



**KANLICA MANTARINDAN (*Lactarius
Salmonicolor*, L) POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI

**2021
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA BÖLÜMÜ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM**

**KANLICA MANTARINDAN (*Lactarius Salmonicolor*, L) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM**

**KARABÜK
Nisan 2021**

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI tarafından hazırlanan “KANLICA MANTARINDAN (*Lactarius Salmonicolor*, L) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 5/04/2021

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Hakan TAHTACI (KBÜ)

Üye : Doç. Dr. Soner ÇAKAR (BEUN)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KANLICA MANTARINDAN (*Lactarius salmonicolor* L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM

Nisan 2021, 73 sayfa

Yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Lactarius salmonicolor* mantarının polifenol oksidaz enzimi kısmen saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. Enzim ekstraksiyonunun parametreleri optimize edildikten sonra elde edilen homojenata amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz işlemleri uygulandı, elde edilen enzim çözeltisi affinite kolonuna uygulanarak jel kromatografisi ile kısmen saflaştırıldı. Protein tayinleri ve enzim aktivite ölçümleri yapılarak saflaştırma verimi %21.279, saflaştırma derecesi ise 15.821 olarak hesaplandı. Katekol ve L-DOPA substratları varlığında enzimin optimum ölçüm pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.00 ve 40 °C olarak saptandı. Katekol substratı kullanılarak optimum ekstraksiyon pH'ı, enzimin pH ve termal kararlılığı araştırıldı. *Lactarius salmonicolor* enziminin kinetik parametreleri, V_{max} (maksimum reaksiyon hızı) ve K_m (substratın enzim ilgisi) belirlendi. Bu değerler katekolle yapılan ölçümlerde $7.220 \mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ve 2.694mM olarak L-DOPA ile yapılan ölçümlerde $6.477 \mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ve 2.494mM

olarak hesaplanmıştır. Polifenol oksidaz enziminin substrat spesifikliğini araştırmak amacıyla sekiz farklı substratla aktivite ölçümleri yapılmış ve en yüksek sonuçlar katekol ve L-DOPA ile elde edilmiştir. Enzimin –18 °C'da bir sene aktivitesini koruyabildiği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler : Polifenol oksidaz, enzim ekstraksiyonu, saflaştırma, *Lactarius salmonicolor*.

Bilim Kodu : 20107

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

EXTRACTION AND PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM KANLICA MUSHROOM (*Lactarius Salmonicolor*, L)

Salam Kasam Mohammed AL-MAMOORI

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Department of Chemistry

Thesis Advisor:

Assist. Prof. Dr. A. Elif BÜYÜKBAYRAM

April 2021, 73 pages

Polyphenol oxidase enzyme from edible and wild mushroom *Lactarius salmonicolor* was partially purified and its biochemical properties were characterized. After optimization of parameters of enzyme extraction, the homogenized enzyme solution was precipitated with ammonium sulfate and dialyzed. Resulting enzyme solution was loaded to the affinity column and partially purified by gel chromatography. Yield and purification factor were calculated as %21.279 and 15.821 after determination of protein contents and enzyme activity measurements. Optimum measurement pH and temperature were obtained as 6.00 and 40 °C in the existence of catechol and L-DOPA. By using catechol substrate, optimum extraction pH, pH and thermal stability were obtained. Kinetic parameters of *Lactarius salmonicolor* enzyme, V_{max} (maximum reaction rate) and K_m (substrate affinity) were determined as 7.220 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ and 2.694 mM by catechol and 6.477 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ and 2.494 mM by L-DOPA. To investigate substrate specificity of polyphenol oxidase enzyme, eight different

substrates were used for enzyme activity measurements. Highest activities were obtained by catechol and L-DOPA. Enzyme keep its activity for one year at -18°C .

Key Words : Polyphenol oxidase, enzyme extraction, purification, *Lactarius salmonicolor*.

Science Code : 20107

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla yakın desteğini esirgemeyen, bu çalışmanın yürütülmesinde bana yön veren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÜYÜKBAYRAM'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim sayesinde tanıdığım arkadaşlarıma ve Karabük Üniversitesi Kimya Bölümü çalışanlarına her türlü destek ve yardımlarından dolayı saygı ve sevgilerimi sunarım.

Karabük Üniversitesi'ne Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında sağladığı destekten dolayı teşekkür ederim (Proje No: FYL-2020-2175).

Hayatım boyunca ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyip benim için her türlü fedakârlıkta bulunan ve yanımda olan canım aileme bugünlere gelmemi sağladıkları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Sevgili eşim Mina ABDULAZEEZ'e hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışmam boyunca da bana verdiği destek, moral ve güç için, başarabileceğime her zaman beni inandırdığı ve sabırla beklediği için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. MANTARLAR.....	3
2.1.1. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi	3
2.1.2. Mantarların Sınıflandırılması	5
2.1.3. <i>Lactarius Salmonicolor</i> Mantarının Özellikleri.....	6
2.2. ENZİMLER.....	7
2.2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	8
2.2.2. Enzim Kinetiği.....	9
2.2.3. Enzim Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	11
2.2.4. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	12
2.3. POLİFENOL OKSİDAZ	15
2.3.1. PPO Enziminin Kaynakları ve Doğadaki Rolü	16
2.3.2. PPO Enziminin Yapısı	17

	<u>Sayfa</u>
2.3.3. PPO Enziminin Biyokimyasal Özellikleri	18
2.3.4. PPO Enziminin Reaksiyon Mekanizması	19
2.3.5. PPO Enziminin Aktivitesi	21
2.3.6. PPO Enziminin Substratları	22
2.3.7. Enzimatik Kararma	25
2.3.8. PPO Enziminin İnhibitörleri	26
2.3.9. Polifenol Oksidaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması	27
2.3.10. PPO'nun Endüstrideki Kullanım Alanları	28
2.4. YÜZEY AKTİF MADDELER	29
2.5. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA	29
2.6. MANTARDAN PPO İZOLASYONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	31
2.7. ÇALIŞMANIN AMACI	34
BÖLÜM 3	35
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR	35
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	35
3.1.2. UV – VIS Spektrofotometre	35
3.1.3. Santrifüj Cihazı	35
3.1.4. pH metre	36
3.1.5. Manyetik Isıtıcılı Karıştırıcı	36
3.1.6. Çalkalayıcı Su Banyosu	36
3.1.7. Homojenizatör	36
3.2. KULLANILAN METOTLAR	37
3.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması	37
3.2.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme	37
3.2.3. Diyaliz	38
3.2.4. Sephadex G-100 Afinite Kolonuyla Ayırıştırma	39
3.2.5. Enzim Çözeltilisinin Kolona Uygulanması ve Elüsyonu	39
3.2.6. Protein Tayini	40
3.2.7. Polifenollerin Tayini	41
3.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	42

	<u>Sayfa</u>
3.2.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	43
3.2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	43
3.2.11. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı.....	43
3.2.12. Polifenol Oksidazın Termal Kararlılığı	44
BÖLÜM 4	45
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. ENZİM EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRMA ÇALIŞMALARI	45
4.1.1. PVP Derişiminin Etkisi.....	45
4.1.2. Triton X-100 Derişiminin Etkisi.....	46
4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	47
4.1.4. Enzimin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	48
4.1.5. Protein Tayini	49
4.1.6. Polifenollerin Tayini	50
4.2. OPTİMUM pH VE SICAKLIK DEĞERLERİ	51
4.2.1. Ölçüm pH'ı Etkisi.....	51
4.2.2. Ekstraksiyon pH'ı Etkisi.....	52
4.2.3. pH Kararlılık Deneyi	53
4.2.5. Ölçüm Sıcaklığı	54
4.2.6. Termal Kararlılık	54
4.2.7. Enzimin Depolanma Kararlılığı.....	55
4.3. ENZİMİN KİNETİK KARAKTERİZASYONU.....	55
4.4. FARKLI SUBSTRATLARIN ARAŞTIRILMASI	56
4.4.1. Substrat Spesifikliği.....	56
4.4.2. L-DOPA ile Ölçüm pH'ı Optimizasyonu	59
4.4.3. L-DOPA ile Sıcaklık Optimizasyonu	59
4.4.4. L-DOPA Kinetik Karakterizasyonu	60
BÖLÜM 5	62
SONUÇ	62
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mantarların genel yapısı.	4
Şekil 2.2. Mantarların Sınıflandırılması ve filogenisi (AFTOL).	6
Şekil 2.3 <i>Lactarius salmonicolor</i> (Kanlıca mantarı).....	7
Şekil 2.4. Kilit ve anahtar teorisi.....	9
Şekil 2.5. Michaelis-Menten grafiği.	10
Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği.....	11
Şekil 2.7. Optimum sıcaklık.....	13
Şekil 2.8. pH etkisi.....	13
Şekil 2.9. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat derişiminin etkisi.	14
Şekil 2.10. Enzim ve substrat derişiminin tepkime hızına etkisi.	15
Şekil 2.11. Tirozinaz enziminin yapısının değişik açılardan gösterimi (A,B,C,D,E).18	
Şekil 2.12. PPO'nun difenolaz aktivitesi.	19
Şekil 2.13. PPO'nun bakır merkezleri.	20
Şekil 2.14. PPO aktivitesinin reaksiyon mekanizması.....	21
Şekil 2.15. Yaygın olarak kullanılan bazı basit fenollerin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.16. Flavonoidlerin genel yapısı.....	23
Şekil 2.17 a) Kateşin, b) Epikateşin.....	23
Şekil 2.18. Klorojenik asit (5- <i>o</i> -kafeilkinik asit).....	23
Şekil 2.19. Bazı flavonollerin kimyasal yapısı a) kuersetin, b) mirisetin.....	24
Şekil 2.20. L-Tirozin ve L-DOPA'nın yapısı.....	25
Şekil 3.1. Genel diyalizin uygulanış şekli: a) Diyaliz tüpünün bağlanması, b) Diyaliz	35
Şekil 3.2. Farklı büyüklükteki moleküllerin jel filtrasyon kromatografisi ile ayrılması.....	37
Şekil 4.1. Ekstraksiyonda kullanılan PVP Derişiminin enzim aktivitesine etkisi.....	43
Şekil 4.2. Ham özütte PVP derişimine bağlı toplam polifenol miktarı.....	43
Şekil 4.3. Triton X-100 derişiminin enzim aktivitesine etkisi.....	44
Şekil 4.4. Eluent tüp numarasına karşı değişen protein miktarı ve enzim aktiviteleri.	45
Şekil 4.5. Bradford kalibrasyon eğrisi.....	46

Sayfa

Şekil 4.6. Folin-Ciocalteu yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 4.7. Ölçüm pH'ının enzim aktivitesine etkisi.	48
Şekil 4.8. Ekstraksiyon pH'ının enzim aktivitesine etkisi.	49
Şekil 4.9. İki saat beklemenin pH kararlığına etkisi.	50
Şekil 4.10. Beş günlük beklemenin pH kararlığına etkisi.....	50
Şekil 4.11. Ölçüm sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi.	51
Şekil 4.12. Sıcaklık ve bekletilme süresinin termal kararlılığa etkisi.	52
Şekil 4.13. Michaelis-Menten grafiği.	53
Şekil 4.14. Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.15. PPO substratlarının absorban spektrumları.	54
Şekil 4.16. Substratların enzim aktiviteleri.	55
Şekil 4.17. L-DOPA ile ölçüm pH'ının enzim aktivitesine etkisi.....	56
Şekil 4.18. L-DOPA ile sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.	56
Şekil 4.19. L-DOPA ile Michaelis-Menten grafiği.....	57
Şekil 4.20. L-DOPA ile Lineweaver-Burk grafiği.	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Safılaştırma sonuçları.....	46
Çizelge 4.2. Protein derişimleri.....	47
Çizelge 4.3. Enzim çözeltilerinde polifenol derişimleri.....	48
Çizelge 4.4. Kullanılan substratların özellikleri.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TX-100	:	Triton X-100
PVP	:	Polivinil pirolidon
PMSF	:	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
kDa	:	Kilodalton
ppm	:	Milyonda bir madde konsantrasyonu ($\mu\text{g/l}$)
PPO	:	Polifenol oksidaz enzimi
SA	:	Spesifik aktivite (U/mg protein)
BSA	:	Bovine serum albumin
E.C.	:	Enzim kod numarası
L	:	Litre
M	:	Molarite
mM	:	Milimolar
μM	:	Mikromolar
rpm	:	Devir/dakika
U	:	Enzim ünitesi
K_m	:	Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	:	Maksimum reaksiyon hızı
mL	:	Mililitre
μm	:	Mikrometre
μL	:	Mikrolitre
μmol	:	Mikromol
nm	:	Nanometre
g	:	Gram
mg	:	Miligram
sn	:	Saniye
$^{\circ}\text{C}$:	Derece santigrat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tüketicinin farkındalığının artması sonucunda tüketilen gıdaların hem sağlıklı hem de damak tadına uygun olmaları gerekmektedir. Bu yüzden yemek sanayisinde üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir [1]. Meyve, sebze ve kabuklu deniz hayvanlarında dövme, kesme, soyma ve dilimleme gibi mekanik hasar ve işlemlerle bazı renk değişiklikleri meydana gelir. Pembeden mavimsi-siyaha kadar olan bu renk değişikliklerine “esmerleşme” denir. Birçok meyve ve sebze ürününde bu renk değişimleri bir dereceye kadar arzu edilir, ancak çoğu zaman istenen düzeyde durdurulamaz. Polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi ve fenolik maddelerin varlığı nedeniyle enzimatik esmerleşme reaksiyonu meydana gelir [2]. Enzimin neden olduğu esmerleşme, sadece renkte değişikliğe neden olmaz aynı zamanda lezzet ve kaliteyi de düşürür, bu nedenle bu sorunu azaltmak için bu enzim üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. PPO enziminin esmerleşme reaksiyonlarını engellemek için bu enzimin inhibe edilmesi gerekmektedir [3-5]. PPO enziminin ekstraksiyon özellikleri, enzimin kaynağına göre değişmektedir [6]. Bu yüzden uygun bir inhibitör bulmadan önce meyve ve sebzelerde bulunan PPO enziminin karakterize edilmesi ve kinetik özelliklerinin, optimum sıcaklık, optimum pH ve sıcaklık dayanımının iyi bilinmesi gerekir.

Enzimler gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Bazı durumlarda, enzimin katalize ettiği reaksiyon istenen olumlu sonuçlara sahiptir, bazı durumlarda ise olumsuz ve istenmeyen sonuçlar oluşabilir. Siyah çayın üretiminde kullanılan polifenol oksidaz enzimi tarafından katalizlenen oksidatif reaksiyonlar sonucu çayın siyah rengi oluşur ve bu istenen bir sonuçtur ama meyvede meydana gelen esmerleşme, bozulma ve besin değerinin azalmasına sebep olur. Burada fenollerin oksidasyon ile kinonlara dönüşümü olumsuz, istenmeyen bir sonuçtur.

Kolay elde edilebilirliği ve yüksek besin değerleriyle mantarlar yıllardan beri önemli bir besin olarak tüketilmektedir. Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanında kaliteli ve ucuz olması nedeniyle potansiyel PPO kaynağı olarak endüstrinin birçok alanında kullanıldığı bilinmektedir [6].

Bu çalışmada oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PPO'nun varlığı, biyokimyasal ve kinetik özellikleri *Lactarius salmonicolor* (kanlıca mantarı) mantarında incelenmiştir. Çalışmanın amacı Karabük etrafından toplanan *Lactarius salmonicolor*'dan PPO enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırılarak ayrıntılı bir biçimde karakterizasyonunun yapılmasıdır. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve ısı kararlılığı, substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi araştırılarak, bazı kinetik verilere ulaşılabilmek hedeflenmiştir. Yapılacak bu çalışmalar sonucunda elde edilecek verilerle, *Lactarius salmonicolor* PPO'nun endüstride kullanılabilirliğine yardımcı olunması ve bu mantarın gıda olarak tüketilmesi ve hatta kültürünün yapılması durumunda saklama ve depolama koşullarının ortaya konması noktasında önemli katkılar sağlayacak bir çalışma olması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

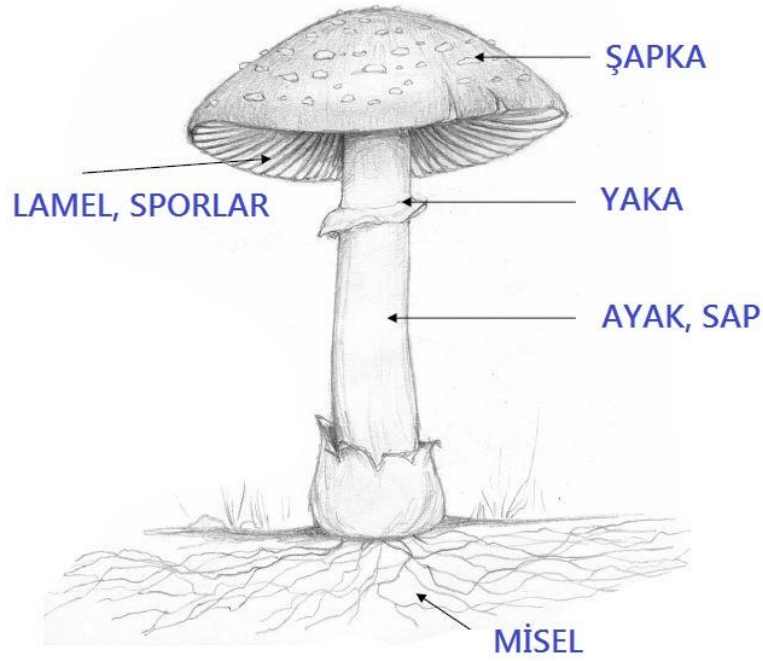
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. MANTARLAR

Bugüne kadar 150.000-160.000 mantar türü kaydedilmiştir ancak bunların arasında, yenilebilir olarak mantarların yaklaşık 100 türü ticari olarak yetiştirilir ve yaygın bir şekilde gıda kaynağı olarak kabul edilmektedir [7]. Yenilebilir mantarların çoğu protein, polisakkaritler, vitaminler, mineral elementler açısından zengindir ve tüm bu maddeler insan için gereklidir [8,9]. Örneğin iğne mantarı, *Pleurotus Eryngii* ve istiridye mantarı günlük yiyeceklerimizde kullanılırken, *Ganoderma Lucidum*, *Cordyceps Sinensis* mantarları öncelikli olarak bitkisel ilaçlarda kullanılmaktadır. Mantar türevi ilaçlar Japonya, Güney Kore gibi Asya ülkelerinde modern klinik uygulamalarda kullanılmaktadır [10].

2.1.1. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

Mantar, insanlara çok yardımcı olan kullanımlara sahiptir ve eski zamanlardan beri fayda sağladığı bilinmektedir. Mantarlar uzun süreden beri bilinmesine rağmen ilk olarak 16. yüzyılda Fransa'da çoğalmaya başlamıştır. Başlangıçta mevsime göre açık havada yetiştirilmiş, 19. yüzyılın başlarında ise nemin tamamen düzenli olduğu kapalı alanlarda ilkel şekilde üretilmeye başlanmıştır [11]. Şekil 2.1 bir mantarın ana parçalarını göstermektedir. Mantarın toprağın altındaki kısmı miseller parça olarak, toprağın üstünde kalan kısmı ise şapka olarak adlandırılır. Miseller kısım bitki köklerine benzer şekilde topraktan su ve besin maddelerini alır ve diğer kısımlara ulaştırır.



Şekil 2.1. Mantarların genel yapısı.

Mantarların altında yer alan lameller mantar gençken pembedir fakat zamanla taşıdığı sporların olgunlaşması sonucu koyu kahve renk alır. Mantarın şapka kısmında, lamellerde yer alan basidiosporlar olgunluğa ulaştınca etrafa yayılırlar ve ortam uygun olduğunda çimlenirler, bunlar yeni mantarlar oluşturur [11]. Mantarlar günlük beslenmemizde lezzetli olmaları ve güzel aromaları nedeniyle büyük önem taşır. Mantarlar %92 oranında su içerir ve besin değeri açısından sebzelerden farklılık göstermez.

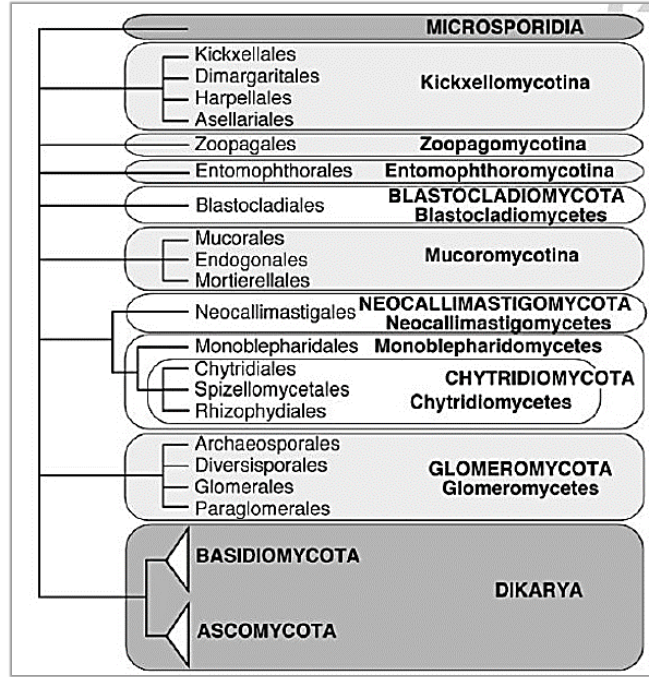
Yenilebilir mantarlar sindirimi kolay ve lezzetli bir besindir ve iyi miktarda vitamin, mineral, protein (etin değeri kadar), karbonhidrat ve yağ içerirler. Mantar proteininin sindirilebilirliği %72-83 arasında değişmektedir. Meyve ve sebzelere kıyasla iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. Mantarlar brom, manganez, çinko, sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit içerir [11] ve önemli bir folik asit kaynağıdır.

Folik asit eksikliği anemiye yol açar, bu nedenle mantarlar anemi tedavisi görenler için bir diyet olarak kabul edilir. Araştırmalara göre mantarlar kan şekerini düşürmektedir

ve kalp damar hastalıklarında kolesterol düşürücü özelliğe sahiptir [11]. Mantarlar hem besin kaynağıdır hem de yan etkilerden arındırılmış bir tedavi olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır, bu nedenle de önemi gün geçtikçe artmaktadır. Mantarlar doğal ürünlerdir, kolaylıkla yetiştirilmeleri ve ucuz olmaları onları araştırma ve klinik denemeler için bir kaynak haline getirir. Günümüzde antibiyotiklerin çoğu mantar kaynaklıdır.

2.1.2. Mantarların Sınıflandırılması

Mantarların sınıflandırılması sürekli değişmekte ve gelişmektedir. Tarih boyunca birçok farklı sınıflandırma sistemi yapılmıştır [12,13]. Günümüzde geliştirilen moleküler teknolojiler sayesinde mantarların sınıflandırılması daha doğru ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Mantar sistemi ilk olarak 1836'da Fries tarafından oluşturulmuştur [14]. Mantarların organizmalar arasındaki yerini incelediğimizde, Whittaker'ın 1969'da mantarların bitkiler aleminde yer almasını ve tohumuz bitkilerle birlikte bir bölüm (*Mycophyta*) şeklinde ele alınmasını önermiştir. Öte yandan Whittaker, düşüncesini geliştirirken yaklaşık yüz beş bin civarında çeşitlilik gösteren mantarların ayrı bir yaşam dünyası oluşturduğunu ve onları *Regnum Myceteae* (mantarlar) adlı bir dünyaya yerleştirdiğini kabul etti [15]. Mantar dünyasındaki grupları belirleme ve sınıflandırma çabaları çok eski olsa da 2004 yılında başlayan ve şu anda devam eden (yeni moleküler evrim yöntemlerini kullanan) AFTOL adlı ortak bir çalışma, tüm mantar gruplarını en üst düzeyde sınıflandırmayı amaçlamaktadır. Fungal Tree Collection Project (AFTOL) kapsamında Hibbet vd. fungal krallığının üst düzey bir sınıflandırmasını yaptı.



Şekil 2.2. Mantarların sınıflandırılması ve filogenisi (AFTOL).

2.1.3. *Lactarius Salmonicolor* Mantarının Özellikleri

Kanlıca mantarı, *Russulaceae* familyasından yenilebilen bir mantar türüdür. *Lactarius salmonicolor*, mantar krallığının *Homobasidiomycetae* sınıfı, *Russulales* takımının *Russulacea* ailesine aittir (Şekil 2.3). Bu mantar türü, ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde, Ekim ve Kasım aylarında Avrupa ormanlarında yağmurlardan sonra ve çam ağaçlarının asidik topraklarında ortaya çıkar. Şapka büyüklüğü 5-15 cm kadardır. Mantarlar gençken ortası biraz oyuk ve ucu içerededir. Büyüdükçe merkez daha çukur ve neredeyse apikal hale gelir. Açık sarıdan turuncuya kadar değişen renklere sahiptir.

Türkiye'nin, özellikle kuzey ve güney bölgelerindeki iklim ve bitki örtüsü yabani mantarlar için uygundur [16,17]. *Lactarius salmonicolor* Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda, Kıbrıs ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde yetişir [18].



Şekil 2.3. *Lactarius salmonicolor* (Kanlıca mantarı).

2.2. ENZİMLER

Canlı organizmalarda biyokimyasal bir reaksiyonun meydana gelebilmesi için, reaksiyonu katalizleyen bir enzimin olması gerekir ve bunlar protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Metabolizma adı verilen canlı organizmalarda meydana gelen biyokimyasal dönüşümlerin tamamı enzimler yardımıyla gerçekleşir. Enzimler yardımıyla organizmadaki organik maddelerin yapımı ve yıkımı, nefes alma ve kas hareketi gibi fizyolojik olaylar gerçekleşir. Deri, boya, temizlik malzemeleri, ilaç, tarım ve veterinerlik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Enzimler gıda endüstrisinde, pastörizasyon ve sterilizasyonun doğru yapılıp yapılmadığını belirlemek için kullanılır.

Tepkimelerin laboratuvarında gerçekleşmesi uzun zaman alır ve bazen reaksiyonun gerçekleşmesi için yüksek basınç, yüksek sıcaklık ve asidik veya bazik bir ortam gibi özel koşullar gerekir. Ancak enzimler kullanıldığında reaksiyon birkaç saniye gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Enzimler çok spesifik moleküllerdir ve diğer kimyasal katalizörlerden daha yüksek bir katalitik güce sahiptir. Enzimle katalizlenen reaksiyonun hızı 10^6 - 10^{16} kez artırılabilir ve yan ürün ve yan etkiler olmadan %100 ürün vermektedir. Katalitik reaksiyonlarda enzim reaksiyon sabitini veya dengesini

değiştirmez sadece tepkimeyi hızlandırır. Enzimlerin etkili oldukları bileşiklere substrat, substrattan tepkime sonucu oluşan madde veya maddelere ürün adı verilir. Bazı enzimler isimlendirilirken substrat isminin sonuna -az eklenir, bazılarında enzimi bulan bilim adamının adı verilmiştir.

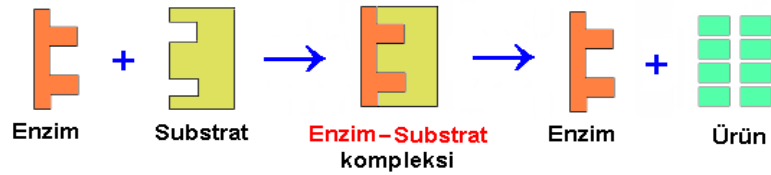
Bazı enzimler kendi başlarına aktif olabilirken çoğunluğu kofaktör adı verilen moleküllerin aktif olmasını gerektirir. Kofaktörler vitamin yapıları, metal iyonları veya organik moleküller olabilir. Enzimle birlikte olan Kofaktör molekülüne “holoenzim” denir ve kofaktörsüz protein kısmına “apoenzim” adı verilir. Apoenzimler kendi başlarına hareket edemezler ancak kofaktör ile katalitik aktivite kazanırlar. Vitamin ve türevleri koenzim olarak önemli maddelerdir. Örneğin birçok redoks tepkimesinde yer alan bir koenzim olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) nikotinamid halkasına sahiptir ve redoks tepkimesi buradaki amid üzerinden yürür. Amino grubu transferinde görev alan koenzimlerden bazıları piridoksal, piridoksin ve piridoksamindir (B_6 vitaminleri) [19].

2.2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler çok etkili katalizörlerdir ve diğer kimyasal katalizörlerden en büyük farkı, spesifik olmalarıdır. Kimyasal katalizörler tepkime hızını 10^2 – 10^3 kadar arttırabilirken enzim katalizörleri, 10^{20} 'ye kadar arttırabilirler. Enzimlerin sentezi canlı hücreler tarafından yapılır. Hücre içinde kalan ve burada işlevi olan enzimlerin yanısıra hücre dışına çıkan ve orada işlev gören enzimler de vardır. Bazı enzimlerin benzer yapıdaki bir grup substrat üzerinde etkisi vardır, diğerleri tek bir molekül üzerine etki eder. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrelerde bile binlerce biyokimyasal reaksiyon aynı anda gerçekleşir. Tüm enzimlerin protein kısmı vardır. Bazı enzimler yalnızca proteinlerden ve amino asitlerden yapılır. Özgüllük ve katalitik aktivite bu enzimlerde protein yapısından kaynaklanır. Amilaz, pepsin, tripsin, üreaz bu tür enzimlerdir. Proteine ek olarak, bazı enzimler yapılarında organik veya inorganik maddeler de içerir (kofaktör). Amino asit ve dizileri apoenzimlerin protein bölümünde farklılık yaratır. Bu yüzden enzim özellikleri ve özgüllüğü apoenzim tarafından belirlenir. Apoenzimler tek başlarına hareket edemezler, ancak kofaktörle birlikte etkinlik kazanırlar. Kofaktörler, anorganik iyonlar ve koenzimler olmak üzere iki çeşittir.

Koenzimler küçük boyutlu organik moleküllerdir. Kofaktör görevi gören inorganik katyonlar, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Na^+ , K^+ dur ve anyonlar Cl^- , Br^- , F^- , I^- dir.

Alman Kimyacı “Emil Fischer” 1894 yılında Anahtar-Kilit ve Enzim-Substrat (ES) ilişkisini ortaya koydu (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kilit ve anahtar teorisi.

Enzimler genelde substratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülünde kofaktörü içeren ve enzim-substrat kompleksinin oluştuğu ufak bölgeler aktif merkezleri oluşturur. Enzim molekülünün içindeki bu özel kısım aktif bölge olarak adlandırılır. Aktif bölgede substrat ve enzim, enzim-substrat kompleksini oluşturur. Substrat ürüne dönüştürülür ve ardından enzim üründen ayrılarak ve tekrar serbest hale geçer. Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi şu şekildedir:

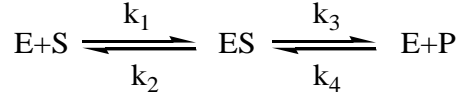


Aktif merkez, enzimin protein kısmında bulunur ve belirli sayı ve dizideki amino asitlerden oluşur. Aktif merkez sayısı birden fazla olabilir ve aktif merkezlerin toplam hacmi enzim yapısında çok küçük bir orandadır. Substrat, H-bağları, Van der Waals etkileşimleri ve elektrostatik kuvvetlerle aktif merkeze zayıf bir şekilde bağlanır.

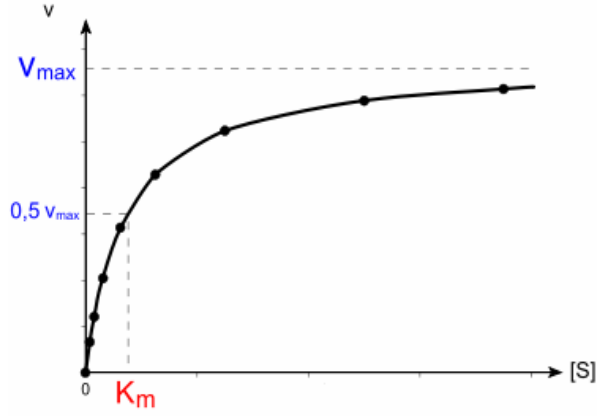
2.2.2. Enzim Kinetiği

ES kompleksi, enzim ve substrattan k_1 hızı ile oluşur. Kompleksin ayrışması ise k_2 hızına sahip geri reaksiyonla olur ve tekrar substrat oluşur. Asıl reaksiyon k_3 reaksiyon hızı ile devam eden ürün oluşum reaksiyonudur. Reaksiyon kararlı duruma (steady-

state) ulaştığında, ES kompleksinin oluşumu ile ayrışması eşit hıza sahiptir ve artık konsantrasyon değişmez.



1913 yılında Michaelis-Menten tarafından enzim reaksiyonlarının kinetiği ile ilgili ilk kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre enzim derişimi sabit iken reaksiyon hızının substrat derişimiyle değişimi incelendiğinde bir hiperbol elde edilir (şekil 2.5).



şekil 2.5. Michaelis-Menten grafiği.

Maksimum hız, hiperbolun artık substrat derişimiyle değişmediği ve sabit bir değere ulaştığı y değeridir ve V_{max} ile belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat konsantrasyonu K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli sabitlerdir. Parabol, Michaelis-Menten denklemleri ile ifade edilir:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

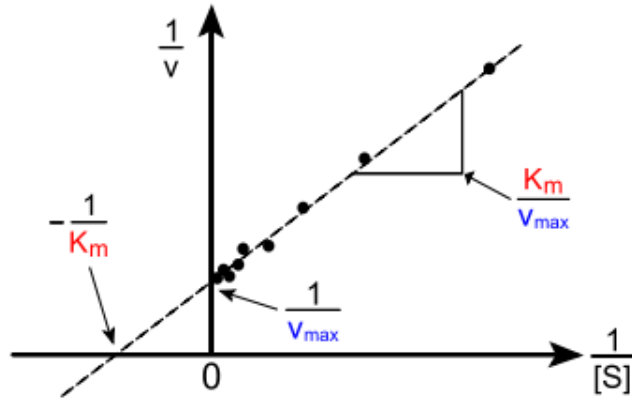
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat derişimi düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük

substrat derişimlerinde herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede ise substrat derişimi oldukça yüksektir ($[S] \gg K_m$), $V = V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı aşığıdaki Lineweaver-Burk denklemdir [20].

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

Denkleme göre ordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} 'dır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği.

2.2.3. Enzim Aktivite Belirleme Yöntemleri

Enzim aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratların varlığında çeşitli barometrik, polarografik, kronometrik ve optik tekniklerin yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan oksijen sayesinde, sistemin oksijen tüketimine dayalı olarak spirometre yardımıyla da ölçülebilir. Kronometre yönteminde, askorbik asit varlığında reaksiyon sırasında

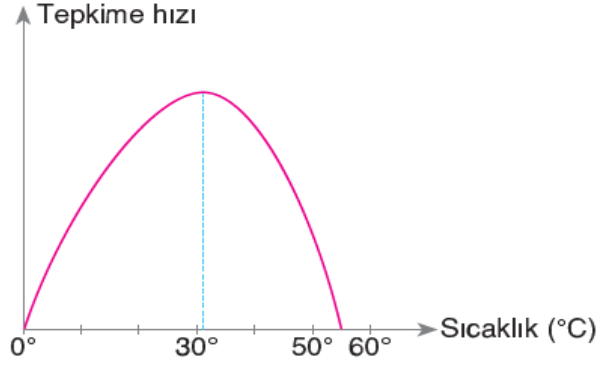
renğin ilk ortaya çıktığı an tespit edilir. Spektroskopide ise substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonu ürünlerinden birinin oluşum hızı ölçülerek enzim aktivitesi belirlenir. Bu yöntem diğerlerine göre daha hızlı ve kolay olduğu için tercih edilir [15]. L-DOPA, katekol, pirogallol, epikateşin ve klorojenik asit bu tür spektrofotometrik enzim aktivitesi tayini çalışmalarında yaygın olarak kullanılan substratlardır. Bu tekniklerin dışında nükleer manyetik rezonans (NMR), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) teknikleri de kullanılır, ancak bu teknikler pahalı cihazlar gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Enzimlerin varlığını, etkinliğini, kataliz mekanizmalarını, lokalizasyonlarını, miktarlarını ve saflıklarını belirlemek için onların aktiviteleri ölçülür. Saptanan binlerce enzim için çeşitli aktivite tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur, çünkü bir yöntemin uygunluğu, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, eldeki mevcut ölçüm cihazlarının niteliği ve ölçümün duyarlılığı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

2.2.4. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

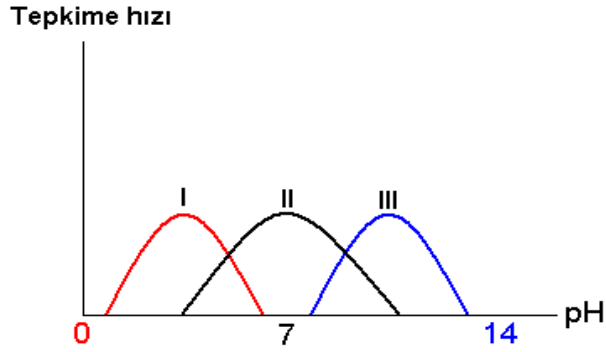
Enzim aktivitesi çeşitli faktörler tarafından etkilenebilir, örneğin sıcaklık, ortam pH'ı, zaman, substrat derişimi, enzim derişimi, çeşitli iyonların konsantrasyonu ve özellikleri, ışık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi ve inhibitörlerin varlığıdır.

Sıcaklık: Artan sıcaklıkla birlikte katalitik enzim reaksiyonlarının hızı artar. Sıcaklıktaki her 10 °C artışla enzim reaksiyonu 2 kat hızlanır. Bununla birlikte, sıcaklık belli bir değere ulaştığında enzim molekülünün yapısı değişikliğe uğrar. Bu durum enzimin katalitik etkisini etkiler ve tepkime ya yavaşlar ya da durur (Şekil 2.7). Bitkisel kaynaklı enzimler 50-60 °C'da, hayvanlardan elde edilen enzimler 40-50 °C arasında optimum sıcaklığa ulaşır [21,22].



Şekil 2.7. Optimum sıcaklık.

Ortam pH'ı: Her enzim belirli bir pH aralığında aktivite göstermektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'ı denir (Şekil 2.8.). Enzim protein yapısında bir moleküldür ve üzerinde amin ve karboksil grupları vardır. Bu gruplar ortamın pH derecesine göre iyonlaşma gösterirler. Bu iyonlaşmaya bağlı olarak yapıların kararlılıklarında farklılıklar gözlenir ve enzimin aktif bölgesinde bir değişim meydana gelir. Enzimatik tepkime genellikle optimum pH'ın her iki yanındaki bölgelerde yavaşlar. Bu nedenle enzimatik çalışmalar tampon kullanılarak optimum pH değerinde yapılır.

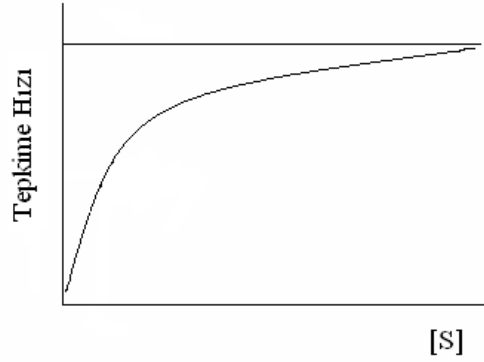


Şekil 2.8. pH etkisi.

Zamanın Etkisi: Bir tepkimenin hızı belirli bir zaman aralığında üretilen ürün miktarı ile belirlenir. Bir enzim tarafından katalizlenen tepkime devam ederken tepkime hızı giderek azalır. Bunun çeşitli nedenleri olabilir. Oluşan ürün miktarı arttıkça aksi yöndeki tepkime oluşmaya başlayabilir, enzim zamanla inaktive olabilir, tepkimeyi önleyen maddeler oluşabilir veya ortamda substrat kalmayabilir. Bu faktörlerin

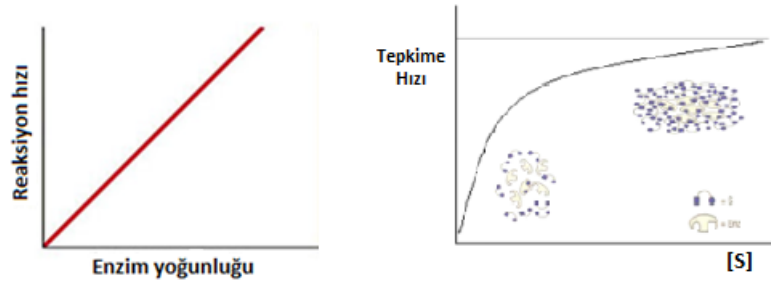
etkisini en aza indirmek için enzimle yapılan çalışmalar substratın yaklaşık %10'unun tüketildiği tepkimenin başlangıç zamanında yapılır.

Substrat derişimi: Substrat derişimi reaksiyon hızını belli bir süre artırır. Sonrasında substrat enzimin aktif merkezlerini doldurduğunda yani enzim substrat tarafından doyurulmuş hale geldiğinde artık tepkime hızı değişmez ve sabit bir değerde kalır (Şekil 2.9). Bu durumda enzimin çalışma hızı maksimum değerdedir (V_{max}). K_m değeri ise enzimin substratına olan ilgisini gösterir. K_m değeri ile afinite ters orantılıdır. K_m değeri ne kadar küçükse enzimle substrat arasındaki afinite o kadar fazladır [21].



Şekil 2.9. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat derişiminin etkisi.

Enzim Derişimi: Enzimin aktive edebileceği substrat miktarı ne kadar fazla ise enzimatik reaksiyonun hızı da enzim derişimi ile doğru orantılı şekilde artar. Enzim ne kadar fazla ise birim zamanda oluşacak ürün de o kadar fazla olur. Enzim, yapısı bozulana kadar substratı aktive etmeye devam eder (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Enzim ve substrat derişiminin tepkime hızına etkisi.

İnhibitör: Tepkime ortamında bulunan ve reaksiyonun hızını olumsuz etkileyen maddelere inhibitör denir. İnhibitörler tersinir ve tersinmez olarak sınıflandırılır. Aktif bölgeye doğrudan bağlanarak aktif bölgeyi bozan veya enzim molekülünün konformasyonunu değiştiren inhibitörler tersinmez davranış gösterir. Michaelis-Menten sabitini artıran ya da maksimum tepkime hızını azaltan inhibitörler bu davranışı enzimle bileşik yaparak gösterirler ve tersinir inhibisyon yaratırlar [23].

2.3. POLİFENOL OKSİDAZ

PPO, aktif merkezinde bakır bulunduran oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir. Bu enzim, oksijen varlığında monofenolik bileşenlerin *o*-difenollere hidroksilasyonu ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu sağlayan reaksiyonları katalizler. Oluşan kinonik yapılardan kırmızı, kahverengi veya siyah polimerik pigmentler oluşur [24,25].

Enzim isimlerindeki karışıklığı önlemek için bitki polifenol oksidaz enzimlerinin adlandırılmasında değişiklikler yapılmıştır. Tirozinaz (monofenol mono oksijenaz) EC.1.14.18.1, katekol oksidaz (katekolaz, difenoloksidaz) EC.1.10.3.2, lakkaz ise EC.1.10.3.1 enzim kodlarıyla gösterilmişlerdir [26]. Bazı kaynaklarda Lakkaz enziminin de PPO enziminin bir sınıfı olduğu belirtilmiştir. Lakkaz, metoksi ile yer değiştirmiş polifenoller ve aromatik diaminler gibi bir çok bileşiğin oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Ancak tirozinazın okside ettiği tirozini oksitleyemez [27].

PPO içeriği bitkinin türü ve yetiştirilişine göre farklı olabilir. Bitki ve meyvelerin olgunluk derecesine göre de bu enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi farklılık gösterebilir. Mekanik işlemler bitki, meyve ve mantarlarda “esmerleşme” adı verilen renk değişimlerine sebep olur. Bu enzimatik kararmalar bir dereceden sonra durdurulamaz ve yiyeceğin tadını ve kalitesini de bozar. Bu istenmeyen durumları engellemek için enzimin inhibisyonu yani aktivitesinin azaltılması veya durdurulması gerekir. Bu da ancak enzimin kinetik özelliklerinin çok iyi bilinmesiyle mümkündür [28,29]. Bu özellikleri belirleyebilmek için mantar, muz, çay, muşmula, enginar, ananas, Napoleon üzümü, patlıcan, elma, tütün, şeftali, patates, vanilya tohumu, yeşil

fasulye, dut, armut, elma, domates, kiraz, kaju fıstığı, enginar, brokoli, göbek marul, nane, kayısı gibi çeşitli kaynaklardan PPO enzimi saflaştırılmıştır [25,28-31]. PPO enziminin moleküler yapısı enzimin kaynağına göre, sayısı ise enzim kaynağına ve saflaştırmada uygulanan metodlara göre değişiklikler gösterebilir [32].

PPO enzimini ihtiva eden kaynaklar çeşitli fenolik bileşiklere sahiptir. Ancak bu bileşiklerin birçoğu söz konusu enzimin substratı değildir [33]. PPO enziminin meyve ve sebzelerde bulunan en önemli substratları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozin gibi flavonoid tipi fenollerdir ve basit fenollerin en yaygın doğal substratı da klorojenik asittir [34,35].

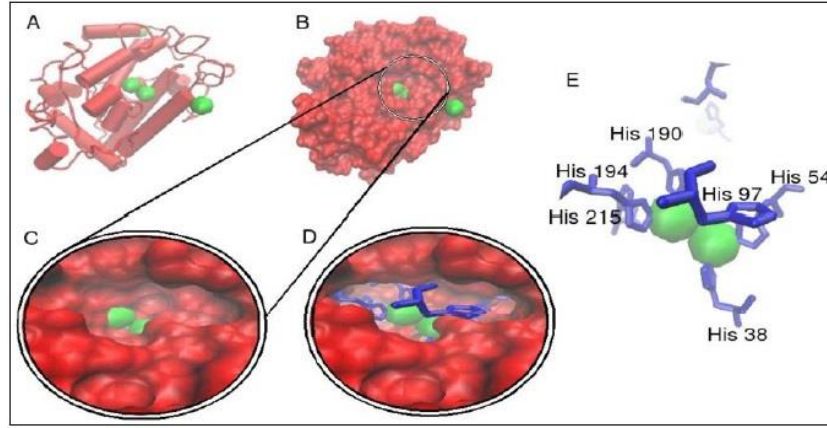
2.3.1. PPO Enziminin Kaynakları ve Doğadaki Rolü

İlk olarak 1856 yılında yemeklik mantarlarda bulunan PPO enzimi, doğada yaygın olarak bulunur [15]. Polifenol oksidaz enzimiyle birlikte polifenoller de bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Mikroorganizmalarda, özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir. Kabuklu deniz hayvanlarında (beyaz karides, küçük karides) bu enzimin varlığına rastlanmıştır [36]. Doğada geniş ölçüde yayılım gösteren ve doku yaralanmalarından sonra istenmeyen enzimatik kararmaya sebep olan bu enzim, bitkilerde kloroplast tilekoidlerinin membranlarında lokalize olmuş durumdadır. Bitkilerde PPO'nun önemli fonksiyonları vardır. Bunlardan birisi, bitki viral veya mikrobiyal bir enfeksiyona maruz kaldığında direncinin artırılmasıdır. Örneğin viral enfeksiyona sahip dokularda PPO enzimi sağlıklı dokulara göre daha fazla bulunmaktadır. Bu dokular enzimatik kararmaya karşı daha hassastır ve burada oluşan kinonların triptofan ile etkileşerek indol asetik asit oluşturdukları ve böylece kallus dokusu oluşturarak o bölgeyi korudukları düşünülmektedir [37]. Patojen bakterilerin örneğin, *Pseudomonas syringe*'nin yol açtığı enfeksiyon durumunda savunma amacıyla PPO gereğinden fazla kullanılır. Ayrıca yine benzer bir savunma durumu böcek istilaları sırasında da görülür. Pancar kurdu, domates meyve kurdu, yeşil şeftali aphidi gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı yaralanmalardan sonra PPO böceklere karşı bir savunma oluşturmaktadır [38]. Patatete virüsle enfekte olan dokular enzimatik kararmaya karşı daha hassastır ve bu dokular sağlıklı dokulara

oranla daha fazla fenol içeriği bulundurur. Diğer taraftan, lipid içeriği enfekte olmuş dokularda daha düşüktür. PPO'nun tabiattaki en önemli görevi bu şekilde bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır. PPO polifenol sisteminin bitki patolojisindeki rolü hakkında çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Tatlı patates dokularının *Ceratocystis fimbriata* mantarından elde edilen patojenik veya patojenik olmayan bir izolatla aşılması dokularda PPO aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Tatlı patates köklerinin düşük konsantrasyonlardaki etilene maruz bırakılması da aynı şekilde *Ceratocystis fimbriata* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığı gibi PPO aktivitesini de arttırmaktadır [39]. Bitkilerin enfeksiyona karşı direncinde PPO'nun rolü şöyledir: enzimatik tepkime sonucu oluşan kinonoid yapılar polimerleşerek suda çözünmeyen koyu renkli yapılar oluşturur. Bu polimerik pigmentler dokuları doldurur ve enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyerler oluşturur. Bazı araştırmacılar bu olayı PPO'nun ana görevi olarak kabul etmektedir. Bu dokularda lipid içeriği de azalır ve bu durum hücre membranlarının geçirgenliğini değiştirerek enzimin substratlarıyla buluşmasını dolayısıyla "bariyer" oluşumunu artırıyor olabilir. Zıt iklim koşullarına dirençli bitkilerde genel olarak dirençsizlere oranla daha fazla PPO aktivitesine rastlanmıştır. Örneğin kış şartlarına dayanıklı bir erik türü olan *Prunus ussuriensis* yapraklarında ve yine kış şartlarına dayanıklı asmalarda dayanıklı olmayanlara oranla daha fazla PPO aktivitesi bulunmuştur [40]. İnsanlarda ise tirozinaz cildin, saçın ve gözün pigmentasyonundan sorumludur.

2.3.2. PPO Enziminin Yapısı

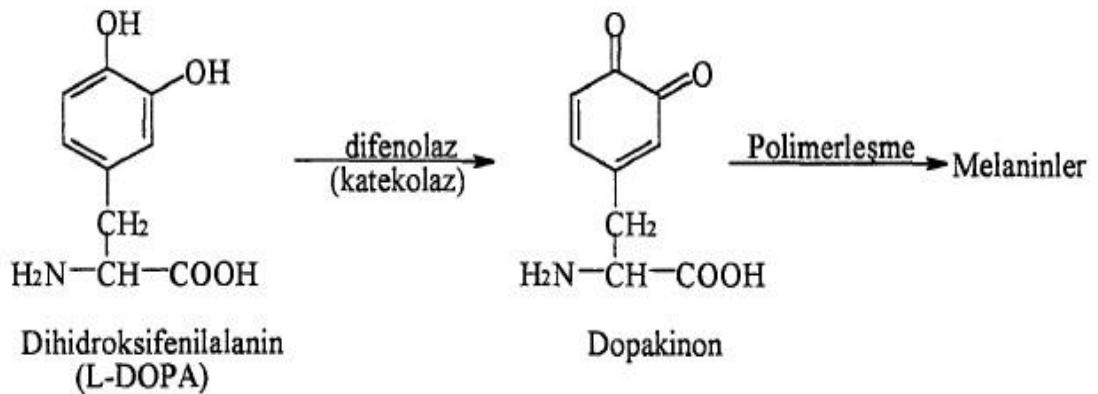
Tirozinaz ilk olarak 1856 yılında Schobenbein tarafından mantarda keşfedilmiştir. Tirozinaz iki bakır atomu ve herbirine bağlı üç histidin aminoasit grubu bulundurur ve bu yapı aktif merkezde bulunmaktadır. İki oksijen atomu aktif merkezde yer alan iki bakır atomuyla etkileşim durumundadır. Şekil 2.11'de tirozinaz enziminin yapısı gösterilmektedir. Bakır atomları yeşil renkte, molekül yüzeyi kırmızı renkte, aktif merkezdeki bakır atomları ile koordine olmuş histidin aminoasitleri mavi çizgi şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 2.11. Tirozinaz enziminin yapısının değişik açılardan gösterimi (A,B,C,D,E).

2.3.3. PPO Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

Tüm PPO'lar indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizler ve bu nedenle Uluslararası Biyokimya Derneğine (IUB) bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada birinci sınıfa dahil edilirler. Buna göre PPO'nun iki farklı aktivitesi vardır: monofenolaz aktivitesi (tirozinaz, kresolaz) [E.C.1.14.18.1] ile monofenolleri difenollere dönüştürür, difenolaz aktivitesi (katekolaz, difenol-oksijen oksidoredüktaz) [E.C.1.10.3.2] ile de difenolleri kinonoik yapılara dönüştürür (Şekil 2.12) [41]. Bu yapılar polimerleşerek melanin pigmentleri oluşturur ve bitkilerdeki esmerleşmenin sorumlusu oluşan bu kahverengi pigmentlerdir.

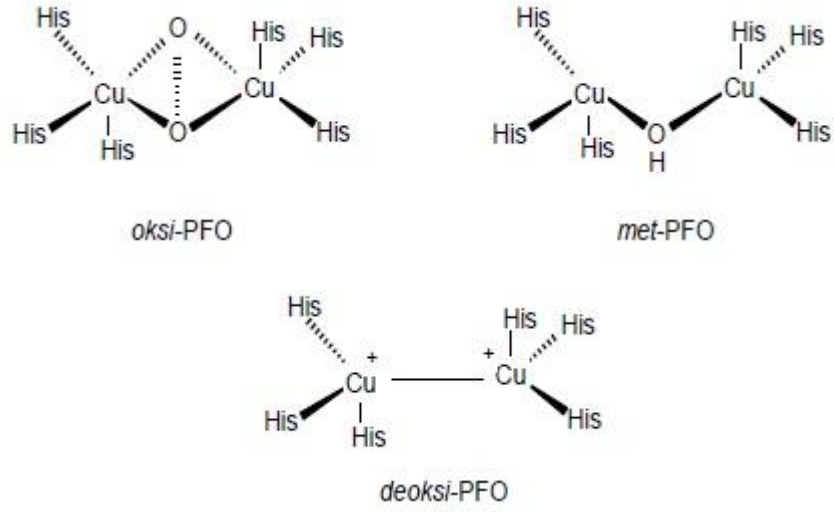


Şekil 2.12. PPO'nun difenolaz aktivitesi.

PPO ortalama 55-65 kDa molekül ağırlığına sahip olup enzimde iki bakır-bağlanma bölgesinin bulunduğu belirtilmiştir. Bakır içeriklerinin patates, tütün ve mantarda % 0.2-0.3 arasında değiştiği bulunmuştur. Taze hazırlanan enzim ekstraktlarında bakırın Cu (I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu (II) şekline yavaşça okside olduğu gözlenmiştir ancak bu değişimin aktivitede bir kayıba yol açmadığı belirlenmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değildir ancak Cu (II) nin ilavesi ile aktivite geri kazanılabilmektedir [42]. Apoenzim, saf enzimin sulu çözeltisinin potasyum siyanür içeren çözeltiliye karşı diyaliz edilmesi ile hazırlanabilmektedir. Saf PPO renksizdir, ancak benzer bir aktivite gösteren lakkaz enzimi mavi renklidir. Konsantre edilen PPO çözeltileri nötral pH değerlerinde oldukça kararlıdır. Bu çözeltiler kısa bir süre için 60 °C'a kadar ısıtıldığında ise enzim tamamen inaktif olur. Bu enzimin nötral pH değerlerinde ve fosfat tamponundaki derişik çözeltileri +4 °C veya -25 °C'da dondurulmuş olarak aktivitede herhangi bir kayıp olmaksızın birkaç ay saklanabilir. Bununla birlikte uzun sürelerde saklandığında aktivitede kayıplar gözlenebilir ve aktivitedeki bu kayıp dönüşümsüzdür. PPO aktivitesi, bakır ile kararlı kompleksler oluşturabilen H₂S, KCN, CO ve *p*-aminobenzoik asit gibi maddelerle inhibe edilebilir.

2.3.4. PPO Enziminin Reaksiyon Mekanizması

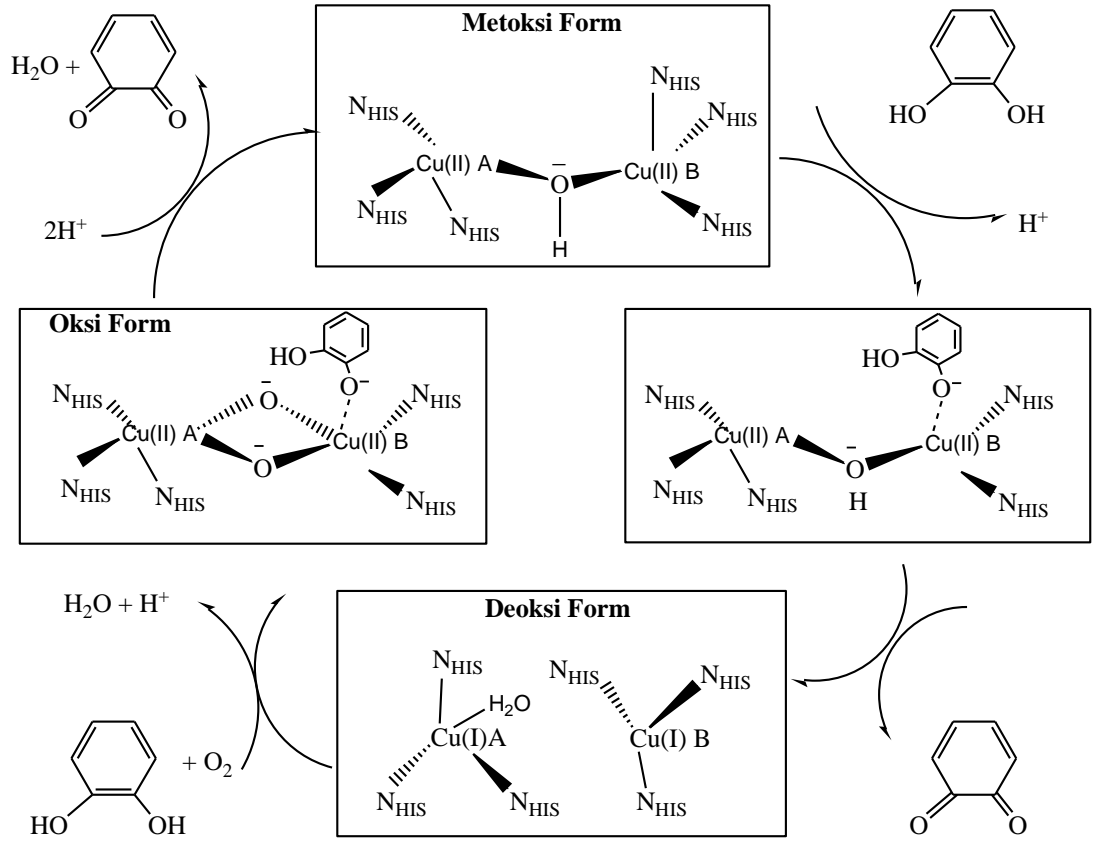
Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar, PPO'nun binükleer bakır kompleksi içeren bir aktif bölgeye sahip olduğunu göstermiştir. PPO'nun aktif merkezi, Tip3 bakır merkezi olarak bilinmektedir. Bakır atomunun merkezde bulunuşları, sırasıyla "metoksi", "deoksi" ve "oksi" halleridir [43]. Metoksi durumunda, enzim Cu²⁺—Cu²⁺ aktif bölgesi *met*polifenol oksidazdır. Deoksi formunda, Cu⁺¹—Cu⁺¹ aktif bölgesi PPO'nun indirgenmiş halidir. Oksi durumunda, Cu²⁺—O₂²⁻—Cu²⁺ aktif bölgesi *oksipol*ifenol oksidazdır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13.PPO'nun bakır merkezleri.

İlk olarak monofenolik substrat, oksî merkezin aksiyal pozisyonundaki iki bakır atomundan birine koordine olur [44]. Üçgen bipiramit ara bileşiğindeki yeniden düzenleme peroksit vasıtasıyla monofenolun hidroksilasyonuna ve su çıkışına ve deoksi formundaki kompleksin oluşumuna yol açar [45]. Oluşan kompleks ya katekolaz döngüsündeki ilk adım olan serbest difenolu verir ya da aktif bölgeye bağlı difenolat ara bileşiği oksidasyona uğrar ve bir kinon ve bir indirgenmiş binükleer bakır enzim bölgesi (deoksi) verir. Bu forma moleküler oksijen bağlandıktan sonra, oksî PPO tekrar rejenere edilir.

PPO tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve *o*-dihidroksi fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu için önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 2.14'de verilmektedir [46].



Şekil 2.14. PPO aktivitesinin reaksiyon mekanizması.

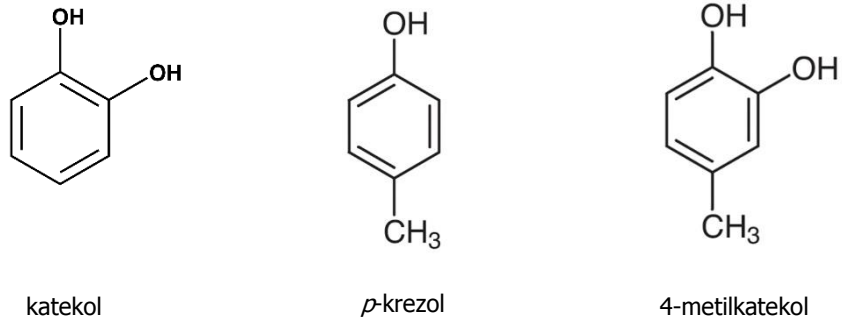
2.3.5. PPO Enziminin Aktivitesi

PPO aktivitesi, palografik, manometrik, kronometrik ve spektrofotometrik gibi çeşitli teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir. Oksidasyon reaksiyonunda kullanılan O₂, bir bir respirometre ile ölçülerek sistemin oksijen harcaması saptanabilir. Kronometrik yöntemde ise askorbik asit ortamında tepkime esnasında rengin ilk görüldüğü an saptanır. Spektrofotometrik metotta ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da oluşan kinonoid yapıların oluşum hızı ölçülür ve enzim aktivitesi bulunur ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir [47].

Son zamanlarda 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kuvvetli bir nükleofil varlığında PPO aktivitesi tayini oldukça yaygın kullanılan spektrofotometrik bir metottur. Bu metod, enzim katalizli üretilen *o*-kinonların nükleofille verdiği renkli katılma ürününün 500 nm civarındaki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır [48].

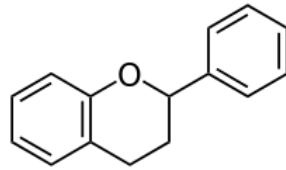
2.3.6. PPO Enziminin Substratları

Meyve ve sebzeler oldukça çeşitli fenolik bileşik ihtiva ederler. PPO'nun meyve ve sebzelerdeki en yaygın substratları flavonoid tipi fenollerle basit fenollerdir [49] (Şekil 2.15). Meyve ve sebzenin cinsi, yetiştirilişi ve enzimin ekstrakte edildiği bitki bölgesi gibi faktörler enzimin substrat spesifikliğini belirler. Aktivite ölçümünün yapıldığı pH'ın da substratın kullanılabilirliğine etkisi vardır [1].



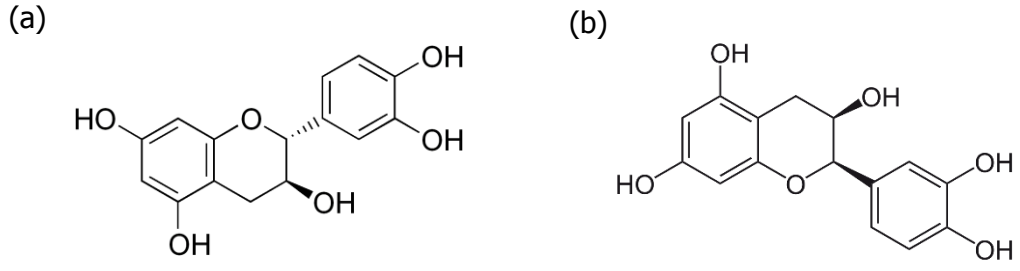
Şekil 2.15. Yaygın olarak kullanılan bazı basit fenollerin kimyasal yapısı.

Flavonoidler bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunurlar. Genel yapıları Şekil 2.16'da görülmektedir.



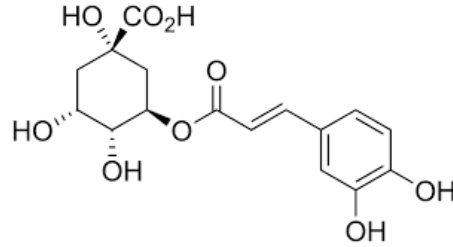
Şekil 2.16. Flavonoidlerin genel yapısı.

Kateşinler flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir. Kateşinler doğada (+) - kateşin ve onun stereoizomeri olan (-) - epikateşin olarak bulunurlar [50] (Şekil 2.17).



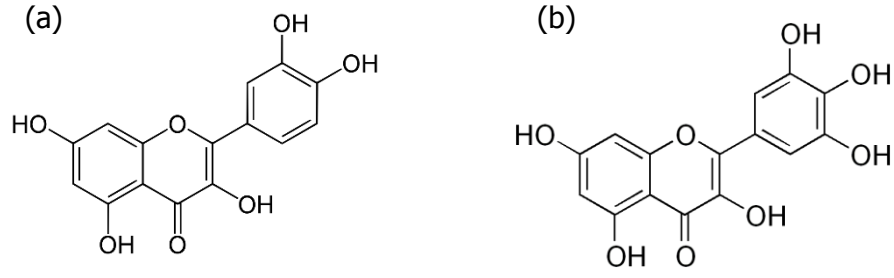
Şekil 2.17. a) Kateşin, b) Epikateşin.

PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden biri olan klorojenik asittir.



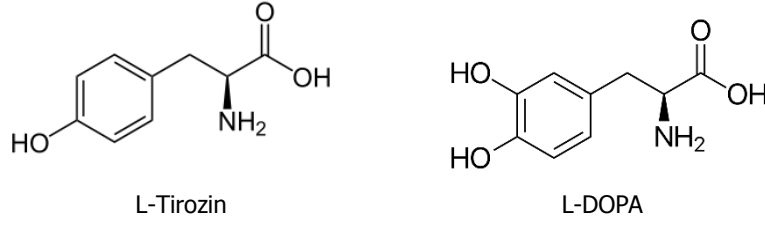
Şekil 2.18. Klorojenik asit (5-*o*-kafeilkinik asit)

Flavonoller, antoksanin pigmentleri olarak da tanımlanıp çok çeşitli teknikler yardımıyla izole edilip karakterize edilmişlerdir. Bu yapılar birçok durumda mirisetin, kuersetin ve kamferol olarak isimlendirilen birçok türevleri halinde esmerleşme reaksiyonlarına doğrudan katılırlar (Şekil 2.18). Antosiyaninler ise, pelargonidin, siyanidin ve delfinedin olarak tanımlanan türevleri halinde daha çok ikincil reaksiyonlarda rol oynarlar.



Şekil 2.19. Bazı flavonollerin kimyasal yapısı a) kuersetin, b) mirisetin.

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifeniletülin) ve tirozinin PPO ile hidroksilasyonu sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) bitki dokularında mevcuttur (Şekil 2.19). Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PPO, L-DOPA'yı dehidrojenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat *p*-krezolu hidroksiller. Şeker pancarı PPO enzimi, tirozine karşı aktivite göstermezken L-DOPA'yı dehidrojenasyona uğratmaktadır. Fakat ilginç olan şudur ki şeker pancarı dokularında kayda değer miktarda L-DOPA bulunmazken, oldukça fazla miktarda tirozin bulunmaktadır [51]. Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen “PPO enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman en iyi PPO substratları bulunmaz” tezini desteklemektedir. L-DOPA 1967 yılından beri Parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir nörotransmitter olan dopaminin eksikliği bu hastalığa sebep olur. L-DOPA kan beyin bariyerini aşabilen bir dopamin prekürsörüdür. Günümüzde L-DOPA Knowles yöntemiyle ticari boyutta kimyasal olarak üretilmektedir. L-DOPA yüksek ticari değere sahiptir fakat yüksek üretim maliyeti nedeniyle bu ilacın alternatif üretim yöntemleri araştırılmaktadır. Bunlardan biri PPO'nun immobilizasyonu ve enzim sayesinde L-Tirozinden L-DOPA'nın üretilmesidir (Şekil 2.20). Burada enzim immobilizasyonu ile pahalı bir enzim olan PPO'nun tekrar tekrar kullanımı ve bu sayede üretim maliyetinin düşürülmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 2.20. L-Tirozin ve L-DOPA'nın yapısı.

2.3.7. Enzimatik Kararma

Mekanik zedelenmeler bitki, meyve ve bazı kabuklu deniz canlılarında esmerleşme adı verilen renk değişimlerine sebep olur. Canlının dokularında bulunan fenolik bileşikler polifenol oksidaz enzimi tarafından kinonlara oksitlenir. Bu yapılar polimerleşerek esmerleşmeye sebep olan kahverengi melanin pigmentlerini oluşturur. Bu ürünlerin endüstriyel proses aşamalarında oluşabilen esmerleşme tepkimeleri kaliteyi azaltır ve ekonomik değerin düşmesine sebep olur. PPO enziminin aktivitesi için oksijen gerekir ve hücrede enzim oksijensiz bir ortamda iken yaralanma sonucunda enzim açığa çıkar ve oksijenle bir araya gelerek aktivite gösterir. Bu da esmerleşme tepkimelerini başlatır. Bu tepkime enzim, substrat ve oksijenin birarada bulunmasıyla gerçekleşir ve esmerleşmeyi engellemek için bunlardan birinin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Böylece tepkime ya azaltılır ya da durdurulur. Enzimin aktivitesini etkileyen sıcaklık, pH gibi parametreler değiştirilerek de tepkimeler engellenebilir. Enzimatik kararma reaksiyonları iki adımda oluşur. Birinci adım, polifenol oksidazın katalizlediği reaksiyon ile monofenollerin ya da difenollerin *o*-kinonlara enzimatik oksidasyonu, ikinci adım ise enzimatik oksidasyon sonucu oluşan *o*-kinonların, enzimatik olmayan kondenzasyon ya da polimerizasyon reaksiyonları sonucu melanin bileşiklerini oluşturmasıdır. Bu esmerleşme reaksiyonları stres koşulları altında oluşur. Çünkü bu koşullar altında hücre içi parçalanma meydana gelir ve PPO substratları (fenolikler ve oksijen) ile temas kurar. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları oldukça karmaşıktır. Birçok monofenolik ya da difenolik bileşik, PPO ile etkileşerek çok farklı türde kinonik ürünlere ya da kondenzasyon ürünlerine dönüştürülürler. Fenolik substratlardan, PPO aktivitesi sonucu üretilen *o*-kinonlar renkli türler olmasına rağmen, enzimatik esmerleşmenin tipik kırmızı-kahverengimsi rengi, *o*-kinonların enzimatik olmayan ikinci adım

reaksiyonları sonucu oluşan melaninlerden kaynaklanır. Fenolik bileşiklerin oksidasyon ürünleri, besinlerdeki proteinlerle etkileşim potansiyeline sahiptir ve bu etkileşimler sonucunda kovalent bağlanma reaksiyonları oluşur. Bu bağlanma reaksiyonları sonucu, proteinlerin yapılarında, fonksiyonlarında ve besinsel değerlerinde değişimler meydana gelir. Proteinlerin besinsel değerindeki azalma, esansiyel aminoasitlerinin kinonlarla etkileşmesinden kaynaklanır.

2.3.8. PPO Enziminin İnhibitörleri

Sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması sırasında meydana gelen enzimatik kararmalar hem müşteriler tarafından istenmeyen bir durumdur, hem de gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu yüzden enzimatik kararmaların kontrolü gıda işleme endüstrisinde oldukça önemli bir yer tutmakta ve araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir. Günümüzde gıda sektöründe PPO kaynaklı enzimatik kararmaları önlemek için çeşitli PPO inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan inhibitörler ürünlerin tadına, kokusuna ve kalitesine etki etmeyen, toksik olmayan ve ekonomik olarak uygun maddeler olmalıdır.

PPO aktivitesini engellemek üzere kullanılan inhibitörler etkilerine göre 6 grupta toplanabilir [51]:

- İndirgeyici ajanlar (askorbik asit ve analogları, sülfidler)
- Şelat yapıcı ajanlar (EDTA, sodyum dietilditiyokarbamat (DIECA), sodyum azid)
- Kompleks yapıcı ajanlar (siklodekstrinler, kitosan)
- Asitlik düzenleyiciler (Askorbik asit, sitrik asit, malik asit, fosforik asit)
- Enzim inhibitörleri (substrat analogları, halojenürler)
- Diğer enzimlerle muamele (proteazlar, *o*-metiltransferaz)

Gıda endüstrisinde indirgeyici ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar *o*-kinonların birikimini önleyerek melanin oluşumunu inhibe eder veya kararlı renksiz ürünler oluşturabilir. Enzimatik kararma inhibitörlerinden en çok kullanılanları kükürt dioksit veya sülfidlerdir, özellikle sodyum sülfid, sodyum bisülfid ve sodyum metabisülfittir.

Sülfidler çok kullanılan PPO inhibitörü olmalarına rağmen, bitki ve meyvelerde yumuşama yaptığı ve tadı etkilediği bilinmektedir. Askorbik asit ve onun izomeri olan erithorbik asit, sülfide alternatif olarak kullanılan indirgeyici ajanlardır ve meyve suyu, püreleri, dondurulmuş dilimli meyveler, kutulanmış meyve ve sebzelerin üretiminde esmerleşme önleyici ajan olarak kullanılmaktadırlar. Askorbik asit oluşturduğu asidik çevre ile enzimin katalitik aktivitesi üzerine etki etmektedir. Sitrik asit de şelatlama özelliğiyle PPO inhibitörü olarak rol oynamaktadır. PPO üzerinde etkili bir diğer inhibitör sisteindir. Sisteinin, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan *o*-kinonlarla tiyol konjugatları oluşturmak suretiyle etki ettiği düşünülmektedir. PPO prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için siyanür, karbon monoksit, sodyum dietilditiyokarbamat, merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe olmaktadır. Doğal kaynaklarda da PFO enziminin inhibisyonuna yol açan polifenoller ve aldehid türevi bileşikler bulunmaktadır. Bazı potansiyel PPO inhibitörleri bitkilerde bulunan kampferol, kuersetin, luteolin gibi flavonoidlerdir. Flavonoidlerin inhibisyon özelliği aktif bölgedeki bakırla şelat yapabilme özelliğinden ileri gelmektedir. Trans sinnamealdehit, anisalaldehit ve kuminalaldehit gibi çeşitli aldehid türevleri ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bunların inhibitör etkilerinin enzimin primer amino gruplarıyla Schiff bazı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. PPO'nun başka birçok inhibitörü bilinmektedir. Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tiyoller, aromatik karboksilik asitler gibi kimyasallar, lignanlar ve bazı alkaloidler gibi doğal bileşikler de bunlar arasındadır [52].

2.3.9. Polifenol Oksidaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

PPO enzimi pek çok kaynağa sahip olduğu için aynı oranda farklı ekstraksiyon ve saflaştırma metotları mevcuttur. Metot seçimi, enzimin kaynağına, istenen saflaştırma derecesine, protein miktarına, safsızlık oranına ve enzimin kullanım amacına göre değişebilir. Çalışmaların çoğunda, ekstraksiyonu takip eden bir çöktürme aşaması vardır ve bunu takiben saflaştırma yöntemi uygulanır. Ekstraksiyon genellikle PPO kaynağının fosfat veya asetat tamponuyla, pH 5-7 aralığında blender yardımıyla homojenize edilmesidir. Bu ekstrakta daha sonra farklı yöntemler uygulanır. Çoğu çalışmada bir sonraki aşama derişik tuz çözeltisiyle proteinlerin çöktürülmesi veya

çözücü temelli çöktürme veya sıcaklık değişimine dayalı faz ayrımı olabilir ve son aşama kromatografik yöntemlerle saflaştırma [53-55]. Ekstraksiyon çözeltisinde bulunan fenollerin enzime bağlanarak enzimin aktivitesini azaltması ve saflaştırma basamağını zorlaştırması sebebiyle genellikle ortama polivinilpirolidon (PVP) veya askorbik asit gibi polifenoller engelleyen maddeler eklenir [19,56,57]. Enzimin çözünürlüğünü artırmak ve özellikle membran enzimlerinin de ekstrakte edilebilmesini sağlamak amacıyla ortama sodyum dodesilsülfat (SDS) gibi düşük derişimli yüzey aktif madde eklenir [58]. Ekstraksiyon çözeltisine geçen proteaz enzimlerinin PPO'ya etki etmesini engellemek amacıyla da fenilmetilsülfonilflorit (PMSF) gibi proteaz inhibitörleri eklenir [59].

2.3.10. PPO'nun Endüstrideki Kullanım Alanları

Tirozinazın gıda, arıtım, sağlık ve kozmetik endüstrisi gibi birçok uygulama alanı vardır. Enzim, meyve ve sebzelerin prosesi esnasında enzimatik kararma tepkimelerine yol açtığı için ilk olarak bu açıdan ilgi çekmiştir. Enzimatik kararma ürünün kalitesini düşürmekte dolayısıyla maddi kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle hasat ve proses esnasında enzimin aktivitesini en aza indirmek için pek çok araştırma yapılmıştır. Gıda endüstrisinde tirozinaz aktivitesinin kontrolü ve esmerleşme tepkimelerinin önlenmesi çok önemlidir ve inhibitörler üzerindeki araştırma çalışmaları devam etmektedir [60,61]. Bazı gıdalar için tirozinaz aktivitesi önlenmesi gereken bir durum olmakla birlikte bu enzimin aktivitesi çay, kahve, kakao, kuru üzüm, kuru erik, kuru incir vb. gibi ürünler için gereklidir ve bu ürünlerin kalitesini artıran bir özelliktir.

Tirozinaz enziminin arıtım, kozmetik ve tıbbi uygulamalara yönelik önemi ise son zamanlarda giderek artan bir yoğunlukta dikkatleri çekmektedir [62]. Endüstriyel ve evsel atıklarda bulunan fenolik maddeler çevre sularını kirletmektedir ve bu maddeler sulardaki canlı yaşam için tehdit oluşturmaktadır. Atık suların, doğada toksik etki gösteren bu maddelerden arındırılarak doğaya verilmesi gerekir. Bu amaçla enzimlerin kullanılması etkili ve basit bir yol olarak yaygınlaşmaktadır. Tirozinaz enziminin zararlı fenoliklerin uzaklaştırılmasında kullanımı konusu hala mühendislik alanında pek çok araştırma konusudur. Atık sularda tirozinaz kullanıldığında fenolikler enzim

tarafından seçici olarak kinonlara oksitlenir. Kinonlar polimerleşerek çökerler ve atık sudan bu yolla uzaklaştırılırlar [63].

Melanin suda çözünmeyen bir heteropolimerdir. Kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışınlarından korunma amacıyla tirozinaz enzimi tarafından üretilir ve kozmetik ürünlerde kullanılır. Tıpta en önemli kullanımı ise Parkinson hastalığının tedavisinde dopamin prekürsörü olarak kullanılan L-DOPA'nın sentezidir. Tirozinin tirozinaz enzimi tarafından hidroksilasyonu ile üretilir.

2.4. YÜZEY AKTİF MADDELER

Tüm yüzey aktif veya yüzey gerilimli moleküller, yüksek molekül ağırlığında polar moleküllerdir. Polar molekülün bir ucu suda çözünen diğer ucu yağda çözünen özelliğe sahiptir. Molekül bir ucunda karboksil, sülfat, sülfonat veya hidroksil gruplarının (COO^- , $\text{Na}^+\text{-SO}_4^-$, $\text{Na}^+\text{-SO}_3^-$, $\text{Na}^+\text{-OH}^-$) bulunmasından dolayı suda çözünürlük kazanır. Öte yandan organik grup içeren diğer uç ise yağda çözünürlük sağlar [64]. Sentetik yüzey gerilimli maddeler üç ana gruba ayrılırlar: iyonik (anyonik, katyonik), iyonik olmayan (noniyonik) ve amfoterik (hem (-) hem (+) uçlu) maddeler [65,66].

Triton X-100 yüzey aktif maddesi laboratuvar araştırmalarında yaygın olarak tercih edilen bir noniyonik deterjandır. Hücre içindeki proteinlerin hücre dışına alınarak ekstraksiyon veriminin artırılmasında kullanılır. Hücre membranının geçirgenliğini artırarak organellerin ve hücre içi proteinlerin açığa çıkmasını sağlar.

2.5. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA

Elde edilmek istenen molekül grubunu diğer maddelerden ayırarak saf bir şekilde elde etmek için bir dizi işlem uygulanır. Bu işlemler karışımdaki molekül gruplarının genellikle çözünme özelliklerine, yoğunluk, elektriksel yük gibi fiziksel karakteristiklerine veya diğer moleküllere ilgisine göre birbirlerinden ayrılımlarını sağlayan yöntemleri kapsar [35].

Enzim kaynağından enzimin çıkarılması: Genellikle her kaynak için farklı biçimlerde yapılır. Mesela bakteri için sonikasyon kullanılırken, bitki için ezme yöntemi kullanılabilir.

Santrifüjleme: Bu yöntem, partiküllerin yüksek hızda döndürülen bir cihazda merkezkaç kuvveti sayesinde ayrılmasına dayanır. Hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilen ve çeşitli aşamalarda başvurulabilecek bir işlemdir.

Çöktürme: Bu yöntemde istenen ya da istenmeyen moleküller çözücü ortamında çöktürülerek katı halde ayrılmaları sağlanır. Bunun için sıklıkla kullanılan tuzlar amonyum ve sodyum sülfat tuzlarıdır ve proteinleri çöktürme amacıyla kullanılırlar. Farklı molekül ağırlığına sahip proteinler belli bir doygunluk derecesine sahip amonyum sülfat ortamında çöktürülür. Bu çöktürme işleminde istenen doygunluk aralığı bulunursa enzim çöktürülerek diğer proteinlerden ayrılır.

Diyaliz: Bu teknikte küçük molekülleri geçiren fakat makromoleküllerin geçişine izin vermeyen bir membrandan yapılmış diyaliz tüpü kullanılır. İstenmeyen küçük maddelerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir. Çözelti diyaliz tüpüne konarak saf su veya tampon içine yerleştirilir. Ultrafiltrasyon temeline göre küçük moleküller diyaliz tüpünün dışına çıkarken içeride ayrımı istenen makromolekülün konsantre bir çözeltisi kalır.

Isıtma: Aranılan enzimin özellikleri göz önünde bulundurarak belirli dereceye kadar ısıtma işlemi yapıldığında ilgilenilmeyen diğer proteinlerden kurtulmuş olunur.

Kromatografi: Kromatografi tekniğinde ayrımı yapılacak moleküller biri hareketli diğeri sabit iki faz arasında hareket ederek kromatografi kolonunda ilerler. Bu hareket esnasında moleküller farklı derecede adsorbsiyon veya farklı dağılım özellikleri veya iyon değişimine uğramaları sebebiyle ayrılırlar. Proteinler çoğunlukla kolon kromatografisiyle ayrılır. Bu teknikte protein karışımı içeren çözelti porlu bir tutucu içeren kolondan geçirilir. Kolonda yer alan tutucu tipine göre kromatografik yöntem

iyon değişimi, afinite kromatografisi veya jel filtrasyonu olarak adlandırılır. Saflaştırma yöntemlerinden en yüksek saflaştırma yüzdesi veren yöntemdir.

Süzme (Filtrasyon): Karışım filtre edici bir materyalden geçirilerek, süspansiyonda bulunan partiküllerin sıvı kısımdan ayrılmasıdır. Bu yolla, kullanılan gözeneklerin çapına göre, filtreden geçen kısımda belli büyüklükte partikül bulunabileceği gibi, bunların tamamı da filtrenin üzerinde kalabilir.

2.6. MANTARDAN PPO İZOLASYONU İLE İLGİLİ ALIşMALAR

Fan ve Flurkey Potabella mantarından tirozinaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzim pH 3.3'ün üzerinde aktivite göstermiştir. Difenolik substratlar denenmiş, en yüksek aktivite katekolle elde edilmiştir. Katekolle yapılan kinetik çalışmada, K_m ham özütte 5.3 mM, saflaştırılmış enzimde 4.3 mM olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış enzimin molakül ağırlığı 75 kDa'dur [67].

Yang vd. Yüzey aktif maddelerin mantar tirozinazının aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla anyonik AOT, noniyonik Brij52 ve katyonik CTAB deterjanlarını denemişler ve bu deterjanların etkisini saptayarak karşılaştırma yapmışlardır [68].

Nunez-Delicado vd. Triton X-114 yüzey aktif maddesini kullanarak iki fazlı sulu sistemde tirozinazın mantardan kısmi saflaştırmasını yapmışlardır. Enzim 5.5 kez saflaştırılmış ve %84 verim elde edilmiştir. Bu çalışmada katyonik ve anyonik deterjanlar denenmiş, kinetik karakterizasyon ve inhibisyon çalışması yapılmıştır. En etkili inhibitör olarak tropolon bulunmuştur [69].

Kolcuoglu vd. *Macrolepiota mastoidea* mantarının monofenolaz ve difenolaz aktivitesini araştırmışlardır. Elde ettikleri ham özütün gösterdiği optimum pH'lar monofenolaz ve difenolaz aktivite için sırasıyla pH 6.0 ve 4.0 olarak bulunmuştur. Bu pH'larda monofenolaz aktivite %100, difenolaz aktivite %60 korunmuştur. Tiyoüre ve askorbik asit monofenolaz aktiviteye, yine askorbik asit ve sodyum metabisülfid difenolaz aktiviteye karşı en etkili inhibitörlerdir [70].

Özel vd. *Boletus erythropus* mantarından elde edilen PPO'yu incelemişler ve organik çözücülerde enzimin katalitik aktivitesini araştırmışlardır. PPO, Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonuyla saflaştırılmıştır. Optimum pH ve sıcaklık 4-metilkatekol substratıyla 8.0 ve 20 °C olarak bulunmuştur. Enzim 24 saat inkübasyondan sonra pH 3.0 ve 9.0 aralığında oldukça stabil davranış göstermiştir. 4 saat inkübasyondan sonra 10 ve 30 °C aralığında yine stabil olduğu saptanmıştır. K_m ve V_{max} , 2.8 mM ve 1430 U/mg protein olarak bulunmuş, enzim aktivitesi sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azit ve benzoik asit tarafından inhibe edilmiştir. Enzim diklorometan, dikloroetan ve toluende etkin katalitik aktivite göstermiştir [71].

Kolcuoglu *Macrolepiota gracilentia* mantarından PPO enzimini Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonuyla saflaştırmış ve enzimin monofenolik ve difenolik aktivitelerini karakterize etmiştir. Enzimin optimum pH'ları monofenolaz ve difenolaz aktivite için sırasıyla pH 7.0 ve 5.0, K_m değerleri ise sırasıyla 0.8 mM ve 1.0 mM olarak bulunmuştur. V_{max} ise 2000 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzim optimum pH'larda 5 gün inkübasyondan sonra monofenolaz aktivitesinin %40'ını, difenolaz aktivitesinin %60'ını korumuştur. Tiyoure en etkili inhibitör olarak saptanmıştır [72].

Colak vd. Üç mantar çeşidini; *Armillaria mellea*, *Lepista nuda* ve *Hypholoma fasciculare* mantarlarını incelemişler ve ham özütteki PPO enziminin 4-metilkatekole karşı oldukça aktif olduğunu saptamışlardır. Optimum pH üç enzim için de 7.0 olarak bulunmuş, optimum pH'da 24 saatlik inkübasyondan sonra *L. nuda* ve *H. fasciculare* enzim aktiviteleri sırasıyla %26 ve %18 azalmış, *A. mellea* enzim aktivitesi ise %11 artmıştır. Optimum sıcaklık *A. mellea*, *L. nuda* ve *H. fasciculare* için sırasıyla 30, 30, 20 °C olarak saptanmıştır. Cr^{+3} ve Cu^{+2} herbirinin aktivitesini inhibe etmiş, sodyum metabisülfid ve askorbik asit ise güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir [73].

Zaidi ve Ali *Agaricus bisporus* ve *Pleurotus ostreatus* mantarlarından tirozinaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Enzim, amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve Sephadex G-100 jel filtrasyon ve DEAE Selüloz iyon kromatografileriyle saflaştırılmıştır. *A. bisporus* için saflaştırma derecesi 16.36, verim %26.6 ve spesifik aktivite 52.19 U/mg olarak, *P. ostreatus* için verim %20.3 spesifik aktivite 46.4 U/mg

olarak bulunmuştur. Molekül ağırlıkları ise sırasıyla 95 ve 75 kDa'dur. Saflaştırılmış enzimin optimum pH değerleri 7.0 ve 6.0, optimum sıcaklık ise 35 °C'tır. İki enzim de en yüksek aktiviteyi L-DOPA substratına karşı göstermiş, K_m değerleri ise sırasıyla 0.933 mM ve 0.119 mM olarak hesaplanmıştır [74].

Dedeoglu ve Guler *Lactarius salmonicolor* mantarından PPO enzimini 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonu kullanarak saflaştırmışlar ve katekol, 4-metilkatekol, pirogallol substratlarına karşı K_m ve V_{max} değerlerini elde etmişlerdir. Optimum pH ve sıcaklık bulunmuş, çeşitli inhibitörler denenerek IC₅₀ değerleri saptanmış, en etkili inhibitör olarak L-tirozin bulunmuştur [75].

Öz vd. PPO enzimini 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonu ile *Lactarius piperatus* mantarından izole etmişlerdir. Optimum pH ve sıcaklık katekol kullanılarak 7.0 ve 20 °C olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesini optimum pH ve 4 °C'ta, 72 saat süreyle korumuş, 20 °C'ta ise 4 saatlik inkübasyon sonucu yine stabilitesini koruduğu saptanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri, 1 mM ve 25 U/mg protein olarak hesaplanmış, inhibisyon çalışmasında ise en etkili inhibitör olarak askorbik asit bulunmuştur. Diklorometan, heptan, toluen çözücülerinde etkin bir biyokatalizör olarak davranmıştır. [76].

Gouzi ve Benmansour *Agaricus bispora* mantarından PPO'yu kısmen saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Enzim monofenolaz ve difenolaz aktivite göstermiş, amonyum sülfat çöktürmesiyle 2 kat saflaştırılmıştır. Monofenolaz aktivite 3.35 EU/mL, difenolaz aktivite 189.3 EU/mL olarak bulunmuştur. PPO -15 °C'ta 44 gün stablitesini korumaktadır. 35 °C'ın üzerindeki sıcaklıklara dayanıksızdır ve aktivitesi azalmaktadır. PPO enzimi substrat olarak pirogallol kullanıldığında pH 5.3 ve 7.0 olmak üzere iki optima göstermiştir. Kinetik parametreler pirogallol için; $V_{max} = 78$ EU/min/mL, $K_m = 1.4$ mM, katekol için; $V_{max} = 168$ EU/min/mL, $K_m = 0.40$ mM olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmasında ise benzoik asit ve sodyum azit yarışmalı inhibisyon, L-sistein ve sodyum florit ise karışık tip inhibisyon göstermişlerdir [77].

Zaidi vd. Tirozinaz enzimini istridye mantarı *Pleurotus ostreatus*'tan ekstrakte etmişler, amonyum sülfatla çöktürme, Sephadex G-100 ve DEAE kromatografileriyle

saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 46.4 U/mg, verim ise % 20.3 olarak bulunmuştur. SDS/PAGE jel elektroforezinden molekül ağırlığı 75 kDa olarak saptanmıştır. Optimum pH ve sıcaklık 6.0 ve 35 °C'tır [78].

Matsumoto-Akanuma vd. *Agaricus brasiliensis* mantarından PPO enzimini kısmen saflaştırmışlar, Triton X-114 yüzey aktif maddesiyle iki fazlı ayırma ve amonyum sülfatla çöktürme yapmışlardır. SDS/PAGE çalışmasından moleküler ağırlıkları 70 ve 45 kDa olarak bulunmuştur. Enzim 1.6 mM SDS varlığında aktive edilmiş, bu işlem sonucunda V_{max} değeri 2 katına çıkmış, K_m değeri ise değişmemiştir [79].

Saki vd. PPO enzimini *Lepiota procera* mantarından 3 fazlı sistem kullanarak kısmen saflaştırmışlar ve saflaştırma derecesini 8.4 olarak bulmuşlardır. SDS/PAGE sonucu saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığı 35 kDa olarak saptanmıştır. Enzim L-DOPA'ya karşı yüksek aktivite göstermiş ($K_m = 0.12$ mM), bunu kafeik asit ($K_m = 0.27$ mM) ve 4-metilkatekol ($K_m = 0.46$ mM) izlemiştir. Optimum sıcaklık ve pH 40°C ve 7'dir [80].

Wu vd. *Agaricus bispora*'dan PPO enzimini amonyum sülfatla çöktürme ve DEAE-Sepharose ve Phenyl Sepharose CL-4B kromatografileriyle saflaştırmışlardır. Molekül ağırlığı 43 kDa, optimum sıcaklık ve pH 20 °C ve 6.5-7.0 olarak bulunmuştur. Enzimin 30 ve 40 °C'ta 60 dakika inkübasyondan sonra stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Katekol için K_m ve V_{max} değerleri 0.67 mM ve 3333 U/mL dak^{-1} 'dir [81].

2.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin Karabük Kanlıca mantarından izolasyonu ve saflaştırılmasıdır. Bu amaçla önce PPO enzimi, Kanlıca mantarından ekstrakte edilmiş, daha sonra amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle çöktürülen enzim, diyalizlenerek afinite kromatografisi kolonuna uygulanmış ve kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri araştırılmış, optimizasyon ve karakterizasyonu yapılmıştır.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan tampon malzemeleri sodyum asetat, asetik asit, sodyum hidroksit, Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 Merck, Tris Bazı ve Trisma hidroklorik asit Sigma-Aldrich markalıdır. Amonyum sülfat, Triton X-100 Merck'den, fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), Sephadex G-100, Folin-Ciocalteu reaktifi, gallik asit Sigmadan tedarik edilmiştir. Sodyum karbonat Riedel de Haen, diyaliz membranı ve polivinilpirolidon (PVP) Sigma-Aldrich, polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve serum albümini Acros, 4-metil katekol ve 4-terseyerbütillatekol Sigma-Aldrich markalıdır. Coomassie Brilliant Blue G-250, *p*-krezol, pirogallol TCI kimyasaldan temin edilmiştir. Macherey-Nagel filtre kağıtları kullanılmıştır.

3.1.2. UV – VIS Spektrofotometre

Enzimin aktivitesini tayin etmek amacıyla yapılan ölçümlerde Shimadzu UV-1201V model spektrofotometre kullanıldı. Enzim aktivitesi, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünün 410 nm'de oluşum hız ölçümleri yapılarak belirlendi. Protein ölçümleri ise 280 nm'de Thermo Fisher GEN 10S spektrofotometre ile yapıldı.

3.1.3. Santrifüj Cihazı

PPO enziminin mantardan saflaştırılması sırasında Eppendorf 5702 R marka soğutmalı santrifüj kullanıldı. Ekstraksiyonda ham ekstraktı elde etmek için ve amonyum sülfatla yapılan çöktürme işlemlerinde 5 °C'da, 60 dak, 4400 rpm'de santrifüjleme yapılmıştır.

3.1.4. pH metre

Hanna Instruments HI 221 marka pH metre kullanılmıştır. Bu cihaz elektrik sinyali üreten bir elektrot kullanılarak sinyali, pH birimine çeviren potansiyometrik bir ölçüm sağlar. Sinyal potansiyel olarak ölçülür. pH ölçümü yapabilmek için gerekli olan; algılama elektrodunun ürün içindeki hidrojen iyon aktivitesinin logaritmasına oransal olarak sağladığı gerilim ile referans elektrodun ideal olarak ürünün aktivitesinden bağımsız, sabit ve sürekli sağladığı gerilimdir. Elektriksel sinyal bu iki gerilim arasındaki fark ile oluşur. Referans ve algılama elektrodu arasındaki gerilim farkı pH metre tarafından ölçülerek pH değerine çevrilir.

3.1.5. Manyetik Isıtıcılı Karıştırıcı

Hazırlanan çözeltilerin bir balık (mıknatıs) yardımıyla ve manyetik alan etkisiyle aynı devir sayısında ve aynı sıcaklıkta homojen bir şekilde karıştırılması MTOPS MS300 HS marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile sağlanmıştır.

3.1.6. Çalkalayıcı Su Banyosu

Farklı sıcaklıklarda alınan ölçümler Nuve ST 30 çalkalamalı su banyosu ile yapılmıştır. Sıcaklık optimizasyonu ve sıcaklık stabilite deneylerinde su banyosu +4 °C ve 70 °C arasındaki sıcaklıklara getirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık saptandı

3.1.7. Homojenizatör

Mantardan PPO enzimi ekstraksiyonu yapılırken Philips marka blender kullanılmıştır. Mantarları parçalamak için blender belirli aralıklarla çalıştırılarak numuneler ekstraksiyon çözeltilisiyle homojenize edilmiştir. Elde edilen çözeltiler süzülerek homojenat elde edilmiştir.

3.2. KULLANILAN METOTLAR

3.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Mantarlar Karabük pazarlarından elde edildikten sonra yıkandı, kir ve çamurdan arındırıldı ve küçük parçalara bölünerek 2.5 gramlık numuneler halinde $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı. Ekstraksiyon çözeltisi %5 PVP, 0.001 M PMSF ve %5 Triton X-100 yüzey aktif maddesi içeren fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.00) şeklinde hazırlandı. 2.5 gramlık mantar numunesi 50 mL ekstraksiyon çözeltisi ile blender yardımıyla 5x10 sn süre homojenize edilmiştir. Karışım 20 dakika manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Filtre kağıdından süzildikten sonra elde edilen süzüntüler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatantlar "ham enzim ekstraktı" olarak toplandı ve çökeltiler atıldı. Tüm bu işlemler buz banyosunda yapıldı ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da soğutulan çözeltiler kullanıldı.

3.2.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme

Bu işlem %0–80 arası doymunlukta amonyum sülfat çözeltileri kullanılarak yapıldı. Çöktürme esnasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları verilen formülle hesaplandı [82].

$$\text{gr}[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2} \quad (3.1)$$

V : süpernatant hacmi.

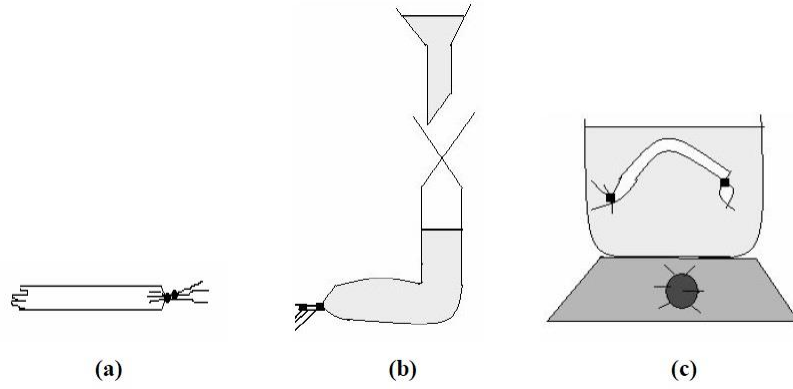
S_1 : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doymunluğu.

S_2 : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doymunluğu.

Çöktürme esnasında amonyum sülfat ham özüte az miktarlarda yavaş yavaş eklendi, her ilave sonrasında daha önce eklenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfat ekleme işlemi bir saat süreyle buz banyosunda devamlı karıştırılarak yapıldı. Katı amonyum sülfat eklenerek %65 doymunluğa getirilen çözelti 4400 rpm'de, soğutmalı santrifüjle, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da bir saat santrifüjlendi. Ham özütün tamamı santrifüjlendi, üstte kalan sıvı kısımlar atılarak tüplerin dibinde kalan çökelekler toplandı ve 10 mL fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.00) çözüldü.

3.2.3. Diyaliz

Diyaliz en eski yöntemlerden biridir ve özellikle biyolojik moleküllerin ayrımında kullanılır. Moleküllerin boyutlarının farklı olması ile ayırım yapılır. Diyaliz tüpleri genellikle molekül ağırlığı 10000 den fazla moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçük porlara sahiptir. Bu nedenle diyaliz torbasının içindeki küçük boyutlu moleküller dışarı çıkıp tampona karışırken, makromoleküller içerde kalarak temizlenmiş olur. Küçük boyutlu moleküllerin çıkışı torbanın içindeki ve dışındaki derişimler eşit oluncaya kadar devam eder. Bu denge durumu genelde 4-6 saat içinde oluşur ve sonrasında dışardaki tampon değiştirilerek diyalize devam edilir. Bu işlem 24-48 saat süreyle 3-6 kez tampon değiştirilerek yapılır.



Şekil 3.1. Genel diyalizin uygulanış şekli: a) Diyaliz tüpünün bağlanması, b) Diyaliz tüpünün doldurulması, c) Tuzların uzaklaştırılması.

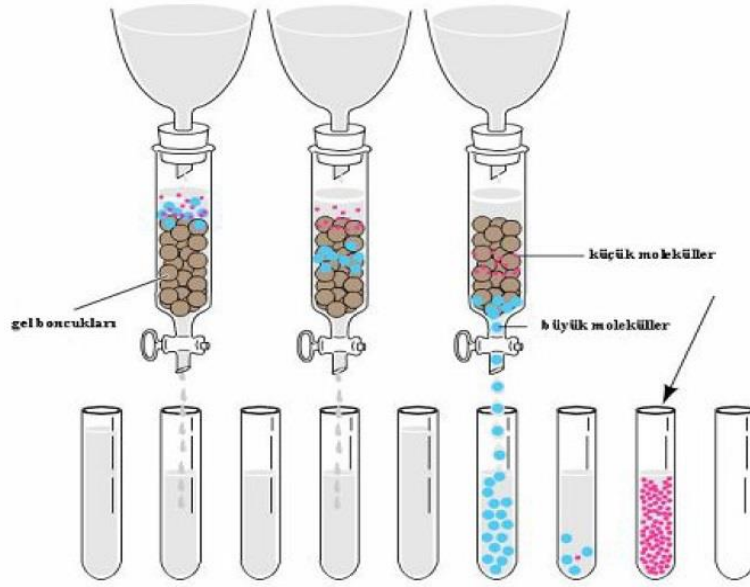
Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz tüpüne yerleştirilmiş ve +4 °C'da 2.0 L fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.00) kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 48 saat boyunca işleme devam edilmiş ve her 6 saatte bir diyaliz tamponu yeni bir 2 L'lik tamponla değiştirilmiştir. Amonyum sülfat ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim artık kısmen saf hale getirilmiştir. Elde edilen bu enzim çözeltisi -18 °C'da depolanmıştır.

3.2.4. Sephadex G-100 Afinite Kolonuyla Ayırıştırma

Jel filtrasyonu veya moleküler elek kromatografisi olarak da adlandırılan jel geçirgenlik kromatografisinde ayırma, molekülün büyüklüğüne göre yapılır. Bu metot binlerce protein, nükleik asit, polisakkarit ve diğer biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılır. Jel filtrasyonu kolonunda hareketli ve sabit fazlar vardır. Sabit faz küçük boyutlu porlara sahip inert partiküllerden meydana gelir. Hareketli faz akış halindeyken, farklı büyüklükte moleküller içeren numune kolona uygulanır ve hareketli faz akışıyla kolondan geçirilir. Bu işlem sırasında sabit fazın porlarından büyük olan moleküller bu porlara giremez ve partiküllerin dışında kaldığı için kolonda daha hızlı ilerler. Partiküllerin porlarına yayılabilen küçük moleküller ise kolonda daha yavaş ilerler. Bu çalışmada afinite jeli olarak Sefadex G-100 kullanılmıştır. 2.125 g malzeme 40 mL fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.00) bir gün bekletilerek jelin oluşumu gerçekleştirilmiştir. 1.0 cm çapında ve 25 cm boyunda bir kolon seçilerek dibi cam pamuğu ile kapatılmış, fosfat tamponu geçirilerek hava kabarcıkları çıkarıldıktan sonra jel kolona yerleştirilmiştir. Kolondan bir gün boyunca tampon geçirilerek jel stabilize edilmiş ve akış hızı belirlenmiştir (0.40 mL dk⁻¹).

3.2.5. Enzim Çözeltilisinin Kolona Uygulanması ve Elüsyonu

Bu işlemlerden sonra amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi kolona uygulanmış ve kolonun musluğundan 3'er mL'lik eluentler alınmıştır. Kolondan alınan her 3 mL'lik çözeltinin, 280 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değeri okunmuştur. Protein hiç gözlenilmeyinceye kadar ayırma işlemine devam edilmiştir. Bu işlemlerden sonra 3'er mL'lik alınan çözeltiler tüplere konularak numaralandırılmış ve her tüpün absorbans değeri ile grafiğe geçirilmiştir. Belli yerlerde pik gösteren tüpler birleştirilerek PPO enziminin aktivitesine bakılmıştır. PPO aktivitesi gösteren çözeltilerdeki protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Farklı büyüklükteki moleküllerin jel filtrasyon kromatografisi ile ayrılması.

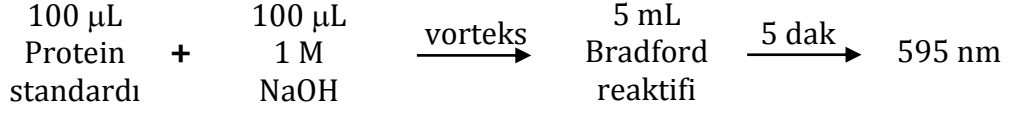
3.2.6. Protein Tayini

Saf eluentteki kalitatif protein tayini 280 nm’de absorbans ölçümleriyle yapıldı. Buradaki absorbans ölçümleri proteinlerin yapısında bulunan bazı amino asitlerin aromatik halkaya sahip olmasına dayanır ve bu halkaya sahip proteinler 280 nm’de UV ışınlarını absorplar.

Ham özütteki ve saf eluentteki kantitatif protein tayini ise Bradford metoduyla yapıldı. Metotda kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi fosforik asit ortamında proteinlerle kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin absorbansı 595 nm’de ölçülür. Bu metodun hassasiyeti yüksek, tayin sınırı düşüktür. Tekrarlanabilir sonuçlar alınır, oluşan kompleks stabildir ve uygulama süresi kısadır.

Protein tayini işlemlerinde önce Bradford reaktifi hazırlandı. 25.0 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 12.5 mL %95’lik etanol içinde çözüldü, üzerine 25 mL %85’lik fosforik asit eklendi ve karıştırılarak su ile 250 mL’ye tamamlandı. 1.0 M NaOH çözeltisi hazırlandı. Protein standardı olarak serum albumini kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için serum albumininden 0.05, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75 ve 1.00 mg mL⁻¹

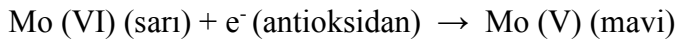
olacak şekilde protein standartları hazırlandı. Bu standartlarla aşağıdaki işlemler gerçekleştirilerek 595 nm’de absorpsanları alındı.



Kör hazırlanırken protein standardı yerine su kullanıldı. Numune ölçümleri içinse yukarıdaki işlem, protein standardı yerine 100 µL numune kullanılarak tekrarlandı. Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden numunelerin protein derişimleri hesaplandı.

3.2.7. Polifenollerin Tayini

Singleton ve arkadaşları tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu metodu toplam fenolik madde içeriğini ölçmek için kullanılır. Bu yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli bileşik oluşturması [83] ve bu renk yoğunluğuna göre absorpsan ölçümü esasına dayanır. Yönteme adını veren Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) bir molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ve varsayılan aktif merkezi Mo (VI)’dır.

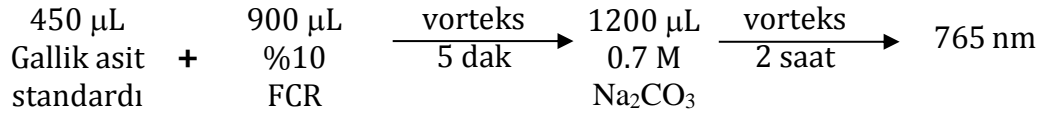


Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler ve sodyum karbonat çözeltisiyle ortamın pH’ı 10’a ayarlanır. Fenolik bir protonun ayrılması, FCR’yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur ve fenolat ile FCR arasında mavi renkli bileşikler oluşur. FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından da indirgenebilir ve fenolik bileşiklere spesifik değildir. Bu metot gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer. Analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğrayabilir [84].

Bu dezavantaja rağmen metot, basit, duyarlı ve kesinliği yüksek olması, tekrarlanabilirliği ve diğer metotlarla gösterdiği korelasyondan dolayı oldukça sık

kullanılmaktadır. Metot sonuçları standart bir fenolik madde, genellikle gallik asit eş değeri olarak verilmektedir.

Metot farklı derişimlerde gallik asit standartlarının kullanımını içerir. 0.5-2.5 mM aralığında 5 derişim olacak şekilde su ile hazırlanan standartlardan 450 µL alınarak üzerine 900 µL %10'luk Folin-Ciocalteau reaktifi eklendi. Karıştırıldı ve 5 dakika bekleme süresinden sonra 1200 µL 0.7 M Na₂CO₃ çözeltisi eklendi, karıştırıldı. 2 saat bekleme süresinden sonra çözeltilerin absorbansları 765 nm'de ölçüldü ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu.



Kör için aynı işlemler 450 µL su alınarak uygulandı. Numuneler için gallik asit standardı yerine 450 µL numune alındı ve aynı işlemler yapıldı, absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon eğrisinden numunelerdeki total polifenol miktarı mM gallik asit eşdeğeri olarak tespit edildi.

3.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Polifenoloksidaz enziminin aktivite tayini, spektrofotometrik olarak 410 nm'deki absorbans artışı kaydedilerek yapılmıştır. Kuvartz numune hücresinde 0.1 mL kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi ve fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.00) kullanılarak hazırlanan 2.9 mL katekol çözeltisi karıştırılmış ve 25 °C'de 2 dakika süresince absorbans artışları kaydedilmiştir. Kör olarak, diyalizat renkli olduğundan, 0.1 mL enzim çözeltisine eklenen 2.90 mL fosfat tamponu kullanılmıştır. Daha sonra absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek eğimden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Bir ünite PPO enzim aktivitesi, 25 °C'da 1 dakikada 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır. Enzimin hacimsel aktivite ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki formüllerle belirlendi:

$$\text{Hacimsel aktivite (U/mL)} = \text{Ünite} / \text{Enzim Hacmi (mL)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \text{Hacimsel Aktivite} / \text{mL'deki mg protein miktarı}$$

3.2.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim özütündeki PPO aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla, asetik asit-sodyum asetat (pH 3.50–5.00), NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 6.00–7.00) ve Tris HCl-Tris Baz (pH 7.50–10.00) tampon sistemleri kullanıldı. Optimum ölçüm pH'ını saptamak amacıyla herbir pH'da katekol çözeltileri hazırlanarak 0.1 mL enzim çözeltisi + 2.9 substrat çözeltisi kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler pH'a karşı grafiğe geçirildi. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri optimum ölçüm pH'ı olarak tespit edildi ve bundan sonraki çalışmalarda aktivite tayinleri optimum pH değerinde gerçekleştirildi.

Optimum ekstraksiyon pH'ını saptamak amacıyla yukarıda anlatıldığı şekilde pH 3.5–10.0 tamponları hazırlandı ve herbir pH'ta ayrı ayrı ekstraksiyonlar yapıldı. Elde edilen ham özütlerle yapılan aktivite ölçümleri pH'a karşı grafiğe geçirildi.

3.2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim özütündeki PPO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 10–70 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık değeri 10 °C artırılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Enzim ve substrat çözeltisi su banyosunda 3 dakika bekletilerek istenilen sıcaklığa getirildi ve bekletmeden hızlı bir şekilde aktivite ölçümü alındı. Aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri optimum ölçüm sıcaklığı olarak belirlendi.

3.2.11. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

Enzim özütünün içerdiği PPO'nun pH kararlılığının incelenmesi amacıyla, asetik asit-sodyum asetat (pH 3.5–5.0), NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 6.0–7.0) ve Tris HCl-Tris Baz (pH 7.5–10.0) tampon sistemleri hazırlandı. 0.4 mL enzim çözeltisi 11.6 mL her bir tampon çözeltisine ayrı ayrı eklenerek 2 saat +4 °C'da bekletildi. Aktivite ölçümü 0.1 mL katekol çözeltisi (150 mg mL⁻¹) üzerine 2.9 mL enzim çözeltisi eklenerek yapıldı ve ölçüm her pH için tekrarlandı. Tampon içindeki enzim çözeltileri +4 °C'da

bekletilmeye devam edildi ve 5. gün yukarıda anlatılan aktivite ölçümü tekrar edilerek enzimin 2 saat ve 5 günlük pH kararlılığı saptanmış oldu.

3.2.12. Polifenol Oksidazın Termal Kararlılığı

Enzim özütünün içerdiği PPO enziminin aktivitesine ait termal kararlılık değerlerini belirlemek amacıyla enzim çözeltileri 4–70 °C arası sıcaklıklarda su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Her bir sıcaklıkta 3 saat boyunca su banyosunda bekletilerek her 30 dk'da bir aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite yüzdesi inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim çözeltilisinin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Kör olarak her pH'ın kendi tamponu kullanıldı.

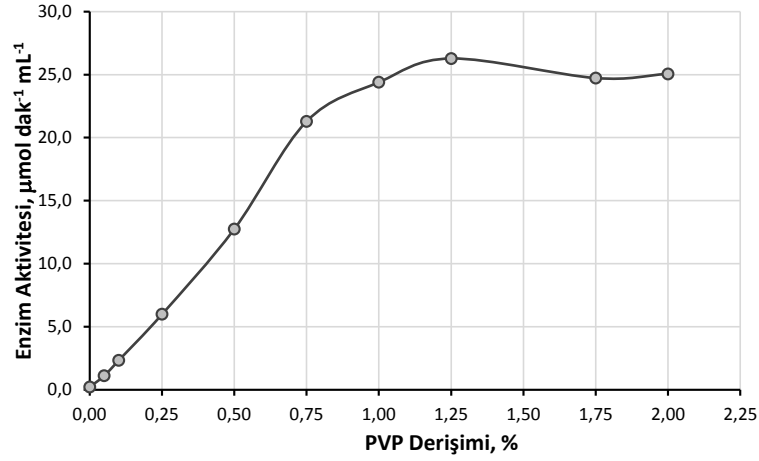
BÖLÜM 4

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. ENZİM EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRMA ÇALIŞMALARI

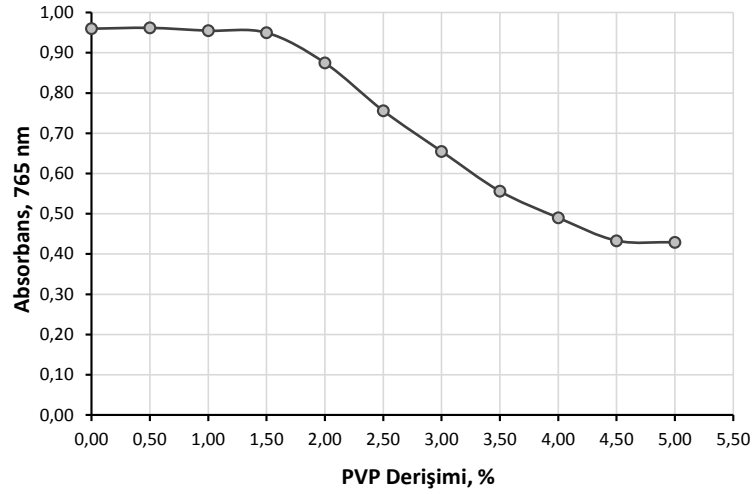
4.1.1. PVP Derişiminin Etkisi

Polivinilpirolidon polifenollerini hidrojen bağıyla kendine bağlar ve bu maddelerin ortamdaki uzaklaştırılmalarını sağlar. Homojenizasyon sonrası süzme işlemiyle ortam polifenollerden temizlenir ve PPO-polifenol tepkimeleri bir ölçüde engellenmiş olur. Ekstraksiyonda kullanılan PVP miktarının optimizasyonu amacıyla %0.01 – 2.00 aralığında farklı yüzdelerde PVP kullanılmış ve her bir PVP derişiminde ekstraksiyon yapılmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi başlangıçta PVP derişimi arttıkça enzim aktivitesi artmış daha sonra ise sabit kalmıştır. Artan PVP miktarıyla polifenollerin ortamdaki uzaklaştırılması serbest enzim miktarını dolayısıyla enzim aktivitesini artırmıştır. Bunun için %1.00 PVP miktarının yeterli olduğu, bu derişimin üzerindeki yüzdeler daha fazla aktivite artışı sağlamadığı için %1.00 oranındaki PVP’nin yeterli miktarda polifenolü uzaklaştırdığı söylenebilir. Öte yandan, burada yapılan enzim aktivite ölçümleri ekstraksiyonu takiben yapılmıştır. Zamanla oluşabilecek polifenol etkisini de (kinonoid yapıların oluşumu) göz önünde bulundurmak amacıyla ham özütte Folin-Ciocalteu yöntemiyle her bir PVP derişimi için fenoliklerin tayini yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Ekstraksiyonda kullanılan PVP derişiminin enzim aktivitesine etkisi.

Ham özütteki polifenol madde miktarının PVP kullanımıyla değişimi %1.50 – 5.00 aralığında incelenmiş ve polifenol miktarının bu aralıkta azalma gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmalarda PVP miktarı %5.00 oranında kullanılmıştır.

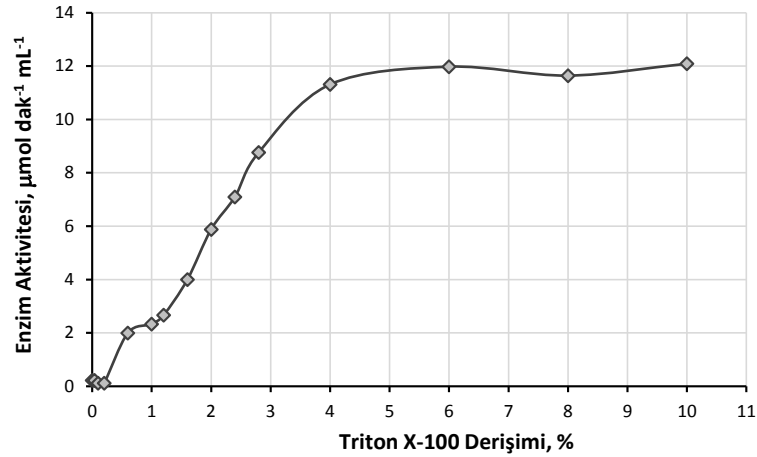


Şekil 4.2. Ham özütte PVP derişimine bağlı toplam polifenol miktarı.

4.1.2. Triton X-100 Derişiminin Etkisi

Triton X-100 araştırmalarda yaygın olarak kullanılan yüzey aktif maddelerdendir. Enzim ekstraksiyonlarında ekstraksiyon çözeltisine verimi artırmak amacıyla genel

olarak %1.0 – 1.5 oranında eklenir [87]. Burada deterjanın ekstraksiyon verimine etkisini incelemek amacıyla %0.0 – 10.0 (h/h) aralığında Triton X-100 içeren ekstraksiyon çözeltileri hazırlanarak herbir yüzdede ham özüt elde edilmiş ve enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Şekil 4.3'den de görüldüğü gibi ekstraksiyon verimi %5.0 derişimde maksimuma ulaşmış bunun üzerindeki derişimlerde verim sabit kalmıştır. Çalışmamızda Triton X-100 yüzey aktif maddesini %5.0 (h/h) oranında kullanmayı tercih ettik ve çalışmanın diğer kısımlarında bu derişimi kullandık. Öte yandan ekonomik açıdan %5.0 derişimin yüksek olduğu söylenebilir ve yöntemin uygunluğu amacıyla ekstraksiyon enzim veriminden ödün verilerek Triton X-100 %2.5 – 3.0 (h/h) oranlarında kullanılabilir. Enzim ekstraksiyon verimini artırmanın yanısıra bu deterjanın enzimin stabilitesini de artırdığını gözlemledik. Triton X-100 eklenmeden yapılan ekstraksiyonlarda ham özüt 4-5 gün içinde hızlı bir şekilde bozulurken, deterjanlı ekstraksiyonlardan alınan ham özütler çok daha dayanıklı olmakta ve 1 ay gibi uzun süreler bozulmadan kalabilmektedir.



Şekil 4.3. Triton X-100 derişiminin enzim aktivitesine etkisi.

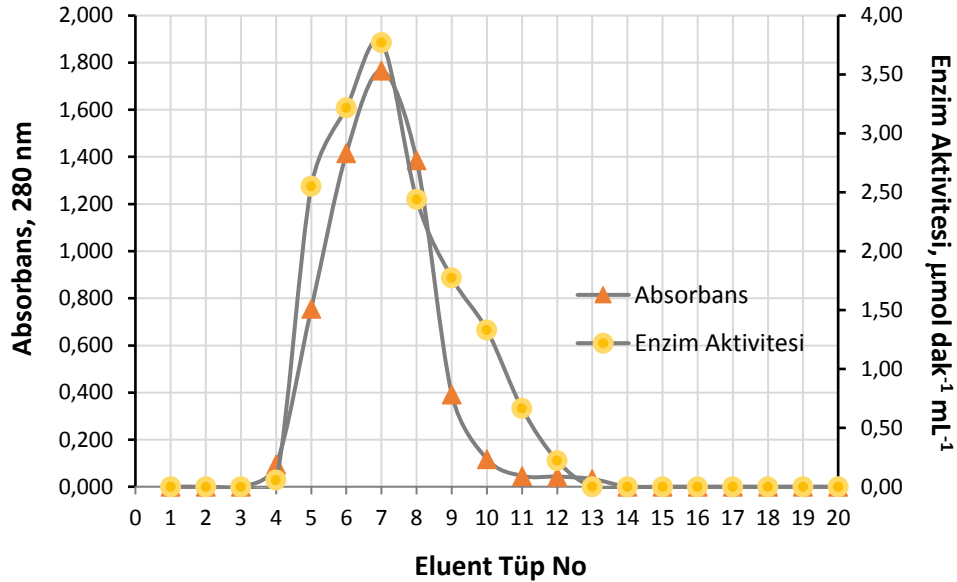
4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Bölüm 3.2.2'de anlatılan şekliyle, %65 oranında amonyum sülfat eklenerek yapılan çöktürme çalışmasından sonra çöken proteinler toplanmış ve diyaliz tüpüne konarak fosfat tamponu ile (0.1 M, pH 7.00) diyalize tabi tutulmuştur. Diyalizden sonra tüpten

alınan enzim çözeltisi yine fosfat tamponuyla 10.0 mL'ye seyreltilmiş ve ayırma kolonuna uygulanmıştır.

4.1.4. Enzimin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Diyalizden elde edilen enzim çözeltisi Bölüm 3.2.4'de tarif edilen şekilde hazırlanan kromatografi kolonuna uygulandı. Kolondan fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.00) geçirilerek 3'er mL'lik eluentler tüplere toplandı. Tüplerdeki eluentlerin 280 nm'de absorbansları ölçülerek protein kalmayınca kadar toplanmaya devam edildi. Kalitatif protein tayininin yanısıra her tüpün 410 nm'de katekol substratıyla enzim aktivitesi ölçüldü. 0.1 mL enzime 2.9 mL substrat çözeltisi eklenerek yapılan ölçümlerde kör olarak renkli olmasından dolayı enzim çözeltisi kullanıldı (0.1 mL enzim + 2.9 mL tampon). Protein tayininde ise kör olarak tampon kullanıldı. Elde edilen protein absorbans değerleri ve enzim aktivite değerlerine karşılık gelen eluent tüp numaralarıyla Şekil 4.4'de görülen grafik çizildi. Kromatografik ayırma sonucunda aktivite gösteren eluentler birleştirilerek saf enzim çözeltisi elde edildi. Saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.



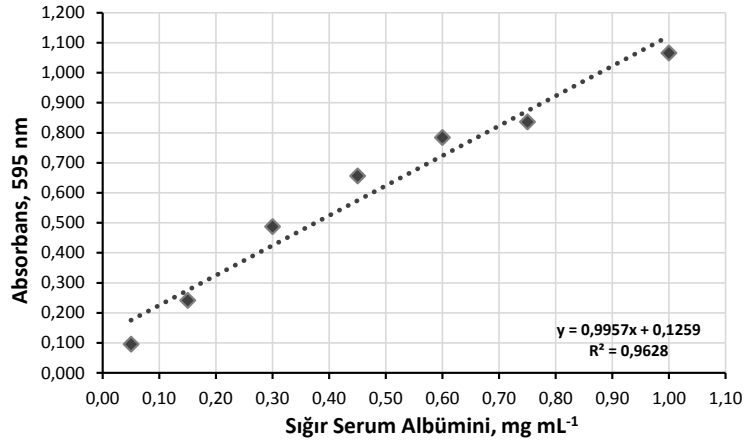
Şekil 4.4. Eluent tüp numarasına karşı değişen protein miktarı ve enzim aktiviteleri.

Çizelge 4.1. Saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Özüt	55	5.595	307.725	1.915	105.325	2.923	—	—
Çöktürme ve Diyaliz	7	17.643	123.501	2.305	23.050	5.358	40.134	1.833
Afinite Kromatografisi	3	21.827	65.481	0.472	1.416	46.244	21.279	15.821

4.1.5. Protein Tayini

Saflaştırma işlemlerinin tüm basamaklarında kantitatif protein tayini yapılmış ve Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem kısa sürede uygulanması, dış faktörlerden etkilenmemesi, oluşan renkli kompleksin dayanıklı olması ve tayin sınırının düşük olması nedeniyle tercih edilmiştir [88]. Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan standartlarla kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4.5) ve ham özüt ve kromatografik saflaştırma sonrası alınan enzim çözeltilerine yine Bradford yöntemi uygulandı, kalibrasyon eğrisi yardımıyla protein içerikleri saptandı (Çizelge 4.2).



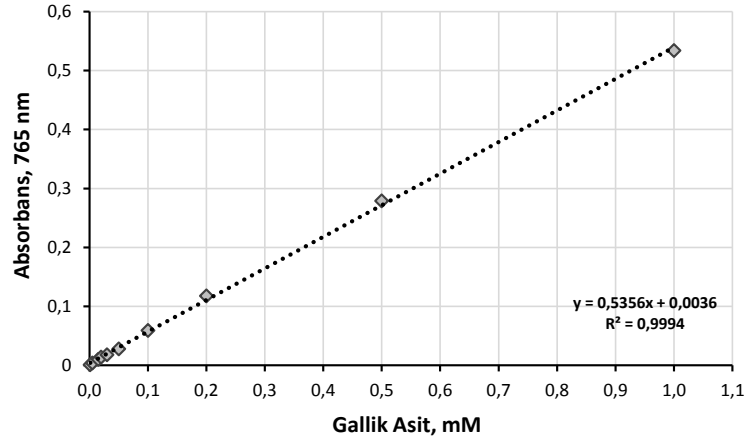
Şekil 4.5. Bradford kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 4.2. Protein derişimleri.

	Protein Derişimi, mg mL⁻¹
Ham Özü	0.348
Çöktürme ve	
Diyalizden sonra	1.411
Saf Eluent	0.472

4.1.6. Polifenollerin Tayini

Polifenolik maddeler tirozinaz enzimi aktivitesiyle kinonlara, kinonlar da polimerleşerek kırmızı-kahverengi pigmentlere dönüşür. Bu pigmentlerin oluşumunu engellemek ve kinonların enzim üzerinde yaptığı inhibisyon etkisinden kurtulmak için polifenolik maddelerin enzim çözeltisinden uzaklaştırılması istenir. Bu amaçla ekstraksiyon çözeltisinde PVP kullanılır. Kalan fenoliklerin bir kısmı diyalizle uzaklaştırılır. Son basamakta, bu istenmeyen maddeler kromatografik uygulamada ayrılır ve enzim arındırılır. Enzimin saflaştırma aşamalarında ne kadar fenolik madde kaldığını saptamak amacıyla Folin-Ciocalteau yöntemi kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş (Şekil 4.6) ve enzim çözeltilerinde toplam fenolik tayini yapılmıştır. Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi polifenollerin ekstraksiyonda kullanılan PVP ile bağlanması ve filtre edilmesi sonucunda ham özütte kalan fenolik derişimi 0.236 mM gallik asit eşdeğeridir. Diyalizden sonra büyük bölümü uzaklaştırılmış, kalan 0.079 mM’lık kısım da ayırma kolonunda tutulmuş ve saf eluent polifenolik maddelerden arınmış olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.6. Folin-Ciocalteu yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği.

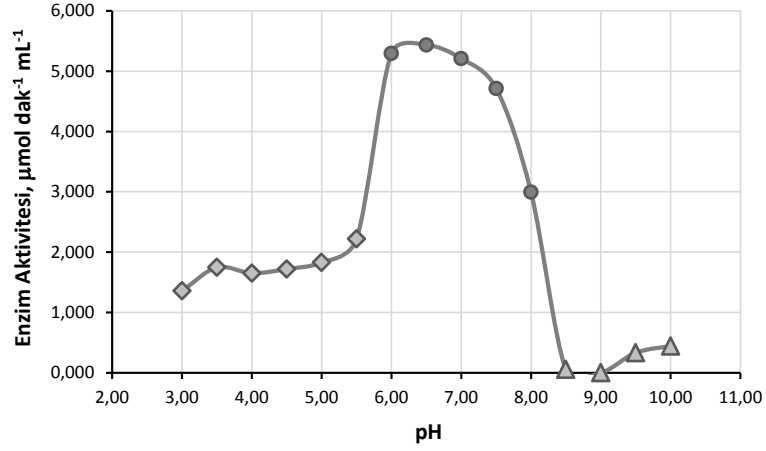
Çizelge 4.3. Enzim çözeltilerinde polifenol derişimleri.

	Polifenol Derişimi, mM (gallik asit eşdeğeri)
Ham Özüt	0.236
Diyaliz Sonrası	0.079
Saf Eluent	0.000

4.2. OPTİMUM pH VE SICAKLIK DEĞERLERİ

4.2.1. Ölçüm pH'ı Etkisi

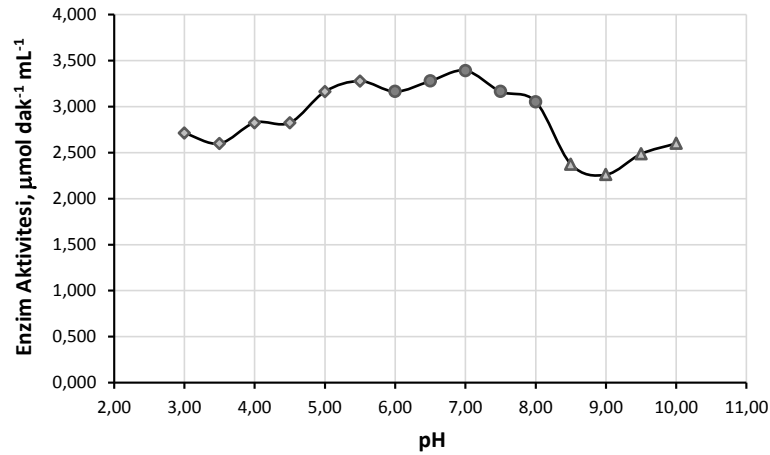
Enzim aktivite ölçümlerinde substratların hazırlandığı tamponların pH'ı enzim kaynağına göre değişebilmektedir. Tamponun pH'ı enzimin yapısını, üzerindeki yükleri değiştirebilmektedir. Literatürde PPO enzimi aktivite ölçümlerinde yaygın olarak fosfat tamponu kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada sodyum fosfat tamponu tercih edildi. Yapılan pH taramasında enzimin pH 3.00–5.50 arasında düşük aktivite gösterdiği, 8.50–10.00 arasında ise aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi enzim pH 6.00–7.50 arasında yüksek aktivite göstermiş ve bu aralıkta gözlenen aktiviteler birbirine yakın olduğu için tampon pH'ının bu aralıkta herhangi bir değere ayarlanarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada pH 7.00 tercih edilmiştir.



Şekil 4.7. Ölçüm pH'nın enzim aktivitesine etkisi.

4.2.2. Ekstraksiyon pH'ı Etkisi

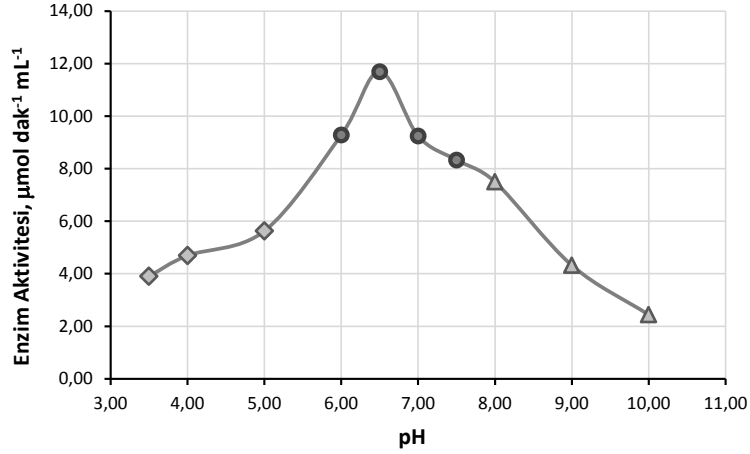
Ekstraksiyonda kullanılan tampon pH'nın ekstraksiyon verimini nasıl etkilediğini saptamak amacıyla pH 3.00–10.00 arasında hazırlanan ekstraksiyon çözeltileriyle ayrı ayrı herbir pH'da ekstraksiyon yapılmış, elde edilen herbir ham özütle enzim aktivite ölçümü yapılarak Şekil 4.8'de görülen grafik elde edilmiştir. pH 3.00–4.50 arasında ve pH 8.50'un üzerinde aktivite düşmüş, pH 5.00–8.00 arasında ise birbirine yakın değerler gözlenmiştir. Bu sonuca göre ekstraksiyon çözeltisi pH'ı 5.00–8.00 arasında olabilir ve çalışmada ekstraksiyonlar pH 7.00'de yapılmıştır.



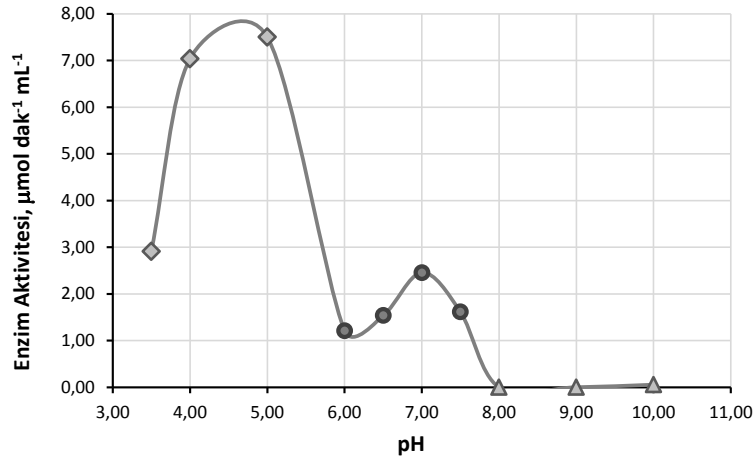
Şekil 4.8. Ekstraksiyon pH'nın enzim aktivitesine etkisi.

4.2.3. pH Kararlılık Deneyi

Lactarius salmonicolor PPO enziminin kararlılığını incelemek üzere Bölüm 3.2.11’de anlatıldığı gibi pH 3.50–10.00 arası hazırlanan tamponlarda +4 °C’da bekletilen enzimin pH davranışı Şekil 4.9’da verilmiştir. 2 saat bekletildikten sonra enzimin katekol substratı ile gösterdiği optimum pH 6.5 olarak belirlenmiştir fakat değerlerin birbirine yakın olması nedeniyle enzimin kararlılık gösterdiği pH’ın 6.00–7.00 aralığı olduğu söylenebilir. Öte yandan enzimin 5 gün bekletilmesi ile elde edilen sonuç, enzimin pH 4.00 ve 5.00’de kararlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.10) ve enzim 5 günü aşan sürelerde bekletilmesi durumunda pH 4.00–5.00 tamponunda saklanabilir.



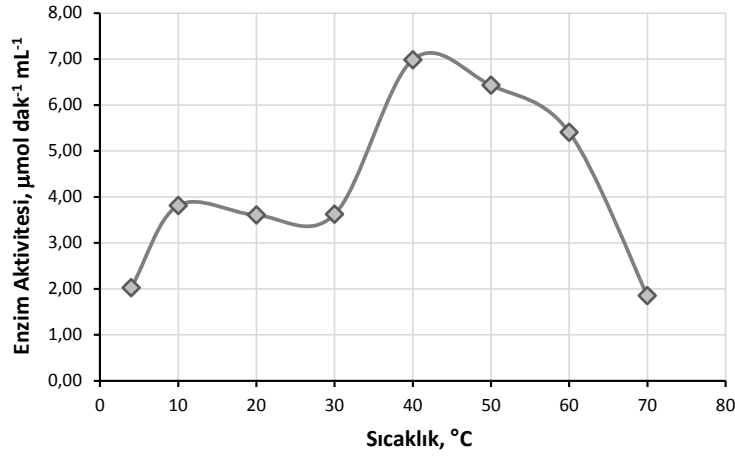
Şekil 4.9. İki saat beklemenin pH kararlığına etkisi.



Şekil 4.10. Beş günlük beklemenin pH kararlığına etkisi.

4.2.5. Ölçüm Sıcaklığı

Su banyosunda ayarlanan sıcaklıkta 3 dakika bekletilen enzim ve katekol çözeltisi UV-Vis küvetinde karıştırılarak tepkime hızı ölçülmüş ve aktivite hesaplanmıştır. Şekil 4.11’de enzim aktivitesine karşılık sıcaklık grafiğinden görüldüğü üzere +4 °C’ta elde edilen düşük aktivite 10–30 °C aralığında yükselmiş ve bu aralıktaki birbirine yakın değerler göstermiştir. Enzim aktivitesi 40 °C’ta ani bir yükselişle maksimum değere ulaşmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda ise enzim aktivitesini kaybetmeye başlamış ve denaturizasyona uğrayarak 70 °C’ta oldukça düşük bir aktivite değeri göstermiştir.

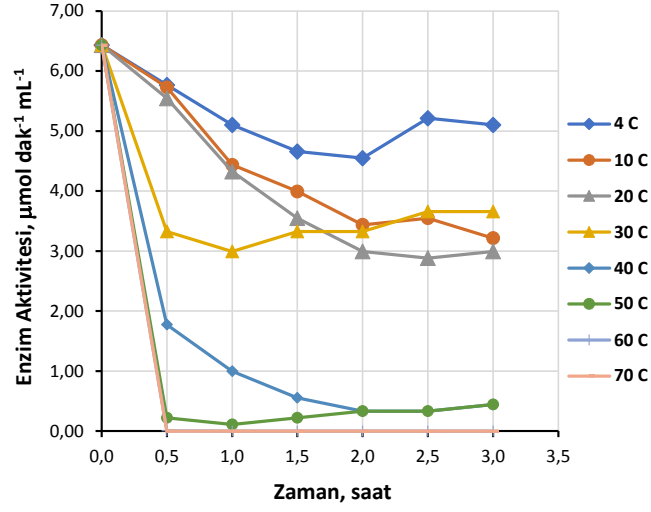


Şekil 4. 11 Ölçüm sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi.

4.2.6. Termal Kararlılık

Lactarius salmonicolor mantarı PPO enziminin termal kararlılığını saptamak için enzim çözeltisi 3 saat istenen sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Her yarım saatte bir katekol substratıyla alınan tepkime hızı ölçümleriyle enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Şekil 4.12’de görüldüğü gibi +4 °C’ta bekletilen enzim en yüksek aktiviteleri göstermiştir. 10, 20, 30 °C’teki aktiviteler daha düşüktür. Bu sıcaklıklarda enzim birbirine yakın aktivite değerleri göstermiştir. Bu üç sıcaklıkta enzim aktivitesi ilk 2 saat boyunca azalmış daha sonra 2 ve 3. saatler arasında sabitlenmiştir. 40 °C ve üzerinde ise ilk 30 dakikalık inkübasyon sonunda aktivite gözlenmemiştir. *Lactarius salmonicolor* mantarı PPO enziminin diğer bitki ve mantar PPO’larına göre sıcaklığa karşı daha

dayanaksızdır ve elde edilen sonuçlara göre saklama koşullarının +4 °C'tan yukarı olmaması gerekir.



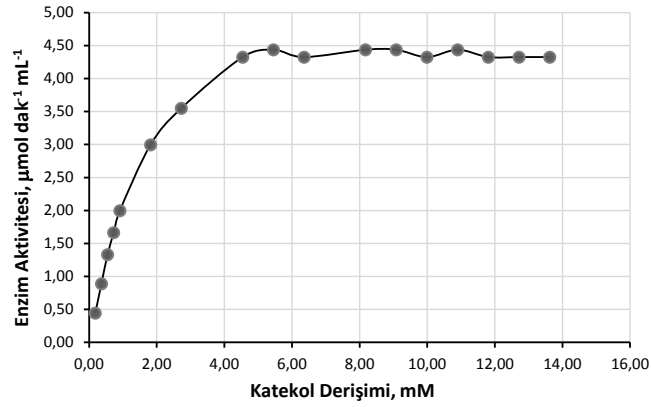
Şekil 4.12. Sıcaklık ve bekletilme süresinin termal kararlılığa etkisi.

4.2.7. Enzimin Depolanma Kararlılığı

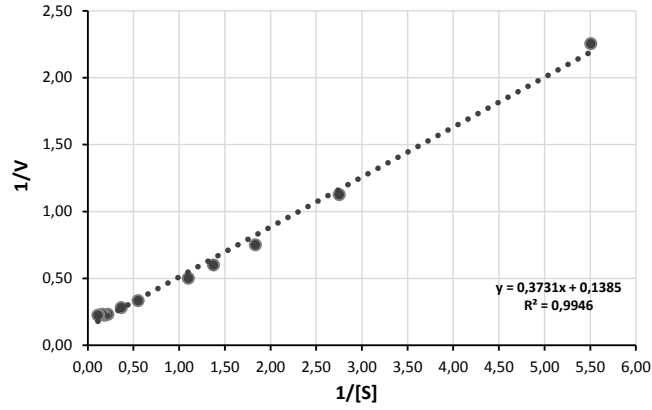
Lactarius salmonicolor PPO enzimi, yapılan raf ömrü ölçümlerine göre +4 °C'ta 1 ay süreyle aktivitesini koruyabilmektedir. Öte yandan -18 °C'ta 1 sene süreyle yapılan ölçümler aktivitesini bu süre zarfında koruduğunu göstermiştir.

4.3. ENZİMİN KİNETİK KARAKTERİZASYONU

Kinetik parametreleri belirlemek amacıyla 0.1–14.0 mM aralığında derişimlere sahip katekol çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 4.13). 0.1 mL enzim çözeltilisine 2.9 mL katekol çözeltilisi eklenerek başlatılan enzim-substrat tepkimesinin herbir katekol derişimi için tepkime hızı ölçülmüş ve enzim aktiviteleri hesaplanmıştır ($\epsilon = 1623 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [74]. Elde edilen Michaelis-Menten grafiğinden x ve y değerlerinin resiprokalleri alınarak, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği (Lineweaver-Burk grafiği) çizilmiş ve bu grafikten Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak V_{\max} ve K_m değerleri $7.220 \text{ } \mu\text{mol dak}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ve 2.694 mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4. 13 Michaelis-Menten grafiği.



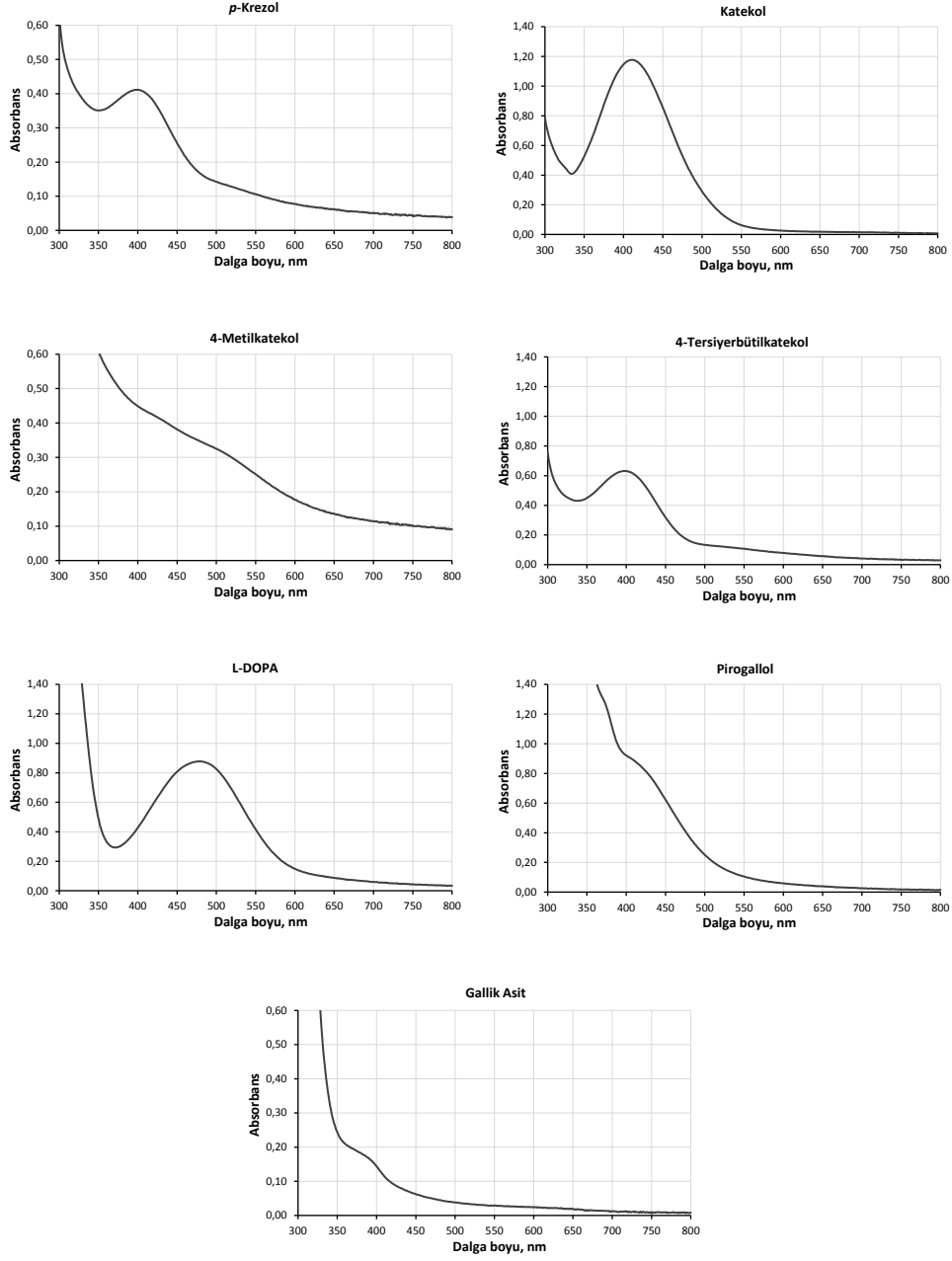
Şekil 4.14. Lineweaver-Burk grafiği.

4.4. FARKLI SUBSTRATLARIN ARAŞTIRILMASI

4.4.1. Substrat Spesifikliği

Lactarius salmonicolor mantarı PPO enziminin çeşitli substratlara karşı gösterdiği aktiviteyi saptamak amacıyla farklı substratlar kullanılarak enzim aktivite ölçümleri alınmıştır. Bu amaçla denemesi yapılan substratlar tirozin, *p*-krezol (monofenolikler), katekol, 4-metilkatekol, 4-terşiyerbütilkatekol, L-DOPA (difenolikler), pirogallol, gallik asittir (trifenolikler). Enzim aktivite ölçümü, oluşan kinonoik ürünün oluşum hızına göre belirlenir ve ölçümlerde her substratın kinon yapısındaki ürünü farklı olduğundan bu ürünlerin maksimum absorbans dalga boyları da farklıdır. Bu nedenle

herbir substrat için ürünün maksimum absorbands yaptığı dalga boyu araştırılmıştır (Şekil 4.15).



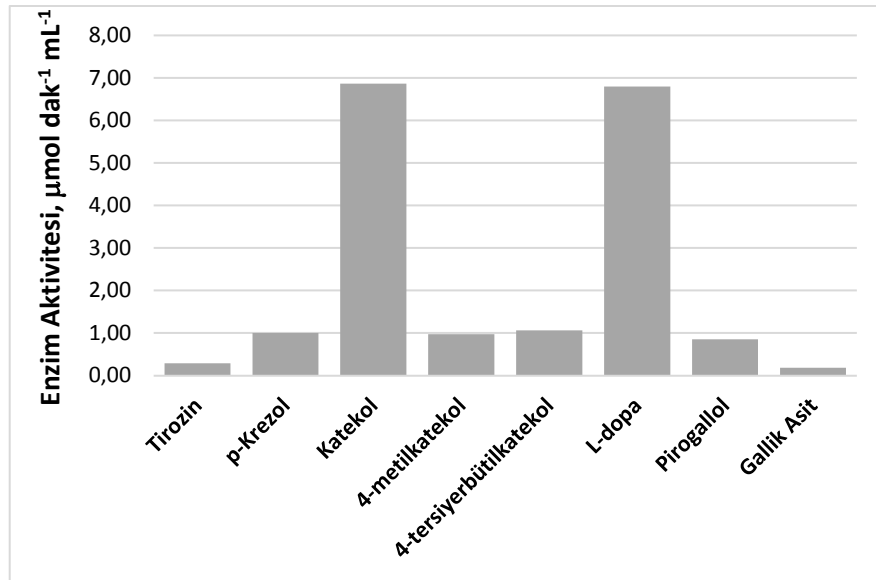
Şekil 4.15. PPO substratlarının absorbands spektrumları.

Enzim ve substrat karıştırılarak 10 dakika ürünün oluşması için beklenmiş ardından 300–800 nm arasında spektrum alınarak en yüksek absorbands gösterdiği dalga boyu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Kullanılan substratların özellikleri.

Substrat		λ (nm)	Derişim (mM)
Tirozin	Monofenol	475	5.0
<i>p</i> -Krezol	Monofenol	400	3.3
Katekol	Difenol	410	10.0
4-metilkatekol	Difenol	400	10.0
4-terşiyerbütilkatekol	Difenol	400	2.5
L-dopa	Difenol	475	10.0
Pirogallol	Trifenol	400	50.0
Gallik Asit	Trifenol	375	50.0

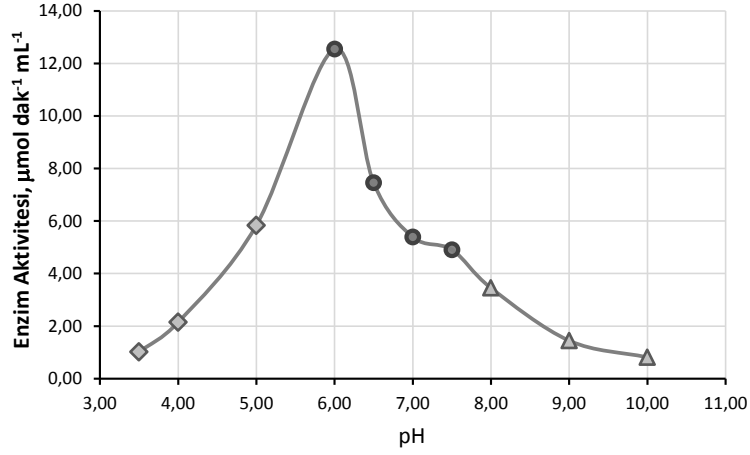
Substratlarla yapılan aktivite ölçümleri saptanan dalga boylarında yapılmıştır. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi enzimin monofenolik ve trifenoliklere karşı aktivitesinin zayıf olduğu buna karşın difenoliklerden katekol ve L-DOPA'ya karşı oldukça yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuca dayanarak çalışmada katekol substratı kullanılmış, L-DOPA'nın ise pH ve sıcaklık optimizasyonları ve kinetik karakterizasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.16. Substratların enzim aktiviteleri.

4.4.2. L-DOPA ile Ölçüm pH'ı Optimizasyonu

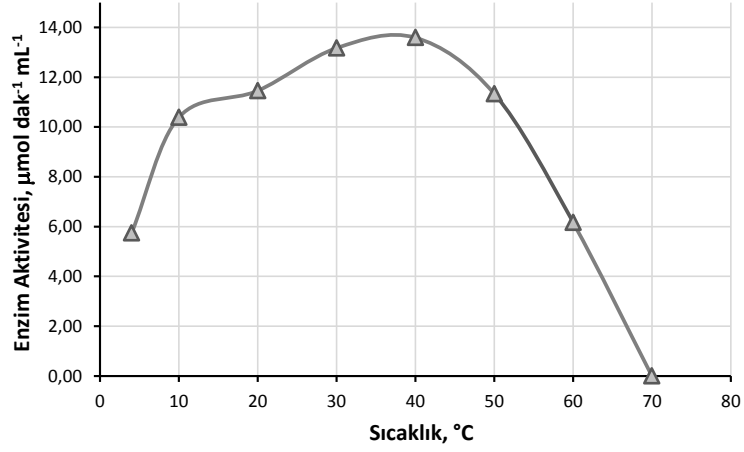
pH 3.50–10.00 arasında tampon çözeltileri hazırlanmış, bunlardan hazırlanan L-DOPA çözeltileriyle aktivite ölçümleri yapılmıştır. Optimum ölçüm pH'ı Şekil 4.17'den de görüldüğü gibi pH 6.00 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. L-DOPA ile ölçüm pH'ının enzim aktivitesine etkisi.

4.4.3. L-DOPA ile Sıcaklık Optimizasyonu

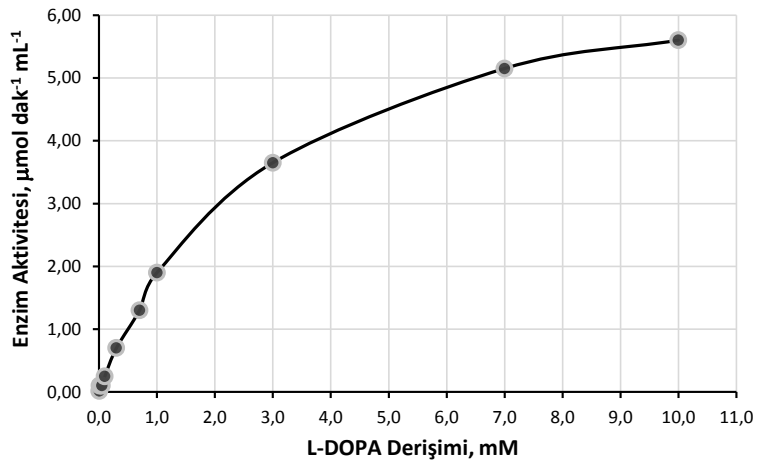
Sıcaklık taraması 4–70 °C arasında yapılmış, Şekil 4.18'de görüldüğü gibi 20–40 °C arası yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bu aralıkta birbirine yakın aktivite değerleri alınmıştır. 40 °C'den sonra ise enzim denaturizasyona uğrayarak 70 °C'de aktivitesini tamamen kaybetmiştir.



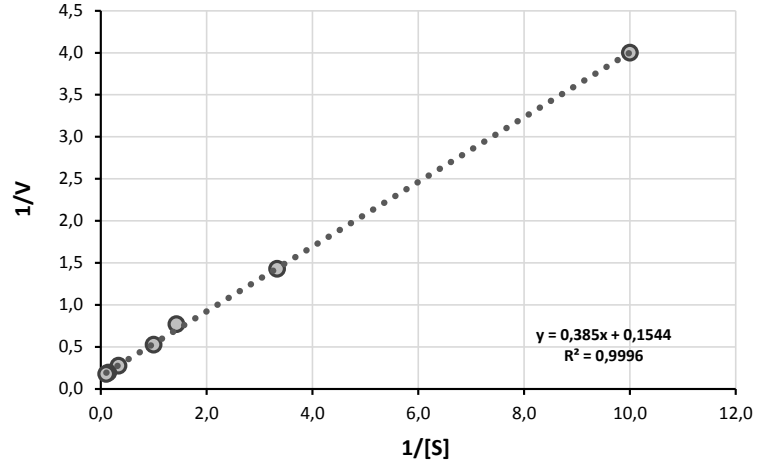
Şekil 4.18. L-DOPA ile sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.

4.4.4. L-DOPA Kinetik Karakterizasyonu

Enzimin L-DOPA ile verdiği kinetik parametreleri saptamak amacıyla pH 6.00 fosfat tamponuyla 0.005–10.00 mM arasında değişen derişimlerde L-DOPA çözeltileri hazırlanmış ve Şekil 4.19'da görüldüğü gibi 475 nm'de yapılan tepkime hızı ölçümleriyle enzim aktiviteleri hesaplanmıştır ($\epsilon_{L-DOPA} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [89]. Şekil 4.20'de ise derişime karşı enzim aktivite grafiğinden Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. V_{\max} ve K_m değerleri sırasıyla $6.477 \text{ µmol dak}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ve 2.494 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. L-DOPA ile Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.20. L-DOPA ile Lineweaver-Burk grafiği.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Bu çalışmada oksidoredüktaz sınıfından bir enzim olan polifenol oksidaz *Lactarius salmonicolor* mantarından izole edilerek biyokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla enzim, *Lactarius salmonicolor* mantarından %5 PVP, %5 Triton X-100 yüzey aktif maddesi ve 1.0 mM PMSF içeren fosfat tamponuyla ekstrakte edilip amonyum sülfatla çöktürülmüş ve diyalizlenmiştir. Afinite kromatografisi uygulanarak saf enzim çözeltisi elde edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi ham enzim özütünde 2.923 olarak bulunmuş, afinite kromatografisinden sonra elde edilen saf enzim eluentinde ise 46.244 olarak elde edilmiştir. Buna göre *Lactarius salmonicolor* PPO enzimi 15.821 kat saflaştırılmıştır.

Enzimin substratları ile yapılan çalışmada monofenolik, difenolik ve trifenolikler denenmiş, monofenolikler olan tirozin ve *p*-krezol, trifenolikler, pirogallol ve gallik asit *Lactarius salmonicolor* PPO'ı tarafından yükseltgenememiş, öte yandan difenoliklerden katekol ve L-DOPA'ya karşı yüksek aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar *Lactarius salmonicolor* PPO'nun difenolaz aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Optimum substrat olarak katekol belirlenmiştir. Katekolla çizilen kalibrasyon eğrisinden LOD 0.168 mM, L-DOPA ile 0.0121 mM olarak elde edilmiş, L-DOPA ile hassasiyetin daha yüksek, tayin sınırının daha düşük olduğu görülmüştür.

Katekol ve L-DOPA ile yapılan ölçüm pH'ı ve sıcaklık optimizasyonunda optimum değerler pH 6.00 ve 40 °C olarak belirlenmiştir. *Lactarius salmonicolor* PPO enzimi pH kararlılığını araştırmak üzere farklı pH'larda, +4 °C'ta 2 saat ve 5 gün inkübasyona maruz bırakılmıştır. 2 saatlik bekleme süresi sonunda enzimin optimum pH'ının değişmediği, 5 günlük inkübasyondan sonra ise optimum pH'ın 6.00-7.00 aralığından 4.00-5.00 aralığına kaydığı dolayısıyla enzimin pH'a karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. *Lactarius salmonicolor* PPO'sunun termal kararlılığını incelemek

amacıyla enzim 4-70 °C aralığındaki sıcaklıklarda 3 saat inkübe edilmiş ve her yarım saatte bir ölçüm alınarak kalan aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre enzimin kararlı olduğu sıcaklıkların 10, 20, 30, 40 °C olarak saptanmış, bu sıcaklıklarda 30 dakikadan itibaren enzim aktivitesi değişmemiştir. 50, 60, 70 °C'larda ise 30 dakikadan sonra enzim aktivitesi kalmamıştır. *Lactarius salmonicolor* PPO enziminin 10-40 °C aralığında 3 saatlik inkübasyonu sonucunda termal kararlılığının yüksek olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise enzim denatüre olmakta ve aktivitesini kaybetmektedir.

Değişen substrat derişimleri kullanılarak, enzim aktivitesine karşılık substrat grafiği elde edilmiş ve *Lactarius salmonicolor* PPO'sunun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu görülmüştür. Çizilen grafikten enzimin 5 mM katekol derişiminde doyunluğa ulaştığı ve daha yüksek substrat derişimlerinde artık enzim aktivitesinin değişmediği saptanmıştır. Bu değer L-DOPA için 10 mM olarak bulunmuştur. Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen K_m ve V_{max} katekolle yapılan çalışmadan 2.694 mM ve 7.220 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak, L-DOPA ile yapılan çalışmadan ise 2.494 mM ve 6.477 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak elde edilmiştir.

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre üstün olması bu enzimlerin kullanımının artmasına, bu yüzden de enzimin farklı kaynaklardan izolasyonuna yönelik çalışmaların giderek gelişmesine sebep olmuştur. PPO bazı klinik kimyasalların sentezinde ve kozmetik sanayiinde kullanılabilirliği yanında çevre sularında kirlilik yaratan fenoliklerin kantitatif tespit ve tayinine kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu nedenle bu enzimin saflaştırma çalışmaları ve

karakterizasyonu, enzimin endüstride kullanılabilirliği üzerine yapılan araştırmalar açısından önemlidir.

PPO'nun sebep olduğu esmerleşme tepkimelerinin bitki, meyve veya mantardaki fenolik içeriğe ve PPO aktivitesine göre değiştiği bilinmektedir. Enzimatik esmerleşme tepkimelerinin dolayısıyla PPO aktivitesinin kontrol edilebilmesi enzim aktivitesine etki eden parametrelerin iyi bilinmesiyle mümkündür. Bu nedenle bitki, meyva ve mantarlardan izole edilen enzimin karakterizasyon çalışmaları önemli ve gereklidir. Bu amaçla, bu çalışmada *Lactarius salmonicolor* PPO'su incelenmiş ve karakterize edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Erzenin, M., “Farklı kaynaklardan afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir (2002).
- [2] Coseteng, M. Y. and Lee, C. Y., “Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning”, **Journal of Food Science**, 52 (4): 985-989 (1987).
- [3] Ponting, J. D., “The control of enzymatic browning of fruits, food enzymes”, Schultz, H. W., ed., **Avi Publ. Co. Inc**, Westport (1960).
- [4] Golan-Goldhirsh, A. and Whitaker, J. R., “Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 32: 1003-1009 (1984).
- [5] Pekyardımcı, Ş. and Balaban, M. O., “High pressure CO₂ treatment on polyphenol oxidase activity”, **Turkish Journal of Chemistry**, 16 (2): 153-163 (1992).
- [6] Marusek, C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H. and Inlow J. K., “Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species”, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 100 (1): 108-123 (2006).
- [7] Chang, S. T. and Wasser, S. P., “The cultivation and environmental impact of mushrooms”, **Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science** (2017).
- [8] Bano, Z., Rajarathnam, S. and Steinkraus, K. H., “Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food”, **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, 27 (2): 87-158 (1988).
- [9] Khan, M. A. and Tania, M., “Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview”, **Food Reviews International**, 28 (3): 313-329 (2012).
- [10] Vitak, T., Yurkiv, B., Wasser, S., Nevo, E. and Sybirna, N., “Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus”, **World Journal of Diabetes**, 8 (5): 187-201 (2017).
- [11] Boztok, K., “Mantar Üretim Tekniği”, **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, İzmir (1990).

- [12] Başbüyük, H. H., Bardakçı, F., Belshaw, R. and Quicke, D. L. J., “Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice”, **Önder Matbaa**, Sivas (2000).
- [13] Kaşık, G., “Mantar Bilimi”, **Marifet Matbaa ve Kağıtçılık**, Konya (2010).
- [14] Sümer, S., “Genel Mikoloji”, **Nobel Basımevi**, Ankara (2006).
- [15] Whitaker, J. R., “Polyphenol oxidase in: Principles of enzymology for the food sciences”, Fenneme, O. R., Ed., **Marcel Dekker Inc.**, New York, 571-582 (1972).
- [16] Solak, M. H., Işıloğlu M., Gücin F. and Gökler, I., “Macrofungi of Izmir province”, **Turkish Journal of Botany**, 23: 383-390 (1999).
- [17] Gezer, K., “Contributions to the macrofungi flora of Antalya province”, **Turkish Journal of Botany**, 24: 293-298 (2000).
- [18] Pekyardımcı, S., “Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları”, **Gıda**, 17 (3): 181-186 (1992).
- [19] Campbell, M. K., “Biochemistry”, **Saunders College Publishing**, Chicago (1991).
- [20] Lineweaver, H. and Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constant”, **Journal of the American Chemical Society**, 56: 658-662 (1934).
- [21] Gomez, L., Ramirez, H. L., Cabreea, G., Simpson, B. K. and Villalonga, R., “Immobilization of invertase-chitosan conjugate on hyaluronic-acid-modified chitin”, **Journal of Food Biochemistry**, 32: 264-277 (2008).
- [22] Kartal, M., Kayahan, S. K., Bozkurt, A. and Toppare, L., “Entrapment of invertase in an interpenetrated polymer network of alginic acid and poly(1-vinylimidazole)”, **Talanta**, 77: 659-662 (2008).
- [23] He, Q. and Luo, Y., “Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce”, **Stewart Postharvest Review**, 6 (3): 1-7 (2007).
- [24] Mayer, A. M. and Harel, E., “Polyphenol oxidases in plants”, **Phytochemistry**, 18 (2): 193-215 (1979).
- [25] Friedman, M., “Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 1523-1540 (1997).
- [26] Sekme, S., “Çeşitli Mantarlarda Polifenol Oksidaz İndüksiyonunun İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul (2011).

- [27] Gedikli, S., “Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği”, Yüksek Lisans Tezi, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir (2008).
- [28] Harel, E., Mayer, A. M. and Shain, Y., “Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition”, *Plant Physiology*, 17: 921-930 (1964).
- [29] Padron, M. P., Lorano, J. A. and Gonsales, A. G., “Properties of *o*-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendish*”, *Phytochemistry*, 14: 1959 (1975).
- [30] Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties”, *Food Chemistry*, 88: 479-484 (2004).
- [31] Arslan, O., Temur, A. and Tozlu, I., “Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1239–1241 (1998).
- [32] Vamos-Vigyazo, L., “Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14: 44-129 (1981).
- [33] Matheis, G. and Belitz, H. D., “Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) mono phenol, dihydroksiphenylalanine: oxygen-oxidoreductase”, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 163: 191 (1977).
- [34] Şakiroğlu, H., “Kuşburnu meyvesinden izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum (1994).
- [35] Sato, M., “The conversion by phenolase of *p*-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid”, *Phytochemistry*, 8: 353 (1962).
- [36] Dogan, S., “*Origanum* L. (Lamiaceae) taksonlarının (*Origanum onites* L. ve *Origanum vulgare* L.spp. *hirtum* Ietswaar) çevre faktörleriyle olan ilişkilerinin ve PFO aktivitesinin belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir (2002).
- [37] Yavru, İ., “Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvelerinde gelişme ve olgunlaşmaya bağlı olarak bazı organik madde miktarları ile polifenol oksidaz aktivitesindeki değişimlerin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon (1997).

- [38] Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D. W. and Steffens, J. C., "Suppression of polyphenol oxidase increases stress tolerance in tomato", *Plant Science*, 167: 693-703 (2004).
- [39] Weber, D. J. and Stahmann, M. A., "Ceratomyces infection in sweet potato: its effect on proteins, isozymes and acquired immunity", *Science*, 146: 929 (1964).
- [40] Molchanova, Z. Y., "The role of oxidases in the resistance of grapevines to unfavorable conditions of wintering", *Vinodel. Vinograd.*, 26 (1): 21 (1966).
- [41] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), "Nomenclature of electron-transfer proteins", *European Journal of Biochemistry*, 200: 599-611 (1989).
- [42] Kertesz, D. and Zito, R., "Phenolase. In: Oxygenases", Hayaichi, O. ed., *Academic Press*, New York, (1962).
- [43] Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. and Garcia-Carmona, F., "Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-Serine, Spectrophotometric determination of intermediates", *Biochimica et Biophysica Acta*, 917: 190-197 (1994).
- [44] Wilcox, D. E., Porras, A. G., Hwang, Y. T., Lerch, K., Winkler, M. E. and Solomon, E. I., "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase", *Journal of the American Chemical Society*, 107: 4015-4027 (1985).
- [45] Solomon, E. I., and Lowery, M. D., "Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry", *Science*, 259: 1575-1581 (1996).
- [46] Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P. A., Varon R. and Garcia-Canovas, F., "Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear oxidases", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2968-2975 (1998).
- [47] Yoruk, R. and Marshall, R. M., "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review", *Journal of Food Biochemistry*, 27: 361-422 (2003).
- [48] Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Garcia-Canovas, F., "A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase", *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246 (1995).
- [49] Swain, T., "Economic importance of flavonoid compounds In: The Chemistry of Flavonoid Compounds", *Pergamon Press*, 513 (1962).
- [50] Ganguly, K. ve Seshado, T. R., "Isolation of the more commonly occurring leucoanthocyanidins of plants", *Journal of Scientific and Industrial Research*, 17: 168-173 (1958).

- [51] McEvily, A. J., Iyengar, R. and Otwell, W. S., "Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3): 253-273 (1992).
- [52] Khan, M. T. H., "Heterocyclic Compounds Against the Enzyme Tyrosinase Essential for Melanin Production: Biochemical Features of Inhibition" **BIOACTIVE HETEROCYCLES III Book Series: Topics in Heterocyclic Chemistry**, Vol. 9: 119-138 (2007).
- [53] Nurul Aqilah Mohd, Z., Azizah, O. and Azizah Abdul, H., "Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]", *Food Chemistry*, 136 (2): 407-414 (2013).
- [54] Zhiqing, G., Dajing, L. and Chunquan, L., "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel", *Lwt-Food Science and Technology*, 60 (2): 1095-1099 (2015).
- [55] Güray, M. Z. and Şanlı-Mohamed, G., "A new thermophilic polyphenol oxidase from *Bacillus* sp.: partial purification and biochemical characterization", *Journal of Proteins and Proteomics*, 4 (1): 11-20 (2013).
- [56] Batista, K. A., Batista, G. L. A., Alves, G. L. and Fernandes, K. F., "Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 102: 211-217 (2014).
- [57] Sojo, M. M., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. and Sanchez-Ferrer, A., "Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12): 4924-4930 (1998).
- [58] Cheema, S. and Sommerhalter, M., "Characterization of polyphenol oxidase activity in *Ataulfo* mango", *Food Chemistry*, 171: 382-387 (2015).
- [59] Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J. and Garcia-Carmona, F., "Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (4): 984-988 (1996).
- [60] Mayer, A. M., and Harel, E., "Polyphenol oxidases in plants", *Phytochemistry*, 18: 193-215 (1979).
- [61] Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. and Eskin, N. A., "Oxidative enzymes in foods", 3rd ed., *Elsevier Applied Science*, London and New York, 217-273 (1991).
- [62] Eskin, N. A., "Biochemistry of foods", 4th ed., *Academic Press*, New York, 90-92 (1990).

- [63] Husain, Q. and Jan U., “Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenoloxidases”, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 59: 286-293 (2000).
- [64] Samsunlu, A., “Çevre Mühendisliği Kimyası”, *SAM – Çevre Teknolojileri Merkezi Yayınları*, İstanbul, 12: 86-88 (1999).
- [65] Stryer, L., “İleri Teknoloji Malzemeleri”, 3rd ed., *W.H. Freeman and Company*, New York, 44-46 (1998).
- [66] Beşel, E., “Triton X-114 sulu iki-faz yönteminin mantardan elde edilen polifenoloksidazın eldesi için kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 26, (2003).
- [67] Fan, Y. and Flurkey, W. H., “Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms”, *Phytochemistry*, 65: 671-678 (2004).
- [68] Yang, Z., Deng, J. and Chen, L., “Effect of ionic and non-ionic surfactants on the activity and stability of mushroom tyrosinase”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47: 79-85 (2007).
- [69] Nunez-Delicado, E., Bru, R., Sanchez-Ferrer, A. and Garcia-Carmona, F., “Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase”, *Journal of Chromatography B*, 680: 105-112 (1996).
- [70] Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. and Saglam, N., “Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*)”, *Food Chemistry*, 101: 778-785 (2007).
- [71] Özel, A., Colak, A., Arslan, O. and Yildirim, M., “Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents”, *Food Chemistry*, 119: 1044-1049 (2010).
- [72] Kolcuoglu, Y., “Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*)”, *Process Biochemistry*, 47:2449-2454 (2012).
- [73] Colak, A., Sahin, E., Yildirim, M. and Sesli, E., “Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon”, *Food Chemistry*, 103: 1426-1433 (2007).
- [74] Zaidi, K. U. and Ali, A. S., “Comparative evaluation of purified and characterized tyrosinases from two edible mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* and their clinical potential”, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 8(2): 161-170 (2015).
- [75] Dedeoglu, N. and Ozensoy Guler, O., “Differential *in vitro* inhibition of polyphenoloxidase from a wild edible mushroom *Lactarius salmonicolor*”,

- Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2): 464-470 (2009).
- [76] Öz, F., Colak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N. and Sesli, E., “Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents”, *Journal of Food Biochemistry*, 37(1): 36-44 (2011).
- [77] Gouzi, H. and Benmansour, A., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) imbach”, *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5: A76 (2007).
- [78] Zaidi, K. U., Ali, A. S. and Ali, S. A., “Purification and characterization of high potential tyrosinase from macrofungi and its appliance in food engineering”, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Doi: 10.15414/jmbfs.2015.5.3.203-206.
- [79] Matsumoto-Akanuma, A., Akanuma, S., Motoi, M., Yamagishi, A. and Ohno, N., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from Culinary-Medicinal Royal Sun mushroom (the Himematsutake), *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideae)”, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(1): 73-82 (2011).
- [80] Saki, N., Akin, M., Alici, H. E. and Arabaci, G., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase form the wild edible mushroom *Lepiota procera* using three-phase partitioning”, *International Journal of Food Engineering*, 20170208 (2018).
- [81] Wu, J., Gao, J., Chen, H., Liu, X., Cheng, W., Ma, X. and Tong, P., “Purification and characterization of polyphenol oxidase form *Agaricus bisporus*” *International Journal of Food Properties*, 16: 1483-1493 (2013).
- [82] Ergün, A., “Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir (2016).
- [83] Slinkard, K. and Singleton, V. L., “Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55 (1977).
- [84] Huang, D. J., Ou, B. X. and Prior, R. L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856 (2005).
- [85] Öz, F., “*Lactarius piperatus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon (2010).

- [86] Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- [87] Nematpur, F. S., Haghbeen, K., Babaei, M. K., Jazii, F. R., Nouraeen, O. and Yancheshmeh, M. B., "The banana pulp polyphenol oxidase is a Tyrosinase", *Journal of Biological Sciences*, 8 (3): 526-533 (2008).
- [88] Bradford, M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248, (1976).
- [89] Muñoz, J. L., García-Molina, F., Varón, R., Rodríguez-Lopez, J. N., García-Cánovas, F., and Tudela, J., "Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity", *Analytical Biochemistry*, 351 (1): 128-138 (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Salam Al-Mamoori, Irak'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kamel Şehit ve Al-Rafeden Ortaokulu'nda, lise öğrenimini Al-kahlis Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında Bağdat Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandı, 2012 yılında mezun oldu. Mezuniyetten bir süre sonra Yüksek Lisans programına başladı, çeşitli firmalarda çalıştı, halen özel bir firmada kimya malzemeleri üzerine görevine devam etmektedir.