

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOCAELİ İLİNDEN TOPLANAN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

BÜŞRA KAHVECİ

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAELİ İLİNDEN TOPLANAN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

BÜŞRA KAHVECİ

Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ

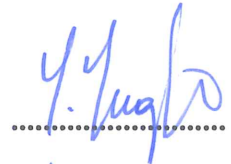
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç. Dr. Özlem AKSOY

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Dr. Öğr. Üyesi Nuray VAROL

Jüri Üyesi, Afyonkarahisar Sağlık Bil. Üniv.







Tezin Savunulduğu Tarih: 16.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Fenolik madde içeriği bakımından zengin olan birçok besin grubu doğal PPO (Polifenol oksidaz) kaynağı olarak kullanılmakta ve çeşitli araştırmalara dahil edilmektedir. PPO'lardan ilaç, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda yararlanılmaktadır. Bu çalışmada zengin PPO kaynağı olan mantara alternatif olarak kullanılacak bir bitki türünün tespit edilip enzim karakterizasyonunun gerçekleştirilmesinin yanı sıra kullanılan yöntemle de daha avantajlı, güvenilir ve kolay enzim preperasyonu yapılmasına olanak sağladığına inanılmaktadır.

“ Kocaeli ilinden toplanan bazı tıbbi bitkilerde polifenol oksidaz enziminin taranması ve biyokimyasal karakterizasyonu ” adlı yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, danışmanım, Dr. Öğr. Üyesi Yonca Yüzügüllü Karakuş'a, bu çalışmayı gerçekleştirirken laboratuvarında çalışmama müsaade eden Sayın Prof. Dr. Fazıl Özen'e, bu çalışma için gerekli bitki materyallerinin toplanıp, tür teşhisinin yapılmasında ve çalışmamla ilgili çeşitli konularda yardımını esirgemeyen Sayın Ar. Gör. Dr. Arda Acemi'ye, başta Semih Işık ve Günce Göç olmak üzere birlikte çalıştığım, desteklerini esirgemeyen Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma, tezimin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren aileme teşekkür ederim. Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2017/057) birimine de şükranlarımı sunarım.

Haziran – 2019

Büşra KAHVECİ

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.....	4
1.1. Polifenoller	4
1.2. Polifenol Oksidazlar (PPO).....	6
1.2.1. Lakkazlar	8
1.2.2. Tirozinazlar	8
1.2.3. Katekol-Oksidazlar	9
1.3. Bitki Polifenoloksidazları Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	9
1.4. Mantar Polifenoloksidazları Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar	11
1.5. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Endüstriyel Kullanımı	13
1.6. Çalışmada Kullanılan Tıbbi Bitkilere Ait Genel Bilgiler	14
1.6.1. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	14
1.6.2. Trabzon hurması (<i>Diospyros kaki</i> L.)	16
1.6.2. İncir (<i>Ficus carica</i> L.)	17
1.6.3. Töngel (<i>Mespilus germanica</i> L.).....	18
1.6.4. Böğürtlen (<i>Rubus canescens</i> DC.)	19
1.6.5. Koyunkıran (<i>Hypericum calycinum</i> L.)	20
1.6.6. Dağ çileği (<i>Fragaria vesca</i> L.).....	21
1.6.7. Ebegümeci (<i>Malva sylvestris</i> L.)	22
1.6.8. Adaçayı (<i>Salvia forskahlei</i> L.)	23
1.6.9. Kıvrıkcık nane (<i>Mentha spicata</i> L.)	23
1.7. Üçlü-Faz Ayırma Sistemi(TPP).....	24
2. MALZEME YÖNTEM	27
2.1. Kimyasallar	27
2.2. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Tür Teşhislerinin Yapılması	27
2.3. Bitki Dokularından Ham Ekstraktların (Özütlerinin) Hazırlanması Ve Konsantre Edilmesi.....	29
2.4. Enzim Aktivite Tayini	30
2.5. Protein Miktar Tayini.....	30
2.6. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi ile Polifenol Oksidazın Saflaştırılması	30
2.7. Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	31
2.7.1. Moleküler ağırlığın hesaplanması	31
2.7.2. Sıcaklık ve pH'nın polifenol oksidaz üzerine etkisi	31
2.7.3. Organik çözücülerin polifenol oksidaz aktivitesine etkisi	32

2.7.4. Substrat spesifite analizi.....	32
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1. Bitki Örneklerinin Polifenol Oksidaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması	33
3.2. Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu	34
3.2.1. Ekstraksiyon pH'sının optimizasyonu	34
3.2.2. PVPP konsantrasyonunun optimizasyonu	35
3.3. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Fenol Oksidaz Enziminin Biberiye'den (<i>R. officinalis</i>) Saflaştırılması	36
3.3.1. Amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi.....	36
3.3.2. Ham ekstrakt/t-bütanol oranının belirlenmesi.....	38
3.3.3. Üçlü-faz ayırma sistem pH'sının belirlenmesi.....	40
3.4. SDS-PAGE Analizi.....	42
3.5. Reaksiyon Sıcaklığının Biberiye (<i>R. officinalis</i>) Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	43
3.6. Reaksiyon pH'sının Biberiye (<i>R. officinalis</i>) Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	45
3.7. Biberiye (<i>R. officinalis</i>) Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Organik Çözücüler Varlığında İncelenmesi.....	46
3.8. Biberiye (<i>R. officinalis</i>) Polifenol Oksidaz Enziminin Substrat Spesifite Analizi.....	47
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR.....	51
EKLER.....	61
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	66
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Farklı polifenol gruplarının kimyasal yapıları.....	4
Şekil 1.2.	Flavonoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapıları.....	5
Şekil 1.3.	Kataliz sırasında PPO merkezindeki met, deoksi ve okse formlarının döngüsü.....	7
Şekil 1.4.	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	14
Şekil 1.5.	Trabzon hurması (<i>Diospyros kaki</i> L.).....	16
Şekil 1.6.	İncir (<i>Ficus carica</i> L.).....	17
Şekil 1.7.	Töngel (<i>Mespilus germanica</i> L.).....	18
Şekil 1.8.	Böğürtlen (<i>Rubus canescens</i> DC.).....	19
Şekil 1.9.	Koyunkıran (<i>Hypericum calycinum</i> L.).....	20
Şekil 1.10.	Dağ çileği (<i>Fragaria vesca</i> L.).....	22
Şekil 1.11.	Ebegümeci (<i>Malva sylvestris</i> L.).....	22
Şekil 1.12.	Adaçayı (<i>Salvia forskahlei</i> L.).....	23
Şekil 1.13.	Kıvırcık nane (<i>Mentha spicata</i> L.).....	24
Şekil 1.14.	TPP Faz Oluşumları.....	25
Şekil 3.1.	Amonyum sülfat konsantrasyonunun TPP sisteminde ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanımına etkisi.....	38
Şekil 3.2.	Ham ekstrakt:t-bütanol oranının TPP sisteminde ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve geri kazanımına etkisi.....	39
Şekil 3.3.	TPP sistem pH'sının ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanımına etkisi.....	41
Şekil 3.4.	Biberiye'den saflaştırılan polifenol oksidazın SDS-PAGE jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.5.	Sıcaklık değişiminin enzim aktivite (A) ve kararlılığı (B) üzerine etkisi.....	44
Şekil 3.6.	Reaksiyon pH değişiminin enzim aktivite (A) ve kararlılığı (B) üzerine etkisi.....	45
Şekil A.1.	Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi.....	62
Şekil B.1.	Molekül ağırlığı hesaplamada kullanılan grafik.....	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1.	Biberiye bitkisinin antioksidan ekstraktı içeriği.....	16
Tablo 2.1.	Kullanılan bitkilere ait lokalite, habitat ve toplandıkları bölge özellikleri.....	28
Tablo 3.1.	Bitki ham ekstratlarına ait polifenol oksidaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo 3.2.	Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna pH'nın etkisi.....	34
Tablo 3.3.	Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna PVPP'nin etkisi.....	35
Tablo 3.4.	Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun TPP sisteminde polifenol oksidaz ayırımına etkisi.....	37
Tablo 3.5.	Ham ekstrakt/t-bütanol oranının TPP sisteminde polifenol oksidaz ayırımına etkisi.....	38
Tablo 3.6.	TPP sistem pH'sının polifenol oksidaz ayırımına etkisi.....	40
Tablo 3.7.	Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen polifenol oksidazların kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	44
Tablo 3.8.	Farklı organik çözücülerin Biberiye polifenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Tablo 3.9.	Biberiye polifenol oksidazının substrat spesifite analizi.....	47
Tablo C.1.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm :	Santimetre
Cu :	Bakır
dk :	Dakika
g :	Gram
Hg :	Cıva
l :	Litre
mg :	Miligram
M :	Molar
ml :	Mililitre
mM :	Milimolar
mg/μl :	Miligram/Mikrolitre
U :	Unit/Enzim Birimi
U/μl :	Unit/mikrolitre
U/l :	Unit/Litre
U/mg :	Unit/Miligram
μmol :	Mikromol
μl :	Mikrolitre
μm :	Mikrometre
μM :	Mikromolar
% :	Yüzde
= :	Eşittir
°C :	Santigrat derece

Kısaltmalar

Ag :	Aktivite gözlenmedi
KDa :	Kilodalton
Lak :	Lakkaz
MnP :	Mangan peroksidaz
PPO :	Polyphenol oxidase (Polifenol oksidaz)
PVPP :	Polivinilpolipirrolidon
SR :	Serbest Radikal
TPP :	Three Phase Partitioning (Üç fazlı bölümleme)
UV :	Ultraviyole

KOCAELİ İLİNDEN TOPLANAN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN TARANMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Ülkemiz yenilenebilir enerji kaynakları açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına karşın, bu kaynakların endüstriyel kullanımdaki payı oldukça düşük gözükmektedir. Bu çalışmada fenolik madde içeriği açısından zengin olan mantara alternatif olarak kullanılabilecek ekonomik bir bitkisel polifenol oksidaz kaynağının/kaynaklarının bulunması ve enzimin olası uygulama alanlarının bulunması için karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu hedefle, Kocaeli ili yerel pazarlarda ve aktarlarda yaygın olarak satılan ve tıbbi özelliğe sahip bazı bitki (biberiye (*Rosmarinus officinalis*), Trabzon hurması (*Diospyros kaki*), incir (*Ficus carica*), töngel (*Mespilus germanica*), böğürtlen (*Rubus canescens*), koyunkıran (*Hypericum calycinum*), dağ çileği (*Fragaria vesca*), ebegümesi (*Malva sylvestris*), adaçayı (*Salvia forskahlei*) ve kıvırcık nane (*Mentha spicata*) yaprakları polifenol oksidaz aktiviteleri açısından taranmıştır. Çalışılan bitki örnekleri arasından sadece biberiye yapraklarının katekol substratı ile mantarla karşılaştırılabilecek düzeyde yüksek polifenol oksidaz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Daha sonra biberiyeden enzim Üçlü-Faz Ayırma (TPP, Three Phase Partitioning) sistemi ile ilk defa bu çalışmada saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Buna göre, %50 (w/w) (NH₄)₂SO₄, 1:1 oranında enzim/t-bütanol içeren pH 6,5’da (25°C) hazırlanmış sistemden polifenol oksidaz enzimi orta fazda toplanmış ve yaklaşık %59 geri kazanım ile 15 kat saflaştırılmıştır. Enzim molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 53 kDa olarak, optimum pH ve sıcaklık değerleri ise sırasıyla 7,0 ve 40°C olarak belirlenmiştir. Substrat spesifite sonuçları enzimin katekol oksidaz özelliği gösterdiğine işaret etmektedir. Enzim dayanıklılığının sıcaklığa bağlı olarak azaldığı gözlenirken pH 6,0-9,0 arasında aktivitesinin yaklaşık %80 ila %99’unun korunduğu gözlenmiştir. Ayrıca, enzimin Dimetilsülfoksitten (DMSO) olumsuz yönde etkilenmediği görülürken test edilen çözücülere karşı ilgisi DMSO > Metanol > Aseton > Etanol şeklinde bulunmuştur. Sonuç olarak biberiye yapraklarının polifenol oksidaz kaynağı olarak kullanılabileceği 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: Polifenol Oksidaz, *Rosmarinus officinalis*, Saflaştırma, Üçlü-Faz Ayırma.

SCREENING AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME IN SOME MEDICAL PLANTS COLLECTED FROM KOCAELİ.

ABSTRACT

Although our country has abundant renewable energy sources, the ratio of industrial usage of these sources is surprisingly quite low. In this study, it was aimed to determine an alternative source(s) to mushroom, which has been known as potential phenol source, for polyphenol oxidase production and characterize the enzyme for investigation of its possible application areas. Towards this aim, the some medicinal plant leaves (rosemary (*Rosmarinus officinalis*), kaki persimmon (*Diospyros kaki*), fig (*Ficus carica*), medlar (*Mespilus germanica*), blackberry (*Rubus canescens*), Rose-of-Sharon (*Hypericum calycinum*), wild strawberry (*Fragaria vesca*), common mallow (*Malva sylvestris*), garden sage (*Salvia forskahlei*) ve spearmint (*Mentha spicata*) which are widely used in local markets and herb shops in Kocaeli were screened in terms of their polyphenol oxidase activities. Among them, the rosemary leaves have been found to possess the highest polyphenol oxidase activity against catechol among the other plants tested and mushroom (known as a rich source of phenol oxidases). Then, the enzyme has been purified by Three-Phase Partitioning (TPP) from the rosemary leaves and characterized for the first time. Accordingly, the polyphenol oxidase enzyme has been partitioned to the interphase in the system prepared at pH 6.5 (25°C) by addition of t-butanol with the ratio of 1:1 (v/v) to the mixture containing crude extract saturated with 50% (w/w) (NH₄)₂SO₄. Under these conditions, the enzyme has been 15-fold purified with a 59% activity recovery. The molecular weight of the enzyme has been determined as 53 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature values have been estimated as 7.0 and 40°C, respectively. Enzyme stability has been observed to decrease with respect to temperature, while 80-99% of its initial activity has been remained at a pH range from 6.0 to 9.0. In addition, while the enzyme has not been adversely affected by Dimethylsulfoxide (DMSO), its affinity for the tested solvents has been found in DMSO> Methanol> Acetone> Ethanol. As a result, it has been suggested that the rosemary leaves can be used as a source of polyphenol oxidase and the single-step extraction method tested here provides a simple, reliable, economical and efficient way for enzyme preparation.

Keywords: Polyphenol Oxidase, *Rosmarinus officinalis*, Purification, Three-Phase Partitioning (TPP).

GİRİŞ

Gelişmekte olan teknoloji, çevre kirliliği, zirai ilaçlar, sigara, ultraviyole (UV) ışınları ve diğer birçok etken canlıların, özellikle de insanların, çeşitli zararlı etmenler ile karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır. Çevresel ve psikolojik etkiler bireylerde serbest radikal (SR, ROS, reaktif oksijen bileşikleri) oluşumuna neden olmaktadır (Öğüt, 2014). Oluşan bu serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA ile etkileşimi sonucunda bu hayati moleküller zarara uğrar, normal fonksiyonları bozulur. Son yıllarda serbest radikaller ve bunların insan sağlığı açısından zararları giderek önem kazanmış, ateroskleroz (damar sertliği), diyabet, kanser ve yaşlanma (aging) gibi birçok gibi birçok hastalık mekanizmasının altında serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların olduğu öne sürülmüştür (Akagün, 2009). Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle bu hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir. Bunun için de ilaçlardan öte tüketilen sağlıklı besinler önem kazanmaktadır. Antioksidan içeren besinler bu amaçla tüketilebilecek önemli besin gruplarıdır (Öğüt, 2014).

Son 10 yıldır araştırmacılar ve gıda üreticilerinin polifenollere olan ilgileri oldukça artmıştır. Bunun nedeni polifenollerin antioksidan özellik göstermeleri ve canlı organizmaların belirli hastalıklarında önleyici olarak görev yapmalarıdır (Jime'nez ve diğ., 2018).

Polifenoller meyve, sebze ve tahılda doğal olarak bulunur (Pandey ve diğ., 2009). Patojen saldırısına, ultraviyolenin zararlı etkilerine karşı koruyucu olarak görev yapmaktadırlar (Beckman, 2000). Polifenoik bileşiklerin hepsi farklı kimyasal yapılara sahip olduğundan, hepsinin farklı biyolojik işlevleri vardır (Pandey ve diğ., 2009). Bitkilerin sekonder metabolitleridir (Daglia, 2012). Gıdaların acı, tat, koku gibi niteliklerinin oluşumunda rol oynayabileceği gibi aromaya da katkıda bulunarak lezzet arttırabilir ve besinlerin dış görünümünde önemli rol oynarlar (Pandey ve diğ., 2009).

Polifenol oksidazlar temel olarak üç grup altında incelenmektedir; Bunlar; lakkazlar (*p*-difenol:oksijen-oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2), katekol oksidazlar (*o*-difenol:oksijen-oksidoredüktaz, E. C. 1.10.3.1) ve tirozinazlardır (monofenol-monooksijenazlar, E.C. 1.14.18.1). Lakkazlar dört bakır atomu, katekol oksidaz/tirozinazlar ise iki bakır atomu içermektedirler (Yediel, 2018).

Lakkazlar, hem *p*-difenol hem de *o*-difenoller üzerinde etkilidirler (Mayer ve Harel, 1979). Tirozinazlar monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu gerçekleştirirler. Bitkisel ürünlerde kararmaya neden olması sebebiyle bitki dokularında oldukça sık rastlanılan bir enzimdir (Chazarra ve diğ., 2001).

Katekol oksidazlar, zarar görmüş bitki dokularını patojenlere ve böceklerle karşı korurlar. Bu enzim grubu *o*-difenoller üzerinde etkilidir. Bitkilerde kahverengi polifenolik katekol melaninlerinin oluşmasını sağlarlar (Eicken ve diğ., 1999).

Bu çalışmada, Kocaeli ili sınırları içerisinde doğal ve yaygın olarak yetişen Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.FIL.), İncir (*Ficus carica* L.), Töngel (*Mespilus germanica* L.), Böğürtlen (*Rubus canescens* DC.), Koyunkıran (*Hypericum calycinum* L.), Dağ çileği (*Fragaria vesca* L.), Ebegümece (*Malva sylvestris* L.), Adaçayı (*Salvia forskahlei* L.) ve Kıvırcık nane (*Mentha spicata* L.) toplanarak, toplanarak, her birinin taze yapraklarından özütler elde edildi ve katekol substratı kullanılarak spektrofotometre (Cary 60, Agilent) ile polifenol oksidaz enzimlerin varlığı analiz edildi. Yaprak özütleri arasında polifenol oksidaz enzim miktarı en yüksek olan bitki (*Rosmarinus*) belirlendi ve “Üçlü-Faz Ayırma” yöntemiyle enzim saflaştırıldı. Saf olarak elde edilmiş olan enzimin, elektroforez yöntemi kullanılarak, molekül ağırlığı belirlendi. Daha sonra enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması için spektrofotometrik analizler (sıcaklık ve pH etkisi, substrat spesifite tayini, organik solventlerin fenol oksidaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi) gerçekleştirildi.

Yürütülen bu çalışmada endüstriyel açıdan önem arz eden polifenol oksidaz enzimlerinin; ilk defa Kocaeli’nde yetişen, aromatik ve/veya yenilebilir özellikteki bazı bitkiler ile tıbbi açıdan faydalı olduğu düşünülen; aynı zamanda çay olarak da tüketilen bitkilerdeki taraması gerçekleştirilmiştir. Bitki kaynaklı fenol oksidazların kromatografik yöntemlerle saflaştırılmasına ait çok sayıda literatür çalışması

bulunmasına rağmen bu çalışmada kullanılan üçlü-faz ayırma yönteminin bulunduğu rapor sayısı sınırlı sayıdadır. Kullanılan bitkisel materyallerde polifenol oksidaz enzimine ait daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmadaki temel hedef, doğal olarak yetişen bazı tıbbi aromatik bitki yapraklarının birçok farklı endüstriyel sektörde kullanım alanına ve ticari öneme sahip polifenol oksidaz enzimlerinin üretimi için tarımsal kökenli ucuz ve yenilenebilir biyokütle oluşturduğunu göstermektir. Ayrıca, bitkisel polifenol oksidaz enziminin geleneksel kromatografi yöntemlerine göre çok daha kısa sürede ve düşük maliyette saflaştırma olanağı sağladığı gibi kolay manipüle edilebilir özellikte ve oldukça güvenilir olan üçlü-faz ayırma yöntemi ile izole edilebileceğini ortaya çıkarmaktır. Nitekim çalışmada belirlenen hedeflere başarıyla ulaşılmıştır.

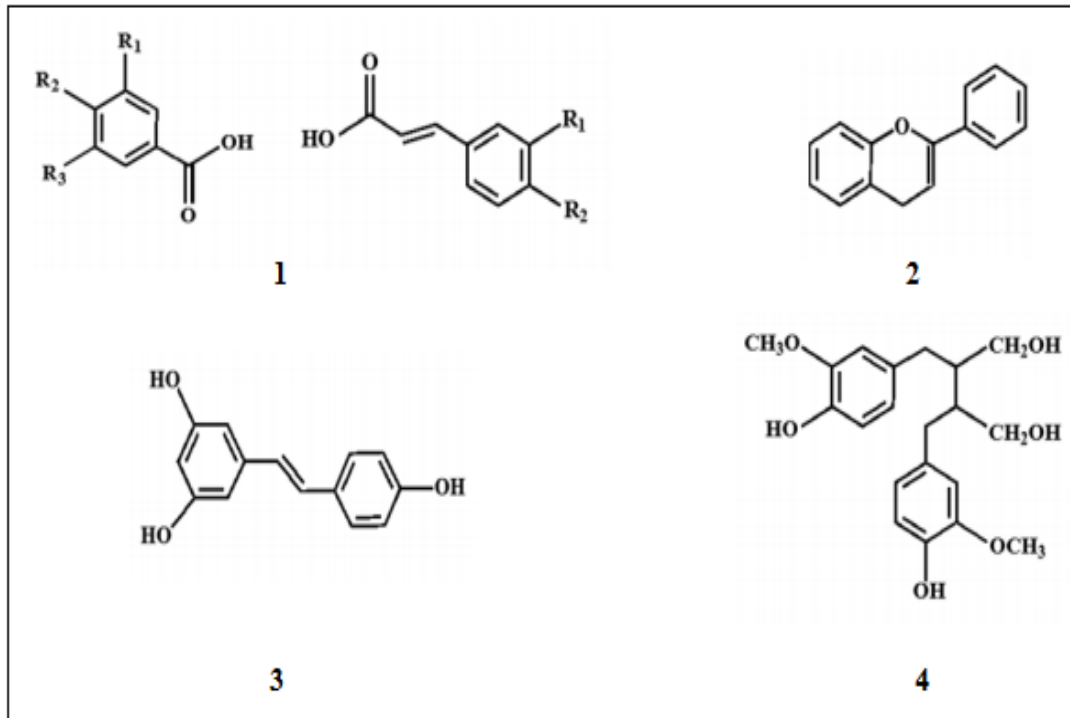
1. GENEL BİLGİLER

1.1. Polifenoller

Polifenoller, bitkilerin sekonder metabolitleridir (Daglia, 2012).

Bütün bitki fenolik bileşikleri, ortak bir ara madde, fenil alanin ve öncü bir skihimik asitten meydana gelmektedir. Çoğunlukla hidroksil gruplarına bağlı bir veya daha fazla şeker kalıntısı ile konjuge formlarda ortaya çıkarlar (Kondratyuk ve diğ., 2004).

Polifenolik bileşikler, içerdikleri fenol halkalarının sayısının ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanların fonksiyonuna göre Fenolik asitler, Flavonoidler, Stilbenler ve Lignanlar olarak farklı gruplarda sınıflandırılırlar (Jimenez ve diğ., 2004). (Şekil 1.1.)

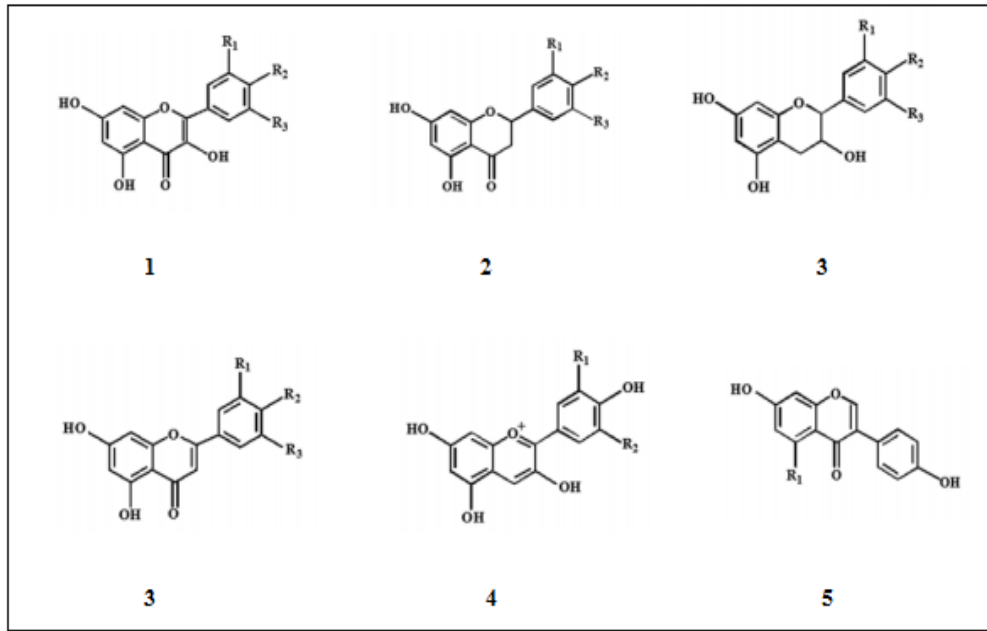


Şekil 1.1. Farklı polifenol gruplarının kimyasal yapıları. (Fenolik asit [1], Flavonoidler [2], Stilbenler [3], Lignanlar [4]) (Pandey ve diğ., 2009)

Hidrobenzoik ve hidrosinamik asit türevleri olarak ikiye ayrılan Fenolik asitler, gıdalarda bol miktarda bulunur. Hidrosinamik asit yenilebilir bitkilerde, hidrobenzoik aside oranla daha fazla bulunur ve p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik asitlerden oluşur (Naczki ve diğ., 1995).

Flavonoidler, temel olarak üç karbon atomunun birleşerek oluşturduğu heterosikl grubu ile bağlanmış iki aromatik halkadan oluşur (Pandey ve diğ., 2009). Bitkilerin, çekici renkli yapraklarının oluşumundan sorumlu 4000'den fazla flavonoid türü tanımlanmıştır (Groot ve diğ., 1998).

Yapılarındaki heterosikl çeşidine göre flavonoidler; flavonoller, flavanoller, flavanonlar, flavanoller, antosiyaninler ve izoflavonlar olarak altı gruba ayrılmaktadırlar (Jimenez ve diğ., 2004) (Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. Flavonoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapıları (Flavonoller [1], Flavanonlar [2], Flavanoller [3], Flavonlar [4], Antosiyaninler [5], İzoflavonlar [6]) (Pandey ve diğ., 2009)

Stilbenler, iki karbon içeren metilen köprüsüyle birbirine bağlanmış, iki fenil parçasından oluşurlar. Bitkilerde enfeksiyon ve yaralanma sonucu tepki olarak sentezlenmektedirler (Pandey ve diğ., 2009).

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben), doğal olarak oluşan ve kolay incelenen bir stilben çeşididir, en çok üzümde görülür (Pandey ve diğ., 2009).

Liganlar, difenolik bileşikler içerirler. 2,3-dibenzilbütan yapısı içerirler bu yapı, iki sinamik asit tortusunun dimerizasyonundan oluşur (Adlercreutz ve diğ., 1997).

Polifenoller, bitkilerin maruz kaldığı stres sonucunda oluşan zararlara karşı koruyucu olarak görev yapmaktadırlar (Bolwell ve diğ., 2000).

Bitkilerin dış katmanları iç katmanlara oranla daha fazla polifenolik bileşik içermektedir (Estrella ve diğ., 1992). Bitkilerin polifenol içeriklerinde, çevresel faktörler, hasat sırasındaki büyüme derecesi, depolama gibi faktörler etkili olmaktadır. Bunların yanı sıra yetiştirme sürecindeki güneş ışığına maruz kalma süresi, toprak yapısı vb. faktörlerde etkili olmaktadır (Manach ve diğ., 2004).

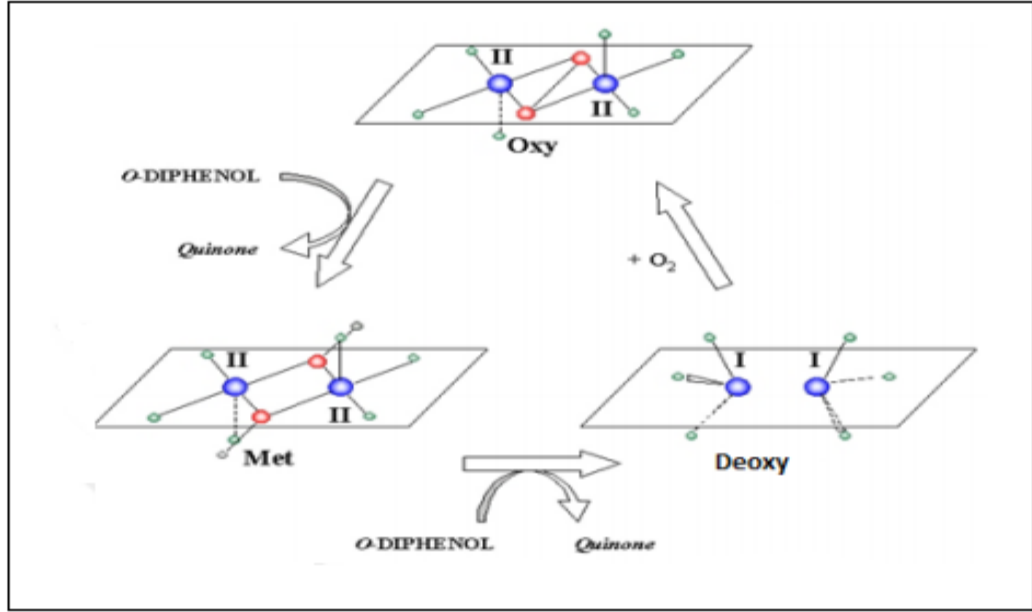
Bitkilerin polifenol içeriğini etkileyen diğer bir faktör de depolama koşullarıdır. Yapılan çalışmalar, bitkilerin depolandığı süre içerisinde yapılarındaki polifenol oranlarının azaldığını göstermektedir. Bunun nedeni polifenollerin kolayca oksidasyona uğramasıdır (Manach ve diğ., 2004). Oksidasyon reaksiyonları, gıdaların yapı ve görüntüsünde, tadında değişikliklere neden olmaktadır (Pandey ve diğ., 2009). Bu tür değişiklikler, gıda kalitesini düşürüp zararlı olabildiği gibi, siyah çayın oluşması ya da erken hasat edilen bazı meyve türlerinin mevcut fiziksel görüntüsünün meydana gelmesine olanak sağlayarak faydalı da olabilmektedir (Hogge ve diğ., 1982).

1.2. Polifenol Oksidazlar (PPO)

PPO enzimleri, bitkilerin kök, yaprak, çiçek ve vasküler dokularını da kapsayan çeşitli kısımlarında bulunur (Constabel ve diğ.leri, 2008). Tilakoidler başta olmak üzere kloroplast ve mitokondride membranlara sıkıca bağlı olarak bulunmaktadır (Corzo-Martinez ve diğ., 2012; Yörük ve diğ., 2003).

Çekirdekte kodlanan (nükleer kodlu) PPO, stoplazmik ribozomlarda sentezlenir. Asıl yeri olan plastidlere gidene kadar inaktiftir; plastidin tilakoid membranına bağlanana kadar şaperonlar tarafından tutulur, sabitlenir. Bu protein, N- ucunda yer alan bir sinyal peptid dizilimi ile kloropasta yönlendirilir, daha sonra bu sinyal dizisi bir peptidaz enzimi tarafından kesilir, oluşan olgun protein (PPO) tilakoid membrana sıkıca bağlıdır. Kayısı, elma, üzüm, patates, domates ve ıspanak gibi çeşitli bitkilerde bu şekilde PPO oluşumu görülmektedir (Yörük ve diğ., 2003).

PPO'lar, bakır içerdikleri için Tip 3 bakır proteini olarak bilinmektedir. Aktif merkezinde dinükleer bakır kompleksi yer almaktadır (Mayer, 2006). Bakır atomları Cu(A) ve Cu(B) olarak isimlendirilir. Enzimin aktif merkezi reaksiyon sırasında Met, Deoksi ve Oksi adı verilen üçlü bir döngü geçirmektedir. Her bir döngüde iki molekül katekol kinona yükseltgenirken, bir molekül oksijen suya indirgenir (Mishra ve diğ., 2012). (Şekil 1.3.)



Şekil 1.3. Kataliz sırasında PPO merkezindeki met, deoksi ve oksi formlarını döngüsü (Eicken'den uyarlayan Mishra ve diğ., 2012).

Polifenol oksidazlar hasar görmüş dokularda fenolik bileşiklerin, kahverengi pigmentleri üreten kinonlara oksidasyonunu kataliz ederler. Enzimatik esmerleşme olarak bilinen bu olay, besinlerin dış görünüşünü bozduğu ve sonucunda besinlerin kalitesi etkilendiği için besinin tüketiciler tarafından tercih edilme olasılığını düşürmektedir. Bu durum da gıda sanayisini ekonomik açıdan olumsuz olarak etkilemektedir (Nuñez-Delicado ve diğ., 2005). Enzimatik esmerleşmeden en fazla etkilenen besin grubunun tropikal meyveler olduğu rapor edilmiştir (Elmacı ve diğ., 2018).

PPO'lar bakterilerden memelilere kadar pek çok canlıda bulunurlar (Mayer, 1986). Bitkilerdeki PPO'lar; solunum, fotosentez gibi yaşamsal faaliyetlerde serbest radikalleri süpürücü olarak görev yaparlar (Heimdal ve diğ., 1994). Bunun dışında

böceklerle ve patojenlere karşı, bitkisel organlar için savunma mekanizması oluştururlar (Aydemir, 2004).

Polifenol oksidazların çeşitli fenolik bileşikleri oksitleyebilmeleri, geniş substrat spesifitelerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Es-Safı ve diğ., 2003). Bu substratlardan bazıları meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmaktadır. Enzimatik esmerleşmenin yüksek düzeyde görüldüğü elma, bol miktarda klorojenik asit, katekin ve epikatekin içermektedir (Podsdek ve diğ., 2000).

1.2.1. Lakkazlar

Lakkaz (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) enzimleri, oksijen varlığında difenolik bileşikleri kinonlara yükseltgeyen, bakır kofaktörlü oksidoredüktazlardır. Fenolik bileşiklerin yanı sıra, dirençli çevre kirleticilerini de oksitleyebilmektedir (Yediel, 2018).

Katalitik aktivitelerin oluşup, devam edebilmesi için her bir lakkaz proteini için en az dört bakır atomu gerekmektedir. Lakkaz proteinlerine ait dört bakır atomundan biri Tip 1 (Mavi Bölge) adı verilen bölgeye, diğer üç bakır atomu ise Tip 2 ve Tip 3 adı verilen bölgelere ait trinükleer kısma bağlıdır (Decker, 2000). Lakkaz enzimi yapısındaki 4 adet Cu^{+2} atomu kullanarak, substrat molekülünden bir elektron koparıp moleküler oksijene aktararak su açığa çıkarır (Yediel, 2018).

Lakkaz enzimi multimerik kompleksler oluşturacak şekilde birbirine bağlanmış olan izoenzimlerden meydana gelmektedir. Moleküler kütlesi ise 50-110 kDa arasında değişmektedir. Lakkaz enzimi, toplam kütlesinin %10-45'inde yer alan karbohidrat kısmı sayesinde yüksek kararlılık gösteren bir enzim grubudur (Tuncer, 2010).

1.2.2. Tirozinazlar

Sistematik adı; 1,2-benzendiol:oksijen oksidoredüktaz olan Tirozinaz enzimi aynı zamanda polifenol oksidaz, fenolaz, katekol oksidaz, monofenol oksidaz, kresolaz ve katekolaz olarak da adlandırılmaktadır. İlk olarak 1856 yılında Schobenbein tarafından mantar içinde keşfedilmiştir (Öztan, 2007).

Tirozinazlar aktif merkezlerinde, iki tane oksijen atomuyla etkileşim halinde olan her biri üç histidin aminoasidi grubuna bağlanmış iki bakır atomu içermektedir (İkehata,

2000). Moleküler ağırlıkları 33 kDa ile 200 kDa arasında değişiklik gösterir (Özcan, 2007).

1.2.3. Katekol-Oksidazlar

Katekol oksidaz (EC 1.10.3.1) enzimi de Lakkaz gibi difenolaz aktivitesi göstermektedir (Yediel, 2018). Difenol oksidaz, *o*-difenolaz, fenolaz ve polifenoloksidaz olarak da adlandırılmaktadır. Katekol oksidazlar, bir *o*-difenol olan katekolü *o*-benzokinone okside ederler (Hammer, 1993).

Altı adet histidin içeren katekol oksidazın bir histidini kovalent bağlarla sisteine bağlıdır (Inlow ve diğ., 2005).

Katekol oksidazlar, tirozinaz ve hemosiyanin ile birlikte ökaryotlarda ve prokaryot canlılarda bulunur (Valiev, 2007).

1.3. Bitki Polifenoloksidazları Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar

Yağar (2004), kerevizden (*Apium graveolens L.*) polifenol oksidaz enzimini % 80 (w/w) (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) ile çöktürerek kısmi olarak saflaştırmıştır. Yaptığı çalışmada katekol, pirogallol ve L-DOPA substratlarına karşı enzimin biyokimyasal özelliklerini belirlemiş; enzimin tirozin, resorsinol ve *p*-krezol substratlarına karşı aktivite göstermediğini bulmuştur. Ayrıca yaptığı inhibisyon çalışmasında L-sistein, askorbik asit ve glisinin enzim üzerinde etkili inhibitörler olduğunu belirlemiştir.

Guo ve diğ., (2009) yeşil fasülyenin (*Phaseolus vulgaris L.*) kendisi ile kabuğundan, % 10 (w/v) polivinilpirolidon (PVPP) içeren fosfat tamponu (pH 6.8) kullanarak elde ettikleri ham enzim ekstraktlarına % 60'luk (w/w) (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulamış; diyaliz işlemi sonrası elde edilen yeşil fasulye ekstraktına Dietilaminoetil (DEAE)-selüloz kolon kromatografisi ve yeşil fasulye kabuğu ekstraktına ise Sephadex G-100 kolon kromatografisi uygulamışlardır. PPO aktivitesi tespit edilen fraksiyonlardan yeşil fasulye örneğinde PFOIIa ve PFOIIb, yeşil fasulye kabuğu örneğinde de PFOIa ve PFOIb olmak üzere ikişer izoform elde edilmiştir. Daha sonra sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile molekül ağırlıkları sırasıyla 57,5 ve 39,0 kDa, optimum pH değerleri 6,8

ve7,2 olarak belirlenmiştir. Enzimler çalışılan substratlar arasında en yüksek katalitik aktiviteyi pirogallol ile göstermişlerdir. Pirogalloldan sonra en yüksek katalitik aktivitenin görüldüğü substratlar, katekol, 4-metil katekol ve L-DOPA olarak belirlenmiştir.

Aydemir ve Akkanlı'nın (2006) da kereviz (*Apium graveolens* L.) PPO'su ile ilgili yaptıkları çalışmada, enzimi kısmi olarak saflaştırmak için % 40'luk (w/w)tuz çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulanmıştır. Daha sonra katekol substratına karşı optimum pH (7,0) optimum sıcaklık (30 °C), ile K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 29 mM ve 5560 U mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Farklı inhibitörler ile yaptıkları çalışmada en etkili inhibitörün β -merkaptöetanol olduğunu tespit etmişler. Bunun yanı sıra kobalt, civa, baryum, kalay gibi diğer bileşiklerin tuzlarının da enzimi inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca kerevizden kısmi saflaştırılan PPO enzimine ait altı adet izoenzim, elektroforez jelinde gözlemlenmiştir.

Aydemir (2004) yaptığı başka bir çalışmada enginardan (*Cynara scolymus* L.) PPO enzimini kısmi saflaştırarak, farklı fenolik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemiştir. Buna göre, enzim L-tirozini yükseltgemezken, katekol, 4-metil katekol, pirogallol, DL-DOPA, L-DOPA ve gallik aside karşı aktivite göstermiştir. Çeşitli bileşikler ile yapılan inhibisyon çalışmasında ise ditiotreitol, sodyum metabisülfid ve askorbik asit etkili inhibitörler olarak belirlenmiştir. Enginar polifenol oksidazının üç izoformu yapılan PAGE uygulaması ile tespit edilmiştir.

Mishra ve diğ., (2012) zengin bir PFO kaynağı olan patlıcandan (*Solanum melongena*) enzimi izole etmiş ve çeşitli kromatografik teknikler kullanarak saflaştırmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 112 kDa olarak tespit edilmiştir. Tert bütıl katekol, 4-metil katekol, dihidro kafeik asit ve pirokatekol kullanılarak gerçekleştirilen substrat spesifite deneyinde en fazla aktiviteyi 4-metil katekol ile göstermiştir. Çalışılan çeşitli inhibitörler arasında, en güçlü inhibisyon oranını sistein hidroklorür göstermiştir.

Shin ve diğ., (1997)'in yaptığı çalışmada; maş fasulyesine (*Vigna radiata*) ait yaprak, kök, dal ve karanlıkta yetişen fidelerinden elde edilen ham ekstraktlarında SDS PAGE yöntemi kullanılarak sırasıyla 65 , 59 , 52, 47 , 31 ve 21 kDa molekül ağırlıklı PPO alt izoformları tespit edilmiştir. Yapraktan elde edilen saf enzim 6.0 değerinde

bir pH optimumuna ve 5.1 izoelektrik noktasına sahiptir. Farlı *o*-difenolleri yükseltgeyen enzimin L-DOPA için K_m değeri 24 mM'dır. Enzim salisil hidroksamik asit ve 2,3-naftalenediol tarafında yüksek oranda inhibe olmuştur.

Gawlik-Dziki ve diğ., (2007) brokoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) kullanarak yaptıkları çalışmada; elde edilen süpernatanı % 80'lik (w/w) amonyum sülfat ile çöktürülmüş, sonrasında iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırmıştır. Enzimin optimum pH değeri 5,72, moleküler ağırlığı 51,3 – 57 kDa aralığında tespit edilmiştir. Brokoli PPO'sunun vanilin, ferulik asit, klorogenik asit, kafeik asit, katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak spesifite deneyi, askorbik asit, sitrik asit, EDTA ve sodyum sülfat gibi inhibitörler kullanılarak da inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Başka bir çalışmada beyaz kiraz meyvesinden (*Starks gold*) polifenol oksidaz enzimi ekstrakte edilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi ile enzim saflaştırılmıştır. Elde edilen, PPO aktivitesi gösteren iki izoenzimin (A ve B) optimum pH ve optimum sıcaklıkları belirlenmiş; enzim aktivitesi üzerinde L-sistein ile sodyum disülfidin inhibitör etkileri tespit edilmiştir (Ünal ve diğ., 2011).

Yaban mersininden (*Vaccinium corymbosum* L.) izole ettikleri PPO enzimi ile çalışan Siddiq ve Dolan (2017), enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, substrat spesifitesi, kinetik parametreleri ve ısıl kararlılık gibi bazı biyokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Bunların dışında çalışmada ayrıca -20, 4, ve 22°C'de depolama kararlılığı da test edilmiştir.

1.4. Mantar Polifenoloksidazları Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar

Öz ve diğ., (2013), mantardan (*Lactarius piperatus* L.) PPO enzimini affinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Daha sonra saf enzimin, substrat spesifitesini, enzim aktivitesi üzerinde pH'ın ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Çeşitli inhibitörler kullanılarak yapılan çalışmada inhibitörler ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş ayrıca mantar PFO'nun bazı organik çözücülerde aktivite gösterip göstermediği de araştırılmıştır. Askorbik asit, sodyum metabisülfid, benzoik asit ve sodyum azit gibi yaygın PPO inhibitörlerinin *Lactarius*

piperatus PPO enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. I_{50} değerleri sırasıyla 0,02, 0,03, 5,20 ve 90,00 mM olarak elde edilmiştir. Askorbik asit ve sodyum metabisülfid aşırı derecede güçlü inhibitörler ve *L. piperatus* PPO'nun aktivitesinin %75'inden fazlasını sırasıyla 0,03 ve 0,05 mM'de inhibe ettiği tespit edilmiştir. Test edilen iki değerlikli katyonlar arasında, 1mM'de Hg^{2+} ve Cu^{2+} en güçlü inhibitör etki göstermiştir ve *L. piperatus* PPO aktivitesini sırasıyla %34,5 ve %33,5 oranında inhibe ettiği raporlanmıştır.

Valiev (2007) yaptığı çalışmada 'Southern Pine Beetle' olarak anılan bir tür çam böceği ile ortak yaşam süren funguslarda polifenol oksidaz enzimini incelemiştir. Farklı enzim inhibitörlerinin, sıcaklık, pH çeşitli enzim indükleyicilerin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelenmiştir. En yüksek polifenol oksidaz aktivitesi 30°C'de belirlenmiştir. En iyi pH değeri 8,0 olarak tespit edilmiştir. Enzim indükleyici olarak tannik asit kullanılmıştır. Salisil hidroksamik asit ve *p*-kumarik asit enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Enzim önce ultrafiltrasyon saflaştırılmış, elektroforezdan sonra aktivite boyama çalışmaları yapılmıştır.

Özçırak (2012), beyaz çürükçül fungus *Pleurotus ostreatus* HK-35'den derin kültür fermentasyonu ile lakkaz (Lak) ve mangan peroksidaz (MnP) gibi ligninolitik enzimlerin üretimini optimal düzeyde gerçekleştirmek üzere 25°C'de belirlenen inkübasyon zamanı boyunca kültürasyon modunu, bakır (0,5; 1; 2,5; 5 mM) ve mangan (0,15, 0,29, 0,5, 0,75, 0,1 mM) iyonlarını kullanarak, karbon kaynağı olarak seçilen nişasta (1, 5, 10, 20 g/L) ve uyarıcı olarak iyonik olmayan bir deterjan olan Tween-80 (% 0,025; 0,05; 0,1; v/v) varlığında çalışmıştır. Ayrıca protein, pH, biyokütle, indirgen şeker ve azot seviyeleri üzerine de çalışılmıştır. Yapılan 20 günlük kültürasyon çalışmalarında en yüksek Lak ve MnP aktiviteleri 10. ve 12. günlerde sırasıyla 2900 U/L ve 2637,5 U/L olarak tespit edilmiştir. Optimal pH seviyesi yaklaşık olarak 7-8 aralığında gözlenmiştir. 3. günde indirgen şeker ve azot düzeylerinde artış görülmüştür. Karbon kaynağına yönelik çalışmada 10 g/L nişasta varlığında Lak ve MnP aktiviteleri sırasıyla %49 ve %25 olarak azalmıştır. Farklı Tween-80 derişimlerinin kullanımı göz önüne alındığında, *P. ostreatus* tarafından Lak ve MnP enzim üretimleri üzerine kayda değer bir etki görülmemiştir.

Literatürde yer alan çalışmalar, çeşitli mantar türlerinin PPO açısından zengin besin grupları olduğunu destekler niteliktedir.

1.5. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Endüstriyel Kullanımı

Aromatik bileşikler oksitleyici kapasiteleri yüksek olduğu için polifenol oksidazlar, son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Bu özellikleri nedeniyle polifenol oksidaz enzimleri, gıda endüstrisi, kağıt endüstrisi, tekstil endüstrisi, çevre ve tıp alanlarındaki bazı teknolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Güray, 2009).

Polifenol oksidazların esmerleşme tepkimeleri, gıda endüstrisinde çeşitli faydalı amaçlar için kullanılabilir. Bira, şarap ve meyve suyu gibi içeceklerin işlenmesinde kahverengileşme, tortu ve bulanıklığa neden olan fenoliklerin inhibe edilmesinde rol oynamaktadırlar. Polifenol oksidazlardan özellikle lakkazlar, biyopolimerleri çapraz olarak bağlayabilme yeteneğine sahip olduğundan besinlerin fırınlanmasında aktif olarak görev yaparlar (Rodriguez ve diğ., 2006). Bunun yanı sıra, antioksidanların ve gıda renklendiricilerinin sentezi içinde kullanılmaktadırlar (Şimsek ve diğ., 2007).

Gıda sanayinde ayrıca çay, kahve ve kakaoda renk ve aroma vererek, lezzetin artırılmasında sağlamaktadır. Şeker pancarında pektinin jelleşmesinde görev almaktadırlar (Polaina ve diğ., 2007).

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, endüstriyel kağıt hazırlığının ilk basamağını dokulardan ligninin çıkarılması ve kağıt hamurunun ağartılması oluşturmaktadır. Kağıt hamurunun ağartılmasında çevreye zararlı, toksik maddelerin salınmasına neden olan klor bazlı maddeler kullanılmaktadır. Lakkazların bu işlem sırasında, oluşan toksik maddeleri inhibe edici olarak görev yaptığı tespit edilmiştir (Rodriguez ve diğ., 2006).

Endüstriyel atık sularındaki tehlikeli fenolik bileşiklerin varlığı çevre teknolojisinde büyük problem oluşturmaktadır. Son zamanlarda fenolik bileşiklerin, atık suların uzaklaştırılması için polifenol oksidazların kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Polifenol oksidaz enzimleri, zararlı fenolik bileşikler inhibe edicidirler ve çevre kirliliği üzerine olumlu etki gösterirler (Edwards ve diğ., 1999).

Tıbbi alanda, polifenol oksidazlar ağız boşluğundan sorumlu *Streptococcus sobrinus*'un diş yüzeyine yapışıp, zarar vermesi inhibe etmektedirler (Cowan ve diğ., 2000). Parkinson hastalığının tedavisinde ve melanin sentezinin kontrol altına alınmasında rol oynamaktadır. Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-tirozin esterinin L-DOPA'ya dönüştürülmesi polifenol oksidaz enzimleri aktivitesi ile gerçekleştirilmektedir (Xu ve diğ., 1998). Bunun dışında bazı oto-immün hastalıklarda, ön ilaç tedavisi ve tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadırlar (Seo ve diğ., 2003).

Bazı saç boyaları ve dermatolojik cilt bakım ürünlerine preperatlarının temelini lakkaz oluşturmaktadır. Ayrıca, tekstilde kotları ağartma ve kumaşların boyanmasında kullanılırlar (Rodriguez ve diğ., 2006).

1.6. Çalışmada Kullanılan Tıbbi Bitkilere Ait Genel Bilgiler

1.6.1. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Labiatae familyasına ait olan Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) tıbbi ve aromatik bir bitki türüdür (Aysel, 2008).

Biberiye 50- 100 cm boyunda, çalı görünümünde, kış aylarında yaprağını dökmeyen, çiçekleri soluk mavi renkli, çok yıllık bitkidir. Kurduğunda yaprakları kıvrılarak iğnemsî bir yapıya dönüşür, rengi koyu yeşil-kahverengi renge döner (Aysel, 2008). (Şekil 1.4.)



Şekil 1.4. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) (URL-1)

Ülkemizde doğal olarak yayılış göstermektedir (Aysel, 2008). Genellikle maki ikliminin görüldüğü Güney ve Kuzey Anadolu ve adalarda yaygın olarak yetişir. Mersin ve Adana yörelerindeki orman içi boşluklarda, tarla ve üzüm bağı kenarlarında, özellikle de koruma altındaki ağaçlandırma sahaları içinde yayılış göstermektedir (Kırpık, 2005). Ülkemiz sınırları içerisinde Çanakkale (Erenköy), İçel (Tarsus), Yüregir (Mustafalar Köyü) ve Hatay (İskenderun)'da süs bitkisi amacıyla yetiştiriciliği yapılmaktadır (Aysel, 2008).

Biberiye, bileşimindeki uçucu yağlardan dolayı aromatik özellik göstermektedir. (Banyai ve diğ., 2003). FDA tarafından hazırlanan “Code of Federal Regulations (CFR) Title -21 (7/16/1984)” listesinde güvenilir (GRAS) kullanım özelliği gösteren baharat çeşitleri arasında yerini almıştır. Lezzet arttırıcı, baharat ve çeşni olarak kullanılabileceği aynı zamanda uçucu yağlarının ve ekstraktlarının sınırlama getirilmeksizin direkt tüketilebileceği bildirilmiştir (Özçelik, 2000). Özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. (Banyai ve diğ., 2003). Biberiyenin yaprağı bütün veya ufalanmış olarak çorbalarda, güveçlerde, balık ve tavuk vb. yemeklerde, lezzet verici olarak, uçucu yağları da gıda sanayisinde, kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır (Kırpık 2005).

Yapısında bulunan fenolik diterpenler; karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asit nedeniyle antioksidan özellik göstermektedir (Anonim 2003). Biberiye antioksidan aktivitesinin %90'ı karsonik asit ve karnosolden gelmektedir. Biberiye ekstraktının içeriğindeki asit ve alkoller toplam antioksidan aktivitesine olumlu etki yapmaktadır (Özçelik, 2000).

Biberiye, antibakteriyel etkiye sahip olduğu genellikle cilt bakımlarına yönelik çeşitli ürünlerin içeriğine dahil edilmektedir. Bunun yanı sıra hazmı kolaylaştırır. Migren ağrısına faydalı olduğu bilinen biberiye yüzyıllardır migren hastalığı için uygulanan doğal tedavi yöntemlerinin başında yer almaktadır (URL-7).

Biberiye antioksidan ekstrakt içeriği Tablo.1.1'de gösterilmektedir (Özçelik, 2000).

Tablo 1.1. Biberiye bitkisinin antioksidan ekstraktı içeriği (Özçelik, 2000).

% Biberiye Antioksidan Ekstraktı (BAE) Bileşenleri		
Fenolik diterpenler	% 15	
Rosmarinik asit	% 1-2	
Triterpenik Asitler	Ursolik Asit	% 25
	Oleanolik Asit	% 10
	Betulinik Asit	% 15
Diğer Bileşenler	% 8-10	
Şekerler	% 8	
Flavanoid ve diğer fenolikler	% 2-4	

1.6.2. Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.)

Trabzon hurması, *Ebenaceae* familyasına aittir. *Diospyros* adı Yunancadan gelmiştir ve “Kutsal Yiyecek”, “Tanrıların Yiyeceği” anlamını taşımaktadır (Sponberg, 1977).

Trabzon hurması ülkemiz sınırları içerisinde “Cennet Meyvesi”, “Cennet Elması”, “Frenk Elması”, “Amme”, “Hurma” gibi değişik isimlerle tanınmakta ve tüketim oranı yüksek olan bir bitki türüdür. Anavatanı ise Çin’dir. Trabzon hurması meyveleri A vitamini ve karbohidrat bakımından oldukça zengindir (Onur, 1990).



Şekil 1.5. Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) (URL-2)

Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) antioksidan içeriği zengin bir besin grubu olduğu için çeşitli hastalık çeşitlerinde vücut savunma sisteminde etkin olarak görev yapar. Vücudun savunma sistemini bozan zararlı metabolitlere karşı koruyucu etkisi fazla olduğu için kanseri önleyici besinler sıralamasında en başta yer almaktadır. Yapısında, yüksek oranda içerdiği lifler sayesinde kalp-damr rahatsızlıkları ve mide rahatsızlıklarına karşı doğal koruyucu olarak tıbbi faydası görülmektedir (URL-3).

1.6.2. İncir (*Ficus carica* L.)

İncir (*Ficus carica* L.), dutgiller Moraceae familyasına ait olan, taze ve kuru tüketimi sağlanabilen bir bitki türüdür. Dünya üzerinde üretimi en fazla Akdeniz ülkelerinde yapılan incir sağlıklı yaşamın sembolü olarak bilinmektedir (Çalışkan ve Polat, 2011; Trichopoulou et al.ve diğ., 2006; Çalışkan and Polat, 2011).

50'den fazla bileşik içeren incir meyvesi, insan sağlığı üzerinde birçok hastalığa karşı koruyucu olarak görev yapmaktadır (Ribechini ve diğ., 2011). İncirin yapısında bulunan polifenollerin artışın antioksidan kapasitesini de arttırmaktadır (Çalışkan ve Polat, 2011; Solomon ve diğ., 2006).



Şekil 1.6. İncir (*Ficus carica* L.) (URL-3)

Mor ve siyah renkli olan incirlerin yeşil ve sarı renklilere göre toplam antioksidan kapasitesinin 2 kat fazla olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (Çalışkan ve Polat, 2011).

1.6.3. Töngel (*Mespilus germanica* L.)

Ülkemizde Marmara, Karadeniz'in batısı ve Ege bölgesinde yaygın olarak bulunan *Mespilus germanica* gülgiller *Rosacea* familyasına ait bir bitkidir (Yılmaz ve Gerçekcioğlu, 2013).

Türkiye'de belirli bölgelerde yayılış gösteren bu bitki beşbıyık, muşmula gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Yılmaz, 2015). Orman örtüsü içerisinde yabani olarak yetişen muşmula (*Mespilus germanica* L.) ülkemiz sınırları içerisinde ağaççık ve çalı formunda doğal olarak yetişme alanı bulmuştur (Dönmez ve Aydınözü, 2012). Yapısındaki yumuşak çekirdeği nedeniyle yumuşak çekirdekli meyveler grubuna dahil edilmiştir (Bostan ve İslam, 2007).

Karoten ve C vitamini açısından oldukça zengin olan muşmula bitkisi antioksidan özellik gösterir. Yapısındaki Askorbik asit (C vitamini) oksidasyon sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu toksik maddeleri yok etmeye yardımcıdır (Bilsel ve diğ., 2010).



Şekil 1.7. Töngel (*Mespilus germanica* L.) (URL-4)

Antioksidan özelliğinin yanında töngel, düzenli olarak tüketildiğinde tıbbi açıdan gut hastalığı, şeker-diyabet hastalıklarını önleyici olarak görev yapmaktadır. Kan

dolaşımını hızlandıran töngel, bağırsak sisteminin de güçlenmesine fayda sağlamaktadır (URL-5).

1.6.4. Böğürtlen (*Rubus canescens* DC.)

Böğürtlen (*Rubus canescens* DC.) gülgiller *Rosacea* familyasının türlerinden olan üzerinde yaprakları ve renkli meyvesi olan bitki çeşididir. Meyveleri yenilebildiği gibi yapraklarının hemostatik etkiye sahip oldukları da bildirilmiştir (Tuzlacı ve Tolon, 2000).

Çalı şeklinde, dikenli dalları olan ve yeşil dikenli yapraklara sahip olan yapısı ile önce iek açar ve daha sonra da meyvesini verir. Sulu ve oldukça da lezzetli olan böğürtlen meyvesi herkes tarafından bol miktarda tüketilmelidir. İermiş olduğu bol miktarda vitamin değerleri ile magnezyum ve iyot ile, şeker ve asitler ile insan sağlığı için oldukça fayda sağlamaktadır.

Böğürtlen, kanserle mücadele yetenekleri ile bilinen bir antioksidan sınıfı olan polifenollerini içermektedir. Özellikle, antosiyanin bu meyve içerisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Tuzlacı ve Tolon, 2000).



şekil 1.8. Böğürtlen (*Rubus canescens* DC.) (URL-5)

İçerdiği C vitamini yardımıyla; yaraları iyileştirme, cildi yenileme, vücutta serbest radikallere karşı savaş (toksinler tarafından salınan moleküller), demir emilimini destekleme gibi vücuda birçok faydası bulunmaktadır (Tuzlacı ve Tolon, 2000).

Böğürtlen yaprağı, içerdiği flavanoidler ve fenolik asitler nedeniyle kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahiptir. Damar sertliği, hipertansiyon, sinir hastalıklarının tedavisinde destekleyici olarak kullanılan bitkisel karışımlarda bulunur (Aybastier ve diğ., 2011).

1.6.5. Koyunkıran (*Hypericum calycinum* L.)

Clusiaceae familyasının bir türü olan *Hypericum calycinum* L. Altın sarısı renginde, beş parçalı çiçekleri olan çok yıllık bir bitki türüdür. (Şekil.9.) Yaprakları tam yaprak şeklinde olup, gövde ekseninde etrafında karşılıklı dizilmiş durumda yer alır. Kökeni Avrupa ve Kuzey Amerika'nın kurak bölgeleridir (Deltito ve Bayer, 1998).



Şekil 1.9. Koyunkıran (*Hypericum calycinum* L.) (URL-6)

Ülkemiz *Hypericum* türleri bakımından oldukça zengindir ve ülkemiz sınırları içerisindeki mevcut 96 türün 46'sı endemiktir (Güner ve ark., 2012). Türlerine göre halk arasında kantaron, binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu, yaraotu, kuzukıran gibi yöresel adlarla da bilinmektedir (Baytop, 1999).

Hypericum türleri çok sayıda sekonder metabolit içermektedir. Bunlardan bazıları, flavonoidler, organik asitler, uçucu yağlar, amino asitler, ksantonlar, taninler, proksiyanidinlerdir (Greenson ve diğ., 2006).

Hypericum türleri, halk arasında yüzyıllardan bu yana şifa verici bir ot olarak sinir hastalıkları, adet krampları, siyatik, eklem iltihabı ve midevi rahatsızlıklardan kaynaklanan ağrıların giderilmesinde ve bazı cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Kaçar ve Azkan, 2010).

Hypericum türleri ihtiva ettikleri yukarıda tanımlanan sekonder metabolitlerden dolayı birçok farklı tıbbi etkiye sahiptir. Tıbbi alanda antidepresan, antiviral, yara iyileştirici ve kanser önleyici ilaçların içeriğinde kullanılmaktadır (Çırak ve diğ., 2014).

1.6.6. Dağ çileği (*Fragaria vesca* L.)

Fragaria vesca (Dağ çileği) gülgiller *Rosaceae* familyasına ait, çok yıllık bir bitki türüdür. *Fragaria vesca* ormanlık alan ve nemli bölgelerde görülür. Kumlu, killi ve tınlı topraklara uyumludur. Don olaylarına karşı oldukça dayanıklıdır (Madhuri ve diğ., 2009).

Yaprak ve meyveleri flavonoid, tanen, boreol ve elajik asit içermektedir. Elajik asit antikanser özellikte bir bileşik iken borneol ise parfümeride esansiyel yağ olarak kullanılmaktadır (Madhuri ve diğ., 2009).

Fenolik bileşikler ve C vitamini bakımından oldukça zengin olan dağ çileği, yapısındaki bu bileşenler sayesinde insan sağlığına faydalı olmakta ve kronik bir çok rahatsızlığı önlediği için antioksidan özellikli besin olarak tüketilmektedir (Madhuri ve diğ., 2009).

Dağ çileği, böbrek, idrar yolları ve bağırsak sorunları için de birebirdir. Ayrıca diş etlerini güçlendirir, dişlerdeki tartarı önler.. Çilekte yüksek oranda C vitamini bulunduğu gibi, yüksek tansiyon ve kolesterolü düşüren maddeler içerir. Çilek C vitamini ihtiyacını karşılar. Ayrıca bol miktarda potasyum içerir ve lifli besinler arasında önemli bir yer tutar. Diyabetli hastalar, çileğe şeker ilave etmemek şartıyla bu meyveyi bol bol yiyebilirler (URL-8).

Ülkemizde Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinin üretimi karşılamaktadır. En fazla çilek üretimi yapan illerin başında Mersin gelmektedir (Madhuri ve diğ., 2009).



Şekil 1.10. Dağ çileği (*Fragaria vesca* L.) (URL-7)

1.6.7. Ebegümeci (*Malva sylvestris* L.)

Ebegümeci, anavatanı Güney Avrupa ve Asya olmasına rağmen tüm dünyada geniş yayılım gösteren çok yıllık otsu bir bitkidir. *Malvaceae* familyasının bir üyesi olan bu bitkinin yaprakları, geniş kalp şeklinde ve yumuşak dokuludur (Kültür ve diğerleri, 2007).



Şekil 1.11. Ebegümeci (*Malva sylvestris* L.) (URL-9)

Dünyada farklı isimlerle anılan ebegümeci ülkemiz sınırları içerisinde “Gömeçotu” olarak da adlandırılmaktadır (Kültür ve diğerleri, 2007).

Ebegümecinin yaprak ve yaprak sapının antioksidan özelliğinin belirlenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, ebegümecinin yapısındaki flavonoid, vitamin, terpenoid ve mineral içeriğinden dolayı serbest radikallere karşı antioksidan özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Gastrointestinal bozukluklar, dermatolojik hastalıklar ve ürolojik rahatsızlıklar başta olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Gasparetto ve diğ., 2012).

1.6.8. Adaçayı (*Salvia forskahlei* L.)

Lamiaceae (ballıbabagiller) familyasının bir üyesi olan Adaçayı (*Salvia forskahlei* L.) özellikle Akdeniz Bölgesinin dağlık kesimlerinde yaygın olarak yetişmektedir. Anavatanı, Güney Avrupa olan bu bitki, ülkemiz sınırları içerisinde bazı türleri endemik olmak üzere yetişmektedir (Başkan, 2005).

Oval şeklinde gri-yeşil yapraklara sahip bu bitkinin çiçekleri ise pembe, mor, beyaz ya da kırmızı renklidir (Başkan, 2005).



Şekil 1.12. Adaçayı (*Salvia forskahlei* L.) (URL-10)

Tıbbi özellikleri nedeniyle *Salvia* yaygın olarak kullanılmaktadır. Antioksidan özellikli olmaları *Salvia* türlerinin yapılarında yer alan fenolik asitler, flavonoidler, terpenler ve terpenoidlerden kaynaklanmaktadır. Adaçayı, kanser ve damar tıkanıklığını önleme amacıyla tıbbi olarak tüketilmektedir. Bunların yanı sıra yaşlanmayı geciktirici, sindirim sistemine yardımcı ve kalp sağlığını koruyucudur (Başkan, 2005).

1.6.9. Kıvrıcık nane (*Mentha spicata* L.)

Kıvrıcık nane (*Mentha spicata* L.), halk arasında Ballıbabagiller olarak bilinene *Lamiaceae* familyasına mensup bir bitki türüdür (Karakaplan, 2017).

Dünyanın hemen hemen her bölgesinde yayılış gösteren, anavatanı Orta Avrupa ve Asya olan kıvırcık nane, önemli bir tıbbi aromatik bitki türüdür. Yaprakları nane bitkisinin en çok kullanılan ve ekonomik değeri en fazla olan kısmıdır. Yaprak yapısı sivri uçlu, çok kısa sapa sahip parlak yeşil renkli, kuvvetli kokulu formlar şeklinde görülmektedir (Karakaplan, 2017).



Şekil 1.13. Kıvırcık nane (*Mentha spicata* L.) (URL-11)

Mentha cinslerinin tüm türleri uçucu yağ içermektedir, *Mentha spicata*'nın içeriğinde bulunan uçucu yağın en önemli etken maddesi karvondur. Bunun dışında limonen karveoller, karvon izomerleri, karvil asetatlar, mentol, borneol, linalol, menton, jasmon, perilalkol vb. etken maddeleride içermektedir (Akgül, 1993).

Yapısındaki uçucu yağlar ve benzeri sekonder metabolitler tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi çeşitli alanlarda büyük öneme sahiptir (Başer,1993).

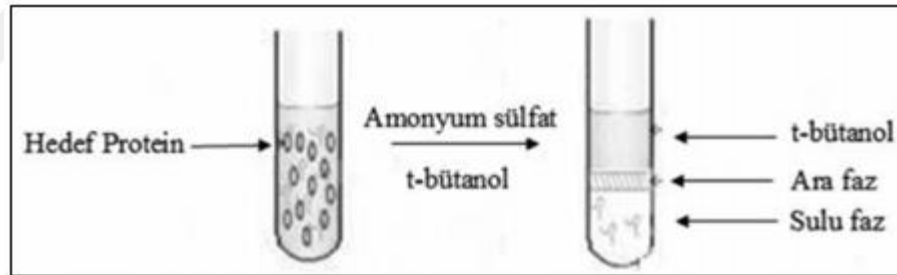
1.7. Üçlü-Faz Ayırma Sistemi(TPP)

TPP, kullanılan protein saflaştırma yöntemleri arasında, saflaştırmada uygulanan hızlı ve etkili bir yöntemlerden birisidir. Sistem, ham enzim çözeltisine yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın (0,8-2,4 M) ve suda çözünürlüğü kısıtlı alifatik bir alkolün (çoğunlukla t-bütanol) ilavesi esasına dayanmaktadır. Çalışmada kullanılan çeşitli alkoller (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ve t-bütanol) alkoller suda çözünürler fakat kozmotrop tuzları çözemezler; bu yüzden çalışma esnasında iki ayrı sıvı faz (alkol fazı üstte ve tuzlu sulu faz altta olmak üzere) meydana gelir (Nostro and ve Ninham, 2012).

t-bütanol, TPP sırasında çöken proteinlere batmama özelliği kazandırır. Ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır, bazen de artar (Dennison and ve Lovrein, 1997).

Üçlü-faz tekniğinin en önemli avantajı büyük ve küçük ölçekli bütün çalışmalara uygulanabilmesidir. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pellet (ara) faza geçer. Oluşan üst fazda genellikle organik solventlerde çözüneme özelliğine sahip, kontamine yapılar yer almaktadır. TPP'nin önem arz eden başka bir özelliği de düşük molekül ağırlıklı yapıların (lipidler ve fenollü yapılar) uzaklaştırılmasıdır (Duman, 2016).

TPP'de orta faz genellikle birkaç dakikadan sonra oluşmaya başlar. Üst ve alt fazlardaki hidrasyon kaymaları, eklenen amonyum sülfat ve t-bütanol miktarlarına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle başlangıç çözeltisinin mL başına 0,2-0,5 mL t-bütanol oranı yeterli olmaktadır. Şekil 1.14.'de TPP ile faz oluşumları gösterilmiştir (Duman, 2016).



Şekil 1.14. TPP Faz Oluşumları (Duman, 2016)

Optimal pH ve sıcaklık gibi deneysel çalışmaları kolaylaştırması TPP'nin, avantajlarından birisidir (Duman, 2016).

TPP uygulamasını optimize ederken kullanılan t-bütanol ve amonyum sülfat parametreleri için ara fazın haricinde alt ve üst fazlarda da analizler yapılır. Böylece hedeflenen proteinin yanı sıra, istenmeyen proteinler ve yapıların hangi fazlara dağıldığını gözlemlemek de mümkün olur (Dennison ve Lovrein, 1997).

Diğer saflaştırma yöntemleri ile kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşük olacağından ve geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse, maddi

açısından oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır (Dennison ve Lovrein, 1997).



2. MALZEME YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar genel olarak SİGMA Ltd., MERCK Ltd. ve Biolife firmalarından satın alınmıştır. Polivinilpolipirrolidon (PVPP), Duchefa Biochemie firmasından temin edilmiştir. Elektroforez için kullanılan markörler ise BİO-RAD firmasından temin edilmiştir.

2.2. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Tür Teşhislerinin Yapılması

Bu çalışmada kullanılan Biberiye (*Rosmarinus officinalis*.L.), Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.FIL.), İncir (*Ficus carica* L.), Töngel (*Mespilus germanica* L.), Böğürtlen (*Rubus canescens* DC.), Koyunkıran (*Hypericum calycinum* L.), Dağ çileği (*Fragaria vesca* L.), Ebegümece (*Malva sylvestris* L.), Adaçayı (*Salvia forskahlei* L.) ve Kıvırcık nane (*Mentha spicata* L.) çoğunlukla Kocaeli iline ait çeşitli bölgelerde doğal yayılış göstermektedir. İlk olarak çalışmada kullanılması planlanan bu bitki taksonlarının arazide gözlemlendikleri ve toplanacakları lokalite koordinatları tespit edildi sonrasında yaşadıkları habitat türleri belirlendi. (Tablo.2.1.). Habitat tipleri belirlenirken, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü tarafından ülke çapında yapılmakta olan Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme Projesi (UBENİS) çalışmalarında kullanılması istenilen EUNİS (Avrupa Doğa Bilgi Sistemi - European Nature Information System) veritabanı baz alındı. Örneklenmesi planlanan bitkilerin hiçbirisi Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda IUCN tarafından belirlenen tehlike kategorilerinde bulunmadığı tespit edildi. Ayrıca bu türler BERN ve CITES sözleşmeleriyle korunan, toplanılması ve ticareti sakıncalı ve yasaklanmış türlerden değildir.

Tablo 2.1.' de belirtilen bölgelerden vejetasyon zamanlarına göre bahar ve yaz aylarında toplanan bitkiler laboratuvara getirildimiş, morfolojik özellikleri baz alınarak tür teşhisleri yapılmıştır. Daha sonra bitkilerin kullanılacak olan yaprak kısımları diğer bölgelerinden ayrıldı ve yıkama kurutma işlemi yapıldıktan sonra tür ismi-tarih şeklinde etiketleme yapılarak -80°C'ye dereceye kaldırılarak muhafaza edildi.

Tablo 2.1. Kullanılan bitkilere ait lokalite, habitat ve toplandıkları bölge özellikleri

Bitki Adı	Toplandığı Enlem-Boylam	Habitat	Toplandığı Bölge
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	E:40.799075° B:29.974099°	J1.1 Şehir,ilçe merkezindeki yerleşim alanları	Kocaeli ili, İzmit ilçesi, Bayındırlık mevkii Bıçkıdere Göleti üst kısmı
Trabzon hurması (<i>Diospyros kaki</i> L. FIL.)	E: 40.904908° B: 29.924811	J1.2 Köy,kırsal çevredeki yerleşim alanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, TahtalıBarajı yakınları Gere de Köyü
İncir (<i>Ficus carica</i> L.)	E: 40.904908° B: 29.924811°	J1.2 Köy,kırsal çevredeki yerleşim alanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, TahtalıBarajı yakınları Gere de Köyü
Töngel (<i>Mespilus germanica</i> L.)	E: 40.905465° B: 29.948510°	J1.2 Köy,kırsal çevredeki yerleşim alanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, TahtalıBarajı yakınları Süverler Köyü
Böğürtlen (<i>Rubus canescens</i> DC.)	E: 40.798951° B: 29.979846°	J1.1 Şehir,ilçe merkezindeki yerleşim alanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Bayındırlık mevkii Bıçkıdere Göleti üst kısmı
Koyunkıran (<i>Hypericum calycinum</i> L.)	E: 40.840908° B: 29.925617°	G3.5 Karaçam ormanları G4.5 Karışık ormanlar	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Umuttepe yerleşkesi, Kuzeybatı yönü Ormanlık alanları

Tablo 2.1. (Devam) Kullanılan bitkilere ait lokalite, habitat ve toplandıkları bölge özellikleri

Bitki Adı	Toplandığı Enlem-Boylam	Habitat	Toplandığı Bölge
Dağ çileği (<i>Fragaria vesca</i> L.)	E:40.866116° B: 29.938899°	G3.5 Karaçam ormanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Umuttepe yerleşkesi, Kuzeybatı yönü Ormanlık alanları
Ebegümeci (<i>Malva sylvestris</i> L.)	E:40.819312° B: 29.920622°	J1.2 Köy,kırsal çevredeki yerleşim alanları	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Umuttepe yerleşkesi Ormanlık alanlar
Adaçayı (<i>Salvia forskahlei</i> L.)	E: 40.852458° B: 29.935201°	G4.5 Karışık ormanlar	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Umuttepe yerleşkesi, Kuzeydoğu yönü Ormanlık alanları
Kıvırcık nane (<i>Mentha spicata</i> L.)	E: 40.836044° B: 29.902917°	E2.2 Nemli otsualanlar	Kocaeli ili İzmit ilçesi, Umuttepe yerleşkesi, Kuzeybatı yönü Yarı nemli çayırliklar

2.3. Bitki Dokularından Ham Ekstraktların (Özütlerinin) Hazırlanması Ve Konsantre Edilmesi

30 gram bitki yaprağı, 200 ml 100 mM (pH 6,5) sodyum fosfat tampon çözeltide 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 5 ila 12,5 mg ml⁻¹ olacak şekilde polivinilpolipirrolidon (PVPP) eklendi ve solüsyon 14.000xg de 30 dk 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 marketten temin edilen olan mantar (*Agaricus bisporus*) kullanıldı (Rescigno ve diğ., 1997). Süpernatant önce oda sıcaklığında 0,22 µm çapında selüloz zardan geçirilerek süzüldü, daha sonra 15 kDa ayırma sınırı olan selüloz zar yardımıyla santrifüj ile konsantre edildi ve elde edilen karışım polifenol oksidaz aktivite tayininde kullanıldı.

2.4. Enzim Aktivite Tayini

Polifenol oksidaz (PPO) varlığının tespiti için 4-metilkatekol ve pyrokatekol olmak üzere iki substrat kullanıldı. Spektrofotometrede (Cary 60, Agilent) 4-metilkatekol ve pyrokatekol için sırasıyla 410 ve 420 nm’de absorbans değerindeki artış ölçüldü (25°C) (Jiang ve diğ., 1999). Enzim aktivitesini ölçmek için örnek küveti 100 mM derişiminde hazırlanan 1 ml substrat (4-metilkatekol/pyrokatekol) ve uygun miktarda seyreltilmiş 1 ml enzim solüsyonu eklenerek, kontrol küveti ise aynı şekilde fakat enzim olmadan hazırlandı. Enzim solüsyonu 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) kullanılarak elde edildi (Alici ve Arabaci, 2016; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). Polifenol oksidaz aktivitesi pyrokatekolün/4-metilkatekolün okside olma katsayısı olan 3450/1010 M-1 cm-1 sönüm katsayısı kullanılarak ve başlangıç reaksiyon hızına göre belirlendi(Ögel ve diğ., 2006; Waite, 1976). Bir ünite polifenol oksidaz aktivitesi (EU) dakikada 1 µmol kinon oluşması esasına göre hesaplandı.

2.5. Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford Metoduna göre belirlenmiş; standart grafiğın çizilmesinde (Ek-A) protein olarak sığır serum albümini kullanılmıştır (Bradford, 1976).

2.6. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi ile Polifenol Oksidazın Saflaştırılması

Çalışmada, 2 mL enzim ekstraktı, farklı amonyum sülfat doygunluklarına (%20, %30, %40, %50 ve %60 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 dk 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 7,0) çözündürüldü. 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 (2160 U), %100 olarak kabul edildi. Amonum sülfat, distile su ve t-bütanolden (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.

2.7. Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu

2.7.1. Moleküler ağırlığın hesaplanması

Kısmi olarak saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesinde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (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 gümüş boyama metodu uygulanarak boyandı (Blum ve diğ., 1987). Molekül ağırlığının hesaplanmasında yararlanılan standart grafik Ek-B'de verildi.

2.7.2. Sıcaklık ve pH'nın polifenol oksidaz üzerine etkisi

Sıcaklıktaki değişikliklerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek amacı ile enzim ve substrat solüsyonları spektrofotometrede (Cary60, Agilent) enzim aktivite ölçümü yapılmadan önce 10 dk boyunca 30°C ile 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 ile 80°C arasındaki farklı sıcaklıklara (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) ayarlanmış su banyosunda yaklaşık 1 saat bekletilerek polifenol oksidaz aktivite ölçümü gerçekleştirildi.

Farklı pH'ların polifenol oksidaz aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için 3,0 ile 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 ile 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 (Kavrayan ve Aydemir, 2001; Gulcin ve diğ., 2005; Sutay Kocabas ve diğ., 2011). pH'nın enzim stabilitesi üzerine etkisini test etmek için ise pH aralığı 3.0 ile 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).

2.7.3. Organik çözücülerin polifenol oksidaz aktivitesine etkisi

Organik çözücülere karşı saflaştırılmış polifenol 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 polifenol oksidaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.7.4. Substrat spesifite analizi

Fenol oksidazları karakterize etmede lakkaz, pyrokatekol oksidaz, tirozinaz ve peroksidazlar için karakteristik substrat olarak tanımlanmış kimyasallar kullanıldı. Buna göre, 0-250Mm arasındaki farklı konsantrasyonlarda (0,1,2,4,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,100,150,200,250 mM) 4-metil katekol (410 nm), ABTS (420 nm), pyrokatekol (420 nm), hidrokinon (440 nm), H₂O₂ (240 nm), pyrogallol (430 nm), syringaldezine (530 nm), L-tirozin (475 nm) ve L-Dopa (475 nm) substrat olarak kullanılarak fenol oksidaz aktiviteleri ölçüldü. K_m ve V_{Max} değerleri Lineweaver–Burk Plot ile hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bitki Örneklerinin Polifenol Oksidaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Polifenol oksidaz aktivite analizi için 4-Metilkatekol ve Pyrokatekol ile yapılan çalışmalarda denemelerde yüksek karşılaştırılabilir aktivite değerleri Pyrokatekol ile elde edildiği için çalışmada substrat olarak Pyrokatekol kullanıldı (Tablo 3.1.) Benzer şekilde Türkhan ve diğ.leri (2018) tarafından Alıç (*Crataegus monogyna*) meyvesinde gerçekleştirilen PPO çalışmasında, enzim aktivite ölçümlerinde üç farklı substrat; 4-metil katekol, pyrokatekol ve L-tirosin ile absorbans ölçümü yapılmış ve en az aktivite değerine L-Tirozin kullanımında, en yüksek aktivite değerine ise pyrokatekol varlığında ulaşılmıştır.

Bitki örneklerinden elde edilen ham ekstraktlarda belirlenen aktivite sonuçları Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Buna göre, en yüksek aktivite Biberiye bitkisinde gözlemlendi.

Tablo 3.1. Bitki ham ekstratlarına ait polifenol oksidaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması

Fenol oksidaz kaynağı	Polifenol oksidaz aktivite (umol mL ⁻¹ dk ⁻¹)
Mantar (<i>Agaricus bisporus</i>)	154
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	333
Kıvrıkcık nane (<i>Mentha spicata</i>)	6
Adaçayı (<i>Salvia forskahlei</i>)	33
Ebegümeci (<i>Malva sylvestris</i>)	65
Dağ çileği (<i>Fragaria vesca</i>)	13
Koyunkıran (<i>Hypericum calycinum</i>)	2
Böğürtlen (<i>Rubus canescens</i>)	2
Töngel (<i>Mespilus germanica</i>)	11
Trabzon hurması (<i>Diospyros kaki</i>)	5
İncir (<i>Ficus carica</i>)	6.2
* Aktivite ölçümlerinde güvenilir bulgular elde edilmesi üzerine substrat olarak pyrokatekol kullanıldı.	

Biberiye yapraklarının fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu ve buna bağlı olarak antioksidan özellikli olarak kullanılabileceği ilk defa Rac ve Ostric-Matijasevic (1955)'e atfen Yanishlieva ve diğ. (2006) tarafından rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada biberiyedeki PPO aktivitesinin diğer bitkilere oranla yüksek çıkması yapısında yüksek oranda polifenolik bileşik içerdiğini doğrular niteliktedir. Rababah ve diğ., (2004) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise biberiye, çemen otu, zencefil, yeşil ve siyah çay, üzüm çekirdeği, gotu kola (Hindistan ve Endonezyaya ait tropik bir bitki) ve ginkgo (Japon eriği) özütleri toplam fenol içerikleri açısından karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; en yüksek toplam fenol içeriği biberiye ekstresinde saptanmıştır.

3.2. Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.1. Ekstraksiyon pH'sının optimizasyonu

Her bir bitki için gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin optimize edilmesi sırasında pH'nın etkisi ilk olarak araştırıldı. Bunun için sırasıyla pH'sı 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tampon çözeltilerinde bitki örnekleri homojenize edildi. En yüksek polifenol oksidaz aktivite değerleri kıvrırcık nane, ebegümeci, böğürtlen, töngel, hurma ve incir hariç pH 6,5'da elde edildi. (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna pH'nın etkisi

Polifenol oksidaz aktivite ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{dk}^{-1}$)					
Polifenol oksidaz kaynağı	pH				
	6.0	6.5	7	7.5	8
Mantar (<i>A. bisporus</i>)	257±2	279±26	154±14	145±23	91±13
Biberiye (<i>R. officinalis</i>)	347±33	936±87	333±11	283±52	91±40
Kıvrırcık nane (<i>M. spicata</i>)	83±5	74±4	61±5	60±7	5±3
Adaçayı (<i>S. forskahlei</i>)	7±1	86±3	33±10	31±9	1±0.1
Ebegümeci (<i>M. sylvestris</i>)	15±2	15±1	65±10	66±3	60±9
Dağ çileği (<i>F. vesca</i>)	4±0.5	14±3	13±0	5±1.8	5±1
Koyunkıran (<i>H. calycinum</i>)	2±0.4	3±1	2±0.3	2±1	1±0.3

Tablo 3.2. (Devam) Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna pH'nın etkisi

Polifenol oksidaz aktivite ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{dk}^{-1}$)					
Polifenol oksidaz kaynağı	pH				
	6.0	6.5	7	7.5	8
Böğürtlən (<i>R. canescens</i>)	3±0.8	6±1	24±6	1±0.1	1±0.1
Töngel (<i>M. germanica</i>)	2±02	9±3	11±6	15±4	7±3
Trabzon hurması (<i>D. kaki</i>)	15±8	5±2.3	6.2±2	14±7	9±1
İncir (<i>F. carica</i>)	3.7±2	5±2.3	6.2±2	14±7	9±1

3.2.2. PVPP konsantrasyonunun optimizasyonu

Ekstraksiyon optimizasyonunda test edilen bir diğer parametre ise fenolik maddeleri uzaklaştırmada kullanılan Polivinilpirolidon (PVPP) miktarıdır. Buna göre ekstraksiyon ortamına 5 ila 75 mg ml⁻¹ PVPP eklendi ve aktivite değerleri ölçüldü. Bu işlem yapılırken her bitkinin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerindeki tampon çözeltiler dikkate alındı.

Tablo 3.3.'de verilen bilgiler PVPP eklenmesinin bitki ham ekstraktlarının hazırlanmasına olumsuz yönde etki gösterdiğine işaret etmiştir. Bu nedenle ekstraksiyon işleminin PVPP eklenmeden gerçekleştirilmesi uygun görüldü.

Ayrıca seçilen bitkiler arasında en yüksek PPO aktivitesine sahip örneğin Biberiye (*R. officinalis*) olması sebebiyle enzim kaynağı olarak bu bitki seçilmiş olup bir sonraki aşama olan enzim saflaştırmasında kullanıldı. Biberiye için gerçekleştirilecek ekstraksiyon PVPP eklenmeden ve pH 6,5'da hazırlanmış 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.3. Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna PVPP'nin etkisi

Polifenol oksidaz aktivite ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{dk}^{-1}$)								
Polifenol oksidaz kaynağı	PVPP miktarı (mg mL ⁻¹)							
	0	5	12.5	25	37.5	50	62.5	75
Mantar (<i>A.bisporus</i>)	279±26	250±10	94±7	61±5	24±5	15±4	8±5	6±2.2
Biberiye (<i>R. officinalis</i>)	936±87	305±5	234±4	145±23	86±3	66±3	46±3	12±1

Tablo 3.3. (Devam) Polifenol oksidaz ekstraksiyonuna PVPP'nin etkisi

Polifenol oksidaz aktivite ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}$)								
Polifenol oksidaz kaynağı	PVPP miktarı (mg mL^{-1})							
	0	5	12.5	25	37.5	50	62.5	75
Kıvırcık nane (<i>M. spicata</i>)	83±5	74±4	59±31	33±10	47±10	33±12	14±7	9±4
Adaçayı (<i>S. forskahlei</i>)	86±3	60±7	34±7	31±9	13±1	14±3	6±2	5±2
Ebegümeci (<i>M. sylvestris</i>)	66±3	47±10	33±10	30±7	16±4	11±6	7±1	3±1
Dağ çileği (<i>F. vesca</i>)	14±3	13±1	7±1	4±2	2±1	2±0.4	5±2	3±1
Koyunkıran (<i>H. calycinum</i>)	3±1	4±1	3±2	2±0.3	2±1	2±1	1±0.1	2±0.1
Böğürtlen (<i>R. canescens</i>)	24±6	15±1	9±4	5±2	5±1	3±3	3±1	2±1
Töngel (<i>M. germanica</i>)	15±4	8±1	6±2	5±1	5±1	3±1	3±1	2±0.3
Trabzon hurması (<i>D. kaki</i>)	15±8	16±3	7±3	6±2	4±2	4±2	3±1	3±1
İncir (<i>F. carica</i>)	14±7	9±3	8±5	7±3	4±1	2±0.4	1±0.1	1±0.4

3.3. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Fenol Oksidaz Enziminin Biberiye'den (*R. officinalis*) Saflaştırılması

3.3.1. Amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi

Çalışmada, PVPP kullanılmadan pH 6,5 100 mM'lık sodyum fosfat tampon çözeltisiyle hazırlanan 2 mL enzim ekstraktının (576 U, 1 mg protein), %20, %30, %40, %50 ve %60'lık (w/w) amonyum sülfat doygunluklarına getirilebilmesi için sırasıyla 0,212, 0,328, 0,452, 0,582, 0,722 gram amonyum sülfat tuzu konuldu. Daha sonra karıştırıcı ile tuzlar 60 dk boyunca çözdürüldü. Üzerine 2 mL enzim oranında t-bütanol eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Üç fazın ortaya çıkması sistemin 4,000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmesiyle gerçekleştirildi. Üst faz (t-bütanolü içeren faz) cam pastör pipeti kullanarak dikkatli bir şekilde sistemden uzaklaştırıldı. Ara faz ve alt faz ise mikropipet yardımıyla birbirinden ayrılarak protein miktar ve enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı. Ara faz 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 6,5) içinde çözdürüldükten sonra analiz edilirken alt faz aynı tampon çözeltisine karşı bir gece diyaliz edildikten sonra analizlerde kullanıldı.

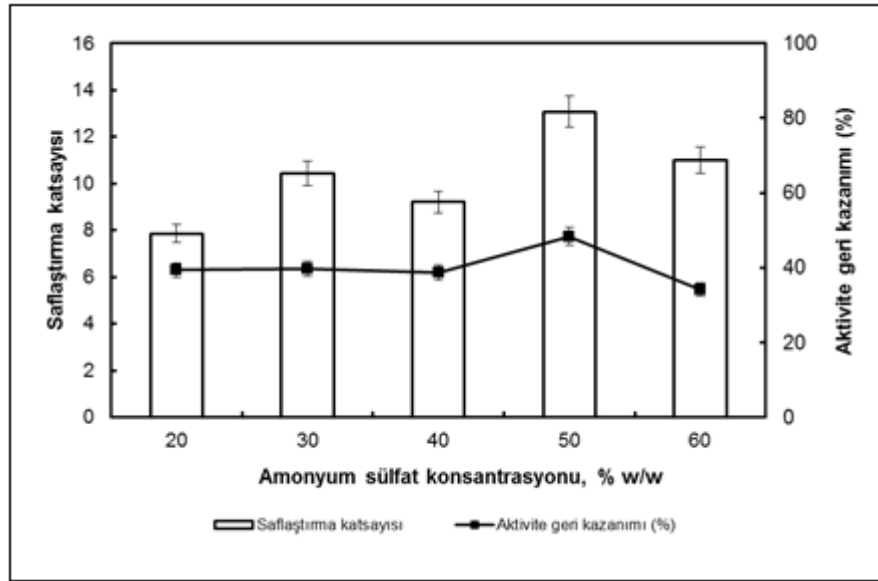
Spesifik aktivite 1 mg protein başına enzim ünitesidir. Saflaştırma katsayısı herhangi bir fazda ölçülen enzime ait spesifik aktivitenin ham ekstraktına oranıdır. Protein

geri kazanım değeri ise herhangi bir fazdaki toplam enzim aktivite değerinin ham ekstraktına oranıyla hesaplanır.

Fenol oksidaz aktivite geri kazanım değerlerinin hazırlanan TPP sistemlerinin hepsinde ara fazda yüksek çıkması enzimin bu fazda ayrıldığına işaret etmektedir (Tablo 3.4.). Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarını içeren sistemlerden %50 (w/w)'lık olanında saflaştırma katsayısı (13) ve aktivite geri kazanımı (%48) en yüksek değerlerde ölçüldüğünden sistemin hazırlanmasında bu konsantrasyon seçildi (Şekil 3.1.).

Tablo 3.4. Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun TPP sisteminde polifenol oksidaz ayırımına etkisi

	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	2160	2160	1	1	100
%20 AS Üst faz	57	24	0.42	0.03	1
%20 AS Ara faz	16980	849	0.05	7.9	39
%20 AS Alt faz	532	67	0.13	0.25	3
%30 AS Üst faz	7	2	0.46	0.003	0.1
%30 AS Ara faz	22526	856	0.04	10	40
%30 AS Alt faz	141	18	0.13	0.065	0.8
%40 AS Üst faz	31.6	12	0.38	0.06	0.5
%40 AS Ara faz	19880	835	0.04	9.2	39
%40 AS Alt faz	204	24	0.12	0.094	1.1
%50 AS Üst faz	10	4	0.40	0.004	0.2
%50 AS Ara faz	28243	1045	0.04	13	48
%50 AS Alt faz	98.4	12	0.12	0.05	0.5
%60 AS Üst faz	22,60	10	0.46	0.01	0.5
%60 AS Ara faz	23760	736	0.03	11	34
%60 AS Alt faz	121	14	0.11	0.06	0.6



Şekil 3.1. Amonyum sülfat konsantrasyonunun TPP sisteminde ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanımına etkisi

3.3.2. Ham ekstrakt/t-bütanol oranının belirlenmesi

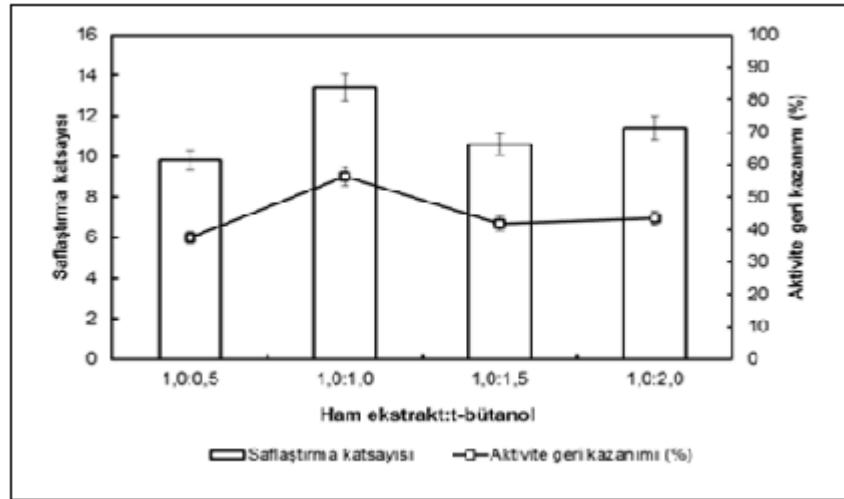
En uygun amonyum sülfat konsantrasyonu (%50, w/w) belirlendikten sonra TPP sistemindeki ham ekstrakt/t-bütanol oranlarının optimizasyonu üzerine çalışmalar yapıldı. Buna göre, ekstraksiyon işleminden sonra %50'lik (w/w) amonyum sülfat çözeltisi üzerine ham ekstrakt/t-bütanol oranları sırasıyla 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0 olacak şekilde t-bütanol eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk. bekletildikten sonra santrifüj edilen içerikte üç farklı faz gözlemlendi ve hepsi ayrı bir şekilde muhafaza edildikten sonra her fazda enzim aktivite ve protein miktarı ölçümleri yapıldı. Enzim aktivite geri kazanım değerleri yine ara fazda yüksek çıkmıştır (Tablo 3.5.). Farklı ham ekstrakt / t-bütanol oranlarını içeren sistemlerden 1:1 oranında olanında saflaştırma katsayısı (13,4) ve aktivite geri kazanımı (%56,4) en yüksek değerlerde ölçüldüğünden sistemin hazırlanmasında bu konsantrasyon seçildi (Şekil 3.2.)

Tablo 3.5. Ham ekstrakt/t-bütanol oranının TPP sisteminde polifenol oksidaz ayırımına etkisi

	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	2703	2054	0.76	1	100
1.0:0.5 üst faz	43	18	0.42	0.01	0.9

Tablo 3.5. (Devamı) Ham ekstrakt/t-bütanol oranının TPP sisteminde polifenol oksidaz ayırımına etkisi

	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	2703	2054	0.76	1	100
1.0:0.5 ara faz	26517	769	0.03	9.8	37.4
1.0:0.5 alt faz	173	19	0.11	0.06	0.9
1.0:1.0 üst faz	44	15	0.34	0.016	0.7
1.0:1.0 ara faz	36187	1158	0.03	13.4	56.4
1.0:1.0 alt faz	152	18	0.12	0.06	0.9
1.0:1.5 üst faz	55	24	0.44	0.02	1.2
1.0:1.5 ara faz	28633	859	0.03	10.6	41.8
1.0:1.5 alt faz	244	22	0.09	0.09	1.1
1.0:2.0 üst faz	28	11	0.40	0.01	0.5
1.0:2.0 ara faz	30862	895	0.03	11.42	43.6
1.0:2.0 alt faz	188	21	0.11	0.07	1.0



Şekil 3.2. Ham ekstrakt:t-bütanol oranının TPP sisteminde ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve geri kazanımına etkisi

3.3.3. Üçlü-faz ayırma sistem pH'sının belirlenmesi

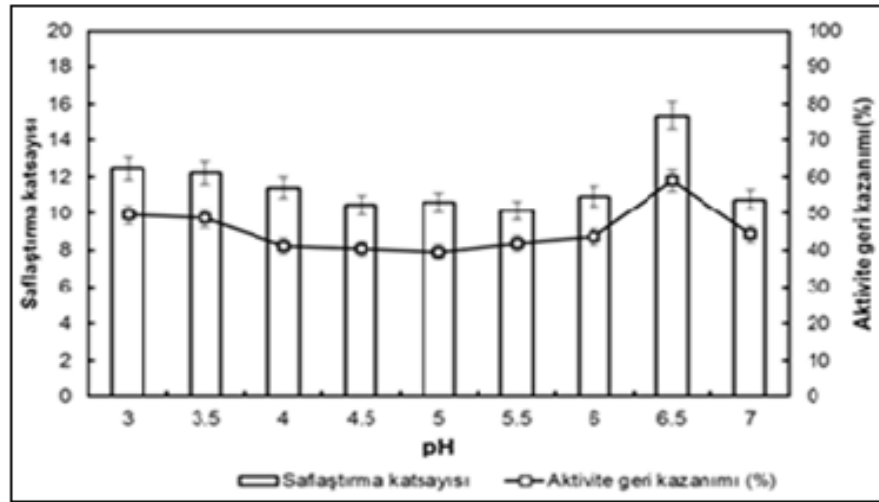
Polifenol oksidaz enziminin TPP sisteminden yüksek verimde saflaştırılması için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının son basamağı sistem pH'sının belirlenmesidir. Bunun için, ekstraksiyon işleminden sonra %50'lik (w/w) amonyum sülfat çözeltisi üzerine 1.0:1.0 oranında t-bütanol eklendi ve sistem pH'sı 3,0 ila 7,0 aralığında ayarlandı. Oda sıcaklığında 30 dak bekletildikten sonra santrifüj edilen içerikte üç farklı faz gözlemlendi ve hepsi ayrı bir şekilde muhafaza edildikten sonra her fazda enzim aktivite ve protein miktarı ölçümleri yapıldı. Enzim aktivite geri kazanım değerleri yine ara fazda yüksek çıkmıştır (Tablo 3.6.). Farklı pH'larda hazırlanan sistemlerden pH'sı 6,5 olanında saflaştırma katsayısı (15) ve aktivite geri kazanımı (59) en yüksek değerlerde ölçüldüğünden sistemin hazırlanmasında bu konsantrasyon seçildi (Şekil 3.3.).

Tablo 3.6. TPP sistem pH'sının polifenol oksidaz ayırımına etkisi

	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	2541	1982	0.78	1	100
pH 3.0 üst faz	31.6	12	0.38	0.01	0.6
pH 3.0 ara faz	31677	982	0.03	12.5	49.5
pH 3.0 alt faz	183	21	0.11	0.07	1.1
pH 3.5 üst faz	36	14	0.40	0.01	0.7
pH 3.5 ara faz	31064	31064	31064	31064	31064
pH 3.5 alt faz	963	963	963	963	963
pH 4.0 üst faz	54.5	24	0.44	0.02	1.2
pH 4.0 ara faz	29035	813	0.03	11.4	41
pH 4.0 alt faz	157	16	0.10	0.06	0.8
pH 4.5 üst faz	72	36	0.50	0.03	1.8
pH 4.5 ara faz	26600	798	0.03	10.5	40.3
pH 4.5 alt faz	310	31	0.10	0.12	1.6

Tablo 3.6. (Devam) TPP sistem pH'sının polifenol oksidaz ayırımına etkisi

	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	2541	1982	0.78	1	100
pH 5.0 üst faz	45	18	0.40	0.02	0.9
pH 5.0 ara faz	26965	782	0.03	10.6	39.5
pH 5.0 alt faz	223	23	0.10	0.09	1.2
pH 5.5 üst faz	57	26	0.46	0.02	1.3
pH 5.5 ara faz	25843	827	0.03	10.2	41.7
pH 5.5 alt faz	200	18	0.09	0.08	0.9
pH 6.0 üst faz	46	17	0.38	0.02	0.8
pH 6.0 ara faz	27806	862	0.03	10.9	43.5
pH 6.0 alt faz	226	23	0.10	0.09	1.1
pH 6.5 üst faz	43	18	0.42	0.02	0.9
pH 6.5 ara faz	39000	1170	0.03	15	59
pH 6.5 alt faz	147	17	0.11	0.06	0.8
pH 7.0 üst faz	28	13	0.46	0.01	0.6
pH 7.0 ara faz	27375	876	0.03	10.78	44.2
pH 7.0 alt faz	225	18	0.08	0.09	0.9

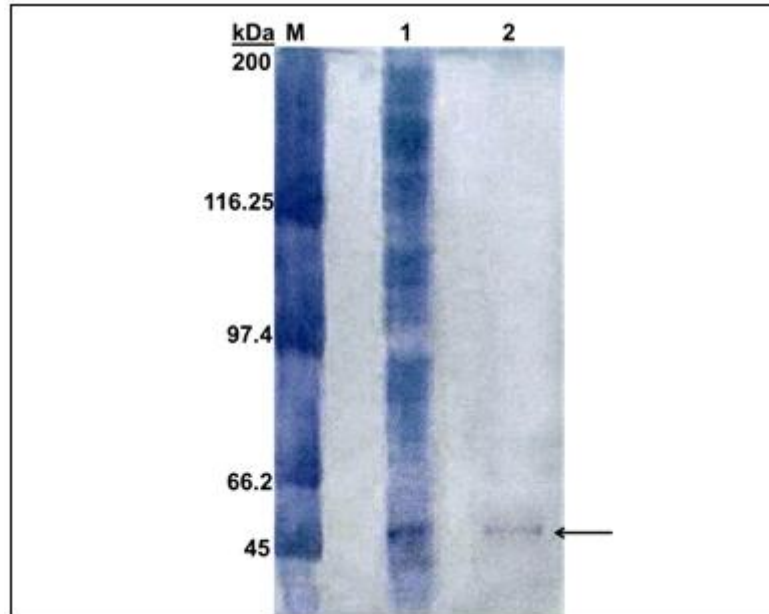


Şekil 3.3. TPP sistem pH'sının ara faz için hesaplanan saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanımına etkisi

Sonuç olarak fenol oksidaz enzimi Biberiye'den (*R. officinalis*) %50 (w/w) Amonyum sülfat ve ham ekstrakt:t-bütanol oranı 1:1 olacak şekilde hazırlanan TPP sisteminde (pH 6,5) ara fazda toplandı ve yaklaşık 15 kat saflaştırma elde edildi.

3.4. SDS-PAGE Analizi

TPP sistemi ile saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini % 10'luk (w/v) SDS-PAGE ile gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası jel, Coomassie Brilliant-Blue metodu ile boyandı. Enzimin saflığının kontrolü ve molekül kütlesinin tayini için yapılan elektroforez sonucu Şekil 3.4.'de verilmiştir. Elektroforegramdan görüldüğü gibi, Biberiyeden izole edilerek hazırlanan enzim preparatı oldukça homojen bir bant vermektedir. Enzimin molekül kütlesi 53 kDa olarak hesaplanmıştır (Ek-B).



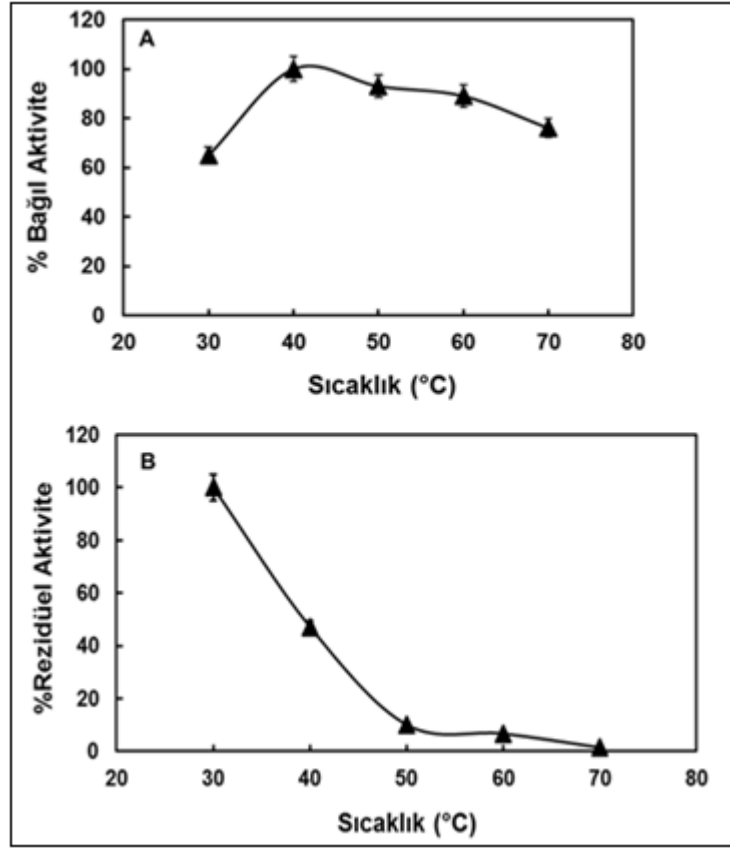
Şekil 3.4. Biberiye'den saflaştırılan polifenol oksidazın SDS-PAGE jel görüntüsü. M: BioRad Moleküler kütle standartlar (Miyozin; 200 kDa, β -galaktozidaz; 116,25 kDa, fosforilaz b; 97,4 kDa, ovalbumin; 45 kDa); 1: Ekstraksiyon sonrası ham ekstrakt diyalizat 10 μ l örnek uygulanmıştır; 2: TPP sonrası polifenol oksidaz enzim preparatı (10 μ l örnek uygulanmıştır).

Fenol oksidazların moleküler kütleleri ve yapıları kaynaktan kaynağa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Genellikle bitkisel ve mantar kaynaklı fenol oksidazların molekül kütlesi 30-60 kDa arasında değişmektedir (Sutay, 2003). Örneğin, Bektaşî üzümü meyvesinin PPO enzim ağırlığı 31 kDa (Bravo ve Osorio, 2015), yeşil fasülye (*Phaseolus vulgaris* L.) PPO'sunun 57,5 kDa, yeşil fasülye kabuğunun 39 kDa (Guo ve diğ., 2009), brokoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) PPO'sunun 51,3 kDa (Gawlik-Dziki ve diğ., 2007) olduğu rapor edilmiştir. Tespit edilen Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin molekül ağırlığının literatür PPO molekül ağırlığına sahip değerlere uygun olduğu belirlendi.

3.5. Reaksiyon Sıcaklığının Biberiye (*R. officinalis*) Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın polifenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30-70°C arası sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite ölçümleri Şekil 3.5'te verilmiştir. Oluşturulan grafikte Biberiye fenol oksidazı için optimum reaksiyon sıcaklığı 40°C olarak bulundu (Şekil 3.5A). Bu sıcaklık değerinin üzerinde aktivite azalmış ancak test edilen en yüksek sıcaklık derecesinde bile (70°C) hala başlangıçtaki aktivitenin %76'ı korunmuştur. Literatürde farklı bitki kaynaklarından izole edilen fenol oksidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri 20 ila 45°C arasında rapor edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu çalışmada izole edilen fenol oksidaz enzimi literatürde rapor edilen sıcaklık aralığındadır.

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisinin belirlenmesi için 30 ila 70°C arası sıcaklıklarda enzim 60 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Şekil 3.5B'de görüldüğü üzere enzimin kararlı kaldığı optimum sıcaklık değeri 30°C olarak belirlendi. Sıcaklık 40°C'ye çıkartıldığında enzim aktivitesinde çok hızlı bir düşüş gözlenmiştir (30°C'de ölçülen aktivitenin yaklaşık %53'u kaybolmuştur). 50°C ve üzerinde enzimatik aktivite neredeyse kaybolmuştur. Buna göre, enzimin yüksek sıcaklık derecelerinde (50-70°C) aktif olmasına rağmen stabilitesinin kısa sürede bozulduğunu görmekteyiz. Bu durum enzimin uzun süren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini sınırlayabilir.



Şekil 3.5. Sıcaklık değişiminin enzim aktivite (A) ve kararlılığı (B) üzerine etkisi

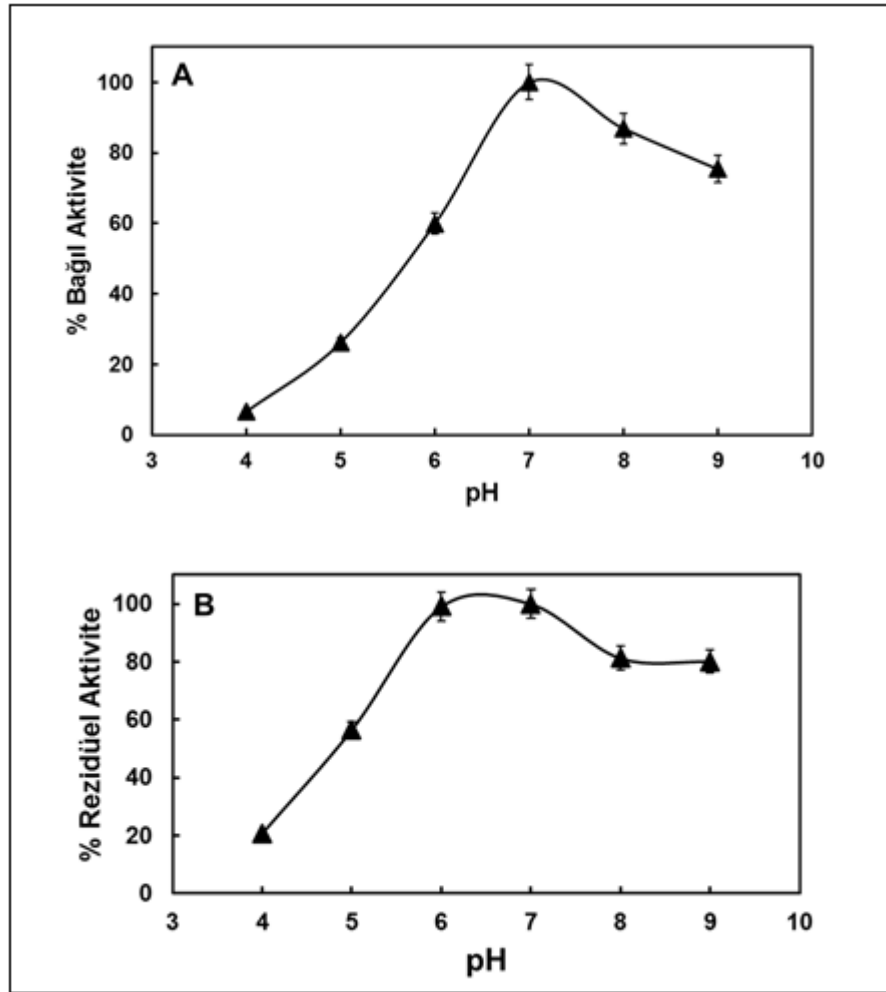
Tablo 3.7. Farklı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen polifenol oksidazların kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

Bitki kaynağı	Optimum sıcaklık	Optimum Ph	Referans
Amasya elması	17	7,0	Oktay ve diğ., 1995
Çilek	25	5,0	Dalmadi ve diğ., 2006
Dut ¹	45	7,0	Sutay Kocabas ve diğ., 2011
Enginar ²	25	6,0	Aydemir, 2004
Hurma	20-40	7,5	Özen ve diğ., 2004
Kekik ³	35	6,5	Dogan ve Dogan, 2004
Kestane ⁴	40	5,0	Xu ve diğ., 2004
Mango	30	7,0	Wang ve diğ., 2007
Muz	30	7,0	Ünal, 2007
Nane	30	7,0	Kavrayan ve Aydemir, 2001
Patlıcan ⁵	20	7,0	Dogan ve diğ., 2002
Biberiye⁶	40	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*); ⁶Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

3.6. Reaksiyon pH'sının Biberiye (*R. officinalis*) Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı pH'ların polifenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için 4,0 ila 9,0 arasında değişen farklı pH'larda gerçekleştirilen aktivite ölçüm bulguları Şekil 3.6.'da verilmektedir. Oluşturulan grafikte Biberiye polifenol 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 3.6.). Bu pH değerinin üzerinde ve altında aktivite kayıplar olmakla birlikte pH 6,0 ve 8,0'de sırasıyla aktivitenin yaklaşık %99 ve %81'i korunmuştur (Şekil 3.6.). Farklı bitki dokularından ekstrakte edilen polifenol oksidazlara ait optimum pH değerleri Tablo 3,7.'de verilmiştir. Genel olarak fenol oksidazların en iyi çalıştıkları reaksiyon pH değerinin 7.0 olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3.6. Reaksiyon pH değişiminin enzim aktivite (A) ve kararlılığı (B) üzerine etkisi

3.7. Biberiye (*R. officinalis*) Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Organik Çözücüler Varlığında İncelenmesi

Organik çözücülerin polifenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi Tablo 3.8.'de 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 gözlemlendi. Sadece DMSO'nun %2,5, %5 ve %7,5'luk derişimlerinde aktivitede hemen hiç kayıp gözlenmedi.

Enzimin olumsuz yönde en fazla etkilendiği çözen etanol olup %25 (v/v)'lık konsantrasyonda başlangıçtaki aktivitenin (çözgenin bulunmadığı ortamda ölçülen) yaklaşık %85'i kaybolmuştur. Biberiye fenol oksidazının organik çözücülere olan dayanıklılığı DMSO > Metanol > Aseton > Etanol şeklindedir.

Tablo 3.8. Farklı organik çözücülerin Biberiye polifenol oksidaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik Çözücü	%v/v	Bağıl PPO Aktivitesi (%)	Organik Çözücü	%v/v	Bağıl PPO Aktivitesi (%)
Kontrol		100			100
Etanol	2,5	89	Aseton	2,5	84
	5	74		5	77
	7,5	59		7,5	74
	10	56		10	64
	15	34		15	55
	20	25		20	49
	25	15		25	18
Metanol	2,5	88	DMSO	2,5	106
	5	82		5	101
	7,5	73		7,5	99
	10	71		10	94
	15	34		15	81
	20	25		20	77
	25	26		25	55

3.8. Biberiye (*R. officinalis*) Polifenol Oksidaz Enziminin Substrat Spesifite Analizi

Biyokatalizör ihtiyacını karşılamak amacıyla fenol oksidaz enziminin katalitik özellikleri incelendi. Farklı substratlar varlığında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Tablo 3.9.'a göre biberiye polifenol oksidazı test edilen tüm fenolik bileşikler okside edebilmektedir. En yüksek aktivite değeri ABTS'te ölçülmüş olup en düşük aktivite 4-metilkatekolde hesaplandı. Diğer yandan enzimin afinitesinin en yüksek bulunduğu substratın katekol, en düşük olanın ise pirogallol olduğu görüldü. Tüm bulgular ele alındığında enzimin *o*- ve *p*-pozisyonundaki farklı tipte difenolikler okside edebildiğini göstermektedir.

Tablo 3.9. Biberiye polifenol oksidazının substrat spesifite analizi

Substrat	K _m (mM)	V _{max} (μmol mL ⁻¹ dk ⁻¹)
4 MetilKatekol	16	250
ABTS	9,5	1250
Katekol	3	625
Hidrokinon	9,7	588
Pirogallol	31	526
Syngalzedin	8,8	357
L-Dopa	18,5	526

Trabzon Yomra ilçesinde yetiştirilen Yomra elmasının (*Malus communis* L.) polifenol oksidaz aktivitesi ve antioksidan özellikleri ne yönelik çalışmada katekol, 4 metilkatekol ve L-DOPA substratları için K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 7,90 mM, 21,50 μM/dk; 10,1 mM, 24,80 μM/dk; 2,50 mM, 1,60 μM/dk olarak bulunmuştur (Can ve diğ., 2014). Patlıcan (*Solanum melongena*) bitkisi PPO için 4-metil katekolde K_m değeri 0,34 mM'dir. V_{max} 212 μM/dk'dır. Tert-bütıl katekol, dihidrokaferik asit ve pirokatekol, 4-metil katekol ile karşılaştırıldığında V_{max} aynı kalmıştır ancak K_m değerleri sırasıyla % 29, 41 ve % 58 daha yüksek tespit edilmiştir (Gautam ve diğ.leri, 2012). Marula ağacı (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*) PPO

enzimini için Mdluli (2005) tarafından gerçekleştirilen çalışmada katekol, DHPPA, katekin ve MC substratları ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Marula için azalan afinitenin sırasıyla, katekin, MC, DHPPA ve katekol için 1.41, 1.45, 3.73 ve 4.99 mM şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada aynı substratlar için llen Km değerlerine baktığımızda Biberiye PPOsunun katekole ilgisinin Yomra elmasının PPO’sundan daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada Kocaeli’de doğal olarak yetişen bitkilerden biberiye (*Rosmarinus officinalis*), Trabzon hurması (*Diospyros kaki*), incir (*Ficus carica*), tönge (Mespilus germanica), böğürtlen (*Rubus canescens*), koyunkıran (*Hypericum calycinum*), dağ çileği (*Fragaria vesca*), ebeğümeci (*Malva sylvestris*), adaçayı (*Salvia forskahlei*) ve kıvırcık nane (*Mentha spicata*) bitkilerinin yapraklarından elde edilen ham ekstraktlarda polifenol oksidaz enziminin üretimine bakıldı ve bulgular en iyi fenol oksidaz kaynağı olarak bilinen mantar ile karşılaştırıldı. Test edilen bitkilerden sadece Biberiye yaprağında, mantara göre yaklaşık 2,2 kat daha fazla polifenol oksidaz aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ekstraksiyon optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve pH 6,5’da hazırlanan ekstraksiyon ortamında mantara göre yaklaşık 3,35 kat daha fazla aktivite gözlemlendi. Sonrasında ham özütten polifenol oksidaz enziminin üçlü-faz ayırma sistemi ile saflaştırma denemeleri gerçekleştirildi. Buna göre, %50 (w/w) amonyum sülfat doygunluğunda hazırlanmış 1:1 oranında ham ekstrakt ve t-bütanol içeren pH’sı 6,5’e ayarlanmış sistemden polifenol oksidaz enzimi yaklaşık %59 aktivite geri kazanımla 15-kat saflaştırıldı. Saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapıldı ve alt ünitesinin molekül ağırlığı 53 kDa olarak hesaplandı. Substrat spesifite sonuçları enzimin katekol oksidaz aktivitesi gösterdiğine işaret etmektedir. Saf enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 40°C ve 7,0 olarak belirlendi. Enzim stabilitesinin sıcaklığa bağlı olarak azaldığı gözlenirken pH 6,0-9,0 arasında aktivitesinin yaklaşık %80 ila %99’unun korunduğu gözlemlendi. Son olarak enzimin DMSO’dan olumsuz yönde etkilenmediği görülürken test edilen çözücülere karşı ilgisi DMSO > Metanol > Aseton > Etanol şeklinde bulundu.

Yapılan çalışma, üçlü faz ayırma yöntemi kullanılarak Kocaeli ilinde gerçekleştirilen ilk çalışma olması açısından oldukça önem arz etmektedir.

Ayrıca geliştirilen çalışma ile biberiye bitki yapraklarının fenol oksidaz kaynağı olarak kullanılabileceği ön görülmekte ve bu bitkiden tek adımda gerçekleştirilen ekstraksiyon metodunun basit, güvenilir, ekonomik ve etkili bir metod olarak enzim preparatı hazırlamada kullanımı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Adams J.A., Taylor J.S.S., Weare J.H., Valiev M., Yang J., Phosphorylation Reaction in cAPK Protein Kinase-Free Energy Quantum Mechanical/Molecular Mechanics Simulations, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, **111**(47), 13455-13464.

Adlercreutz H., Mazur W., Phyto-oestrogens and Western diseases, *Annals of Medicine*, 1997, **29**(2), 95–120.

Akagün G., Alabaş (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2009, 256234.

Akgül A., *Baharat Bilimi ve Teknolojisi*, 6. baskı, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 1993.

Akpınar O., Ak O., Kavas A., Bakir U., Yilmaz L., Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**(14), 5544–5551.

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*, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.070.

Al-Sereiti M. R., Abu-Amer K. M., Sen P., Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Its Therapeutic Potentials, *Indian Journal of Experimental Biology*, 1999, **37**(2), 124–130.

Anderson D., Phillips B. J., Comparative In Vitro and In Vivo Effects of Antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, DOI: 10.1016/s0278-6915(99)00089-7.

Aydemir T., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, *Elsevier Ltd.*, **87**, 59–67, 2004.

Aydemir T., Akkanlı G., Partial Purification and characterisation of polyphenol Oxidase From Celery Root (*Apium graveolens* L.) and The Investigation of The Effects On The Enzyme Activity of Some Inhibitors, *International Journal of Food Science and Technology*, DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01191.x.

Aydemir T., Kavrayan D., Partial Purification and Characterization of Polyphenoloxidase From Peppermint (*Mentha piperita*), *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00106-6.

Aysel M., B., Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve Mercanköşk (*Origanum onites* L.) Bitkilerindeki Antioksidan Aktivite Potansiyellerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008, 233176.

Azkan N., Kaçar O., Tıbbi Bitki Olarak Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) ve Halk Sağlığındaki Yeri'', *Dünya Gıda Dergisi*, 2010, **2010**(5), 82-89.

Balıkçı E., Akın G., Yavuzer E., Gastronomide Bazı Bitki ve Baharatların Ekstraktelerinin Balık Köfteleri Kalitesi Üzerine Etkileri, *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, DOI: 10.21325/jotags.2018.248.

Banyai E.S., Tulok M.H., Hgedüs A., Renner C., VargaI S., Antioxidant Effect of Various Rosemary (*Rosmarium officinalis* L.) Clones, *Acta Biologica Szegediensis*, 2003, **47**(1-4), 111-113.

Başer K.H.C., Essential Oils of Anatolian Labiateae: A Profile, *Acta Horticulturae*, DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.333.27.

Başkan S., Adaçayının (*Salvia officinalis*) Antioksidan Bileşikleri Rosmarinik ve Karsonik Asitin Kapiler Elektroforez İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, 166297.

Baublis A.J., Clydesdale F.M., Decker E.A., Antioxidants in Wheat-Based Breakfast Cereals, *Cereals Foods World*, 2000, **45**(2), 71-74.

Baytop T., *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi*, 2. baskı, Nobel Tıp Yayınevi, İstanbul, 1999.

Beckman C.H., Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation In Wilt Disease Resistance and In General Defence Responses In Plants?, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, DOI: 10.1006/pmpp.2000.0287.

Bostan S.Z., İslam A., Doğu Karadeniz Bölgesi Muşmulalarının (*Mespilus germanica* L.) Seleksiyon Yoluyla İslahı Üzerine Bir Araştırma, *Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Erzurum, Türkiye, 4-7 Eylül.

Bradford M., A Rapid and Sensitive Method For the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Analitical Biochemistry*, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bravo K., Osorio E., Characterization of Polyphenol Oxidase From Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Fruit, *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.126.

Cabanes J., Escribano J., Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Jiménez-Atiénzar M., Partial Purification of Latent Polyphenol Oxidase From Peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular Properties and Kinetic Characterization of Soluble and Membrane-bound Forms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/jf072165y.

Ceylan Ş., Yoldaş F., Elmaci Ö.L., Duman İ., Düzyaman E., Özge M., The Effects of Densities and Nitrogen Different Plant Levels on Some Macro and Micro Element Contents of Okra, *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2018, **32**(2), 162-169.

Chander R., Kanatt S. R., Sharma A., Antioxidant Potential of Mint (*Mentha spicata* L.) in Radiation-Processed Lamb Meat”, *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.066.

Chazarra S., Garcia-Carmona F., Cabanes J., Evidence for a Tetrameric Form of Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Polyphenol Oxidase: Purification and Characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(10), 4870–4875.

Coggon P., Moss G. A., Sanderson G. W., Tea Catechol Oxidase: Isolation, Purification and Kinetic Characterization, *Phytochemistry*, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)91515-2.

Concellon A., Anon M. C., Chaves A. R., Characterization and Changes In Polyphenol Oxidase From Eggplant Fruit (*Solanum melongena* L.) During Storage At Low Temperature, *Food Chemistry*, 2004, **88**(1), 17–24.

Corzo-Martinez M., Corzo N., Villamiel M., Castillo M.D., Browning Reaction, Editör: Simpson B. K., *Food Biochemistry and Food Processing*, 2nd ed., Wiley-Blackwell, New Jersey, 56-83, 2012.

Cowan M. M., Horst E. A., Luengpailin S., Doyle R. J., Inhibitory Effects of Plant Polyphenoloxidase on Colonization Factors of *Streptococcus sobrinus* 6715, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44**(9), 2578-2580.

Çalışkan O., Polat A. A., Phytochemical and Antioxidant Properties of Selected Fig (*Ficus carica* L.) Accessions From The Eastern Mediterranean Region of Turkey, *Scientia Horticulturae*, 2011, **128**(4), 473–478.

Çırak C., Kurt D., Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak Hypericum Türleri ve Kullanım Alanları, *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2014, **24**(1), 38 – 52.

Daglia M., Polyphenols as Antimicrobial Agents, *Current Opinion in Biotechnology*, DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.

Dalmadi I., Rapeanu G., Van Loey A., Smout C., Hendrickx M., Characterization and İnactivation by Thermal and Pressure Processing of Strawberry (*Fragaria ananassa*) Polyphenol Oxidase: A Kinetic Study, *Journal of Food Biochemistry*, 2006, **30**(1), 56–76.

Deltito J., Bayer D., The Scientific, Quasi-Scientific and Populer Literature on The Use of St. John’s Wort in The Treatment of Depression, *Journal of Affective Disorders*, DOI: 10.1016/s0165-0327(99)00008-7.

Dennison C., Lovrein R.,. Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins, *Protein Expression and Purification*, 1997, **11**(2), 149-161.

Dönmez Y., Aydınöz D., Bitki Örtüsü Özellikleri Açısından Türkiye, *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi*, 2012, **24**, 1-17.

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*, DOI: 10.5505/tjb.2014.78949.

Edwards W., Bownes R., Leukes W. D., Jacobs E. P., Sanderson R., Rose P. D., and Burton S. G., A Capillary Membrane Bioreactor Using Immobilized Polyphenol Oxidase for The Removal of Phenols From Industrial Effluents, *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**(3-4), 209-217.

Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C., Catechol Oxidase Structure and Activity, *Current Opinion in Structural Biology*, DOI: 10.1016/s0959-440x(99)00029-9.

Elmacı Y., Yılmaz L., Polifenoloksidaz Enzimleri ve İnaktivasyon Yöntemleri, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2018, **6**(3), 333-345.

Es-Safi N. E., Cheynier V., Moutounet M., Implication of Phenolic Reactions in Food Organoleptic Properties, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, **16**(5), 535–553.

Gasparetto J. C., Martins C. A. F., Hayashi S. S., Otuky M. F., Pontarolo R., Ethnobotanical and Scientific Aspects of *Malva sylvestris* L.: A Millennial Herbal Medicine, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01383.x.

Gawlik-Dziki U., Szymanowska U., Baraniak B., Characterization of Polyphenol Oxidase From Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Botrytis italica*) Florets, *Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.05.012.

Gulçin I., Küfrevioğlu O.İ., Oktay M. 2005. 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**(3), 297–302.

Guo L., Ma Y., Shi J.,Xue S., The Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase From Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.088.

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

Greeson J., Sanford B., Monti D.A., St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A Review of The Current Pharmacological, Toxicological and Clinical Literature, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, DOI: 10.1211/0022357011775910.

Groot H., Rauen U., Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and The Protective Effects of Flavonoids, *Fundam Clin Pharmacol*, 1998, **12**(3), 249-255.

Heimdal H., Larsen M.L., Poll L., Characterization of Polyphenol Oxidase From Photosynthetic and Vascular Lettuce Tissues (*Lectuca sativa*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**(7), 1428–1433.

Ikehata K., Characterization of Tyrosinase for The Treatment of Aqueousphenols, *Canada Bioresource Technology*, 2000, **74**(3), 191-199.

Jiang Y., Fu J., Zauberman G., Fuchs Y., Purification of Polyphenol Oxidase and The Browning Control of Litchi Fruit by Glutathione and Citric Acid, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<950::AID-JSFA289>3.0.CO;2-E.

Jime'nez L., Manach C., Morand C., Rémésy C., Scalbert A., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 2004, **79**(5), 727–747.

Karakaplan N., Nane (*Mentha spicata*) Bitkisinden Uçucu Yağ Eldesi İçin Optimum Koşulların Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2017, 477642.

Kaptan Y., Utilization of *Scytalidium thermophilum* Phenol Oxidase in Bioorganic Synthesis, Master Thesis, The Middle East Technical Universty, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara, 2004, 153425.

Kaya E. D., Turkhan A., Yılmaz İ., Alıç (*Crataegus monogyna*) Meyvesinden Polifenol Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2018, **22**(3), 1048-1054.

Kırpık M., Çukurova Bölgesi Kıraç Ve Taban Arazi Koşullarında Yetiştirilen Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) Çesitlerinin Verim Ve Kalitesi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2005, 198041.

Kondratyuk T. P., Pezzuto J.M., Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health, *Pharmaceutical Biology*, DOI: 10.3109/13880200490893519.

Kültür S., Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **111**(2), 341-364.

Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of the American Chemical Society*, DOI: 10.1021/ja01318a036.

Madhuri S., Pandey G., Some Anticancer Medicinal Plants of Foreign Origin, *Current Science*, 2009, **96**(6), 779–783.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, **79**(5), 727-747.

Mayer A. M., Polyphenol Oxidase in Plants and Fungi: Going places? *Phytochemistry*, DOI: 10.1002/chin.200705260.

Minussi R. C., Pastore G. M., Duran N., Potential Applications of Laccase in Food Industry, *Trends in Food Science and Technology*, 2002, **13**(6-7), 205–216.

Mishra S., Scarano F. J., Calvert P., Entrapment of *Saccharomyces cerevisiae* and 3T3 Fibroblast Cells Into Blue Light Cured Hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2012, **100**(10), 2829-2838.

Mothershaw A. S., Jaffer T., Antimicrobial Activity of Foods With Different Physico-Chemical Characteristics, *International Journal of Food Properties*, DOI: 10.1081/JFP-200033062.

Núñez-Delicado E., Serrano-Megías M., Pérez-López A. J., López-Nicolás J. M., Characterization of Polyphenol Oxidase From Napoleon grape, *Food Chemistry*, 2007, **100**(1), 108–114.

Ninham B.W., Nostro P.L., Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology, *Chemical Reviews*, DOI: 10.1021/cr200271j.

Oktay M., Küfrevioli I., Kocaçalışkan I., Şakiroğlu H., Polyphenol Oxidase From Amasya Apple, *Journal of Food Science*, 1995, **60**(3), 494–496.

Onur S., Trabzon Hurması, *Derim Dergisi Özel Sayısı*, 1990, **7**(1), 4-47.

Ogel 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 *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s00253-005-0216-2.

Ogel Z.B., Klepzig K. D., Valiev A., Analysis of Cellulase and Polyphenol Oxidase Production by Southern Pine Beetle Associated Fungi, *Symbiosis*, 2009, **49**(1), 37–42.

Öğüt S., Doğal Antioksidanların Önemi, *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2004, **11**(1), 25-30.

Öz F., Çolak A., Özel A., Sağlam E. N., Sesli E., Purification and Characterization of a Mushroom Polyphenol Oxidase and Its Activity in Organic Solvents, *Journal of Food Biochemistry*, 2013, **37**(1), 36-44.

Özçırak Ş., Beyaz Çürükçül Fungustan Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2012, 452672.

Özen A., Colak A., Dincer B., Güner S., A Diphenolase From Persimmon Fruits (*Diospyros kaki* L.; Ebenaceae)”, *Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.022.

Özen F., Acemi A., Kocaeli’de Yayılış Gösteren Bitkilerin Endemikler ve Tehlike Sınıfları Yönünden Değerlendirilmesi, *Ot Sistemik Botanik Dergisi*, 2011, **18**, 147–189.

Öztan D., Tirozinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 201019.

Pandey K.B., Rizvi S.I., Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, **2**(5), 270-278.

Parr A. J., Bolwell G. P., Phenols in The Plant and In Man. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of The Diet by Modifying The Phenol Content or Profile, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI: 10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<985::aid-jsfa572>3.0.co;2-7.

Podsedeck A., Wilska Jeszka J., Anders B., Markowski J., Compositional Characterisation of Some Apple Varieties, *European Food Research and Technology*, 2000, **210**(4), 268–272.

Polaina J., Andrew P. M., *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 1rd ed., Springer, Almanya, 2007.

Ribechini E., Pérez-Arantegui J., Colombini M. B., Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry for The Chemical Characterization of Modern and Archaeological Figs (*Ficus carica*), *Journal of Chromatography A*, 2011, **1218**(25), 3915–3922.

Rocha A., Morais A. M. M. B., Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) Extracted From Jonagored Apple, *Food Control*, DOI: 10.1016/S0956-7135(00)00026-8.

Rodriguez Couto S., Toca Herrera J.L., Industrial and Biotechnological Applications of Laccases, *Biotechnology Advances*, 2006, **24**(5), 500-513.

Saroglou, V., Marin P. D., Rancic A., Veljic M., Skaltsa H., Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil of Six Hypericum Species From Serbia, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, **35**(3), 146–152.

Seo S. Y., Sharma V. K., Sharma N., Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**(10), 2837-2853.

Siddiq M., Dolan K.D., Characterization of Polyphenol Oxidase From Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), *Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.061.

Shi C., Dai Y., Xia B., Xu X., Xie Y., Liu Q., The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I From *Nicotiana Tabacum*, *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, **19**(4), 381-382.

Simon F. B., Perez Ilzarbe J., Hernandez T., Gomez Cordoves C., Estrella I., Importance of Phenolic Compounds for The Characterization of Fruit Juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, **40**(9), 1531-1535.

Simsek S., Yemenicioglu A., Partial Purification and Kinetic Characterization of Mushroom Stem Polyphenol Oxidase and Determination of Its Storage Stability in Different Lyophilized Forms, *Process Biochemistry*, 2007, **42**(6), 943-950.

Singh N., Singh R., Kaur K., Singh H., Studies of The Physico-Chemical Properties and Polyphenoloxidase Activity in Seeds From Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus*) Varieties Grown in India, *Journal of Food Chemistry*, DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00057-6.

Shahidi F., Naczki M., *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications*, 1st ed., Technomic Publishing, Lancaster, 1995.

Solomon A., Golubowicz S., Yablowicz Z., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H., Altman A., Kerem Z., Flaishman M. A., Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/jf060497h.

Sponberg S. A., *Ebeneaceae* Hardy in Temperate North America, *Journal of the Arnold Arboretum*, 1977, **58**(2), 146-160.

Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L., Zhang Y., Evaluation to The Antioxidant Activity of Total Flavonoids Extract From Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Leaves, *Food and Chemical Toxicology*, DOI: 10.1016/j.fct.2011.07.042.

Sutay D., Isolation, Characterization and Immobilization of Polyphenol Oxidases From Mulberry (*Morus alba*) Leaf Tissues, Master Thesis, The Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara, 2003, 143440.

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**(3), 701–707.

Torelli S., Belle C., Hamman S., Pierre J.L., Substrate Binding in Catechol Oxidase Activity: Biomimetic Approach, *Inorganic Chemistry*, DOI: 10.1021/ic025599d.

Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Georga K., Soukara S., Dilis V., Traditional foods: Why and how to sustain them, *Trends in Food Science and Technology*, DOI: 10.1016/j.tifs.2006.03.005.

Tuncer M., Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, **22**(2010), 19-63.

Tura D., Roberts K., Sample Handling Strategies for The Determination of Biophenols In Food and Plants, *Journal of Chromatography A*, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00879-8.

Tuzlacı E., Tolon E., Turkish Folk Medicinal Plants, part III: Şile (Istanbul), *Fitoterapia*, 2000, **71**(6), 673–685.

Ulubelen A., Sönmez U., Topçu G., Johansson C. B., An Abietane Diterpene and Two Phenolics From *Salvia forskahlei*, *Phytochemistry*, DOI: 10.1016/0031-9422(95)00888-8.

URL-1:<https://www.biberiyeyagi.com/biberiye-yaginin-faydalari-ve-olasi-zararlari/>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-2:<http://www.sifalibitkiler.us/archives/379>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-3:<https://t24.com.tr/haber/incir-agaci-insanlik-tarihi>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-4:<https://www.takvim.com.tr/galeri/yasam/musmula-nelere-iyi-geliyor-iste-musmulanin-faydalari/2>, (Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019)

URL-5:<https://acikve.net/bogurtlen-meyvesinin-ve-yapriginin-faydalari-nelerdir/>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-6:<http://dogalhayat.org/property/hypericum-calycinum-koyunkiran-2/>, (Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019)

URL-7:<http://sifalibitkiler.net/dag-cilegi>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-8:<http://www.ebitki.com/index.php?hq=Fragaria%20moschata&gr=Latince>, (Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019)

URL-9:<http://dogalhayat.org/property/malva-sylvestris-ebegumeci-2/>, (Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019)

URL-10:<https://www.bitkiler.co/2016/09/adacay-salvia-officinalis.html>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

URL-11:<https://www.sifalibitkiler.biz/nane-pfferminze-mentha-x-piperita/>, (Ziyaret tarihi: 13 Mayıs 2019)

Ünal M. U., Properties of Polyphenol Oxidase From Anamur Banana (*Musa cavendishii*, *Journal of Food Chemistry*, 2007, **100**(3), 909–913.

Waite J. H., Calculating Extinction Coefficients for Enzymatically Produced O-quinones, *Analytical Biochemistry*, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90072-5.

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**(1), 45–55.

Xu Y. M., Stokes A. H., Roskoski R., Vrana K. E., Dopamine, In the Presence of Tyrosinase, Covalently Modifies and Inactivates Tyrosine Hydroxylase, *Journal of Neuroscience Research*, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19981201)54:5<691::AID-JNR14>3.0.CO;2-F.

Xu J., Zheng T., Meguro S., Kawachi S., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From Henry Chestnuts, *Journal of Wood Science*, 2004, **50**(3), 260–265.

Yağar H., Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase From Celery, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2004, **34**(4), 387-397.

Yanishlieva N. V., Marinova E. M., Stabilisation of Edible Oils With Natural Antioxidant, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2001, **103**(11), 752–767.

Yediel A., Bakla Kabuğundan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 521943.

Yılmaz A., Gerçekcioğlu R., Tokat Ekolojisi Muşmula (*Mespilus germanica* L.) Popülasyonu ve Dağılımı Üzerine Bir Araştırma, *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2013, **6**(2), 01-04.

Yılmaz, P., Trabzon İli Tonya İlçesinde Doğal Olarak Yetişen Muşmula Tiplerinin (*Mespilus germanica* L.) Seleksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, 2005, 394382.

Yoruk R., Marshall, M.R., Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase, *Journal of Food Biochemistry*, 2003, **27**(5), 361–422.

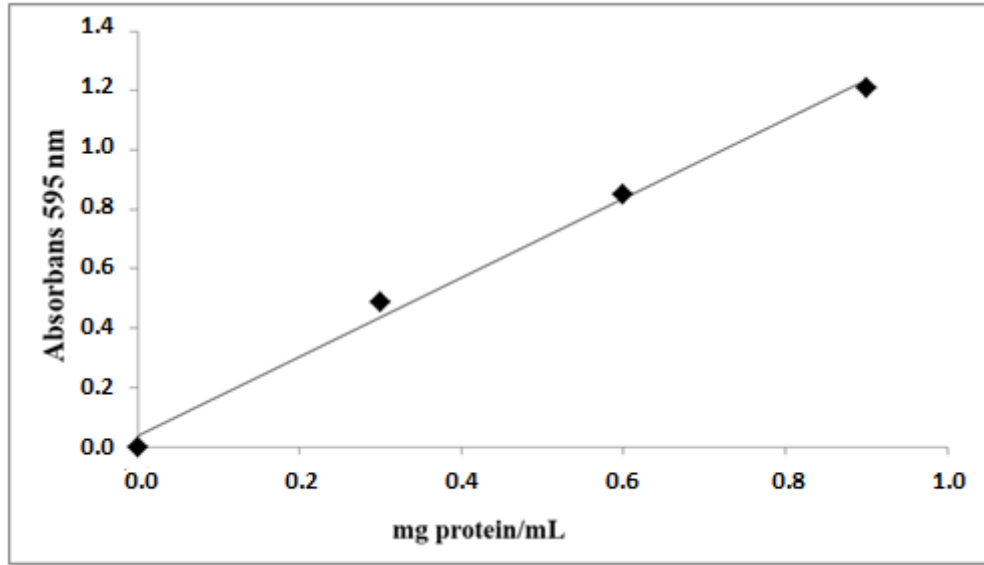
Yuzugullu Y., Structural and Functional Analysis of Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium thermophilum*, PhD Thesis, Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara, 2010, 255456.



EKLER

Ek-A

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 protein çözeltiler, hazırlandı. Numarlandırılmış olan 2 mL'lik ependorflara, farklı BSA konsantrasyonlarından 100 μ L ve 1,5 ml Bradford reaktifi eklendi. İnkübasyon için 10 dak oda sıcaklığında bırakıldı ve ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm gerçekleştirilerek standart eğri oluşturuldu.

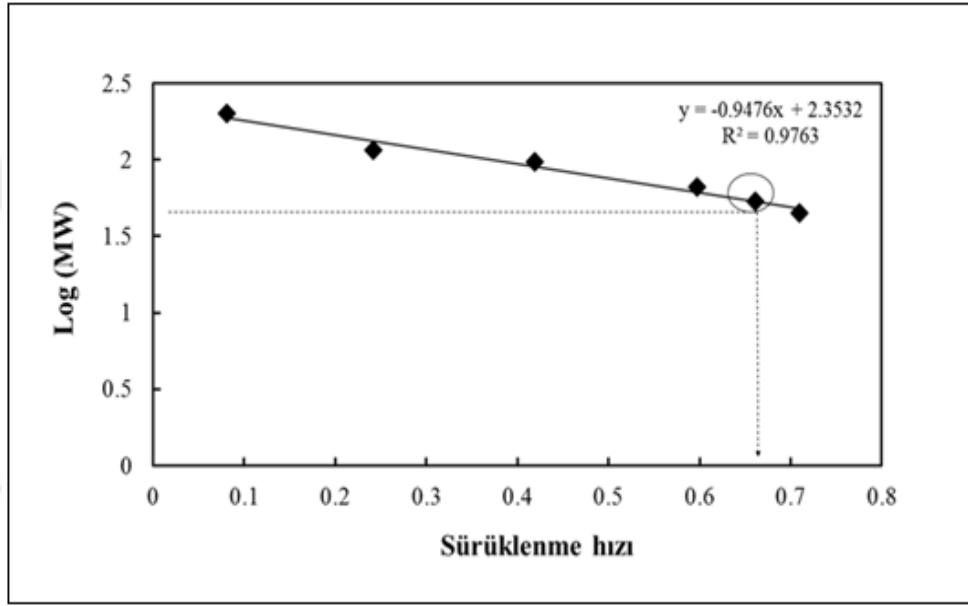


Şekil A.1. Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi

Ek-B

Moleküler Ağırlık Tayini

Biberiye PPO'sunun molekül ağırlığının tayini için, standart olarak kullanılan proteinlerin (Miyozin-200 kDa, β -galaktozidaz-116 kDa, Fosforilaz b-97 kDa, Serum albümin-66 kDa ve Ovalbumin-45 kDa) Rf değerleri x-eksenine ve bunların molekül kütlelerinin logaritmik değerleri de y-eksenine yerleştirilerek standart grafik çizildi. Molekül kütlesi bilinmeyen Biberiye PPO'suna ait Rf değeri, grafikte yerleştirilerek bu değere karşılık gelen noktadan bulundu.



Şekil B.1. Molekül ağırlığı hesaplamada kullanılan grafik. Molekül ağırlığı bilinmeyen proteine (Biberiye PPO) ait veri daire içine alınmıştır.

Ek-C

Solüsyonların hazırlanışı

0.2 M Asetat Tamponu, pH 5.0 (pH 4,0 – 5,5)

54.43 g Sodyum asetat trihidrat

0,2 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7,4 (pH 6,0 – 8,0)

Monobazik 5.93 g

Dibazik 23.0 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7.4'e ayarlanır.

0,1 M Sodyum Karbonat – Sodyum Bikarbonat Tamponu, pH 10,4 (pH 8,0 – 11,0)

1.05 g Sodyum bikarbonat

9.275 g Sodyum karbonat

Öncelikle sodyum bikarbonat üzerine 800 mL distile su ilave edilir ve çözündürülür. Sonra sodyum karbonat ilave edilir ve 1 litreye tamamlanarak tekrar karıştırılır.

50 mM sodyum fosfat tamponu pH 7,0

3,04 g Monobazik

10,92 g Dibazik

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0 ayarlanıp 4oC'de saklanır.

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre): 2,5 g Coomessie Blue, 450 ml metanol içerisinde 1 gece boyunca çözündürülür. 70 ml Asetik asit ve 480 ml distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 4oC'de saklanır.

Destain Solüsyonu (1 litre): 250 ml Metanol, 150 ml Asetik Asit, 675 ml dH2O, koyu renkli şişede karıştırıldıktan sonra 4oC'ye saklanılmak üzere kaldırılır.

NaOH (1M, 100 ml): 4 g NaOH tartılır, 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

1,5 M Tris HCl Tampon, 100 ml (pH 8.8): 18,5 g Tris Base; 0,4 g SDS 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 M HCl ile pH 8.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4oC'de saklanır.

Tablo C.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Markası
Buz Makinası	Scotsman AF80
Etüv	Nüve FN500
pH metre	Inolab WTW cond 3401
Mini Santrifüj	Eppendorf 5418
Ultra Santrifüj	Sigma 4-17K
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Hassas Terazı	Scaltec SPB31
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Buzdolabı	Arçelik,5243 Biolab No-Frost

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Kahveci B., Yüzügüllü Karakuş Y., Özen F., Acemi A., Kocaeli’ndeki Bazı Tıbbi Bitkilerde Fenoloksidaz Enziminin Taranması ve Üçlü Faz Ayırma Yöntemi ile Saflaştırılması, *19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 1-3 Aralık 2017.

Kahveci B., Yüzügüllü Karakuş Y., Screening of Phenol Oxidase Enzymes From Some Medicinal Plants in Kocaeli and Purification of Enzyme by Three-phase Partitioning, *International Agricultural, Biological & Life Science Conference*, Edirne, Türkiye, 2-5 Eylül 2018.

ÖZGEÇMİŞ

22 Eylül 1991 tarihinde İzmit'te doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimini İzmit'te tamamladı. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2016 yılında Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimime başladı. Şuan özel bir gıda laboratuvarında Mikrobiyoloji Analisti olarak görev yapmakta.

