alata*)," *CyTA-Journal of Food*, vol. 17, no. 1, pp. 676–684, 2019.
- [60] E. D. Kaya, O. Bağcı, "Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from kırmızı kısmis grape (*vitis vinifera l.*)," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 45, no. 2, e13627, 2021.
- [61] J.-J. Kim, W.-Y. Kim, "Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng," *Journal of ginseng research*, vol. 37, no. 1, p. 117, 2013.
- [62] J. Zhang *et al.*, "Study on purification and characterization of polyphenol oxidase from *acetes chinensis*," *Molecules*, vol. 26, no. 24, p. 7545, 2021.

- [63] F. Aylward, D. Haisman, "Oxidation systems in fruits and vegetables—their relation to the quality of preserved products," *Advances in food research*, vol. 17, pp. 1–76, 1969.
- [64] K. A. Batista, G. L. Batista, G. L. Alves, K. F. Fernandes, "Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from solanum lycocarpum fruits," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 102, pp. 211–217, 2014.
- [65] J. C. Espin, J. van Leeuwen, H. J. Wichers, "Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 3509–3517, 1999.
- [66] G. H. Onsa, N. bin Saari, J. Selamat, J. Bakar, "Latent polyphenol oxidases from sago log (*metroxylon sago*): Partial purification, activation, and some properties," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 48, no. 10, pp. 5041–5045, 2000.
- [67] A. Quarta, G. Mita, M. Durante, M. Arlorio, A. De Paolis, "Isolation of a polyphenol oxidase (ppo) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads," *Plant physiology and biochemistry*, vol. 68, pp. 52–60, 2013.
- [68] P. d. F. P. Goulart, J. D. Alves, M. M. Magalhaes, L. C. de Oliveira Lima, L. E. Meyer, "Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits," *Food Chemistry*, vol. 83, no. 1, pp. 7–11, 2003.
- [69] A. ŞENER, M. Ü. Ünal, S. Aksay, "Purification and characterization of polyphenol oxidase from goldnugget loquat (*eriobotrya japonica* cv. goldnugget)," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 35, no. 6, pp. 1568–1575, 2011.
- [70] X.-F. Feng, F. Liu, C.-H. Lin, X.-J. Lin, N.-N. Liu, X. Wang, "Purification and characterization of polyphenol oxidase from the bud of *lonicera confusa*," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 38, no. 6, pp. 533–541, 2014.
- [71] F. Zekiri *et al.*, "Purification and characterization of tyrosinase from walnut leaves (*juglans regia*)," *Phytochemistry*, vol. 101, pp. 5–15, 2014.
- [72] B. J. Davis, "Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins," *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 121, no. 2, pp. 404–427, 1964.
- [73] S. Fujita *et al.*, "Purification and characterization of polyphenol oxidase from edible yam (*dioscorea opposita* thunb.)," *Food science and technology research*, vol. 12, no. 3, pp. 235–239, 2006.
- [74] Z. Önez, E. KARAKUŞ, Ş. PEKYARDIMCI, "Izmir grape polyphenol oxidase (*vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties," *Journal of food biochemistry*, vol. 32, no. 3, pp. 396–414, 2008.
- [75] F. ÖZ, A. Colak, A. Özel, N. SAĞLAM ERTUNGA, E. Sesli, "Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 36–44, 2013.

- [76] G. Palma-Orozco, N. A. Marrufo-Hernández, I. Tobias, H. Nájera, “Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase from soursop (*annona muricata* l.) and its inactivation by microwave and ultrasound treatments,” *Journal of food biochemistry*, vol. 43, no. 3, e12770, 2019.
- [77] S. Liu, A. Murtaza, Y. Liu, W. Hu, X. Xu, S. Pan, “Catalytic and structural characterization of a browning-related protein in oriental sweet melon (*cucumis melo* var. *makuwa makino*),” *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, p. 354, 2018.
- [78] A. Sarsenova, D. Demir, K. Çağlayan, S. Abiyev, T. Darbayeva, C. Eken, “Purification and properties of polyphenol oxidase of dried *volvarella bombycina*,” *Biology*, vol. 12, no. 1, p. 53, 2022.
- [79] H. Atasever, B. Dinçer, “Cancur eriğinden (*prunus domestica* l.) polifenol oksidazın saflaştırılması ve eriğin antioksidan özelliğinin İncelenmesi,” p. 49, 2015.
- [80] A. Ergün, “Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı bileşiklerin bu enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması,” 2016.
- [81] A. Jukanti, *Polyphenol oxidases (PPOs) in plants*. Springer, 2017.

### Konferans Bildirisi

1. Çavdar A., Bilen Ç., Karakuş E., Purification and Characterization of Medlar (*Mespilus germanica*) Polyphenol Oxidase Enzyme, 7th International Congress on Life, Social, Health and Sports Sciences in a Changing World, BZT Academy Publishing House, Izmir Turkey, p.182, 24-26 September 2022

