

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REZENE (*Foeniculum vulgare*) TOHUMUNDAN FENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

BİNNUR YILDIRIM

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ



REZENE (Foeniculum vulgare) TOHUMUNDAN FENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

BİNNUR YILDIRIM

Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.

Prof. Dr. Fazıl ÖZEN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Dr. Öğr. Üyesi Bengü ÖZTÜRK
Jüri Üyesi, Yeditepe Üniv.


.....

.....

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 17.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada Kocaeli ilinin yerel pazar ve aktarlarında yaygın olarak satılan, fenolik madde (antioksidan) içeriği bakımından zengin olduğu bilinen rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumundan fenol oksidaz enzimi, düşük maliyet ve yüksek verimle çalışan bir izolasyon yöntemi olarak tanımlanan Üçlü-Faz Ayırma (TPP, Three-Phase Partitioning) sistemi kullanılarak ilk defa bu çalışmada saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri elektroforetik ve spektroskopik açıdan değerlendirildi.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni yapan, gelecekteki meslek hayatımda da bana vermiş olduğu değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, çalışma sürecinde bilgilerini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Araş. Gör. Dr. Arda ACEMİ'ye, tez değerlendirme sürecinde desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Fazıl ÖZEN ve Dr. Öğr. Üyesi Bengü ÖZTÜRK'e, laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerine, destekleriyle yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Eda Baykal SARI, Ceren AĞGEZ, Fatma Zehra CEYHAN, Büşra KAHVECİ, Günce GÖÇ ve Semih IŞIK'a teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, her daim desteğiyle ve sevgisiyle yanımda olan canım babam Fuat YILDIRIM'a ve benimle birlikte yorulan, bütün sıkıntılarda yanımda olan ve her zaman ilgisini üzerimde hissettiğim canım annem Emine YILDIRIM'a, canım kardeşlerim Derya YILDIRIM ve M. Mustafa YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sağladıkları destekle tez çalışmamın ilerlemesine katkıda bulunan TÜBİTAK'a (Proje numarası: 117Z600) şükranlarımı sunuyorum.

Haziran - 2019

Binnur YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ	1
1.GENEL BİLGİLER	3
1.1. Oksidatif Stres	3
1.1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	4
1.1.2. Antioksidanlar.....	7
1.2. Fenol Oksidazlar.....	13
1.2.1. Lakkaz.....	14
1.2.2. Tirozinaz.....	14
1.2.3. Katekol oksidaz.....	16
1.3.4. Peroksidaz.....	16
1.3. Gıda Bitkileri.....	17
1.3.1. Rezene.....	17
1.3.2. Hünnap.....	18
1.3.3. Keçiboynuzu.....	19
1.3.4. Kişniş.....	20
1.3.5. Meyan.....	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Bitki Örneklerinin Temini	23
2.2. Fenol Oksidaz Ham Ekstraktlarının Hazırlanması	23
2.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi	23
2.4. Fenol Oksidaz Aktivite Tayini	24
2.5. Protein Miktar Tayini.....	24
2.6. Fenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu	24
2.6.1. Moleküler ağırlığın hesaplanması	24
2.6.2. Aktivite boyama.....	25
2.6.3. Sıcaklık ve pH'nın fenol oksidaz üzerine etkisi	25
2.6.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi	26
2.6.5. Substrat spesifite analizi	26
2.6.6. Organik çözücülerin fenol oksidaz üzerine etkisi.....	26
2.6.7. İnhibitörlerin enzim aktivite üzerine etkisi	27
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
3.1. Bitki Örneklerinin Fenol Oksidaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması	28
3.2. Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	29
3.2.1. pH optimizasyonu.....	29
3.2.2. PVP konsantrasyonunun optimizasyonu	30
3.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi ile Fenol Oksidazın Saflaştırılması.....	31

3.3.1. Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) konsantrasyonunun belirlenmesi	33
3.3.2. Ham ekstrakt:t-bütanol oranının belirlenmesi	34
3.3.3. Üçlü-faz ayırma sistem pH'sının belirlenmesi	35
3.4. Elektroforetik Analizler.....	36
3.4.1. SDS-PAGE elektroforezi	36
3.4.2. Aktivite boyama	38
3.5. Saflaştırılan <i>Foeniculum vulgare</i> (Rezene) Fenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu	39
3.5.1. Reaksiyon sıcaklığının enzim üzerine etkisinin araştırılması	39
3.5.2. Reaksiyon pH'sının enzim üzerine etkisinin araştırılması	41
3.5.3. Kinetik parametrelerin belirlenmesi	42
3.5.4. Substrat spesifite analizi	43
3.5.5. Organik çözücülerin enzim aktivite üzerine etkisi	44
3.5.6. İnhibitörlerin enzim aktivite üzerine etkisi.....	45
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	49
EKLER.....	63
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Oksidatif denge.....	3
Şekil 1.2.	Antioksidanların sınıflandırılması.....	8
Şekil 1.3.	(a)Hidro benzoik asit ve (b) hidroksi sinnamik asit molekül yapısı.....	11
Şekil 1.4.	Flavonoid grupları.....	12
Şekil 1.5.	PG, TBHQ, BHA ve BHT'nin moleküler yapıları.....	13
Şekil 1.6.	Lakkazın aktif bölgesinin genel yapısı ve detayları (<i>Trametes trogii</i> lakkazı PDB ID: 2HRG).....	14
Şekil 1.7.	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> tirozinazın yapısal özellikleri.....	15
Şekil 1.8.	Melanin oluşumu.....	15
Şekil 1.9.	<i>Ipomea</i> katekol oksidazının yapısı.....	16
Şekil 1.10.	Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>).....	18
Şekil 1.11.	Hünnap (<i>Zizyphus jujuba</i>).....	19
Şekil 1.12.	Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i>).....	20
Şekil 1.13.	Kişbiş (<i>Coriandrum sativum</i>).....	21
Şekil 1.14.	Meyan (<i>Glycyrrhiza glabra</i>).....	22
Şekil 3.1.	TPP sisteminin görsel gösterimi.....	32
Şekil 3.2.	Rezene fenol oksidazının SDS-PAGE profil görüntüsü.....	37
Şekil 3.3.	Rezene fenol oksidazının ADA (1) ve <i>t</i> BC (2) ile aktivite boyama sonuçlarını gösteren jel görüntüsü.....	38
Şekil 3.4.	Reaksiyon sıcaklığının rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkisi.....	39
Şekil 3.5.	Sıcaklık değişiminin enzim kararlılığı üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.6.	Reaksiyon pH'sının rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.7.	Reaksiyon pH değişiminin enzim kararlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.8.	Katekol konsantrasyonunun fenol oksidaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	43
Şekil 3.9.	Fenol oksidaz enziminin Lineweaver-Burk Plot eğrisi.....	43

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Farklı bitki örneklerinde ölçülen fenol oksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	28
Tablo 3.2.	Ekstraksiyon pH'sının optimizasyonu.....	29
Tablo 3.3.	Rezeneden fenol oksidaz ekstraksiyonu Sırasında kullanılan PVP'nin optimizasyon sonuçları.....	30
Tablo 3.4.	Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP sistemlerinde fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi.....	34
Tablo 3.5.	Farklı ham ekstrakt:t-bütanol oranlarının TPP sistemlerinde fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi.....	35
Tablo 3.6.	Sistem pH'sının TPP'de fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi.....	36
Tablo 3.7.	Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen fenol oksidazların molekül kütlesi.....	37
Tablo 3.8.	Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen fenol oksidazların optimum pH ve sıcaklıklarının karşılaştırılması.....	40
Tablo 3.9.	Rezene fenol oksidazının substrat spesifite analizi ve <i>T. versicolor</i> lakkaz ile karşılaştırılması.....	44
Tablo 3.10.	Farklı organik çözügenlerin Rezene fenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	45
Tablo 3.11.	İnhibitörlerin rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkileri ve <i>T. versicolor</i> lakkazı ile karşılaştırılması.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
µL	: Mikrolitre
µmol/mL/dak	: mikromol/mililitre/dakika
cm	: Santimetre
g	: Gram
g/L	: gram/litre
L	: Litre
M	: Molar
mg/mL	: miligram/mililitre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat derece
U	: Unit-Enzim birimi
U/g	: Unit/gram

Kısaltmalar

(a/a)	: Ağırlık/Ağırlık
(h/h)	: Hacim/Hacim
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum Sülfat
(v/v)	: Volume/Volume
(w/w)	: Weight/Weight
(w/v)	: Weight/Volume
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADA	: 4-amino-N-N diethylaniline
APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümini)
CTAB	: Setriltrimetilamonyum
dH ₂ O	: Deiyonize Su
DMSO	: Dimethyl sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
HCl	: Hidroklorik Asit
kDa	: KiloDalton
NaOH	: Sodyum Hidroksit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PVP	: Polivinilpirolidon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SHAM	: Salisil hidrokksamik asit
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TPP	: Three Phase Partitioning (Üçlü faz ayırma sistemi)

REZENE (*Foeniculum vulgare*) TOHUMUNDAN FENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada ekonomik bir bitkisel fenol oksidaz kaynağının bulunması ve enzimin olası uygulama alanlarının belirlenmesi için karakterizasyonu hedeflendi. Bu hedefle, rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumundan enzim Üçlü-Faz Ayırma (TPP) sistemi ile ilk defa bu çalışmada saflaştırıldı ve karakterize edildi. Buna göre, %65 (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 1,0:0,5 oranında enzim/*t*-bütanol içeren pH 6,0'da (25°C) hazırlanmış sistemden fenol oksidaz enzimi orta fazda toplandı ve yaklaşık %120 geri kazanım ile 2 kat saflaştırıldı. Enzim alt biriminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 21,8 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerleri ise sırasıyla 7,0 ve 70°C olarak belirlendi. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 49 mM ve 909 U/mL olarak bulundu. Aktivite boyama sonrası saf enzimde lakkaz ve katekol oksidaz aktivitesi tespit edildi. %10 (v/v) konsantrasyonuna kadar organik çözücülerden etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) varlığında enzim aktivitesinin kontrole göre %80-84'ünün korunduğu tespit edildi. Ayrıca fenol oksidaz inhibitörü olarak bilinen salisil hidroksamik asit (SHAM), setriltrimetilamonyum bromit (CTAB) ve polivinilpirolidon (PVP) varlığında inhibisyon gözlemlendi. Sonuç olarak rezene bitki tohumlarının fenol oksidaz kaynağı olarak kullanılabilceği ön görülmekte ve bu bitkiden tek adımda gerçekleştirilen ekstraksiyon metodunun basit, güvenilir, ekonomik ve etkili bir metot olarak enzim preparatı hazırlamada kullanımı önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fenol oksidaz, *Foeniculum vulgare*, Karakterizasyon, Saflaştırma, Üçlü-Faz Ayırma.

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PHENOL OXIDASE ENZYME FROM FENNEL (*Foeniculum vulgare*) SEED

ABSTRACT

In this study, it was aimed to produce phenol oxidase and characterize the enzyme for investigation of its possible application areas. Towards this aim, the enzyme has been purified by Three-Phase Partitioning (TPP) from the fennel (*Foeniculum vulgare*) seeds and characterized for the first time. Accordingly, the phenol oxidase enzyme has been partitioned to the interphase in the system prepared at pH 6.0 (25°C) by addition of *t*-butanol with the ratio of 1.0:0.5 (v/v) to the mixture containing crude extract saturated with 65% (w/v) (NH₄)₂SO₄. Under these conditions, the enzyme has been 2.0-fold purified with a 120% activity recovery. The subunit molecular weight of the enzyme has been determined as 21.8 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature, K_m and V_{max} values have been estimated as 7.0, 70°C, 50 mM and 909 U/ml, respectively. Purified enzyme has revealed both catechol oxidase and laccase activities after the activity staining. Up to 10% (v/v) concentration, some organic solvents like ethanol, acetone and dimethyl sulfoxide (DMSO) have been found to make the 80-84% of the initial activity remained. On the other hand, inhibition has been observed in the presence of salicyl hydroxamic acid (SHAM), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and polyvinylpyrrolidone (PVP), which are known as phenol oxidase inhibitors. As a result, it has been suggested that the fennel plant seeds can be used as a source of phenol oxidase and the single-step extraction method tested here provides a simple, reliable, economical and efficient way for enzyme preparation.

Keywords: Phenol oxidase, *Foeniculum vulgare*, Characterization, Purification, Three-Phase Partitioning.

GİRİŞ

Günümüzde dünyanın karşılaştığı en önemli problemlerden bir tanesi petrol, kömür ve doğal gaz gibi fosil kaynaklarının kullanımı sonucu ortaya çıkan küresel ısınma ile su, hava ve toprak kirliliğidir. Aynı zamanda fosil kaynaklar gittikçe azalmakta ve ücretleri buna bağlı olarak artmaktadır. Bu nedenle, doğayı korumak, enerji ve madde ihtiyacını karşılamak için fosil kaynaklara dayalı ekonomi günümüzde biyolojik kaynaklara dayalı ekonomi ile yer değiştirmektedir. Bu amaçla, tarımsal (hayvansal ve bitkisel), kentsel ve endüstriyel kökenli yenilenebilir biyokütle yan ürünleri hammadde olarak tercih edilmektedir. Bu hammaddeler biyoyakıt, biyogüç ve biyoürünler elde etmek için kullanılmakta ve ticari değere sahip ürünlere dönüştürülmek amaçlı işlenmektedir. Bitkilerin çoğunlukla yeşil yaprakları/tohumları/meyveleri karbohidrat, protein, enzim, lipid, çeşitli fenolik maddeler ve fitokimyasal maddeler için tükenmeyen bir ham madde kaynağı oluşturmaktadır.

Yeşil bitkiler yüksek miktardaki fitokimyasal ve biyoaktif madde içeriklerinden dolayı “fonksiyonel besinler” olarak tanımlanmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2002; Martin ve diğ., 1979) ayrıca insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri ve hastalık önleyici etkilerinden dolayı son yıllarda özellikle dikkat çekmektedirler (Esin Çelik ve diğ., 2008; Fattouch ve diğ., 2007; Mothershaw ve Jaffer, 2004). Fonksiyonel besinler, serbest radikal yakalayıcı moleküller ile fenolik bileşikleri içerirler (Tura ve Roberts, 2002; Yanishlieva ve Marinova, 2001).

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşiklerdir. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir (Javonovic ve diğ., 1984; Moure ve diğ., 2001; Shahidi ve diğ., 1992; Shadidi ve Nacz 1995).

Fenolik maddelerin oksidasyonunda rol oynayan fenol oksidazlar çok geniş bir enzim ailesini oluştururlar. Genel olarak üç grup altında toplanırlar. Bunlar; lakkazlar (*p*-benzendiol:oksijen-oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2), katekol oksidazlar (*o*-difenol: oksidoredüktaz, E. C. 1.10.3.1) ve tirozinazlardır (monofenol-monooksijenazlar, E.C. 1.14.18.1). Öte yandan, bazen fenol oksidazlara dahil edilen peroksidazlar (E.C. 1.11.1.7), hidrojen perosit varlığında fenolik maddeleri oksitleyen enzimlerdir. Endüstride fenol oksidazlar geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bunlar arasında; gıda, kimyasal endüstri, eczacılık, şarap, bira ve meyve suyu üretimi (fenolik maddelerin uzaklaştırılması), atık su işlemleri, biyosensör üretimi, rezin, plastik, kağıt endüstrisi ve melanin sentezi sayılabilir (Güray, 2009).

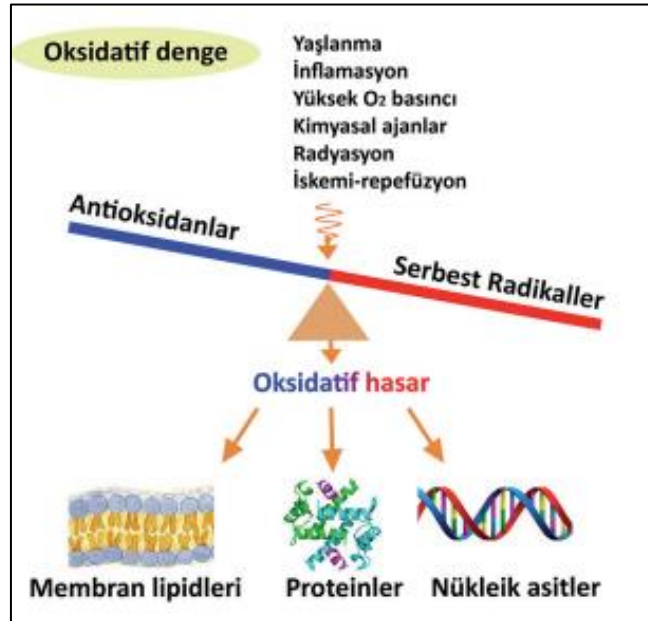
Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bitkilerin meyve, yaprak, çiçek ve kök kısımları geleneksel olarak sık tüketilmektedir. Özellikle Kocaeli’de yerel pazar ve aktarlarda bulunabilen keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), hünnap (*Zizyphus jujuba* MILLER), kişniş (*Coriandrum sativum* L.), rezene (*Foeniculum vulgare* L.) ve meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) yerel halk tarafından gıda ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, yerel pazarlarda ve aktarlarda yaygın olarak satılan, fenolik madde (antioksidan) içeriği bakımından zengin olduğu bilinen bitkilerden keçiboynuzu, hünnap, kişniş, rezene ve meyanın temin edilerek her birinin gıda olarak kullanılan kısımlarından elde edilen özütlerde fenol oksidaz enzimlerin varlığının araştırılması hedeflenirken aynı zamanda enzimin geleneksel olmayan üçlü-faz ayırma metodu ile tek basamakta saflaştırılarak biyokimyasal özelliklerinin detaylı olarak incelenmesi de planlandı.

Sonuç olarak gıda olarak kullanılan bazı tıbbi bitkilerin birçok farklı endüstriyel sektörde kullanım alanına sahip fenol oksidaz enzim üretimi için tarımsal kökenli ucuz ve yenilenebilir biyokütle oluşturduğu ilk defa gösterildi. Ayrıca bitki tohumlarından fenol oksidaz enzimi Üçlü-Faz Ayırma (TPP) sistemi ile ilk kez bu çalışmada saflaştırıldı. Yüksek geri kazanımla saf olarak elde edilen fenol oksidaz enzim kullanımının endüstride birçok avantaj sağlayabileceği ve gelecek çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Oksidatif Stres

Oksijen yaşam için gereklidir ancak aerobik canlıların bütün hücrelerinde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijen, aynı zamanda çok tehlikeli formlar olan serbest radikallere dönüşmektedir. Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içerisinde süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen, vb. reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaktadır. Organizmada serbest radikaller ve onları detoksifiye eden antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması “oksidatif stres” olarak tanımlanır. Hücre içerisinde normal şartlarda oksidan ve antioksidanlar denge halinde bulunmaktadır. Ancak bu denge hali reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması ya da antioksidan miktarındaki azalma nedeniyle oksidanlar yönüne kaymaktadır (Şekil 1.1). Oksidatif stres koşulları altında kanser, hücresel yıpranma ve yaşlanma, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, diyabet ve bağışıklık sistemi hastalıkları ile sonuçlanan, hücre membranları ve DNA gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına sebep olabilen radikalik zincir reaksiyonları oluşmaktadır (Halliwell ve Aruoma, 1991).



Şekil 1.1. Oksidatif denge (Özcan ve diğ., 2015)

1.1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Biyolojik sistemlerde birçok radikal türü olmasına karşın en çok görülen ve oksijenden oluşan radikaller genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadır. Oksijenden oluşan radikaller biyolojik sistemlerde oluşan radikallerin önemli bir sınıfını temsil etmektedirler. Aerobik yaşamın bir parçası olan ROS'lar devamlı üretilmektedirler. Bunlar çeşitli enzimatik reaksiyonlar veya mitokondride elektron taşıma zinciri (ETS) boyunca oksijenin indirgenmesi ile oluşmaktadır.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) başlıca radikal türleri; Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), Hidroksil radikali (OH^{\bullet}), Hidroperoksil radikali (HO_2^{\bullet}) ve non-radikal (radikal olmayan) türleri ise; Hidrojen peroksit (H_2O_2), Hipokloröz asit ($HOCl$), Singlet oksijen (1O_2) olarak yer almaktadır.

Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Moleküler oksijenin bir elektron (e^-) alarak indirgenmesi sonucu oluşur (Denklem 1.1) (Cash ve diğ., 2007).



Süperoksit radikalinin oluşumu çoğunlukla hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir. Süperoksit radikali bir serbest radikal olmasına karşın, kendisi doğrudan zarar vermez. Asıl önemli olan kısım, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı ile geçiş metal iyonları indirgeyicisi olmasıdır. Azalmış süperoksit radikali seviyeleri, bakteriyal enfeksiyonlara karşı artan bir yatkınlık oluşturabilir. Artmış süperoksit radikali seviyeleri ise SOD (süperoksit dismutaz) enzimi tarafından H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit radikali seviyeleri yoğun bir şekilde kontrol altına alınmış olur. Süperoksit radikalinin aşırı üretimi ise hücrel metabolizmanın artan glukoz tarafından dengesinin kaybedildiği durumlarda gerçekleşir. ATP (adenozin trifosfat) sentezi engellenir ve elektron taşıma zinciri (ETS) yavaşlar (Memişoğulları, 2005).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin 2 elektron (e⁻) alarak indirgenmesi sonucu oluşur (Denklem 1.2). Süperoksit radikali üreten herhangi bir sistem aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H₂O₂ (hidrojen peroksit) üretimi gerçekleştirir ve oluşan bu tepkime “dismutasyon” tepkimesi olarak adlandırılmaktadır.



H₂O₂ zayıf bir oksidan ile geçiş metali iyonlarının yokluğunda nispeten kararlı ve zayıf bir indirgendir (Gutteridge, 1995). Herhangi bir ortaklanmamış elektronu bulunmadığından kendisi bir serbest radikal olarak kabul edilmez; fakat ROS olarak kabul edilir. H₂O₂ yüksek konsantrasyon seviyelerinde güçlü oksijen radikalleri oluşturması nedeniyle toksik sayılır. Artan H₂O₂ seviyelerinde vücut karşı savunma mekanizması olarak, glutatyon peroksidaz (selenyum içeren), bazı diğer peroksidazlar ve katalaz enzimlerinin etkisi ile hücre dışına çıkarılır (Gutteridge, 1995). Bu enzimlerle H₂O₂, oksijen ve su gibi ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Mercan, 2004). Başlıca önemi ise, reaktif geçiş metal iyonları varlığında, OH• (hidroksil radikali) oluşumu için bir kaynak olmasıdır.

Hidroksil Radikali (OH•)

Moleküler oksijenin 3 elektron (e⁻) alarak indirgenmesi sonucu oluşur (Denklem 1.3). OH• radikali çok yüksek reaktivitesi bulunan tehlikeli bir radikaldir (Memişoğulları, 2005; Valko ve diğ., 2007). Hidroksil radikali (OH•) suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan oluşan önemli bir üründür (Gutteridge, 1995).



Hidroksil radikali kaynağı Haber-Weiss reaksiyonudur ve bu reaksiyonda O₂•⁻ radikalinin H₂O₂ ile reaksiyona girmesiyle hidroksil radikali oluşur (Denklem 1.4).



$O_2^{\bullet-}$ radikali geçiş metal iyonu olan Fe^{+3} ü Fe^{+2} iyonuna indirgemesi ile Fenton reaksiyonunu hızlandırmaktadır (Denklem 1.5) (Afonso ve diğ., 2007; Valko ve diğ., 2006). Bu şekilde H_2O_2 ile Fe^{+2} arasında Fenton reaksiyonunu başlatır (Özyürek ve diğ., 2008). Bu şekilde hidroksil radikali oluşur (Denklem 1.6).



Canlı organizmada hidroksil radikalinin süpürülmesi için özelleşmiş bir enzim ya da molekül bulunmamaktadır. Bu yüzden hidroksil radikali sentetik antioksidanlar ya da gıdalarla alınan antioksidanlar ile süpürülmektedir.

Singlet Oksijen (1O_2)

Eşlenmemiş elektron içermediğinden serbest radikal olmayan reaktif oksijen türüdür. Delta ve sigma olmak üzere singlet oksijenin iki şekli bulunmaktadır. Singlet oksijen, oksijenin yüksek reaktif şeklidir. Singlet oksijenin oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda çok önemlidir (Gutteridge, 1995). H_2O_2 ' nin reaksiyonu veya hipokloröz asit ile de üretilebilmekte ve hala patofizyolojik önemi tartışılmaktadır.

Hidroperoksil Radikali ($HO_2\bullet$)

Süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) protonlanması ile hidroperoksil radikali oluşur. Süperoksit radikalinden daha güçlü bir indirgeyici ve daha güçlü bir oksidandır. Hidroperoksil radikalinin biyolojik membranları kolay geçmesi ve yağ asitleri ile direkt etkileşime girmesi önemlidir (Gutteridge, 1995).

Hipokloröz Asit (HOCl)

Aktif nötrofillerde oluşan kuvvetli bir oksidandır. Nötrofil sitoplazması içerisinde bulunan “hem” içeren enzim olan miyeloperoksidaz enzimi etkisiyle klorür iyonları (Cl^-) ve H_2O_2 ' den HOCl oluşmaktadır (Denklem 1.7) (Murray ve diğ., 1996).



Hipokloröz asit hidroksil radikali oluşumunu Fe^{+2} bağımlı reaksiyon ve Fe^{+2} bağımsız reaksiyon ile arttırabilir (Denklem 1.8, Denklem 1.9) (Gutteridge, 1995).



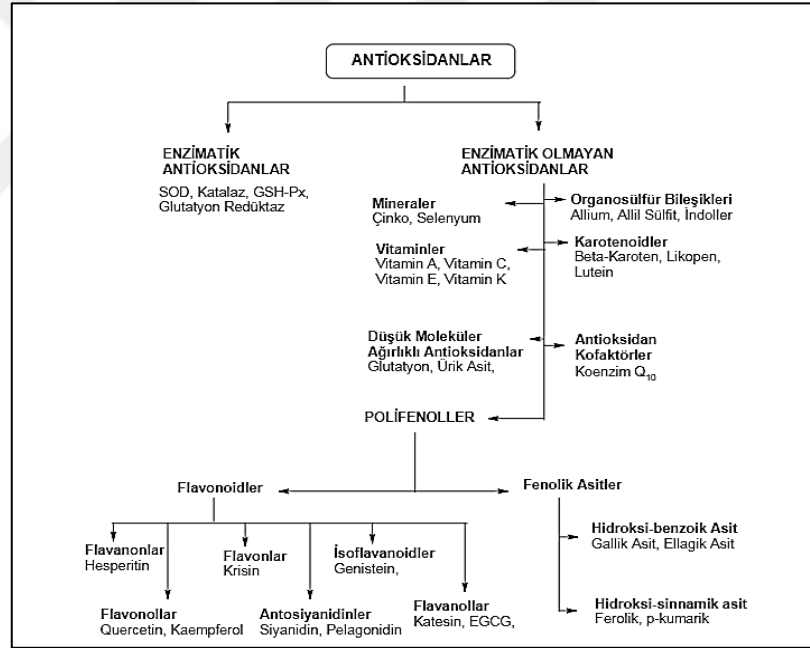
Biyolojik sistemlerde ROS'un hem pozitif hem de negatif etkileri vardır. Düşük yoğunluklarda olduklarında ROS'un pozitif etkilerinden söz etmek mümkün olabilir. Örneğin, fagositoz aracılığı ile enfeksiyonlara karşı savunma, sitokrom p450 aracılığıyla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, sitotoksik lenfositler ile makrofajlar aracılığıyla kanser hücrelerini öldürme, hücre büyümesinin düzenlenmesi, mitokondride ATP üretimi ve düşük konsantrasyonlarda mitojenik yanıtlara sebep olma ve hücre içi sinyalizasyon sayılabilir. Diğer taraftan ROS proteinleri, karbohidratlar, lipidler ve DNA gibi temel biyomoleküllere karşı negatif etki ederler (Ardestani ve Yazdanparast, 2007). Serbest radikallerin pozitif ve negatif etkileri arasında hassas bir denge vardır ve bu denge hali canlı organizmalar için çok önemlidir. Bu denge hali "redoks düzenleme" olarak isimlendirilen mekanizmalar ile elde edilir. Canlı organizmaları redoks düzenlemesi çeşitli oksidatif streslerden korumaktadır (Valko ve diğ., 2007).

1.1.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ya da mevcut bulunan serbest radikalleri süpürerek hücrenin zarara uğramasını engelleyen ayrıca yapısında fenolik fonksiyon bulunduran moleküllerdir (Kahkönen ve diğ., 1999). Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise nükleik asitler, lipidler ve proteinlerde oksidatif hasara neden olan, bunun sonucunda ise çeşitli patolojik durumlara veya hastalıklara neden olan toksik maddelerdir. Bu zararlı bileşiklerin varlığı, antioksidanları önemli kılmaktadır (Cao ve Prior, 1999). Çünkü antioksidanlar, prooksidanları indirgeyerek düşük toksisiteli ya da zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001). Antioksidanlar vücut hücreleri aracılığıyla üretildikleri gibi aynı zamanda dışarıdan gıdalar yolu ile

alınabilmektedir. Gıdalarda bulunan ve insan vücudunu toksik prooksidanlardan koruyan doğal antioksidanlar, öncelikli olarak vitaminler (E, A ve C vitaminleri), karotenoidler, polifenoller ve flavonoidlerdir. Antioksidanların en önemlileri polifenoller ile polifenollerin türevleridir. Bu bileşikler (polifenoller) oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilmektedirler. Örneğin; singlet oksijeni süpürerek mevcut oksijen derişimini düşürebilirler, hidroksil radikallerini tutma özelliğini kullanarak zincir reaksiyonunun başlamasını önleyebilir veya metal iyon katalizörlerini bağlayabilirler (Shahidi, 1996).

Normal fizyolojik şartlar altında hücreler, oluşan serbest radikaller ve peroksitler gibi moleküllerin sebep olabileceği oksidatif hasarı engelleyebilmek için antioksidan savunma sistemleri aracılığıyla korunmaktadır (Rice-Evans ve diğ., 1997). Bu savunma sistemleri Şekil 1.2'de gösterildiği gibi sınıflandırılır.



Şekil 1.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Özkaya, 2007)

Doğal Antioksidanlar

Hücre içerisinde çeşitli mekanizmalar ile oluşan serbest radikallerin etkileri bazı enzimler aracılığıyla engellenir. Pek çok enzim serbest radikalleri engellemede doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunsa bile içlerinde en önemli olanların çalışma mekanizmaları aşağıdaki gibidir;

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (E.C.1.15.1.1) enzimi süperoksitin oksijene ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler (Denklem 1.10) (Chaudiere ve Iliou, 1999).



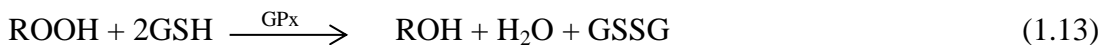
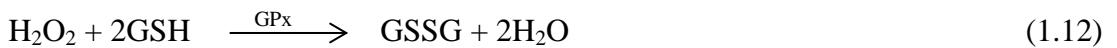
Katalaz (CAT)

Katalaz (E.C.1.11.1.6) enzimi, hidrojen peroksinin su ve oksijene dönüşmesini sağlayarak etkisiz hale getirir (Denklem 1.11). H_2O_2 , bir radikal olmamasına karşın yüksek reaktivite gösteren OH^{\bullet} radikalinin öncüsüdür ve oksidatif hasara neden olabilir. Bu sebeple katalaz, H_2O_2 'nin iki elektronunu su ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek H_2O_2 konsantrasyonunu azaltmaya çalışır.



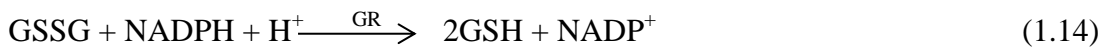
Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Selenoenzimlerden olan glutatyon peroksidaz (E.C.1.11.1.4) enzimi, hidrojen peroksit varlığında hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur (Denklem 1.12). Reaksiyonda GSH (glutatyon) okside olmuş GSSG (glutatyona) yükseltgenirken, organik hidroperoksitler alkole ve hidrojen peroksit suya indirgenir (Denklem 1.13) (Chaudiere ve Iliou, 1999).



Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz (E.C.1.8.1.7) enzimi, GPx (glutatyon peroksidaz) aracılığıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşmuş olan okside glutatyonun (GSSG) tekrar eski indirgenmiş formu olan glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizler (Denklem 1.14) (Pektaş, 2009).



Non-Enzimatik (Enzimatik Olmayan) Antioksidanlar

Enzimatik yapıda olmayan doğal antioksidanlardır. Bitki ya da hayvan dokularında bulunan veya bitkisel ya da hayvansal kaynaklı olan bileşiklerin pişirilmesi ya da işlem görmesiyle oluşan maddelerdir. Hemen hemen bütün bitkilerde, bazı hayvansal dokularda ve mikroorganizmalarda bulunabilirler (Görünmezoğlu, 2008). Doğal antioksidanların pek çoğu fenolik bileşiklerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar, karotenoidler, askorbik asit, tokoferoller ve flavonoidlerdir.

Askorbik asit (C Vitamini)

C vitamini, suda çözünebilir bir vitamindir. Vücuttan idrarla atılır ve her gün dışarıdan alınması gereklidir. C vitamini özellikle sebze ve meyvelerde bulunur. Örneğin, çilek, limon, portakal, yeşilbiber, domates vs. yüksek miktarda askorbik asit içermektedirler.

Düşük molekül ağırlıklı bu antioksidan demir absorpsiyonu, kollajen sentezi ve hücrelerin indirgenmiş halinin korunmasında önemlidir. C vitamini insanda hastalık oluşturma potansiyeline sahip pek çok türü okside edebilmektedir (Buettner, 1993; Halliwell, 1999).

Tokoferoller (E Vitamini)

Tokoferoller, doğada α , γ , β ve δ olmak üzere dört farklı biçimde bulunur. Bunlar arasında ise biyolojik olarak en aktif olan ayrıca en yaygın biçimde bulunan α -tokoferoldür (Shadidi, 2000).

E vitamini, yağda çözünebilir bir vitamindir. Oksijen bulunmayan ortamlarda sıcaklık ve asite dayanıklıdır. Eşleşmemiş elektronlar ile reaksiyona girebilen ve indirgeyebilen hidroksil grubunu içerir. Serbest radikal reaksiyonlarında zincir kırıcı etkiye sahiptirler (Antmen, 2005).

β -Karoten

Bitkilere sarı, turuncu ve kırmızı renklerini veren β -karoten, hidrokarbon karotenoidler sınıfına girmektedir. β -karoten ısıya, ışığa ve oksijene karşı son derece duyarlıdır. Bu sebeple, gıda endüstrisinde antioksidan ve katkı maddesi olarak

kullanılmaktadır (Çalımlı, 2003). A vitamininin provitamini olan β -karoten, A vitamini eksikliğinde vitamin A'ya çevrilir. β -karoten, yağda çözünen vitamindir. Membranlarda, homojen lipid çözeltilerde ve intakt hücrelerde, yapılan çalışmalarda β -karotenlerin tokoferollere kıyasla antioksidan aktivitesinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Buna rağmen β -karoten, lipozomları lipid peroksidasyonlarına karşı koruma yeteneğindedir (Woodall, 1997).

Polifenoller

Polifenoller her molekülünde birden çok fenol grubu bulunduran bileşiklerdir. Ayrıca polifenoller, fenol oksidaz enzimleri katalizörlüğünde enzimatik esmerleşmeye sebep olan önemli madde grubudur. Polifenollerin antioksidan aktivitesi demiri indirgeme gücüne ya da serbest radikalleri bağlama kapasitesine dayanmaktadır (Pulido ve diğ., 2000; Yoshino ve Murakami, 1998). Yapılan bazı çalışmalarda polifenollerin *in vivo* şartlar altında endotelial fonksiyon artırıcı (Caton ve diğ., 2010), iltihap önleyici ve hücrel sinyal iletimine olumlu etki sağlayan özellikleri gibi birçok önemli etkilerinin varlığı rapor edilmiştir (Ramos, 2008; Sies ve diğ., 2005; Williams ve diğ., 2004). Polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ayrılır (Neo ve diğ., 2010).

Fenolik asitler

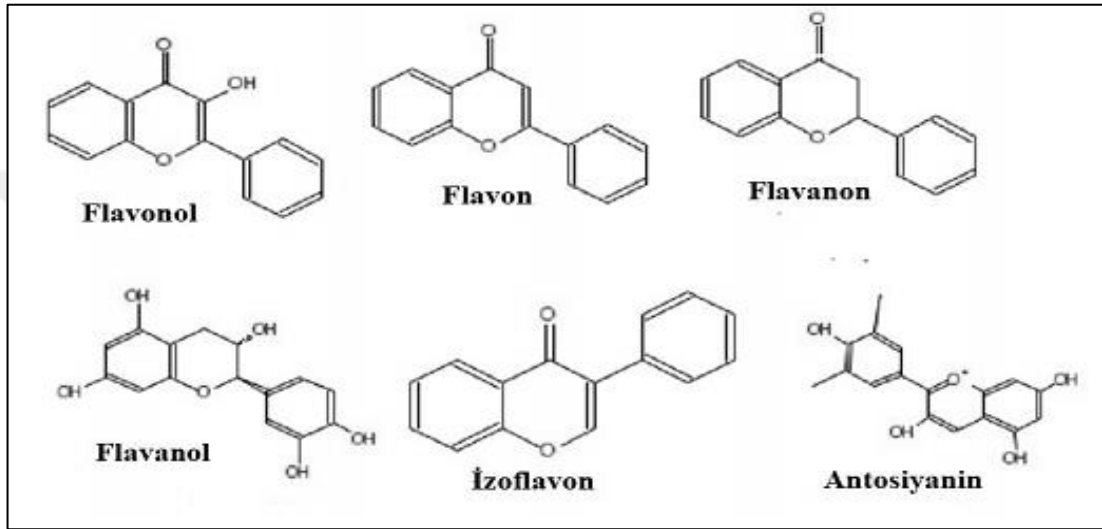
Fenolik asitler bitkilerde çok fazla miktarda bulunurlar. Bunlar hidroksi sinamik asit ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşmaktadır (Şekil 1.3). Doğal olarak oluşabilen bu bileşikler; kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok kronik olan hastalığın asıl nedeni olan reaktif oksijen türleri ile serbest radikallere karşı güçlü bir antioksidan etki göstermektedirler (Andreasen ve diğ., 2001; Yu ve diğ., 2002; Yu ve diğ., 2003).



Şekil 1.3. (a) Hidro benzoik asit ve (b) hidrosi sinamik asit molekül yapısı (Russell ve Duthie, 2011)

Flavonoidler

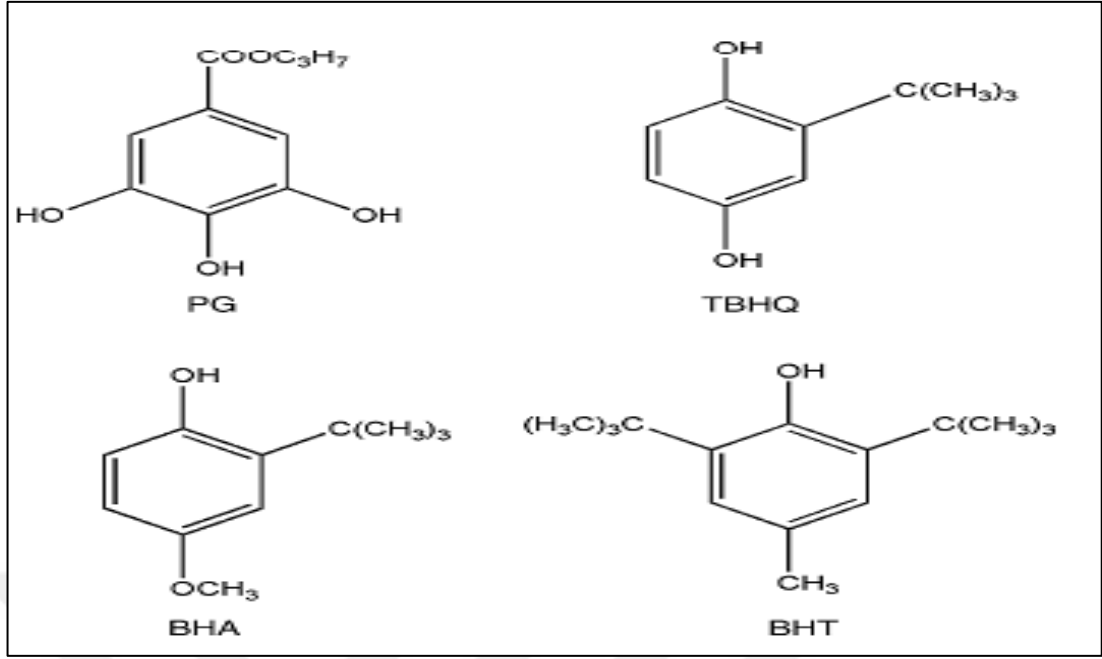
Flavonoidler, difenilpropanoidler olup insan vücudunda sentezlenemeyen genellikle bitkilerde bulunan antioksidanlardır. Flavonoidler serbest radikalleri engelleyici, antibiyotik ve antialerjen özellikleri taşımaları, enzim aktivitelerini düzenleyici, iltihap, ishal ve ülser önleyici gibi görev almalarından ötürü önem taşımaktadır (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu, 2009). Antioksidan kapasitesi bakımından önemli olan bazı flavanoidler Şekil 1.4’de gösterilmektedir.



Şekil 1.4. Flavanoid grupları (Çetin, 2012)

Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar, gıdaların ve hayvan yemi ürünlerinin tazeliğini, besleyici değerini, lezzetini ve rengini korumak ayrıca stabilize etmek için yıllardır yaygın şekilde kullanılmaktadır (Williams ve diğ., 1999). Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), tert-bütül hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG), kimyasal stabiliteyi (Şekil 1.5), düşük maliyetleri ve bulunabilirlikleri nedeniyle en sık kullanılan sentetik antioksidanlardır (Yang ve diğ., 2002). Sentetik antioksidanların yararına örnek olarak gıda ürün kalitesini korumada yüksek düzeyde koruma sağlanması verilebilir, ancak aşırı miktarda antioksidanlar sağlık açısından risk taşımaktadır. Bu sebeple astım ve kurdeşen de dahil olmak üzere alerjen reaksiyonlara neden olabilirler (Simon, 2003). BHA ve BHT'nin laboratuvar hayvanlarında yüksek seviyelerde kullanıldığında karaciğer hasarından ve karsinogenezden sorumlu olduğundan şüphelenilmiştir (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).



Şekil 1.5. PG, TBHQ, BHA ve BHT'nin moleküler yapıları (Shahidi ve Zhong, 2010)

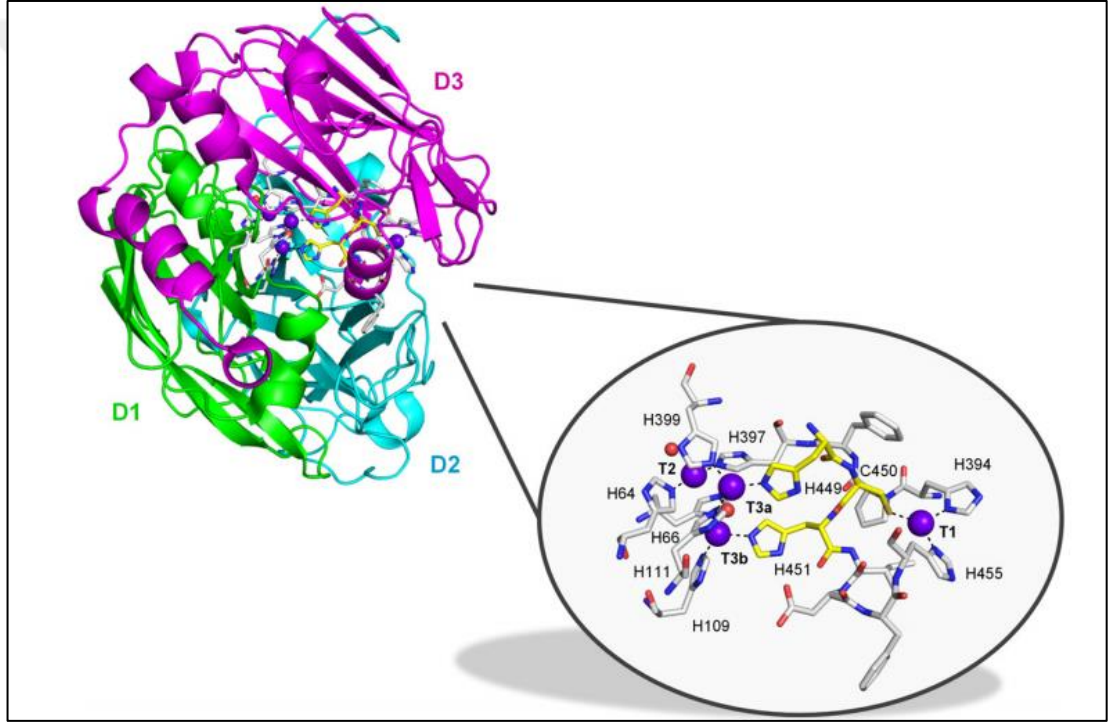
1.2. Fenol oksidazlar

Fenol oksidaz enzimleri aktif merkezlerinde bakır atomu içeren “metalloenzimler” grubunda yer almaktadır. Substratları fenolik bileşiklerdir ve oksijen varlığında esmerleşme reaksiyonu ile substratlarını oksitlemektedirler. Fenol oksidazın neden olduğu esmerleşme reaksiyonu, bitki dokusundaki fenoliklerin yüksek oranda reaktif kinonlara dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Proteinler ve polifenoller arasında polimerizasyon ve yoğunlaşma reaksiyonları yapıldıktan sonra, bu şekilde oluşan kinonlar renk değişikliği sağlamak için kahverengi pigmentlerin oluşumuna yol açar (Gonzalez ve diğ., 2000; Mayer, 2006). Bu reaksiyonlar, proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere neden olmakta ve bu da işlenmiş gıdaların kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Genel olarak “fenolaz” veya “polifenol oksidazlar”, fenol oksidaz için substrat olan moleküler oksijen varlığında aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen enzimleri tarif etmek için kullanılır. Bu enzimlerin üç ana grubu lakkazlar (E.C. 1.10.3.2, *p*-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz), katekol oksidazlar (*o*-difenol oksidoredüktaz; E.C. 1.10.3.1) ve tirozinazlardır (E.C. 1.14.18.1, monophenol monooksijenaz) (Griffith, 1994).

1.2.1 Lakkaz

Lakkazlar (*p*-benzediol: oksijen oksidoredüktazlar, EC 1.10.3.2), 18. yüzyıldan beri yoğun olarak çalışılan bir enzimdir (Sharma ve Kuhad, 2008). İlk olarak 1883'te Yoshida tarafından tanımlanmış ve 1985'te Bertrand tarafından enzim içeren bir metal olarak rapor edilmiştir (Mayer ve Staples, 2002). Lakkaz enzimi mantarlar, yüksek bitkiler ve böcekler arasında yaygın şekilde dağılmıştır (Mayer ve Staples, 2002). Aktif bir holoenzim formu olarak lakkaz molekülü, genellikle üç redoks bölgesine (tip 1, tip 2 ve tip 3 Cu çifti) bağlı oldukları için multicopper oksidazların üyesidir (Farver and Pecht, 1984). Lakkaz enzimleri multimerik kompleksler oluşturacak biçimde oligomerize olan izoenzimlerden oluşmaktadır.

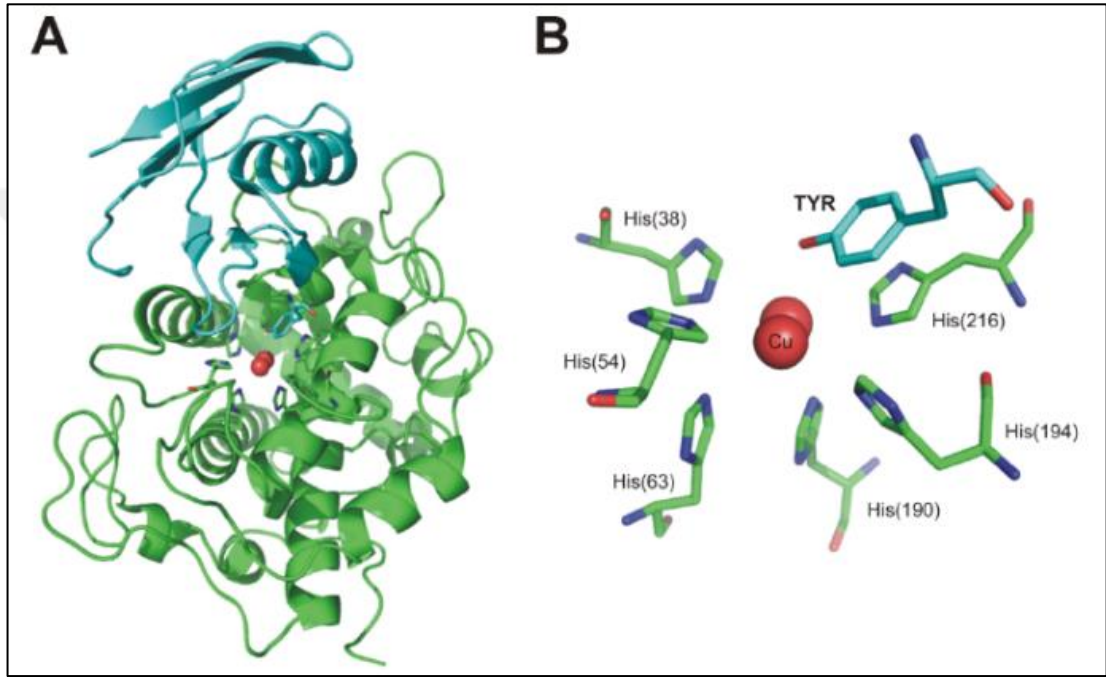


Şekil 1.6. Lakkazın aktif bölgesinin genel yapısı ve detayları (*Trametes trogii* lakkazı, PDB ID: 2HRG). Üç kupredoksin benzeri alan (D1, D2 ve D3) sırasıyla yeşil, mavi ve eflatun ile gösterilmiştir. Mor mavi küreler bakır iyonlarını, kırmızı küreler ise su moleküllerini gösterir. İç transfer yolunun T1 Cu'dan T2 / T3 trinükleer kümesine olan kalıntıları sarı renktedir. Katalitik bakırların birinci koordinasyon alanında yer alan kalıntılar ve bunların etkileşimleri (siyah çizgiler olarak) de temsil edilmektedir (Mate ve Alcalde, 2015)

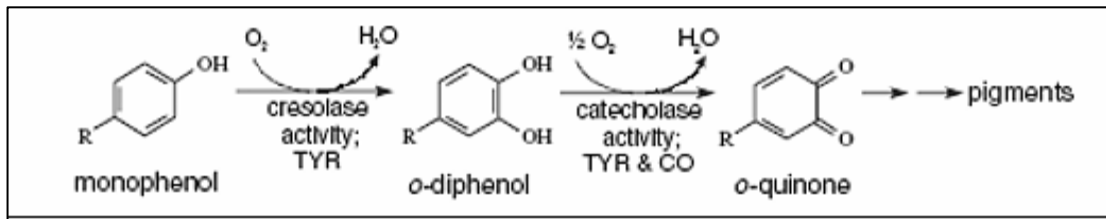
1.2.2. Tirozinaz

Tirozinazlar (monofenol monooksijenaz, EC 1.14.18.1), çeşitli organizmalarda bulunan ve bakır içeren bir monooksijenazdır (Şekil 1.7). Bu enzimler, monofenollerin hidrosilasyonunu (kresolaz aktivitesi) ve daha sonra *o*-difenollerin

karşılık gelen *o*-kinonlara (katekol oksidaz aktivitesi) oksidasyonu olan iki tip reaksiyonu katalize eder (Şekil 1.8). Bu *o*-kinonlar, diğer maddelerle reaksiyona girerek veya kendi kendine polimerleşerek melaninler gibi yüksek molekül ağırlıklı siyah/kahverengi pigmentleri oluşturur (Marusek ve diğ., 2005). Bitkiler için tanenler, lignin, flavonoidler (Marusek ve diğ., 2005) gibi fenolik polimerlerin üretilmesinde ve bitki hücrelerinin solunum ve bitkilerde yaraların iyileşmesi sırasındaki redoks potansiyelinin düzenlenmesi için önemlidir (Mayer, 2006).



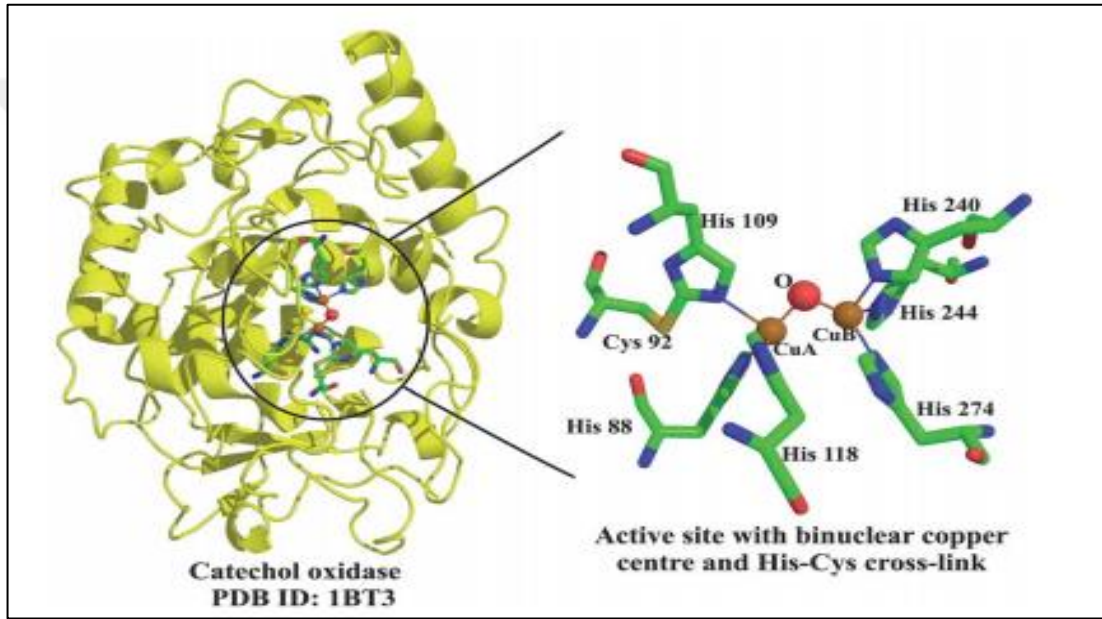
Şekil 1.7. *Streptomyces castaneoglobisporus* tirozinazın yapısal özellikleri. A, X-ışını kristalografisi (PDB kodu: 2ZWE) ile çözülmüş olan bir caddy proteini (mavi) ile komplekslenmiş bakır bağlı tirozinazın (yeşil) genel üçüncül yapısı (Matoba ve diğ., 2006). Bakır atomları kırmızı toplar olarak temsil edilir ve bakır koordinasyonunda yer alan kalıntılar çubuklarla gösterilir. B, Binükleer bakır merkezinin koordinasyon küresinin gösterimi ve tirozin substratının konumu (Enguita, 2011)



Şekil 1.8. Melanin oluşumu. Siyah/kahverengi pigmentler, fenoliklerin kresolaz ve ardından katekolaz aktivitesi yoluyla oksidasyonu ile oluşur (Marusek ve diğ., 2006)

1.2.3. Katekol Oksidaz

Katekol oksidazlar (*o*-difenol oksidoredüktaz; EC 1.10.3.1), melanin oluşumunda yalnızca son tepkimeyi katalize eden anahtar enzimlerdir; sadece katekolaz aktivitesine sahiplerdir. Yapılarında iki bakır atomu bulundurlar (Şekil 1.9). Katekol oksidaz araştırmalarında, enzimin substrat özgüllüğü için katekol, 4-metilkatekol ve kafeik asit ile yüksek aktivite gösterdiği (Gerdemann ve diğ., 2002), diğer yandan –COOH grubu içeren substratlar tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (Rompel ve diğ., 1999). Katekol oksidazlar bitki dokularında ve bazı böcek ve kabuklularda bulunur (Hughes, 1999).



Şekil 1.9. *Ipomea* katekol oksidazının yapısı. Aktif bölge, her biri üç histidin tarafından koordine edilen iki bakır atomu (CuA ve CuB) içerir (Ravikiran ve Mahalakshmi, 2014)

1.2.4. Peroksidaz

Peroksidazlar (E.C.1.11.1.7), hidrojen peroksit varlığında reaksiyonları katalize eden birçok mikroorganizma ve bitki kaynağı tarafından üretilen hemoproteinlerdir (Durán ve Esposito, 2000).

Fenol oksidaz enzimi gibi peroksidazlar, difenollerin istenmeyen kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentlere polimerize olan *o*-kinonları üreten indirgen substratlar olarak işlev görebileceği enzimatik esmerleşmeye katılan oksidoredüktazlardır (Chisari ve diğ., 2007).

1.3. Gıda Bitkileri

1.3.1. Rezene

Rezene (*Foeniculum vulgare*), Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait bir bitkidir (Şekil 1.10). Rezene, karakteristik bir anason kokusuyla oldukça aromatikdir. Salata, çorba ve bitkisel çaylar gibi pek çok tabakta stabil bir bileşendir (Carvalho, 2005; Santayana ve diğerleri, 2007; Tardío, ve diğ., 2006).

Bu ot birçok mutfak ve geleneksel ilaç kullanımına sahiptir. Örneğin, yumrular, genç sürgünler, yapraklar, çiçeklenme gövdeleri, olgun salkımları ve tamamen olgunlaşmış, kurutulmuş tohumlar yaygın olarak ev yapımı ilaçlarda kullanılır ve özellikle sindirim sistemi hastalıkları olmak üzere çeşitli şikayetlerin tedavisinde yararlı olduğu söylenir (Camejo ve diğ., 2003; Carvalho, 2005; Novais ve diğ., 2004; Santayana ve diğerleri, 2007).

Rezene, böbrek taşlarının tedavisinde, idrar söktürücü olarak kullanıldığı gibi diyabet, mide rahatsızlıkları, bronşit ve kronik öksürüklerin tedavisinde de kullanılmaktadır. Ayrıca anne sütünü arttıran özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Camejo-Rodrigues ve diğerleri, 2003 Carvalho, 2005; Novais ve diğ., 2004; Salgueiro, 2004).

Rezene tüketiminin olası faydalı etkileri iki grup sekonder metabolitin varlığı ile ilişkili olabilir: poliasetilenler ve polifenoller. Poliasetilenlerin çoğunun Apiaceae familyasının en çok havuç ve yaban havucu kuşağında bulunduğu bilinmektedir, ancak son zamanlarda rezene yumrusunda da bulunduğu bildirilmiştir (Zidorn ve diğ., 2005).

Önemleri, kolon kanseri hücrelerine, insan mide adenokarsinom hücrelerine, lösemiye (L-1210), fare melanomuna (B-16) ve fare fibroblast türevli tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermeleridir (Christensen ve Brandt, 2006; Kobæk-Larsen ve diğ., 2005). Polifenoller de rezene başta olmak üzere birçok bitkide gözlenmekte olup önemli özellikleri antioksidan olmalarıdır (Bilia ve diğ., 2000; Parejo ve diğ., 2004).



Şekil 1.10. Rezene (*Foeniculum vulgare*) (URL-1)

1.3.2. Hünnap

Zizyphus jujuba (hünnap), Rhamnaceae (Çehrigiller) familyasına ait çoğunlukla Avrupa, güney ve doğu Asya ve Avustralya'da, özellikle de kuzey Çin'in iç bölgesinde ve ülkemizde de daha çok Batı ve Güney bölgelerinde yetişen meyveleri yenilebilir özellikte olan bir bitkidir (Şekil 1.11). Ana biyolojik aktif bileşenleri vitamin C, fenolikler, flavonoidler, triterpenik asitler ve polisakkaritlerdir.

Meyve özütleri gastrointestinal bozuklukların tedavisinde, anti-enflamatuar ve anti-kanser etkili olarak ve obezite karşıtı olarak kullanılmaktadır (Gao ve diğ., 2013). Hünnap genellikle hem beslenme hem de nutrasötik (hastalık riskini azaltan ve sağlık üzerinde yararlı etki gösteren) değerler ile ilgili olarak biyolojik aktif bileşiklerin mükemmel bir kaynağı olarak tanınır. Kurutulmuş hünnap meyveleri, besin değerlerinin yüksek olmasından dolayı, binlerce yıldır gıda katkı maddesi ve tatlandırıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Li ve diğ., 2007). Macun, püre, şurup ve şekerlemeden yapılan hünnap meyveleri, sindirim iyileştirilmesi ve genel sağlık bakımı için tüketilir (Huang ve diğ., 2008, Outlaw ve diğ., 2002). Aynı zamanda kadınlarda dalak ve histeri yetersizliği sendromlarında anoreksi, yorgunluk ve ishal tedavisi için Çin tıbbında (TCM) kullanılmaktadır (Guo ve diğ., 2010).



Şekil 1.11. Hünnap (*Zizyphus jujuba*) (URL-2)

1.3.3. Keçiboynuzu

Ceratonia siliqua (keçiboynuzu), Fabaceae (Baklagiller) ailesine mensup yenilebilir özellikte olan tıbbi bir bitkidir (Şekil 1.12). Çiğneme tütünlerine aroma vermesi amacıyla ve çikolata sanayinde tatlandırıcı olarak meyveleri kullanılır.

Keçiboynuzu meyvesinde bulunan fenolik bileşiklerin ana kategorileri fenolik asitler, gallotaninler ve flavonoidlerdir. Keçiboynuzu meyvelerindeki polifenollerin konsantrasyonu kuvvetle genetik, çevresel ve ekstraksiyon yöntemlerine bağlıdır (Papagiannopoulos ve diğ., 2004). Keçiboynuzu meyvelerinde fenolik bileşikler, serbest, bağlı veya çözünür konjuge formlar olarak bulunur (Novotni ve diğ., 2011). Dubravka ve diğ. keçiboynuzu fenoliklerinin çoğunun kovalent olarak diyet liflerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak, keçiboynuzu tohumu zengin fenolik bileşik kaynağıdır ve bitkinin 448 mg/kg miktarında ekstrakte edilebilir polifenoller içerdiği belirlenmiştir (Papagiannopoulos ve diğ., 2004).

Keçiboynuzu, literatürde anti-tümör, anti-proliferatif ve proapoptotik aktiviteye sahip olduğu gösterilen fitokimyasal bileşikler bakımından zengindir. Örneğin, yaygın olarak çalışılan bir polifenol olan quercetin, doğrudan antiapoptotik protein Bcl-xL'yi hedef alarak T-lösemik hücrelerde apoptozu teşvik eder (Primikyri ve diğ., 2014).



Şekil 1.12. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) (URL-3)

1.3.4. Kışniş

Coriandrum sativum, Apiaceae (Umbelliferae) ailesinde kışniş olarak bilinen bir türdür (Şekil 1.13). Meyveleri ve tohumları yenilebildiği gibi meyvelerinden elde edilen esansiyel yağların antioksidan aktivite gösterdiği de bildirilmiştir (Samojilik ve diğ., 2010, Wangenstein ve diğ., 2004). Kışniş meyvelerinden elde edilen uçucu yağ gıda, ilaç, parfümeri, kozmetik ve içecek sanayinde çeşitli şekillerde kullanıldığı için ekonomik öneme sahiptir.

Kışniş, eski zamanlardan beri halk ilaçlarında veya baharat olarak kullanılan bir bitki türüdür. Günümüzde ise parfüm, tıp, ve gıda sanayinde büyük bir kullanım yelpazesine sahiptir. Kışniş'den elde edilen uçucu yağın ana bileşeni olan Linalool, meyvemsi ve hafif çiçeksi kokusuyla çeşitli ilaç örneklerinde kötü kokuyu önlemek amacıyla kullanılır (Doğan ve Akgün, 1987). Öte yandan elde edilen bu uçucu yağları ile bazı ekstraktları, kanser önleyici (antimutagenic) (Eslava ve diğ., 2004), kan şekeri düşürücü (hypoglycemic) (Waheed ve diğ., 2006), gaz giderici (carminative) ve yağ düşürücü (hypolipidemic) (Chithra ve Leelamma, 2000; Lal ve diğ., 2004), ağrı kesici (analgesic) (Chaudhry ve Tariq, 2006), kaygı giderici (anxiolytic) (Emamghoreishi ve diğ., 2005), kas gevşetici (relaxant) (Vejdani ve diğ., 2006) ve mikrop öldürücü (antimicrobial) (Kubo ve diğ., 2004; Cantore ve diğ., 2004) etkilerinden dolayı kullanılırlar.



Şekil 1.13. Kişniş (*Coriandrum sativum*) (URL-4)

1.3.5. Meyan

Glycyrrhiza glabra, Fabaceae (Baklagiller) ailesinden geniş yayılışa sahip, rizomu baharat olarak kullanılan ve antioksidan aktivitesi bulunan tıbbi bir bitkidir (Şekil 1.14).

Çeşitli kimyasal araştırmalar bitkinin metanolik ekstraktlarında antioksidan etkilerle sağlanan çok çeşitli biyoaktif zengin polifenol içeriğinin varlığı gösterilmiştir (Asl ve Hosseinzadeh, 2008; D'Angelo ve diğ., 2009).

Glycyrrhiza glabra'nın kökleri, tıpta çeşitli bozuklukların tedavisinde 3.000 yıldan beri yaygın olarak kullanılmakta; geleneksel Doğu tıbbında ve eski Hint tıbbında (Ayurveda) önemli bir rol oynamaktadır (Naik ve diğ., 2003; Tang ve diğ., 2004).

Antimikrobiyal (Fukai ve diğ., 2002), antiviral (Fiore ve diğ., 2008), anti-enflamatuar ve anti-ülser (Aly ve diğ., 2005) gibi birçok farmakolojik aktivite, glikirizin (Glycyrrhizin, *Glycyrrhiza glabra* kökünün temel tatlandırıcı bileşeni) ve glisirizik asit meyan kökü bileşiklerine bağlanmıştır.



Şekil 1.14. Meyan (*Glycyrrhiza glabra*) (URL-5)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitki Örneklerinin Temini

Bitki örnekleri Kocaeli İli'nde çeşitli yörelerdeki halk pazarlarından ve aktarlardan satın alındı. Yaprak, çiçek ve meyvesi bulunan bitki örneklerinin halk tarafından yaygın olarak kullanılan kısımları yıkanıp 4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

2.2. Fenol Oksidaz Ham Ekstraktlarının Hazırlanması

30 gram bitki yaprağı/meyvesi/tohumu (bitkinin yaygın olarak kullanılan kısmı), 200 mL'lik 100 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tampon çözelti içinde 4°C'de havanda dövülerek homojenize edildi (Kavrayan ve Aydemir, 2001; Rescigno ve diğ., 1997; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). Ortamdaki fenolik maddeleri uzaklaştırmak amacıyla son konsantrasyonu 12,5 mg/mL olacak şekilde polivinilpolipirolidon eklendi ve solüsyon 14,000xg'de 30 dak (4°C'de) santrifüj edilerek elde edilen süpernatant enzim ham ekstraktı olarak kullanıldı (Gulcin ve diğ., 2005; Kavrayan ve Aydemir, 2001; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). Pozitif kontrol için fenol oksidaz miktarı yüksek olduğu bilinen kültür mantarı (*Agaricus bisporus*) kullanıldı (Rescigno ve diğ., 1997).

2.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi

Üçlü-faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, genellikle tuz olarak amonyum sülfat ve bir organik çözügen olarak *t*-bütanol eklenmesiyle oluşur. Uygun koşullar altında üç faz oluşur. Bütanolce zengin üst faz (apolar bileşikler içerir), polar bileşikler içeren sulu fazdan ara yüzey protein çökeltisi ile ayrılır. Saflaştırılmış protein dağılımı, üstteki organik çözügen fazı ile alttaki sulu fazın arasındaki çözünmeyen ara yüzeyde görünür (Dennison ve Lovrein, 1997).

Çalışmada, 2 mL enzim ekstraktı, farklı amonyum sülfat doyumluklarına (%20, %30, %40, %50, %55, %60, %65, %70 ve %80 w/v) getirildi ve farklı enzim/*t*-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) sağlanacak şekilde *t*-bütanol eklenmesi yapıldı. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 4,500 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek faz ayrımı gözlenenler dikkate alındı (Alici ve Arabaci, 2016; Duman ve Kaya, 2014). Proteinin bulunmasının beklenmediği üst faz dikkatlice

pipetlenerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra alt fazın pipet yardımı ile orta fazda oluşan çökeltiden ayrılması sağlandı. Fenol oksidaz enzimini içeren çökelti 1 mL'lik 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinde (pH 6,0) çözdürüldü. Sonrasında orta ve alt faz örneklerinde aktivite ve protein tayin analizleri gerçekleştirildi. Üçlü-faz ayırma sistemlerinde biyomoleküllerin seçici olarak ayrılmasında rol oynayan parametreler (amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:*t*-bütanol oranı, sistem pH'sı) ayrıca optimize edildi.

Ham ekstrakt aktivitesi (1390 U), %100 olarak kabul edildi. Amonyum sülfat, distile su ve *t*-bütanol'den (ham ekstrakt hariç) oluşan bir kör sistem hazırlandı. Tüm denemeler iki kez tekrarlandı paralel deney bulguları arasındaki farklılığın $\pm\%5$ 'ten daha düşük olduğu bulundu.

2.4. Fenol Oksidaz Aktivite Tayini

Fenol oksidaz varlığının tespiti için 420 nm'de (25°C) spektrofotometre (Cary 60, Agilent) kullanılarak absorbans değerindeki artış ölçüldü (Ögel ve diğ., 2006). Enzim aktivitesini ölçmek için örnek küveti 100 mM derişiminde hazırlanan 500 μ L substrat (katekol), 1 mL sodyum fosfat tampon çözeltisi (100 mM, pH 7,0) ve uygun miktarda seyreltilmiş 500 μ L enzim solüsyonu eklenerek, kontrol küveti ise aynı şekilde fakat enzim olmadan hazırlandı. Enzim solüsyonu 100 mM'lık sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) kullanılarak elde edildi (Ögel ve diğ., 2006). Enzim aktivite değeri başlangıç reaksiyon hızı ve katekolün okside olma katsayısı olan $3450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri kullanılarak belirlenmiştir (Ögel ve diğ., 2006). 1 ünite aktivite (U), 1 mikromol katekolü 1 dakikada okside edebilen enzime karşılık gelmektedir.

2.5. Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford Metoduna göre belirlenmiş olup, standart grafiğın çizilmesinde (Ek-B) protein olarak sığır serum albümini kullanıldı (Bradford, 1976).

2.6. Fenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu

2.6.1. Moleküler ağırlığın hesaplanması

Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesinde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) yöntemi uygulandı. Buna göre, örnekler

%0,1 (w/v) SDS içeren %5'lik (w/v) yükleme and %15'lik (w/v) ayırma jellerinde yürütüldü (Laemmli, 1970) ve coomasie brillant-blue boyama metodu uygulanarak boyandı (Blum ve diğ., 1987). Molekül ağırlığın belirlenmesinde kullanılan standart grafik Ek-C'de verilmiştir.

2.6.2. Aktivite boyama

Aktivite boyama metodu fenol oksidazlardan lakkaz, katekol oksidaz ve peroksidaz aktivitelerinin poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrımı amacıyla uygulandı (Rescigno ve diğ., 1997). Bunun için SDS içermeyen poliakrilamid jeli, %7,5'lük (w/v) ayırma ve %4'lük (w/v) yükleme jellerini içerecek şekilde hazırlandı ve elektroforez 150 V'da 45 dak yürütüldü (Kaptan, 2004). Süre sonrasında jel önce 20 mL'lik 100 mM potasyum fosfat tampon çözelti (pH 6,0) ile 5 dak süreyle yıkandı ve daha sonra jele sırasıyla lakkaz aktivite tayini için 10 mM HCl çözeltisinde hazırlanmış 40 mM 4-amino-N-N diethylaniline (ADA), peroksidaz aktivite tayini için 10 mM H₂O₂ ve katekol oksidaz aktivite tayini için 10 mM asetik asit çözeltisinde hazırlanmış 40 mM 4-tert-bütül katekol eklenerek yıkandı ve aktif bantlar tespit edildi (Rescigno ve diğ., 1997). ADA ve H₂O₂ sonrası pembe-kırmızı, 4-tert-bütül katekol sonrası ise koyu mavi renkte bantların varlığı analiz edildi.

2.6.3. Sıcaklık ve pH'nın fenol oksidaz üzerine etkisi

Sıcaklıktaki değişikliklerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek amacı ile enzim ve substrat solüsyonları spektrofotometrede (Cary60, Agilent) enzim aktivite ölçümü yapılmadan önce 1-2 dak boyunca 30°C ila 80°C arasındaki farklı sıcaklıklara ayarlanmış su banyosunda bekletildi ve 420 nm'de enzim aktivite ölçümü hızlı bir şekilde gerçekleştirildi (Gulcin ve diğ., 2005; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). Sıcaklığa karşı enzim dayanıklılığını ölçmek için ise enzim örnekleri 30°C ila 80°C arasındaki farklı sıcaklıklara (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) ayarlanmış su banyosunda yaklaşık 1 saat bekletilerek fenol oksidaz aktivite ölçümü gerçekleştirildi

Farklı pH'ların fenol oksidaz aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için 3,0 ila 10,0 arasında değişen farklı pH'larda ve standart koşullarda spektrofotometrede enzim aktivite ölçümü yapıldı. pH 3,0-5,0 arasındaki reaksiyonlar için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6,0 ila 7,0 için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 8,0

için 100 mM tris tampon çözeltisi ve pH 9,0-10,0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanıldı (Gulcin ve diğ., 2005; Kavrayan ve Aydemir, 2001; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). Hazırlanan tampon çözeltiler Ek-A'da verilmiştir. pH'nın enzim stabilitesi üzerine etkisini test etmek için ise pH aralığı 3,0 ila 10,0 arasında (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0) hazırlanmış tampon çözeltilerde enzim örnekleri 1 saat bekletilerek fenol oksidaz aktivite ölçümleri yapıldı (Sutay Kocabas ve diğ., 2008).

2.6.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

0-200 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda katekol varlığında fenol oksidaz aktiviteleri ölçülmüş; K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk Plot ile hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.6.5. Substrat spesifite analizi

Saflaştırılan fenol oksidaz enziminin aynı grupta yer alan lakkaz, katekol oksidaz ve tirozinaz enzimlerinden hangisi/hangilerinin özelliklerini taşıdığını tayin etmek amacıyla enzimlere spesifik substratlar kullanıldı. Bunlar arasında 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; lakkaz substratı, 420 nm), guaiacol (lakkaz substratı, 465 nm), syringaldezine (lakkaz substratı, 530 nm), hidrokinon (lakkaz substratı, 440 nm), katekol (katekol oksidaz substratı, 420 nm), L-tirozin (tirozinaz substratı, 475 nm), L-DOPA (tirozinaz substratı, 475 nm) ve kafeik asit (katekol oksidaz substratı, 420 nm) yer almaktadır (Ögel ve diğ., 2006). Enzim aktivite analizleri yukarıda fenol oksidaz aktivitesi için açıklanan şekilde sadece substrat değiştirilerek gerçekleştirildi. Karşılaştırma amacıyla ticari lakkaz enzimi (*Trametes versicolor* lakkazı) kullanıldı.

2.6.6. Organik çözücülerin fenol oksidaz üzerine etkisi

Organik çözücülere karşı saflaştırılmış fenol oksidaz enziminin dayanıklılık derecesini karşılaştırmak amacıyla, aseton, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanol son konsantrasyonları %2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 ve 25 (v/v) olacak şekilde reaksiyon karışımına direk eklendi (Ögel ve diğ., 2006) ve fenol oksidaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirildi.

2.6.7. İnhibitörlerin enzim aktivite üzerine etkisi

Fenol oksidaz inhibitörü olarak literatürde rapor edilen salisil hidroksamik asit (salicyl hydroxamic acid, SHAM), setrimonyum bromür (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) ve polivinilpirolidonun (PVP) kısmi saflaştırılmış enzim üzerine etkilerini araştırmak üzere, adı geçen bileşikler son konsantrasyonları 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 mM olacak şekilde reaksiyon karışımına direk eklendi (Ögel ve diğ., 2006) ve fenol oksidaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirildi. Karşılaştırma amacıyla ticari lakkaz enzimi (*T. versicolor* lakkazı) kullanıldı.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bitki Örneklerinin Fenol Oksidaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Fenol oksidaz kaynağı olarak kullanılan ve kültür mantarına alternatif bir bitki bulmak üzere test edilen, 5 bitki örneğinden Tablo 3.1’de görüldüğü üzere sadece rezene bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilen özütte kültür mantarından daha yüksek (yaklaşık %238) aktivite ölçüldü. Meyan, Hünnap, Keçiboynuzu ve Kışniş’te kültür mantarına göre sırasıyla %8, %6, %4 ve %3 oranında bağıl aktivite değerleri gözlemlendi. Buna göre, pozitif kontrole göre en yüksek aktivite Rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumlarında belirlendiği için bundan sonraki aşamalarda bu bitki kullanıldı.

Tablo 3.1. Farklı bitki örneklerinde ölçülen fenol oksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Fenol oksidaz kaynağı	Fenol oksidaz aktivite (U/mL)	Bağıl aktivite (%)
Kültür mantarı (<i>Agaricus bisporus</i>)	200±17	100
Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>)	475±15	238
Meyan (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	16±17	8
Hünnap (<i>Zizyphus jujube</i>)	11±0	6
Keçiboynuzu (<i>Cerantonia siliqua</i>)	8±1	4
Kışniş (<i>Coriandrum sativum</i>)	5±0	3

Fenol oksidaz aktivite değerleri farklı bitki türlerinde değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada fenol oksidaz aktivitesi, armut yaprağında 234 U/mL, dut yaprağında 213 U/mL, vişne yaprağında 149 U/mL, elma yaprağında 45 U/mL olarak ölçülmüştür (Sutay, 2003). Bu çalışmada en yüksek aktivite elde edildi.

3.2. Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.1. pH optimizasyonu

Seçilen fenol oksidaz kaynağının ekstraksiyonu sırasında ortam pH'sını optimize etmek için pH'sı 3,0 ila 9,0 arasında değişen koşullarda ekstraksiyon ortamları hazırlanarak özütler elde edildi (Bölüm 2.2) ve standart koşullarda spektrofotometrede enzim aktivite tayini gerçekleştirildi (Bölüm 2.4). Pozitif kontrol olarak kültür mantarı kullanıldı.

Ölçülen fenol oksidaz aktivite değerleri göz önüne alındığında en yüksek aktivite, pH'sı 6,0 olan ortamda rezene bitkisinde gözlemlendi (Tablo 3.2). Buna göre, bundan sonraki ekstraksiyon denemelerinde pH değeri 6,0 olarak seçildi.

Tablo 3.2. Ekstraksiyon pH'sının optimizasyonu

Fenol oksidaz aktivite (U/mL)		
	Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Kültür mantarı (<i>Agaricus bisporus</i>)
pH		
3,0	43±28	22±4
4,0	145±5	244±3
5,0	166±19	220±22
6,0	488±13	270±13
7,0	475±21	265±13
8,0	258±0	142±19
9,0	175±20	88±10

Literatürde farklı bitki örneklerinde yapılan fenol oksidaz enzim ekstraksiyon optimizasyonunda farklı pH'lar seçilmiştir. Örneğin, Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisinden fenol oksidaz enzim ekstraksiyonunda pH 6,5 (Kouakou ve diğ.,2008), üzümünden (*Vitis vinifera*) tirozinaz enzim ekstraksiyonunda pH 7,0 (Öztaş, 2007), enginar (*Cynara scolymus* L.) fenol oksidaz enzim ekstraksiyonunda ise pH 6,0 (Aydemir, 2004) optimum olarak seçilmiştir. Genelde ekstraksiyon sırasında tercih edilen pH'nın 6,0-7,0 aralığında olduğu görülmektedir.

3.2.2. PVP konsantrasyonunun optimizasyonu

PVP, fenolik maddelerle hidrojen bağı yaparak fenol-fenol oksidaz etkileşimini engellemesi sebebiyle bitkilerden enzim ekstraksiyonunda sıklıkla tercih edilir (Smith ve Montgomery, 1985). Rezeneden fenol oksidaz izolasyonunda kullanılacak optimum PVP değerini belirlemek amacıyla ekstraksiyon ortamına 5-75 mg/mL PVP eklendi. Tablo 3.3’de görüldüğü üzere 50 mg/mL PVP fenollerin uzaklaştırılmasında en etkin sonucu verdi.

Literatürde farklı bitki örneklerinde yapılan ekstraksiyon optimizasyonunda farklı PVP konsantrasyonları seçilmiştir. Örneğin, Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisinden ekstraksiyon optimum olarak %0.5 (w/v) PVP varlığında gerçekleştirilmiştir (Esmâ ve Gülnur, 2013). Üzümden (*Vitis vinifera*) tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ise %3 (w/v) PVP kullanılarak yapılmıştır (Öztaş, 2007). Görülmektedir ki her bitki örneği için optimum PVP değeri değişiklik gösterir. PVP optimum konsantrasyona ulaşıldıktan sonra enzim aktivitesindeki artış konsantrasyon arttıkça devam etmez, azalmaya başlar.

Tablo 3.3. Rezeneden fenol oksidaz ekstraksiyonu sırasında kullanılan PVP’nin optimizasyon sonuçları

PVP konsantrasyonu (mg/mL)	Fenol oksidaz aktivite (U/mL)
5	436±11
12.5	487±14
25	501±17
37.5	518±7
50	695±40
62.5	641±53
75	549±33

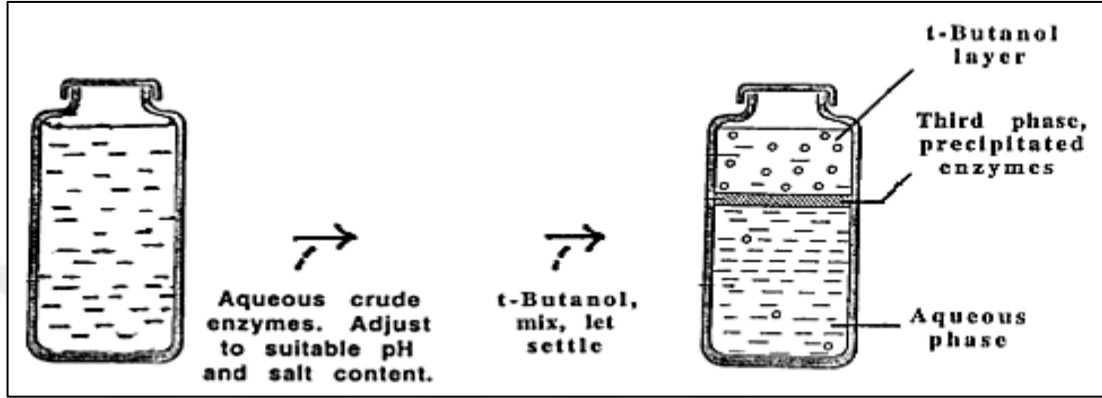
3.3. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi ile Fenol Oksidazın Saflaştırılması

Üçlü-Faz Ayırma Sistemleri, üç sıvı fazın farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, bu sistemler tek bir ekstraksiyonla iki ya da daha fazla bileşiğin ayrımının yeni olasılıklarını sunmaktadırlar. Konveksiyonel bir biçimde "salting out", proteinleri izoionik çöktürme, yardımcı çözenle çöktürme, osmotik ve kozmotropik çöktürme gibi pek çok tekniği içeren prensipleri ortaklaşa çalıştıran bir biyoayırım tekniğidir. Üçlü faz sistemleri (TPP) biyolojik moleküllerin (örneğin; protein, hücre, organel ve biyolojik membranlar) ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan seçimli ve etkin bir metottur.

Üçlü-faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, genellikle tuz olarak amonyum sülfat kullanılır. Amonyum sülfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ucuz olduğu, hali hazırda temin edilebildiği, bazı proteinleri stabilize ettiği ve yüksek çözünürlüğünden dolayı, protein tuzlanmasında (salting out) kullanılan en popüler tuzdur (Dennison ve Lovrein, 1997). Dahası, NH_4^+ ve SO_4^{2-} 'ın kendi Hofmeister serisinin uçlarında oldukları ve protein yapıları gibi makromoleküllerdeki moleküller arası etkileşimleri stabilize ettiği gösterilmiştir. Amonyum sülfat doyması kritik öneme sahiptir ve protein-protein etkileşimi ve çökmesinden sorumlu olduğu için TPP'de büyük bir rol oynar. 'Salting out' mekanizmasıyla protein çökmesine neden olur. 'Salting out' etkinliği ilk önce amonyum sülfat miktarına ve ikinci olarak da çözeltinin iyon gücüne bağlı olacaktır. Örneğin, daha yüksek tuz çökeltisinde, su molekülleri, tuz iyonları tarafından tutulur, daha güçlü protein-protein etkileşimleriyle sonuçlanır ve protein molekülleri hidrofobik etkileşimler yoluyla çöker (Gagaoua, 2014).

Üçlü-faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, genellikle organik çözen olarak ise *t*-bütanol kullanılır. TPP'nin özelliği *t*-bütanol kullanılmasıdır. *t*-bütanol, suda çözünür bir C4 iyonik olmayan kosmotroptur, ancak katı tuz eklendikten sonra hidratlanır ve farklılaşan bir çözücü olarak işlev görür. Saflaştırılan enzimin denatürasyonuna neden olmaz çünkü daha büyük moleküller büyüklüğü nedeniyle katlanmış üç boyutlu protein yapısının içine nüfuz edemez. Olağandışı olarak, organik bir çözücü için, *t*-bütanol protein yapısını stabilize eder. Aynı zamanda enzim aktivitelerini ve protein-protein etkileşimlerini de inhibe eder (Rachana ve

Lyju Jose, 2014). Proteinlerin sulu çözeltisine eklenen amonyum sülfat ve *t*-bütanol ile uygun koşullar altında üç faz oluşur. Bütanolce zengin üst faz (apolar bileşikleri içerir), polar bileşikleri içeren sulu fazdan ara yüzey protein çöktürmesi ile ayrılır. Saflaştırılmış protein dağılımı, üstteki organik çözügen fazı ile alttaki sulu fazın arasındaki çözünmeyen ara yüzeyde görünür (Dennison ve Lovrein, 1997).



Şekil 3.1. TPP sisteminin görsel gösterimi. (Dennison ve Lovrein, 1997)

Üçlü-faz sistemleri, proteinin saflaştırılması ve konsantrasyonu için kullanılan basit fakat ekonomik, kromatografik olmayan bir işlemdir (Rachana ve Lyju Jose, 2014).

TPP'nin birkaç avantajı;

1. Kısa işlem süresi ile basit bir işlemdir.
2. Amonyum sülfat ve *t*-bütanol ucuz kimyasallardır, bu nedenle TPP'yi ekonomik bir protokol haline getirir.
3. TPP koşulları proteinleri denatüre etmez.
4. Genellikle oda sıcaklığında yapılır.
5. TPP yarı mikro seviyelere veya litre ölçeğine kadar ölçeklenebilir.
6. TPP, kromatografiden farklı olarak proteini konsantre eder ve saflaştırır.

Bir enzimin üçlü faz sistemi ile yüksek verimde saflaştırılması başlıca üç parametreye bağlıdır: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonu, ham ekstrakt:*t*-bütanol oranı ve sistem pH'sı olmak üzere. Her bir parametre optimize edilerek rezene tohumundan fenol oksidaz enziminin saflaştırılması için en uygun sistem belirlendi. Gerçekleştirilen tüm denemelerde fenol oksidaz enziminin orta fazda bulunduğu belirlendiğinden sadece bu faza ait bulgular aşağıda verildi.

3.3.1. Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) konsantrasyonunun belirlenmesi

Amonyum sülfat konsantrasyonu, TPP sistemlerinde oldukça önemlidir. Yeterli miktarda fenol oksidaz enziminin kompleks karışımdan (ham ekstrakt) kontamine edici materyallerle minimum etkileşim oluşturacak şekilde ekstrakte edilebilmesi için amonyum sülfat derişiminin optimize edilmesi gerekmektedir.

Genellikle optimizasyon denemelerine %20 (w/v) doygunlukta hazırlanmış çözeltilerle başlanır ve istenilen proteinin orta fazda en yüksek miktarlarda bulunduğu derişim belirlenir (Dennison ve Lovrien, 1997). Tablo 3.4, farklı amonyum sülfat doygunluklarında hazırlanmış, ham ekstrakt ile *t*-bütanolün eşit hacimlerde eklendiği sistemlerde fenol oksidaz enziminin orta fazdaki ayırım davranışlarını göstermektedir.

Buna göre, maksimum %86 aktivite geri kazanımla orta fazda 1,8-kat saflaştırılmış fenol oksidaz enzimi %65 (w/v) (NH₄)₂SO₄ doygunluğunda hazırlanmış sistemden elde edildi. %60 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda hazırlanan sistemde de 1,8-kat saflaştırma derecesine ulaşıldı; ancak aktivite geri kazanımı %65 (w/v)'deki değere göre daha düşük olduğundan sonraki aşamalarda kullanılmak üzere tercih edilmedi.

Genelde düşük konsantrasyonlarda hazırlanan tuz çözeltilerinde saflaştırma derecesi ve geri kazanım değerleri düşük hesaplanır. Diğer yandan yüksek tuz içeren TPP sistemlerinde ise proteinin tuz içeren üst faza doğru yönelimi gerçekleşeceğinden etkili bir saflaştırma gerçekleştirilemez (Bayraktar ve Önal, 2013). Nitekim Tablo 3.4'te görüldüğü üzere %65 (w/v)'in üzerinde saflaştırma katsayısı ile enzim geri kazanım değerleri düşüş gösterdi. Bu nedenle, bundan sonraki denemelerde (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonu %65 (w/v) olan TPP sistemi kullanıldı.

Fenol oksidazların üçlü-faz yöntemi ile saflaştırılması üzerine literatürdeki bilgi sınırlıdır. Rapor edilenler arasında sistemde kullanılan amonyum sülfat konsantrasyonunun değişkenlik gösterdiği göze çarpmaktadır. Örneğin, TPP ile *Pleurotus ostreatus*'dan lakkazın saflaştırılması %60, *Trametes hirsute*'den aynı enzimin saflaştırılması ise %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Kumar ve diğ., 2012; Patil ve diğ., 2018).

Tablo 3.4. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP sistemlerinde fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi

(NH ₄) ₂ SO ₄ konsantrasyonu (%, w/v)*	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	SA (U/mg)	SK	%GK
20	195±28	0,36	534±83	0,5	14
30	236±50	0,37	641±100	0,6	17
40	695±117	0,46	1497±233	1,4	50
50	778±125	0,52	1497±256	1,4	56
55	904±146	0,56	1604±260	1,5	65
60	1056±200	0,55	1924±300	1,8	76
65	1195±200	0,62	1924±150	1,8	86
70	751±114	0,54	1390±217	1,3	54
80	-	-	-	-	-

*0,5 mL *Foeniculum vulgare* (Rezene) ham ekstraktının spesifik aktivitesi 1069 U/mg ve total protein miktarı 1,3 mg'dır. Farklı amonyum sülfat doyunluklarında hazırlanmış karışımlara ham ekstrakt:t-bütanol oranı 1:1 olacak şekilde eşit hacimlerde t-bütanol eklendi. Oluşan orta fazdaki çökeltiler toplandı, sulu tampon çözeltide çözdürüldü ve analiz edildi. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım

3.3.2. Ham ekstrakt:t-bütanol oranının belirlenmesi

Ham ekstrakt:t-bütanol oranı da TPP sistemlerinde önemli bir parametre olup optimize edilmelidir. En uygun oranı belirlemede, %65 (w/v) doyunlukta (NH₄)₂SO₄ içeren 1,0:0,5'ten 1,0:2,0 (v/v)'ye değişen oranlarda ham ekstrakt ve t-bütanol içeren sistemler kuruldu. En iyi fenol oksidaz saflaştırma katsayısı (1,9) ve yüksek aktivite geri kazanımı (%115), %65 (w/v) (NH₄)₂SO₄ doyunlukta 1,0:0,5 (v/v) ham ekstrakt:t-bütanol oranına sahip sistemden hesaplandı (Tablo 3.5). Burada enzim aktivitesinin simültane olarak arttığı görülmektedir.

TPP sistemleriyle gerçekleştirilen enzim saflaştırma denemeleri sırasında enzim aktivasyonun gerçekleşmesine sıklıkla karşılaşılmaktadır (Narayan ve diğ., 2008; Özer ve diğ., 2010; Sharma ve Gupta, 2001; Singh ve diğ., 2001; Wati ve diğ., 2009; Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018). Bu duruma ayırma sırasında enzim molekülünün esnekliğindeki artışın sebep olabileceği daha önce yayınlanan raporlarda sunulmuştur (Akardere ve diğ., 2010; Özer ve diğ., 2010; Şen ve diğ., 2011; Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018).

Literatürde farklı bitkisel ve mantar kaynaklı fenol oksidazların üçlü faz sistemi ile saflaştırılmasında ham ekstrakt:t-bütanol oranı değişkenlik göstermektedir. Örneğin, TPP ile *Pleurotus ostreatus*'dan lakkazın saflaştırılmasında ham ekstakt:t-bütanol oranı 1,0:1,8 olarak belirlenmiştir (Kumar ve diğ., 2012). TPP ile *Paulownia tomentosa*'dan fenol oksidazın saflaştırılmasında ise ham ekstakt:t-bütanol oranı 1,0:2,0 olarak bulunmuştur (Çesko, 2018).

Tablo 3.5. Farklı ham ekstrakt:t-bütanol oranlarının TPP sistemlerinde fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi

Ham ekstrakt:t- bütanol oranı (v/v)*	Toplam	Toplam	SA (U/mg)	SK	%GK
	aktivite (U)	protein miktarı (mg)			
1,0:0,5	1600±121	0,78	2031±160	1,9	115
1,0:1,0	1195±200	0,62	1924±150	1,8	86
1,0:1,5	987±61	0,57	1710±176	1,6	71
1,0:2,0	876±86	0,58	1497±150	1,4	63

*0,5 mL *Foeniculum vulgare* (Rezene) ham ekstraktının spesifik aktivitesi 1069 U/mg ve total protein miktarı 1,3 mg'dır. %65 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda hazırlanmış karışımlara farklı ham ekstrakt:t-bütanol oranı içerecek şekilde t-bütanol eklendi. Oluşan orta fazdaki çökeltiler toplandı, sulu tampon çözeltide çözdürüldü ve analiz edildi. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım

3.3.3. Üçlü-faz ayırma sistem pH'sının belirlenmesi

TPP sistemlerinin etkinliğini etkileyen bir diğer önemli parametre sistem pH'sıdır. TPP'nin temeli protein molekülündeki katyonik bölgelere sülfat iyonunun (SO_4^{-2}) bağlanmasına dayanır ki ortam pH'sı bu bağlanmayı önemli ölçüde etkiler. Sistem pH'sının değişimi fazlar ile yüklü proteinler arasındaki etkileşimleri etkileyeceğinden proteinlerin fazlardaki dağılımı da büyük ölçüde etkilenir. Bu nedenle, pH'nın optimize edilmesi gereklidir. TPP sisteminin pH'sı, proteinin izoelektrik noktasından küçük olduğunda protein orta faza doğru yönelim gösterir (Dennison ve Lovrien, 1997).

Sistem pH'sının fenol oksidaz enziminin fazlardaki ayırımına etkisini araştırmak üzere hazırlanan sistemlerde tuz konsantrasyonu (%65, w/v) ve ham ekstrakt:t-bütanol oranı (1,0:0,5) sabit tutuldu, sonrasında sistem pH'sı 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) ve 0,1 M hidroklorik asit (HCl) kullanılarak istenilen pH'ya ayarlandı.

Fenol oksidaz enziminin büyük bir kısmı pH 6,0'da diğer proteinlerden ayrılarak orta fazda çöktü (Tablo 3.6). Diğer bir deyişle, en yüksek saflaştırma katsayısı (2,0) ve aktivite geri kazanım (%120) değerleri pH'sı 6,0'a ayarlanmış sistemde ölçüldü. Sistem pH'sı 5,0'dan küçük ve 7,0'dan büyük olan sistemlerde enzimatik aktivite gözlenmedi. Bu durum proteinin asidik ve bazik ortamlarda denatüre formda fazda ayrıldığına işaret eder (Pike ve Dennison, 1989).

Tablo 3.6. Sistem pH'sının TPP'de fenol oksidaz enzim dağılımına etkisi

Sistem pH*	Toplam				
	Toplam aktivite (U)	protein miktarı (mg)	SA (U/mg)	SK	%GK
3	-	0,32	-	-	-
4	-	0,38	-	-	-
5	528±50	0,54	962±190	0,9	38
6	1668±200	0,78	2138±241	2,0	120
7	1600±121	0,78	2031±160	1,9	115
8	-	0,51	-	-	-
9	-	0,45	-	-	-

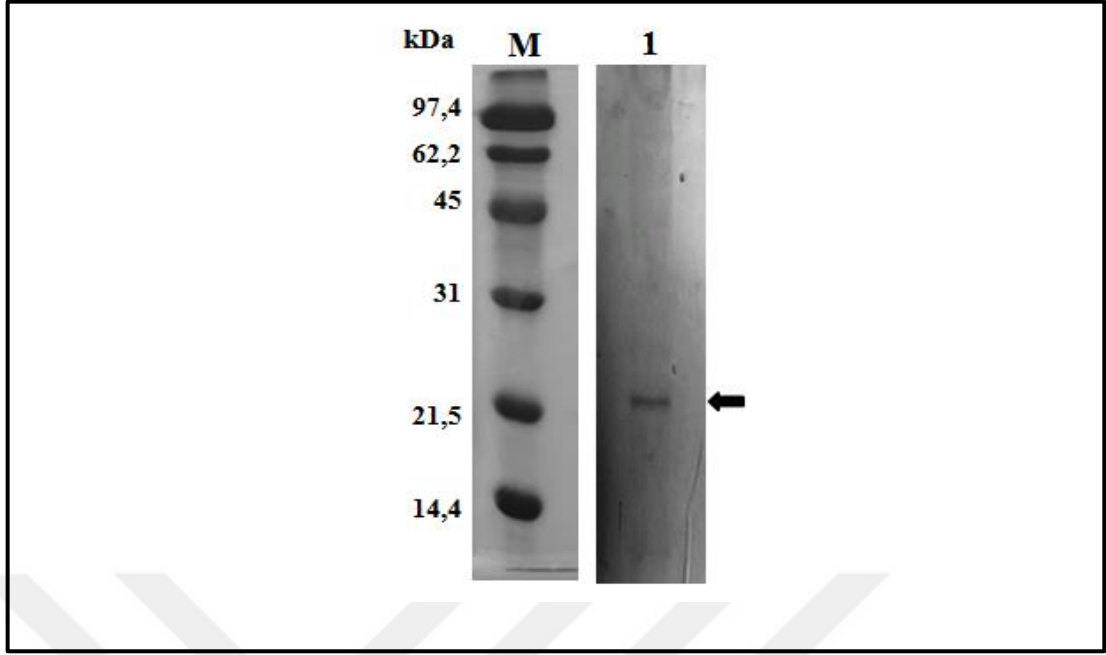
*0,5 mL *Foeniculum vulgare* (Rezene) ham ekstraktının spesifik aktivitesi 1069 U/mg ve total protein miktarı 1,3 mg'dır. %65 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda hazırlanmış 1.0:0.5 oranında ham ekstrakt ve t-bütanol içeren sistemler farklı pH'lara ayarlandı. Oluşan orta fazdaki çökeltiler toplandı, sulu tampon çözeltide çözdürüldü ve analiz edildi. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım

Sonuç olarak rezene tohumundan fenol oksidaz enzimi TPP tekniği kullanılarak %120 aktivite geri kazanım ile 2 kat saflaştırıldı. Daha sonra enzim konsantre edilerek elektroforetik ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.4.Elektroforetik Analizler

3.4.1.SDS-PAGE elektroforezi

Üçlü-faz saflaştırma sistemi ile kısmi olarak saflaştırılan fenol oksidaz enzim çözeltisi SDS-PAGE'de analiz edildiğinde, jelde yaklaşık 21,8 kDa'ya karşılık gelen bir adet bant gözlemlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Rezene fenol oksidazının SDS-PAGE profil görüntüsü. *M*: BioRad Moleküler kütle standartlar (Fosforilaz b; 97,4 kDa, Serum albumin; 66,2 kDa, Ovalbumin; 45 kDa, Karbonik anhidras; 31 kDa, Tripsin inhibitör; 21,5 kDa, Lizozim; 14,4 kDa, Aprotinin; 6,5 kDa); *1*: ÜFA sonrası fenol oksidaz enzim preparatı (20 µg örnek uygulandı)

Literatürde farklı bitki kaynaklarından izole edilen fenol oksidaz enzimlerinin moleküler kütlesi çalışılan bitki kaynaklarına göre değişkenlik göstermektedir (Tablo 3.7). Bu çalışmada enzim için bulunan molekül ağırlık değeri literatürde rapor edilen 18 ile 38 kDa aralığında olduğundan uyumludur.

Tablo 3.7. Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen fenol oksidazların molekül kütlesi

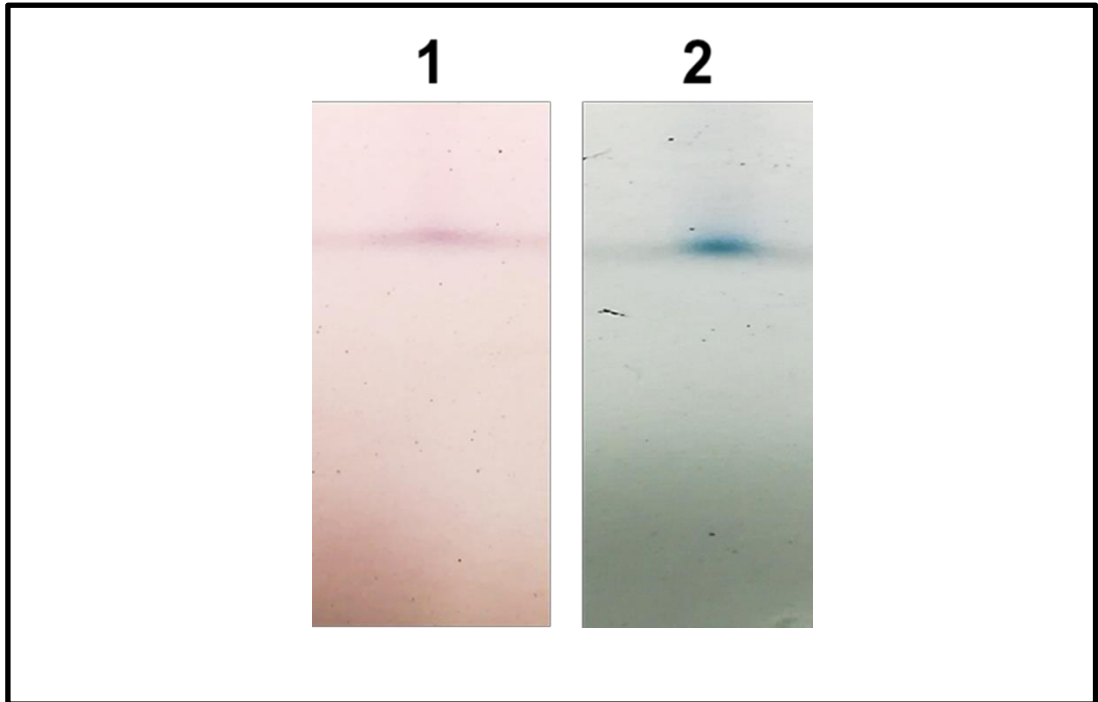
Bitki kaynağı	Molekül ağırlığı (kDa)	Referans
Mamey ¹	18	Palma-Orozco ve diğ., 2011
İpek çiçeği ²	25	Yamamoto ve diğ., 2002
Bayağı papav ³	28,2	Fang ve diğ., 2007
Sapodilla ⁴	24	Vishwasrao ve diğ., 2017
Talı patates ⁵	38	Kanade ve diğ., 2007
Rezene ⁶	21,8	Bu çalışma

¹Mamey (*Pouteria sapota*), ²İpek çiçeği (*Portulaca grandiflora*), ³Bayağı papav (*Asimina triloba*), ⁴Sapodilla (*Manilkara zapota*), ⁵Tatlı patates (*Ipomoea batatas*), ⁶Rezene (*Foeniculum vulgare*)

3.4.2. Aktivite boyama

SDS içermeyen poliakrilamid jel elektroforez sonrası, TPP sistemi ile saflaştırılan fenol oksidaz örneği Rescigno ve diğ. (1997) tarafından rapor edilen yöntemle boyandı. Buna göre; jel önce 20 mL'lik 100 mM potasyum fosfat tampon çözelti (pH 6,0) ile 3 dak süreyle yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra sırasıyla aktivite tayini için; 1) 10 mM HCl çözeltisinde hazırlanmış 40 mM N,N diethyl-p-phenylenediamine (ADA) (lakkaz aktivitesi için), 2) 10 mM asetik asit çözeltisinde hazırlanmış 40 mM 4-tert-butyl katekol (*t*BC) eklendi.

ADA ile boyama sonrası pembe renkte bir bant gözlemlendi. ADA, lakkaz substratı olarak tanımlandığından jel üzerinde görülen bant lakkaz aktivitesinin varlığına işaret etmektedir. *t*BC ise katekol oksidaz substratıdır; *t*BC varlığında ilk boyamanın gözlemlendiği bölgedeki bant maviye dönüştü. Mavi renk *t*BC'nin okside olduğunu göstermektedir; çünkü *o*-kinon (*t*BC'nin okside formu) ADA ile birlikte mavi renkte bir bileşiğin oluşmasına sebep olur (Rescigno ve diğ., 1997). Her iki boyama sonrası jelde tek bant görülmüş olması örneğin hem lakkaz hem de katekol oksidaz aktivitesi gösterdiğini belirtmektedir.



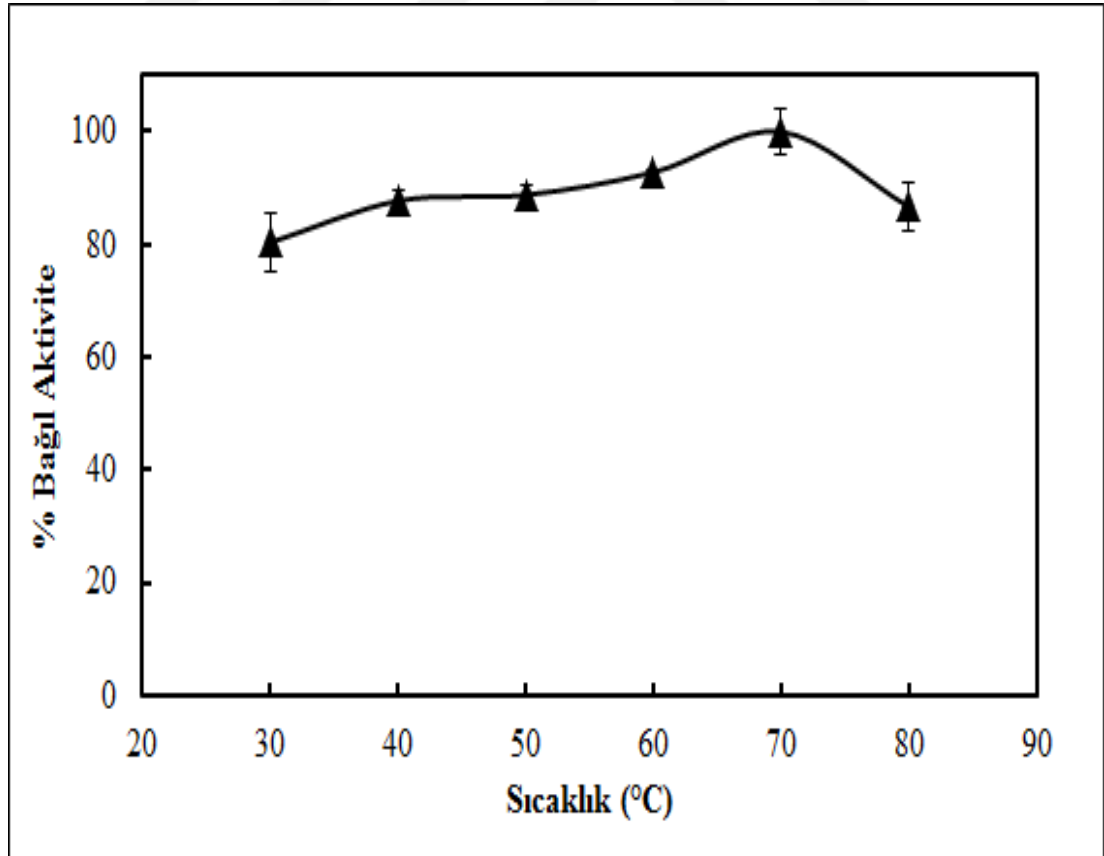
Şekil 3.3. Rezene fenol oksidazının ADA (1) ve *t*BC (2) ile aktivite boyama sonuçlarını gösteren jel görüntüsü

3.5. Safılaştırılan *Foeniculum vulgare* (Rezene) Fenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Reaksiyon sıcaklığının enzim üzerine etkisinin araştırılması

Sıcaklığın fenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30-80°C arası sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite ölçümleri Şekil 3.4'de verilmiştir. Oluşturulan grafikte Rezene fenol oksidazı için optimum reaksiyon sıcaklığı 70°C olarak bulundu. Bu sıcaklık değerinin üzerinde aktivite azalmış ancak hala başlangıçtaki aktivitenin %70'i korunmuştur.

Literatürde farklı bitki kaynaklarından izole edilen fenol oksidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri çalışılan bitki kaynaklarına göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, *Eriobotrya japonica* (yeni dünya) meyvelerinden çıkarılan fenol oksidaz enzimi de, 70°C'de optimum aktivite göstermiştir. Ayrıca literatürde yer alan diğer bitki kaynaklarının optimum sıcaklık dereceleri Tablo 3.8' de yer almaktadır.



Şekil 3.4. Reaksiyon sıcaklığının rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkisi

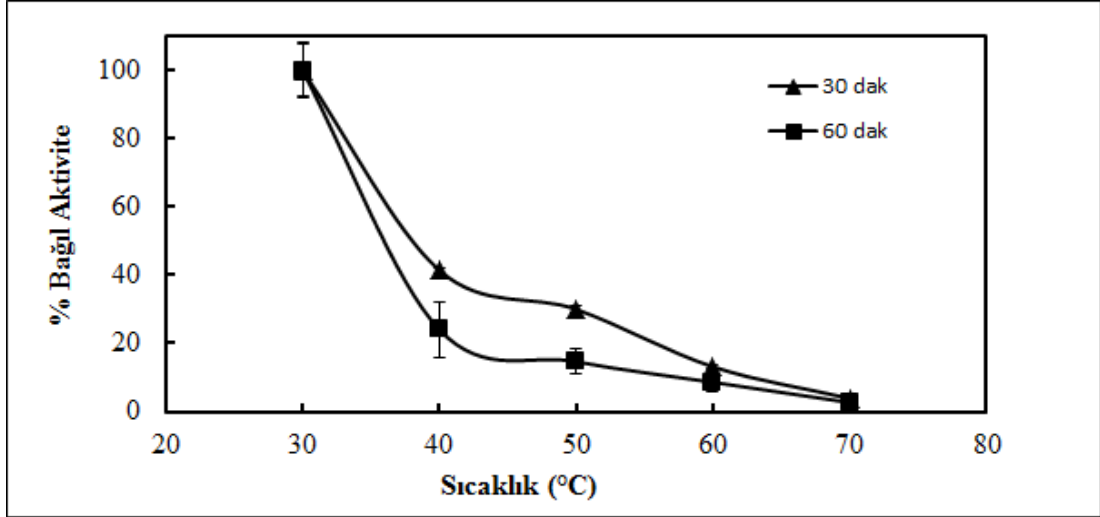
Tablo 3. 8. Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen fenol oksidazların optimum pH ve sıcaklıklarının karşılaştırılması

Bitki kaynağı	K _m (Katekol, mM)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Referans
Amasya elması	34	15	7,0	Oktay ve diğ., 1995
Çilek	5,9	25	5,0	Dalmadi ve diğ., 2006
Dut ¹	-	45	7,0	Sutay Kocabas ve diğ.,2011
Enginar ²	10,2	25	6,0	Aydemir, 2004
Hurma	12,4	20-40	7,5	Özen ve diğ., 2004
Kekik ³	18	35	6,5	Dogan ve Dogan, 2004
Kestane ⁴	14,3	40	5,0	Xu ve diğ., 2004
Mango	6,3	30	7,0	Wang ve diğ., 2007
Muz	8,5	30	7,0	Ünal, 2007
Nane	6,3	30	7,0	Kavrayan ve Aydemir,2001
Patlıcan ⁵	8,7	20	7,0	Dogan ve diğ., 2002
Mamey ⁶	44	-	7,0	Palma-Orozco ve diğ.,2011
Rezene ⁷	49	70	7,0	Bu çalışma

¹Dut (*Morus alba* L.); ²Enginar (*Cynara scolymus* L.); ³Kekik (*Thymus longicaulis* subsp.*chaubardii* var. *chaubardii*); ⁴Kestane (*Castanea henryi*); ⁵Patlıcan (*Solanum melongena* var. *insanum*); ⁶Mamey (*Pouteria sapota*); ⁷Foeniculum vulgare

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisinin belirlenmesi için 30 ila 70°C arası sıcaklıklarda enzim 30 dak ve 60 dak inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda aktivite ölçümleri yapıldı. Şekil 3.5’de görüldüğü üzere enzimin kararlı kaldığı optimum sıcaklık değeri 30°C olarak belirlendi. Sıcaklık 40°C’ye çıkartıldığında enzim aktivitesinde çok hızlı bir düşüş gözlemlendi (30°C’de ölçülen aktivitenin yaklaşık %59’u kaybolmuştur).

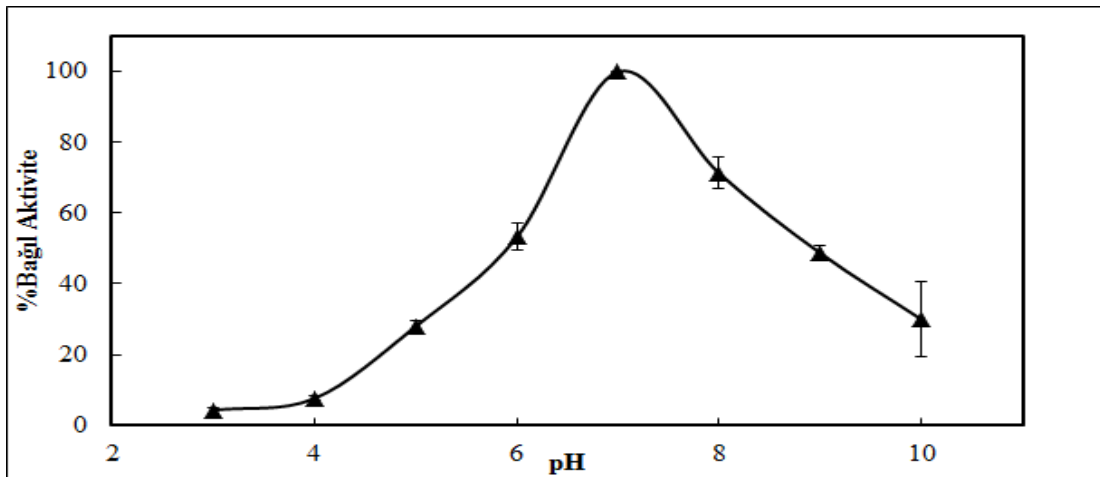
İnkübasyon süresinin etkisine bakıldığında ise 60 dak inkübasyon 30 dak’a göre aktivitenin yarıyarıya azalması ile sonuçlandı. Şekil 3.4 ve Şekil 3.5 beraber incelendiğinde, enzimin yüksek sıcaklık derecelerinde (60-80°C) aktif olmasına rağmen stabilitesinin kısa sürede bozulduğunu görmekteyiz. Bu durum enzimin uzun süren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini sınırlayabilir.



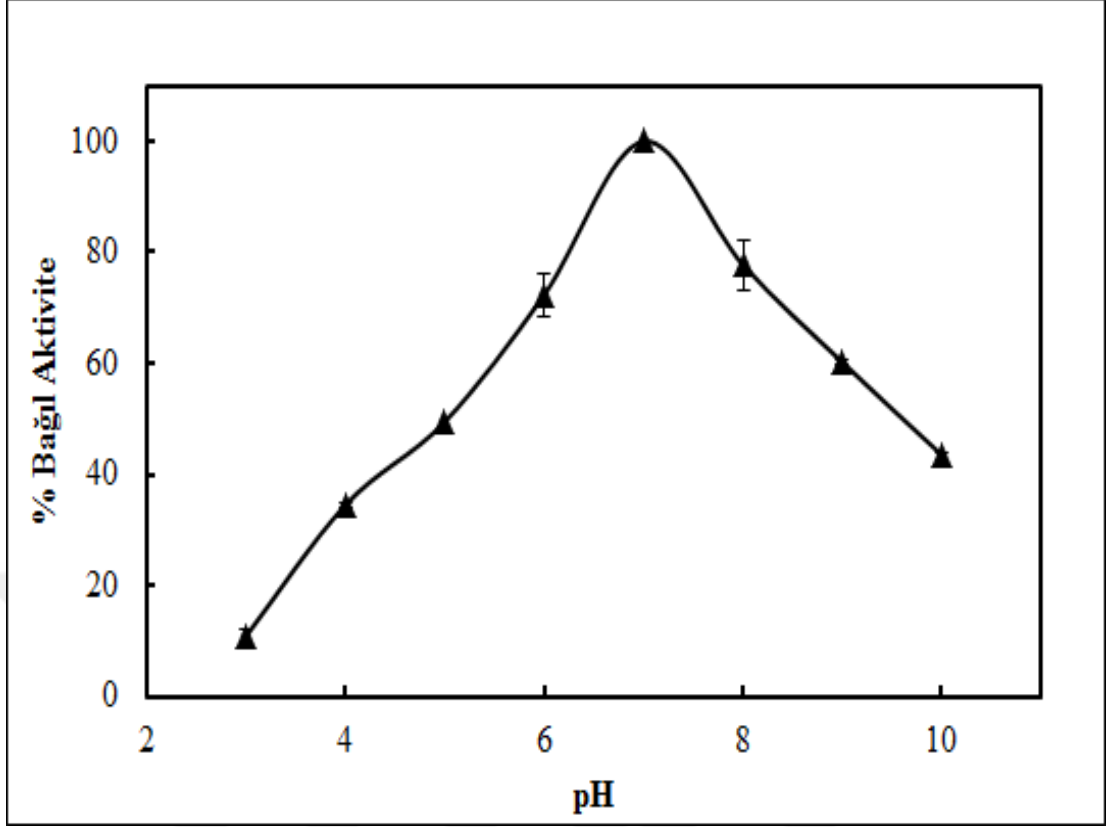
Şekil 3.5. Sıcaklık değişiminin enzim kararlılığı üzerine etkisi

3.5.2. Reaksiyon pH'sının enzim üzerine etkisinin araştırılması

Farklı pH'ların fenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için 3,0 ile 10,0 arasında değişen farklı pH'larda gerçekleştirilen aktivite ölçüm bulguları Şekil 3.6'de verilmiştir. Oluşturulan grafikte Rezene fenol oksidazı için optimum reaksiyon pH'sı 7,0 olarak belirlendi. Benzer şekilde enzimin bir saat süreyle başlangıçtaki aktivitesini koruduğu pH değeri de 7,0 olarak bulundu (Şekil 3.7). Bu pH değerinin üzerinde ve altında aktivite kayıplar olmakla birlikte pH 6,0 ve 8,0'de sırasıyla aktivitenin yaklaşık %72 ve %77'si korundu (Şekil 3.7). Farklı bitki dokularından ekstrakte edilen fenol oksidazlara ait optimum pH değerleri Tablo 3.8'de verilmiştir. Genel olarak fenol oksidazların en iyi çalıştıkları reaksiyon pH değerinin 7,0 olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3.6. Reaksiyon pH'sının rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkisi



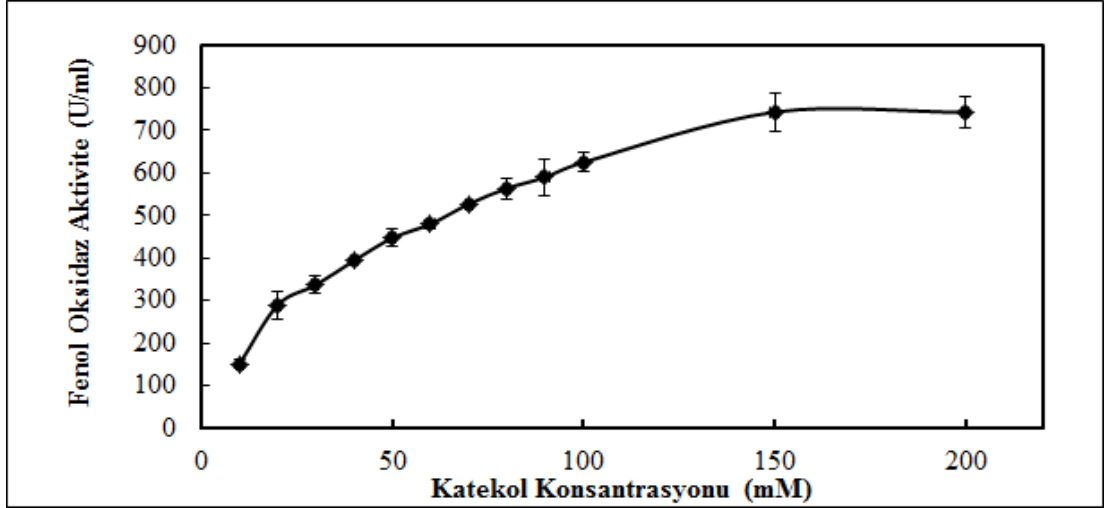
Şekil 3.7. Reaksiyon pH değişiminin enzim kararlılığı üzerine etkisi

3.5.3. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

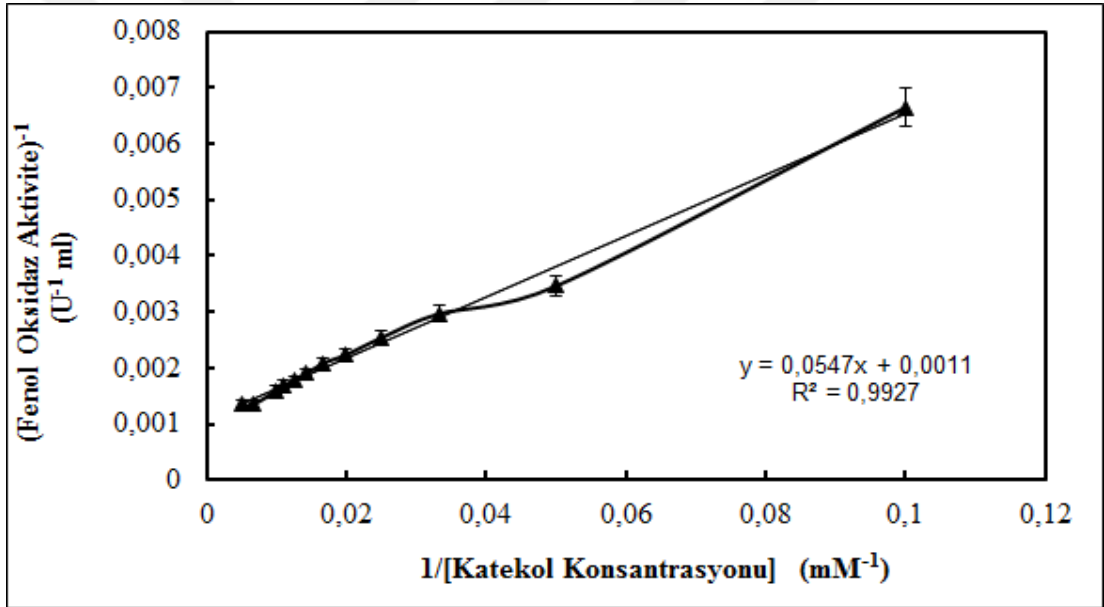
Rezene fenol oksidazına ait K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması için oluşturulan Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'de verilmiştir.

Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini belirten bu değerlerin hesaplanması amacıyla fenol oksidaz enzimi substratı olan katekolün 10 – 200 mM aralığındaki konsantrasyonlarında aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramından ($1/S$ 'ye karşı $1/V$) K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 49 mM ve 909,00 $\mu\text{mol/dak/ml}$ olarak bulundu.

Literatürde farklı bitki dokularından ekstrakte edilen fenol oksidazlar için katekole karşı ilgisini ifade eden K_M değerleri farklılık göstermektedir (Tablo 3.8). Buna göre rezene fenol oksidazının katekole ilgisi diğer bitkisel fenol oksidaz enzimlerine göre azdır (K_M değeri daha yüksektir).



Şekil 3.8. Katekol konsantrasyonunun fenol oksidaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis- Menten grafiği



Şekil 3.9. Fenol oksidaz enziminin Lineweaver–Burk Plot eğrisi

3.5.4. Substrat spesifite analizi

Biyokatalizör ihtiyacını karşılamak amacıyla fenol oksidaz enziminin katalitik özellikleri incelendi. Farklı substratlar varlığında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi ve bilinen bazı lakkaz substratları (ABTS, guaiacol, syringaldazine, hidrokinon) (Burton, 2003) ile *Trametes versicolor* lakkazı (Sigma) kullanarak karşılaştırma yapıldı. Tablo 3.9’da verilen bulgulara göre, rezene fenol oksidaz enzimi katekol, ABTS ve kafeik asit varlığında aktivite gösterdi. Ancak guaiacol oksidasyonunu gerçekleştirmedi.

T. versicolor lakkazı ise beklenildiği gibi tipik lakkaz substratı olarak bilinen ABTS ve guaiacolu okside edebildi. Buradan rezene fenol oksidazının genel olarak *o*- ve *p*-difenolik bileşikleri okside edebildiğini görmekteyiz.

Tablo 3.9. Rezene fenol oksidazının substrat spesifite analizi ve *T. versicolor* lakkaz ile karşılaştırılması

Substrat	Rezene fenol oksidazı %Bağlı aktivite ^a	<i>T. versicolor</i> lakkazı %Bağlı aktivite ^a
100 mM Katekol	100	-*
50 mM Kafeik asit ^b	63	-*
50 mM Kafeik asit ^c	31	-*
5 mM ABTS ^b	95	-*
5 mM ABTS ^c	-*	100
5 mM Guaiacol ^b	-*	-
5 mM Guaiacol ^c	-*	42

*Aktivite gözlenmedi; ^aYüzde bağlı aktivite enzim tarafından katalizlenen en yüksek aktivite değerinin her bir substratta ölçülen aktivite değerine bölünmesiyle hesaplandı; ^bfosfat tamponunda ölçülen aktivite; ^casetat tamponunda ölçülen aktivite

3.5.5. Organik çözücülerin enzim aktivite üzerine etkisi

Organik çözücülerin fenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Organik çözücüler proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Genelde proteindeki kovalent olmayan bağlar, iyonik gruplar ve dipoller, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi özellikleri değiştirirler.

Organik çözücülerin eklendiği reaksiyon ortamlarında genel olarak çözücü konsantrasyonunun artışına bağlı olarak aktivitede kademeli olarak azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma hemen hemen tüm çözücülerde (metanol hariç) en yüksek konsantrasyonda dahi %20'den fazla değildir (Tablo 3.10). Enzimin olumsuz yönde en fazla etkilendiği çözücü metanol olup %10 (v/v)'luk konsantrasyonda başlangıçtaki aktivitenin (çözücünün bulunmadığı ortamda ölçülen) %43'ü kaybolmuştur. Rezene fenol oksidazının katalizinin organik çözücülere olan dayanıklılığı DMSO > Etanol > Aseton > Metanol şeklindedir. Enzimin çözücülere olan dayanıklılığı iyi bir biyokatalizör olarak biyotransformasyon başta olmak üzere çeşitli uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 3.10. Farklı organik çözümlerin Rezene fenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücü	% v/v	Bağlı FO* aktivitesi (%)	Organik çözücü	% v/v	Bağlı FO* Aktivitesi (%)
Kontrol	0	100	Kontrol	0	100
Etanol	2,5	93	Aseton	2,5	93
	5	89		5	91
	7,5	84		7,5	90
	10	82		10	80
Metanol	2,5	70	DMSO	2,5	93
	5	64		5	86
	7,5	59		7,5	85
	10	57		10	84

*FO: Fenol oksidaz

3.5.6. İnhibitörlerin enzim aktivite üzerine etkisi

Fenol oksidaz inhibitörü olarak literatürde rapor edilen bileşiklerin (Walker ve McCallion, 1980; Rescigno ve diğ., 2002) aktivite üzerindeki etkileri katekol substratı varlığında analiz edildi. Tablo 4.11’de verilen sonuçlara göre SHAM (bakır uzaklaştırıcı ajan, Lim ve diğ., 1999; Rescigno ve diğ., 2002), lakkaz inhibitörü olarak bilinen CTAB (iyonik olmayan deterjan) ve katekol oksidaz inhibitörü olarak tanımlanan PVP varlığında inhibisyon gözlemlendi. SHAM, CTAB ve PVP inhibitörleri arasından Tablo 3.11’ de verilen sonuçlar dikkate alındığında en etkili inhibitör SHAM olarak belirlendi.

Rezene fenol oksidazı lakkaz substratı olan ABTS varlığında, PVP inhibitörü incelendiğinde katekol substratı kullanıldığına gözlenen sonuca benzer olarak yine inhibisyona uğradığı görülmektedir.

T. versicolor lakkazı ise beklendiği şekilde SHAM ve CTAB varlığında inhibe olmuş, ancak PVP tarafından aktivasyona uğramıştır. Rezene fenol oksidazı hem lakkaz hem de katekol oksidaz inhibitörlerinden (sırasıyla CTAB ve PVP) olumsuz yönde etkilenmiştir. Buradan rezene fenol oksidazının hem lakkaz hem de katekol oksidaz özelliklerini taşıdığını söyleyebiliriz.

Tablo 3.11. İnhibitörlerin rezene fenol oksidaz aktivite üzerine etkileri ve *T. versicolor* lakkazı ile karşılaştırılması

Substrat+İnhibitör	Rezene fenol Oksidazı		Rezene fenol oksidazı <i>T. versicolor</i> lakkazı	
	%Bağlı aktivite	Substrat+İnhibitör	%Bağlı aktivite	%Bağlı aktivite
100 mM Katekol (inhibitörsüz)	100	5 mM ABTS (inhibitörsüz)	100	100
+20 mM SHAM	18	+20 mM SHAM	-*	78
+25 mM SHAM	12	+25 mM SHAM	-*	66
+30 mM SHAM	-	+30 mM SHAM	-*	57
+35 mM SHAM	-	+35 mM SHAM	-*	51
+40 mM SHAM	-	+40 mM SHAM	-*	38
+45 mM SHAM	-	+45 mM SHAM	-*	34
+50 mM SHAM	-	+50 mM SHAM	-*	31
+20 mM PVP	85	+20 mM PVP	276	56
+25 mM PVP	81	+25 mM PVP	224	70
+30 mM PVP	74	+30 mM PVP	188	75
+35 mM PVP	68	+35 mM PVP	138	77
+40 mM PVP	60	+40 mM PVP	133	107
+45 mM PVP	59	+45 mM PVP	125	114
+50 mM PVP	55	+50 mM PVP	101	117
+20 mM CTAB	20	+20 mM CTAB	-*	-
+25 mM CTAB	12	+25 mM CTAB	-*	-
+30 mM CTAB	10	+30 mM CTAB	-*	-

*Ölçüm yapılmadı

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gıda olarak kullanılan Rezene (*Foeniculum vulgare*), Hünnap (*Zizyphus jujube*), Kişniş (*Coriandrum sativum*), Meyan (*Glycyrrhiza glabra*) ve Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) bitkilerinin dokularından elde edilen ham ekstraktlarda fenol oksidaz enziminin üretimine bakıldı ve bulgular en iyi fenol oksidaz kaynağı olarak bilinen kültür mantarı ile karşılaştırıldı. Test edilen bitkilerden sadece rezene tohumunda, kültür mantarına göre yaklaşık %238 daha fazla fenol oksidaz aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ekstraksiyon optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve 50 mg/mL PVP varlığında pH 6,0'da hazırlanan ekstraksiyon ortamında kültür mantarına göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla fenol oksidaz içeren ham ekstrakt eldesi sağlandı. Daha sonra ham özütten fenol oksidaz enziminin üçlü-faz ayırma sistemi ile saflaştırma denemeleri gerçekleştirildi. Buna göre, %65 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda hazırlanmış 1,0:0,5 oranında ham ekstrakt ve *t*-bütanol içeren pH'sı 6,0'ya ayarlanmış sistemden fenol oksidaz enzimi yaklaşık %120 aktivite geri kazanımla 2-kat saflaştırıldı. Saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapıldı ve alt ünitesinin molekül ağırlığı 21,8 kDa olarak hesaplandı. Aktivite boyama sonuçları enzimin hem lakkaz hem de katekol oksidaz aktivitesi gösterdiğine işaret etmektedir. Substrat spesifite ve inhibitör analiz sonuçları bu bulguyu desteklemiştir. Saf enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 70°C ve 7,0 olarak belirlendi. Enzim stabilitesinin sıcaklığa bağlı olarak azaldığı gözlenirken pH 6,0-8,0 arasında aktivitesinin yaklaşık %72 ila %77'sinin korunduğu gözlendi. Lineweaver-Burk diyagramından (1/S'ye karşı 1/V) K_m değeri 49 mM, V_{max} değeri ise 909,00 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak hesaplandı. Son olarak enzimin etanol, DMSO ve asetondan olumsuz yönde etkilenmediği görülürken çözümlere karşı ilgisi DMSO > Etanol > Aseton > Metanol şeklinde bulundu. Fenol oksidaz enziminin güvenilir, maliyeti düşük ve yüksek verimle çalışan bir ekstraksiyon yöntemi olarak tanımlanan Üçlü-Faz Ayırma (TPP) yöntemi kullanılarak saflaştırılması endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Karakterize edilen enzimin artan reaksiyon sıcaklıklarında aktivitesinin düşmediği aksine enzim aktivitesinin arttığı gözlendi, ancak enzimin artan sıcaklığa karşı stabilitesinin azalması endüstriyel uygulamalarda

çalışılan sürenin uzaması gibi olumsuz durumlara karşı bir dezavantaj özelliği taşımaktadır. Bunun yanısıra pH aralığı incelendiğinde, enzim aktivitesinin reaksiyon ve stabilite özelliklerini geniş sayılabilecek pH aralıklarında koruduğu gözlendi ve bu durumun endüstriyel uygulamalarda çalışılan sürenin uzaması gibi olumsuz durumlara karşı bir avantaj özelliği taşıdığı düşünölmektedir. Önem taşıyan diğer bir husus ise enzim aktivitesinin farklı organik çözücölere karşı olumsuz yönde etkilenmediğinin görölmesidir. Enzimin aktivite boyama sonuçları ile hem lakkaz hem de katekol oksidaz aktivitesi gösterdiğine işaret etmektedir. Substrat spesifite ve inhibitör analiz sonuçları bu bulguyu desteklemiştir. Gelecek çalışmalarda daha farklı metodlar kullanılarak enzimin daha saf halinin elde edilmesi amaçlanabilir. X-ışını kristolografisi yöntemleri ile enzimin üç boyutlu yapıları oluşturularak moleküler düzeyde analiz yapılabilir.

KAYNAKLAR

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., Reactive Oxygen Species and Superoxide Dismutases: Role in Joint Diseases, *Joint Bone Spine*, 2007, **74**(4), 324–329.

Akardere E., Ozer B., Celem E. B., Onal S., Three-Phase Partitioning of Invertase from Baker's Yeast, *Separation and Purification Technology*, 2010, **72**(3), 335–9.

Alici E. H., Arabaci G., Purification of Polyphenol Oxidase from Borage (*Trachystemon orientalis* L.) by Using Three-Phase Partitioning and Investigation of Kinetic Properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **93**, 1051–6.

Aly A. M., Al-Alousi L., Salem H. A., Licorice: A Possible Antiinflammatory and Anti-Ulcer Drug, *AAPS PharmSciTech*, 2005; **20**(6), 74–82.

Andreasen M. F., Kroon P. A., Williamson G., Garcia-Conesa M. T., Intestinal Release and Uptake of Phenolic Antioxidant Diferulic Acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, **31**(3) 304–314.

Antmen E., β Talasemide Oksidatif Stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2005, 164732.

Ardestani A., Yazdanparast R., Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of Achillea Santolina Extracts, *Food Chemistry*, 2007, **104**(1), 21–29.

Asl M. N., Hosseinzadeh H., Review of Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza sp.* and its Bioactive Compounds, *Phytother Res*, 2008, **22**(6), 709–724.

Aydemir T., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, *Food Chemistry*, 2004, **87**(1), 59–67.

Bayraktar H., Önal S., Concentration and Purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by Three-Phase Partitioning, *Separation and Purification Technology*, 2013, **118**, 835–41.

Bertrand, Sur la Laccase et sur le Pouvoir Oxydant de Cette Diastase, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1985, **120**, 266–9.

Bilia A. R., Fumarola M., Gallori S., Mazzi G., Vincieri F. F., Identification by HPLC–DAD and HPLC–MS Analyses and Quantification of Constituents of Fennel Teas and Decoctions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**(10), 4734–4738.

Blum H., Beier H., Gross H. J., Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, *Electrophoresis*, 1987, **8**, 93–9.

Bradford M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**, 248–54.

Buettner G. R., The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, Alpha-Tocopherol, and Ascorbate, *Arch Biochem Biophys*, 1993, **300**(2), 535–543.

Burton S. G., Laccases and Phenol Oxidases in Organic Synthesis—a Review, *Current Organic Chemistry*, 2003, **7**, 1317–31.

Camejo-Rodrigues J., Ascensão L., Bonet M. À., Vallès J., An Ethnobotanical Study of Medicinal and Aromatic Plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal), *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, **89**(2-3), 199–209.

Cantore P. L., Iacobelli N. S., Marco A., Capasso F., Senatore F., Antibacterial Activity of *Coriandrum sativum* L., and *Foeniculum vulgare* Miller Var Vulgare (Miller) Essential Oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, **52**, 7862–7866.

Cao G., Prior R. L., In Vivo Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **27**, 1173–1181.

Carvalho A. M., Plantas, Tradición y Saber Popular Enun Territorio del Nordeste de Portugal, Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho, PhD. Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, 2005.

Cash T. P., Pan Y., Simon M. C., Reactive Oxygen Species and Cellular Oxygen Sensing, *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, **43**, 1219–1225.

Caton P. W., Potheary M. R., Lees D. M., Khan N. Q., Wood E. G., Shoji T., Kanda T., Rull G., Corder R., Regulation of Vascular Endothelial Function by Procyanidin-Rich Foods and Beverages, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, **58**, 4008–4113.

Chaudhry N. M. A., Tariq P., Bactericidal Activity of Black Pepper, Bay Leaf, Aniseed and Coriander Against Oral Isolates, *Pakistan Journal of Pharmacology and Science*, 2006, **19**(3): 214–218.

Chaudiere J., Ferrari-Iliou R., Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 1999, **37**, 949–962.

Chisari M., Barbagallo R. N., Spagna G., Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit, *Agric Food Chem*, 2007, **55**, 3469–3476.

Chithra V., Leelamma S., *Coriandrum sativum* Effect on Lipid Metabolism in 1,2-Dimethyl Hydrazine Induced Colon Cancer, *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, **71**, 457-463.

Christensen L. P., Brandt K., Bioactive Polyacetylenes in Food Plants of the Apiaceae Family: Occurrence, Bioactivity and Analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **41**(3), 683–693.

Çalimli A., Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Ankara, 2006.

Çapanoğlu E., Boyacıoğlu D., Meyve ve Sebzelerin Flavonoid İçeriği Üzerine İşlemenin Etkisi, *Akademik Gıda*, 2009, **7**, 41-46.

Çesko C., *Paulownia tomentosa*'dan Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Çeşitli Bitki Özüleri ile İnhibisyonu, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2018, 513588.

Çetin A., *Scolymus Hispanicus* L. (Asteraceae)'un In Vitro Antioksidan Özelliklerinin Farklı Metotlar ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2012, 315928.

D'Angelo S., Morana A., Salvatore A., Zappia V., Galletti P., Protective Effect of Polyphenols from *Glycyrrhiza glabra* Against Oxidative Stress in Caco-2 Cells, *Journal of Medicinal Food*, 2009, **12**, 1326–33.

Dalmadi I., Rapeanu G., Van Loey A., Smout C., Hendrickx M., Characterization and Inactivation by Thermal and Pressure Processing of Strawberry (*Fragaria ananassa*) Polyphenol Oxidase: A Kinetic Study, *Journal of Food Biochemistry*, 2006, **30**, 56–76.

Dennison C., Lovrein R., Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins, *Protein Expression and Purification*, 1997, **11**, 149–61.

Dogan S., Dogan M., Determination of Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), *Food Chemistry*, 2004, **88**, 69–77.

Doğan A., Akgün A., Kişniş Üretimi, Bileşimi ve Kullanımı, *Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 1987, **2**, 326-333.

Doğan M., Arslan O., Doğan S., Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Different Aubergine Tissues (*Solanum melongena* var. *insanum*, *Solanum melongena* var. *falcatum* and *Solanum melongena* var. *zhukovskyi*), *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, **37**, 415–23.

Duman Y., Kaya E., Purification and Recovery of Invertase from Potato Tubers by Three Phase Partitioning and Determination of Kinetic Properties of Purified Enzyme, *Turkish Journal of Biochemistry*, 2014, **39**, 443–8.

Durán N., Esposito E., Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review, *Applied Catalysis B: Environmental*, 2000, **28**, 83-99.

Emamghoreishi M., Khasaki M., Aazam M. F., *Coriandrum sativum*: Evaluation of its Anxiolytic Effect in the Elevated Plus-Maze, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **96**, 365-370.

Esin Çelik S., Özyürek M., Altun M., Bektaolu B., Güçlü K., Berker K. I., Özgökçe F., Reşat A., Antioxidant Capacities of Herbal Plants Used in the Manufacture of Van Herby Cheese: “Otlu Peynir”, *International Journal of Food Properties*, 2008, **11**, 747–61.

Eslava J. C., Arroyo S. G., Pietrini R. V., Aguirre J. J. E., Antimutagenicity of Coriander (*Coriandrum sativum*) Juice on the Mutagenesis Produced by Plant Metabolites of Aromatic Amines, *Toxicology Letters*, 2004, **153**(2), 283-292.

Esmâ H. A., Gülnur A., Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) Bitkisi Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Metallerin Etkisi, *SAÜ. Fen Bil. Der.*, 2013, **17**(3), 399-405.

Fang C., Wang C., Xiong Y. L., Pomper K. W. J., Extraction and Characterization of Polyphenol Oxidase in Pawpaw (*Asimina triloba*) Fruit, *Food Biochem*, 2007, **31**, 603-620.

Farver O., Pecht J., In Copper Proteins and Copper Enzymes (CRC. ,Boca raton), 1984, **1**, 183.

Fattouch S., Caboni P., Coroneo V., Tuberoso C. I. G., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., Cabras P., Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**, 963–9.

Fiore C., Eisenhurt M., Krausse R., et al., Antiviral Effects of Glycyrrhiza Species, *Phytother Res*, 2008, **22**, 141–148.

Francisco J., Enguita, Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases, *Mycofactories*, 2011, 57-72.

Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nomura T., Antimicrobial Activity of Licorice Flavonoids Against Methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, *Fitoterapia*, 2002, **73**, 536–539.

Gagaoua M., Three-Phase Partitioning as an Efficient Method for the Purification and Recovery of Ficin from Mediterranean Fig (*Ficus carica* L.) Latex, *Separation and Purification Technology*, 2014, **132**, 461-467.

Gao Q. H., Wu C. S., Wang M., The Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Fruit: A Review of Current Knowledge of Fruit Composition and Health Benefits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**, 3351–63.

Gerdemann C., Eicken C., Krebs B., The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins, *Accounts of Chemical Research*, 2002, **35**(3), 183-91.

Gonzalez E. M., de Ancos B., Pilar-Cano M., Partial Characterization of Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Blackberry Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**, 5459–5464.

Görünmezoğlu Ö., Kayısı ve İncir Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2008, 216909.

Griffith G. W., Phenoloxidases, *Progress in Industrial Microbiology*, 1994, **29**, 763-788.

Gulcin I., Küfrevioğlu O. İ., Oktay M., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and Inhibitory Effects of some Chemicals on Enzyme Activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2005, **20**, 297–302.

Guo S., Duan J. A., Tang Y. P., Zhu Z. H., Qian Y. F., Yang N. Y., Shang E. X., Qian D. W., Characterization of Nucleosides and Nucleobases in Fruits of *Ziziphus jujuba* by UPLC-DAD-MS, *J. Agric. Food Chem*, 2010, **58**, 10774–10780.

Gutteridge J. M. C., Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clin. Chem*, 1995, **41**, 1819-1828.

Güray M. Z., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Thermophilic *Bacillus sp.*, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009, 251048.

Halliwell B., Vitamin C: Poison, Prophylactic or Panacea?, *Trends Biochem Sci*, 1999, **24**, 255–259.

Halliwell B., Aruoma O. I., DNA Damage by Oxygen-Derived Species: its Mechanisms and Measurement in Mammalian Systems, *FEBS Letters*, 1991, **281**, 9-19.

Huang Y. L., Yen G. C., Sheu F., Chau C. F., Effects of Watersoluble Carbohydrate Concentrate from Chinese Jujube on Different Intestinal and Fecal Indices, *J. Agric. Food Chem*, 2008, **56**, 1734–1739.

Hughes A. L., Evolution of the Arthropod Prophenoloxidase/ Hexamerin Protein Family, *Immunogenetics*, 1999, **49**, 106-114.

Jovonovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G., Flavonoids as Antioxidants, *J.Am.Chem. Soc.*, 1984, **116**, 4846-4851.

Kahkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M., Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 3954-3962.

Kanade S. R., Suhas V. L., Chandra N., Gowda L. R., Functional Interaction of Diphenols with Polyphenol Oxidase. Molecular Determinants of Substrate/Inhibitor Specificity, *FEBS J.*, 2007, **274**, 4177-4187.

Kaptan Y., Utilization of *Scytalidium thermophilum* Phenol Oxidase in Biorganic Syntheses, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004, 153425.

Kaur C., Kapoor H. C., Anti-Oxidant Activity and Total Phenolic Content of some Asian Vegetables, *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, **37**(2), 153-161.

Kavrayan D., Aydemir T., Partial Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from Peppermint (*Mentha piperita*), *Food Chemistry*, 2001, **74**, 147-54.

Kobæk-Larsen M., Christensen L. P., Vach W., Ritskes-Hoitinga J., Brandt K., Inhibitory Effects of Feeding with Carrots or (-)-Falcarinol on Development of Azoxymethane-Induced Preneoplastic Lesions in the Rat Colon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(5), 1823-1827.

Kouakou T. H., Kouadio Y. J., Kouamé P., Waffo-Téguo P., Décendit A., Mérillon J.M., Purification and Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidases from Embryogenic and Nonembryogenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cells, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, **158**(2), 285-301.

Kubo I., Fujita K. I., Kubo A., Hihei K. I., Ogura T., Antibacterial Activity of Coriander Volatile Compounds Against *Salmonella choleraesuis*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, **52**(11): 3329-3332.

Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-5.

Lal A. A. S., Tkumar P. B. M., Pillai K. S., Hypolipidemic Effect of *Coriandrum sativum* L. In Triton-Induced Hyperlipidemic Rats, *Indian Journal of Experimental Biology*, 2004, **42**, 909-912.

Li J., Fan L., Ding S., Ding X., Nutritional Composition of Five Cultivars of Chinese Jujube, *Food Chem*, 2007, **103**, 454-460.

Lim J. Y., Ishiguro K., Kubo I., Tyrosinase Inhibitory Pcoumaric Acid from Ginseng Leaves, *Phytotherapy Research*, 1999, **13**, 371–5.

Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of the American Chemical Society*, 1934, **56**, 658–66.

Martín R. A. P., Hortigüela L. V., Lozano P. L., Cortina M. D. R., Carretero C.de L., In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Spanish Honeys, *International Journal of Food Properties*, 1979, **11**, 727–37.

Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J.K., Comparative Analysis of Polyphenol Oxidase from Plant and Fungal Species, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, **100**, 108–123.

Mate D. M., Alcalde M., Laccase engineering: From Rational Design to Directed Evolution, *Biotechnology Advances*, 2015, **33**(1), 25–40.

Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., et al., Crystallographic Evidence that the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase is Flexible During Catalysis, *J Biol Chem*, 2006, **281**, 8981-90.

Mayer A. M., Polyphenol Oxidases in Plants and Fungi: Going Places? A Review, *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2318–2331.

Mayer A.M., Staples R.C., Laccase: New Function for an Old Enzyme, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 551-565.

Memişoğulları R., Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, **3**, 30-39.

Mercan U., Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, **15**(1-2), 91-96.

Mothershaw A. S., Jaffer T., Antimicrobial Activity of Foods with Different Physico-Chemical Characteristics, *International Journal of Food Properties*, 2004, **7**, 629–38.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C., Natural Antioxidants from Residual Sources, *Food Chem*, 2001, **72**, 145-171.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., *Harper'in Biyokimyası*, 24 baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 1996.

Naik G. H., Priyadarsani K. I., Satav J. G., et al., Comparative Antioxidant Activity of Individual Herbal Compounds Used in Ayurvedic Medicine, *Phytochemistry*, 2003, **63**, 97–104.

Narayan A. V., Madhusudhan M. C., Raghavarao K. S. M. S., Extraction and Purification of *Ipomoea* Peroxidase Employing Three-Phase Partitioning, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, **151**, 263–72.

Neo Y. P., Ariffin A., Tan C. P., Tan Y. A., Phenolic Acid Analysis and Antioxidant Activity Assessment of Oil Palm (*E. guineensis*) Fruit Extracts, *Food Chemistry*, 2010, **122**, 353–359.

Novais M., Santos I., Mendes S., Pinto-Gomes C., Studies on Pharmaceutical Ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal), *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, **93**(2-3), 183–195.

Novotni D., Curic D., Bituh M., Colic Baric I., Skevin D., Cukelj N., Glycemic Index and Phenolics of Partially-Baked Frozen Bread with Sourdough, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2011, **62**, 26–33.

Oktay M., Küfrevolu I., Kocaçalışkan I., Şakiroğlu H., Polyphenoloxidase from Amasya Apple, *Journal of Food Science*, 1995, **60**, 494–6.

Outlaw W. H., Zhang S. Q., Riddle K. A., Womble A. K., Anderson L. C., Outlaw W.M., Outlaw N.N., Outlaw E.C., Thistle A.B., The Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.), A Multi Purpose Plant, *Econ. Bot.*, 2002, **56**, 198–200.

Ögel Z. B., Yuzugullu Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir A. S., Production, Properties and Application to Biocatalysis of a Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase from the Thermophilic Fungus *S. thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**, 853–62.

Özen A., Colak A., Dincer B., Güner S., A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.; Ebenaceae), *Food Chemistry*, 2004, **85**, 431–7.

Özer B., Akardere E., Çelem E. B., Önal S., Three-Phase Partitioning as a Rapid and Efficient Method for Purification of Invertase from Tomato, *Biochemical Engineering Journal*, 2010, **50**, 110–5.

Özcan O, Erdal H., Çakırca G., Yönden Z., Oxidative Stress and its Impacts on Intracellular Lipids, Proteins and DNA, *J Clin Exp Invest.*, 2015, **6**(3), 331-6.

Özkaya A., Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin ve Ellagik Asidin Etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 2007, 212136.

Öztaş D., Tirozinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 201019.

Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Apak R., Hydroxyl Radical Scavenging Assay of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method Using Catalase for Hydrogen Peroxide Degradation, *Analytica Chimica Acta*, 2008, **616**, 196–206.

Palma-Orozco G., Ortiz-Moreno A., Dorantes-Álvarez L., Sampedro J. G., Nájera H., Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mamey (*Pouteria sapota*), *Phytochemistry*, 2011, **72**(1), 82–88.

Papagiannopoulos M., Wollseifen H. R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R. Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UVESI/MSN, *J. Agric. Food Chem*, 2004, **52**, 3784–3791.

Parejo I., Jauregui O., Sánchez-Rabaneda F., Viladomat F., Bastida J., Codina C., Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography–Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**(12), 3679–3687.

Pektaş İ., Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2009, 245516.

Pike R. N., Dennison C., Protein Fractionation by Three Phase Partitioning (TPP) in Aqueous/t-butanol Mixtures, *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **33**, 221–8.

Primikyri A., Chatziathanasiadou M. V., Karali E., Kostaras E., Mantzaris M. D., Hatzimichael E., Shin J. S., Chi S. W., Briasoulis E., Kolettas E., et al., Direct Binding of Bcl-2 Family Proteins by Quercetin Triggers its Pro-Apoptotic Activity, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 2737–2741.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F., Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J. Agr. Food Chem*, 2000, **48**, 3396–3402.

Rachana C. R., Lyju J. V., Three Phase Partitioning – A Novel Protein Purification Method, *International Journal of Chemtech Research*, 2014, **6**, 3467–3472.

Ramos S., Cancer Chemoprevention and Chemotherapy: Dietary Polyphenols and Signalling Pathways, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, **52**, 507–526.

Ravikiran B., Mahalakshmi R., Unusual Post-Translational Protein Modifications: the Benefits of Sophistication, *RSC Adv.*, 2014, **4**(64), 33958–33974.

Rescigno A., Sanjust E., Montanari L., Sollai F., Soddu G., Rinaldi A. C., Oliva S., Rinaldi A., Detection of Laccase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase on a Single Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Analytical Letters*, 1997, **30**, 2211–20.

Rescigno A., Sollai F., Pisu B., Rinaldi A., Sanjust E., Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2002, **17**, 207–18.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends in Plant Science*, 1997, **2**, 152-159.

Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Büldt-Karentzopoulos K., Magrini A., Eicken C., Gerdemann C., Krebs B., Substrate Specificity of Catechol Oxidase from *Lycopus europaeus* and Characterization of the Bioproducts of Enzymic Caffeic Acid Oxidation, *FEBS Letters*, 1999, **445**, 103-110.

Russell W., Duthie G., Plant Secondary Metabolites and Gut Health: The Case for Phenolic Acids, *Proceedings of the Nutrition Society*, 2011, **70**(3), 389–396.

Samojlik I., Lakic N., Mimica-Dukic N., Dakovic-Svajcer K., Bozin B., Antioxidant and Hepatoprotective Potential of Essential Oils of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and Caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**, 8848–53.

Santayana M. P., Tardío J., Blanco E., Carvalho A., Lastra J., San Miguel E., Morales R., Traditional Knowledge of Wild Edible Plants Used in the Northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a Comparative Study, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2007, **3**(1), 27.

Sellés-Marchart S., Casado-Vela J., Bru-Martinez R., Isolation of a Latent Polyphenoloxidase from Loquat Fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic Characterization and Comparison with the Active Form, *Arch Biochem Biophys*, 2006, **446**, 175–185.

Shahidi F., Ambigaipalan P., Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects: a Review, *J. Funct. Foods*, 2015, **18**, 820-897.

Shahidi F., Antioxidants in Food and Food Antioxidants, *Nahrung*, 2000, **44**, 158-163.

Shahidi F., Naczki M., Food Phenolics Sources Chemistry Effects Applications, *Technomic Publication*, 1995, 235-277.

Shahidi F., Wanasundara K.J., Critical Reviews in Food Science, *Nutrition*, 1992, **32**(1), 67.

Shahidi F., Zhong Y., Lipid Oxidation and Improving the Oxidative Stability, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**(11), 4067.

Shahidi F., Natural Antioxidants, *Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.

Sharma A., Gupta M. N., Purification of Pectinases by Three-Phase Partitioning, *Biotechnology Letters*, 2001, **23**, 1625–7.

Sharma K. K., Kuhad R. C., Laccase: Enzyme Revisited and Function Redefined, *Indian Journal of Microbiology*, 2008, **48**, 309–316.

Singh R. K., Gourinath S., Sharma S., Roy I., Gupta M. N., Betzel C. H., Srinivasan A., Singh T. P., Enhancement of Enzyme Activity Through Three-Phase Partitioning: Crystal Structure of a Modified Serin Protease at 1.5Å Resolution, *Protein Engineering, Design and Selection*, 2001, **14**, 307–13.

Simon R. A., Adverse Reactions to Food Additives, *Curr Allergy Asthma Rep*, 2003, **3**, 62–66.

Sies H., Schewe T., Heiss C., Kelm M., Cocoa Polyphenols and Inflammatory Mediators, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, **81**, 304–312.

Smith D., Montgomery M. W., Improved Methods for Extraction of Polyphenol Oxidase from D'Anjou Pears, *Phytochemistry*, 1985, **24**, 901–4.

Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, Characterization, and Identification of a Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Application of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407–15.

Sutay Kocabas D., Ogel Z. B., Bakir U., Screening of Tree Leaves as Annual Renewable Green Biomass for Phenol Oxidase Production and Biochemical Characterization of Mulberry (*Morus alba*) Leaf Phenol Oxidases, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, **27**, 701–7.

Sutay D., Isolation, Characterization and Immobilization of Polyphenol Oxidases from Mulberry (*Morus alba*) Leaf Tissues, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Entitüsü, Ankara, 2003, 143440.

Şen A., Eryılmaz M., Bayraktar H., Önal S., Purification of α -galactosidase from Pepino (*Solanum muricatum*) by Three-Phase Partitioning, *Separation and Purification Technology*, 2011, **83**, 130–6.

Tang S. Y., Whiteman M., Peng Z. F., Jenner A., Yong E. L., Halliwell B., Characterization of Antioxidant and Antiglycation Properties and Isolation of Active Ingredients from Traditional Chinese Medicines, *Free Radic Biol Med*, 2004, **36**, 1575–1587.

Tardío J., Pardo-De-Santayana M., Morales R., Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2006, **152**(1), 27–71.

Tura D., Roberts K., Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants”, *Journal of Chromatography A*, 2002, **975**, 71–93.

URL-1: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/herbs-and-spices/health-benefits-of-fennel.html>, (Ziyaret tarihi: 14 Haziran 2019).

URL-2: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/fruit/jujube.html>, (Ziyaret tarihi: 14 Haziran 2019).

URL-3: <https://www.georgiopolihotels.com/creta-carob/>, (Ziyaret tarihi: 14 Haziran 2019).

URL-4: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/herbs-and-spices/coriander-substitutes.html>, (Ziyaret tarihi: 14 Haziran 2019).

URL-5: <https://bitkidiyari.wordpress.com/2016/08/19/meyan-koku-nerelerde-kullanilir/>, (Ziyaret tarihi: 14 Haziran 2019).

Ünal M. U., Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*), *Food Chemistry*, 2007, **100**, 909–13.

Kumar V. V., Sathyaselvabala V., Premkumar M. P., Vidyadevi T., Sivanesan S., Biochemical Characterization of Three Phase Partitioned Laccase and its Application in Decolorization and Degradation of Synthetic Dyes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, **74**, 63-72.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, **39**, 44-84.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 2006, **160**, 1-40.

Vejdani R., Shalmani H. R. M., Fattahi M. M., Nia F. S., Abdollahi M., Zali M. R., Alizadeh A. H. M., Bahari A., Amin G., The Efficacy of an Herbal Medicine, Carmint, on the Relief of Abdominal Pain and Bloating in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Pilot Study, *Digestive Diseases and Sciences*, 2006, **51**(8): 1501-1507.

Vishwasrao C., Chakraborty S., Ananthanarayan L., Partial Purification, Characterisation and Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Polyphenol Oxidase Isolated from Kalipatti Sapota (*Manilkara Zapota*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, **97**(11), 3568–3575.

Waheed A., Miana G. A., Ahmad S. I., Khan M. A., Clinical Investigation of Hypoglycemic Effect of *Coriandrum Sativum* in Type-2 (NIDDM) Diabetic Patients, *Pakistan Journal of Pharmacology*, 2006, **23**(1): 7-11.

Walker J. R. L., McCallion R. F., The Selective Inhibition of Ortho- and Para-Diphenol Oxidases, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 373–7.

Wang J., Jiang W., Wang B., Liu S., Gong Z., Luo Y., Partial Properties of Polyphenol Oxidase in Mango (*Mangifera indica* L. CV. "Tainong") Pulp, *Journal of Food Chemistry*, 2007, **31**, 45–55.

Wangensteen H., Samuelsen A. B., Malterud K. E., Antioxidant Activity in Extracts from Coriander, *Food Chemistry*, 2004, **88**, 293-297.

Wati R. K., Theppakorn T., Benjakul S., Rawdkuen S., Three-Phase Partitioning of Trypsin Inhibitor from Legume Seeds, *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 1307–14.

Williams G. M., Iatropoulos M. J., Whysner J., Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives, *Food Chem Toxicol*, 1999, **37**, 1027-1038.

Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C., Flavonoids: Antioxidants or Signaling Molecules?, *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, **36**, 838–849.

Woodall A. A., Britton G, Jackson M. J., Carotenoids and Protection of Phospholipids in Solution or in Liposomes Against Oxidation by Peroxyl Radicals: Relationship between Carotenoid Structure and Protective Ability, *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1336**, 575–586.

Yamamoto K., Yoshitama K., Teramoto S., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Callus Cultures of *Portulaca Grandiflora*, *Plant Biotechnol*, 2002, **19**, 95-101.

Yang M. H., Lin H. J., Choong Y. M., A Rapid Gas Chromatographic Method for Direct Determination of BHA, BHT and TBHQ in Edible Oils and Fats, *Food Res Int*, 2002, **35**, 627–633.

Yanishlieva N. V., Marinova E. M., Stabilisation of Edible Oils with Natural Antioxidants, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2001, **103**, 752–67.

Yoshida H., Chemistry of Lacquer (Urushi) Part 1, *Journal of Chemical society*, 1883, **43**, 472– 86.

Yoshino M., Murakami K., Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds: Application to Antioxidant Characterization., *Anal Biochem*, 1998, **257**, 40-44.

Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M., Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 1619–1624.

Yu L., Perret J., Harris M., Wilson J., Haley S., Antioxidant Properties of Bran Extracts from “Akron” Wheat Grown at Different Locations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 1566–1570.

Yuzugullu Karakus Y., Acemi A., Işık S., Duman Y. Purification of Peroxidase from *Amsonia Orientalis* by Three-Phase Partitioning and its Biochemical Characterization, *Separation Science and Technology*, 2018, **53**, 756–66.

Zidorn C., Jöhrer K., Ganzera M., Schubert B., Sigmund E. M., Mader J., Stuppner H., Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(7), 2518–2523.

Xu J., Zheng T., Meguro S., Kawachi S., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Henry Chestnuts (*Castanea Henryi*), *Journal of Food Science*, 2004, **50**, 260–5.





EKLER

Ek-A

Solüsyonların Hazırlanışı

0,1 M Sitrata tamponu pH 3,0

Sodyum sitrat 2,713 g

Sitrik asit 17,437 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 3,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrata tamponu pH 4,0

Sodyum sitrat 9,838 g

Sitrik asit 12,782 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 4,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrata tamponu pH 5,0

Sodyum sitrat 16,963 g

Sitrik asit 8,127 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 5,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 6,0

Monobazik 13,68 g

Dibazik 3,30 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 6,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7,0

Monobazik 6,08 g

Dibazik 16,34 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 M Tris Tamponu, pH 8,0

Tris 12,114 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 8,0'a ayarlanır.

0,1 M Glisin sodyum hidroksit Tamponu, pH 9,0 (pH 9- pH 10)

Glisin 0,66 g

Sodyum hidroksit 0,046 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 9,0'a ayarlanır.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE Elektroferez jeli için;

%15 (h/h) ayırma jeli

%30 Akrilamid – 2,5 ml

1,5 Tris-HCl [pH 8,8] – 1,25 ml

ddH₂O – 1,18 ml

%20 SDS – 0,025 ml

%10 APS – 0,050 ml

Ek-A (Devam)

TEMED – 0,005 ml
%5 (h/h) yükleme jeli
%30 Akrilamid – 830 µL
1 M Tris-HCl [pH 6,8] – 630 µL
ddH₂O – 3,4 ml
%20 SDS – 0,025 ml
%10 APS – 0,050 ml
TEMED – 0,005 ml

%10 h/h APS (Amonyumpersülfat)

10 g APS tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80°C’de muhafaza edilir.

Jel Yükleme Tamponu

%20 SDS – 2 ml
1 M Tris-HCl – 1 ml
Gliserol – 1 ml
Mercaptoethanol – 1 ml
Bromophenol

Mercaptoethanol dışındaki diğer tüm kimyasallar karıştırılır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir. Jel yükleme tamponu kullanılacağı zaman 200 µL sample buffer için 50 µL mercaptoethanol olacak şekilde Mercaptoethanol bu karışıma eklenir.

10x Running Buffer

30 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülür. pH 8,3’e ayarlanıp 4°C’de saklanır. Jeli yürütme esnasında bu solüsyondan 100 ml alınır ve üzerine 900 ml distile su ilave edilerek karıştırılır. Sonrasında elektroforez tankına aktarılarak jel yürütülür.

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre)

2,5 g Coomassie Blue, 450 ml metanol içerisinde 1 gece boyunca çözdürülür. 70 ml Asetik Asit ve 480 ml distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 4°C’de saklanır.

Destain Solüsyonu (1 litre)

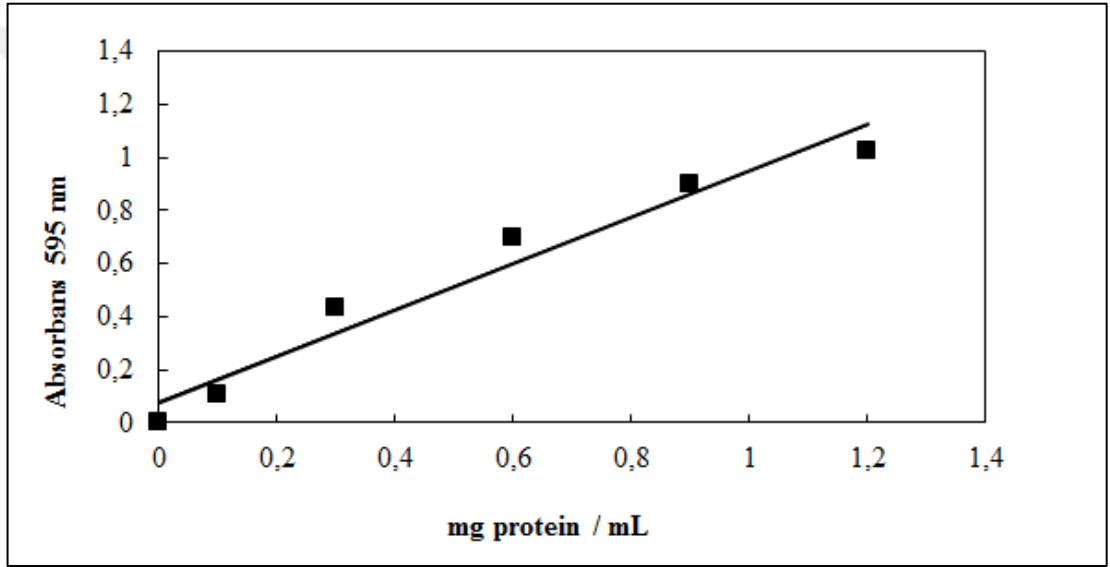
250 ml Metanol, 150 ml Asetik Asit, 675 ml distile su, koyu renkli şişede karıştırıldıktan sonra 4°C’ye saklanılmak üzere kaldırılır.

1,5 M Tris HCl Tamponu, 100 ml (pH 8.8)

18,5 g Tris Base; 0,4 g SDS 80 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 M HCl ile pH 8,7 ‘ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4°C’de saklanır.

Ek-B

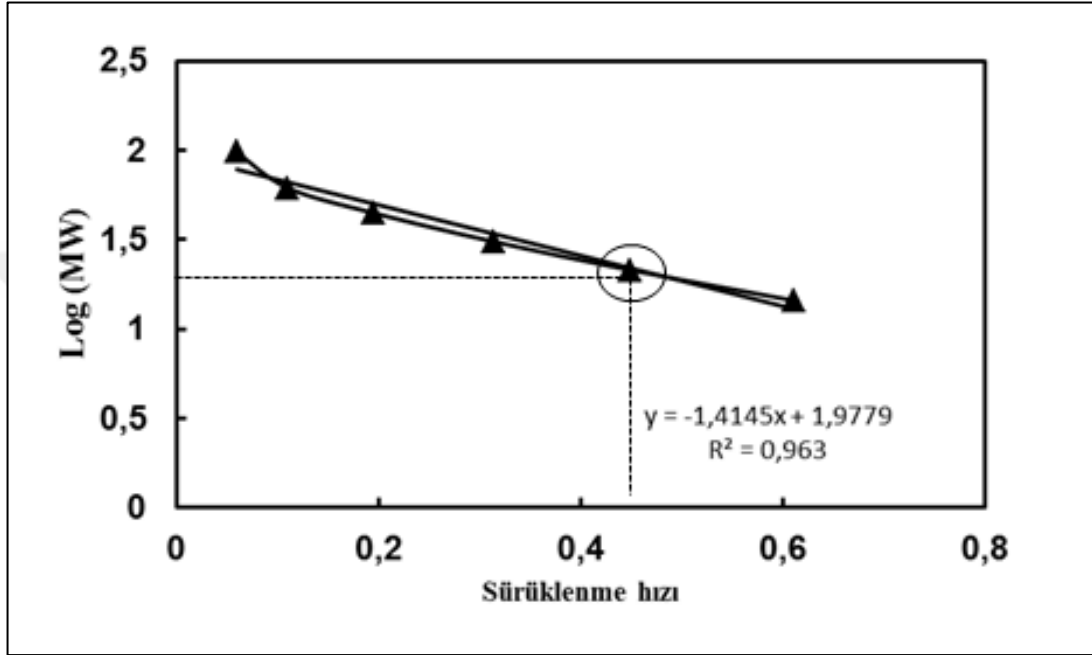
Protein miktarının belirlenmesi için standart protein olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Stok BSA çözeltisi (2 mg/mL) aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde standart protein çözeltiler, hazırlandı. Numarlandırılmış olan 2 mL'lik ependorflara, farklı BSA konsantrasyonlarından 100 µL ve 1.5 ml Bradford reaktifi (expedon, Bradford Ultra Protein Assay) eklendi. 10 dak oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm gerçekleştirilerek standart eğri oluşturuldu (Şekil E.1).



Şekil E.1. Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi

Ek-C

Saflaştırılmış rezene fenol oksidazının moleküler ağırlığını tespit etmek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Analiz sonrası örneğe ait molekül ağırlığının hesaplanması aşağıdaki grafik ile gerçekleştirildi ve yaklaşık 21,8 kDa civarında tek bir bant gözlemlendi (Şekil E.2).



Şekil E.2. Molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan grafik

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Yıldırım B., Yüzügüllü Karakuş Y., ‘Rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumundan fenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu’, *Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi (Bahar) 2019 Bildiriler Kitabı Cilt I (Fen Bilimleri)*, s11.



ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kocaeli'de tamamladı. 2012 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

