



**SIRTIGÖKÇE MANTARINDAN (*Russula
Cyanoxantha*, L.) POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN ELDE EDİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ

**2022
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA BÖLÜMÜ**

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

**SIRTIGÖKÇE MANTARINDAN (*Russula Cyanoxantha*, L.) POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN ELDE EDİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ

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

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

**KARABÜK
Eylül 2022**

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ tarafından hazırlanan “SIRTIGÖKÇE MANTARINDAN (*Russula Cyanoxantha*, L.) POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN ELDE EDİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Elif BÜYÜKBAYRAM

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 30/09/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Hasan ÇABUK (BEUN)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yasemin TÜMER (KBÜ)

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

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

Doç. Dr. Müslüm KUZU

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.”

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**SIRTIGÖKÇE MANTARINDAN (*Russula Cyanoxantha*, L.)
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN ELDE EDİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Elif BÜYÜKBAYRAM

Eylül 2022, 74 sayfa

Russula cyanoxantha mantarı (Sırtıgökçe) yabani ve yenilebilir bir mantardır ve Karabük civarından elde edilmiştir. Bu mantardan polifenol oksidaz enzimi elde edilmiş, enzim kısmen saflaştırılarak biyokimyasal açıdan araştırılmıştır. Enzimin ekstraksiyonu aşamasında yer alan değişkenler optimize edilmiş daha sonra elde edilen ekstraktın proteinleri amonyum sülfatla çöktürülmüştür. Çökelti diyaliz işlemiyle temizlenmiş ve jel kromatografi kolonuna uygulanarak afinite yöntemiyle kısmen saflaştırılmıştır. Enzim çözeltilerinde protein tayini ve enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve verim %11,30, saflaştırma derecesi 9,33 olarak hesaplanmıştır. *Russula cyanoxantha* polifenol oksidaz enziminin substrat ilişkisini incelemek amacıyla dokuz farklı substrat denenmiş, bu substratlarla yapılan aktivite ölçümleri sonucunda maksimum aktivite katekol ve L-Dopa ile gözlenmiştir. Katekol ve L-Dopa eşliğinde yapılan ölçümlerde maksimum aktivitenin gözleendiği pH ve sıcaklık katekol için

sırasıyla 7,0 ve 10 °C şeklinde, L-Dopa için 7,0 ve 30 °C şeklinde bulunmuştur. Katekol substratı ile enzimin ekstraksiyonunda kullanılan optimum pH, pH kararlılığı ve termal kararlılık incelenmiştir. *Russula cyanoxantha* polifenol oksidaz enzimi kinetik açıdan incelenmiş, V_{max} (en yüksek reaksiyon hızı) ve K_m (substrat-enzim ilişkisi) araştırılmış, katekol için bu veriler sırasıyla 1,965 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ ve 1,769 mM şeklinde L-Dopa için 1,369 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ ve 15,193 mM şeklinde bulunmuştur. Enzimin –18 °C’de aktivitesini bir yıl boyunca koruyabildiği bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler : Polifenol oksidaz, enzim ekstraksiyonu, saflaştırma, *Russula cyanoxantha*.

Bilim Kodu : 20107

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

EXTRACTION AND PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME FROM SIRTIGÖKÇE MUSHROOM (*Russula Cyanoxantha*, L.)

Mina Abdulaal Abdulazeez ABDULAZEEZ

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Chemistry**

Thesis Advisor:

Assist. Prof. Dr. Ayşe Elif BÜYÜKBAYRAM

September 2022, 74 pages

Russula cyanoxantha mushroom (Sırtıgökçe) is a wild and edible mushroom and was obtained from Karabük countryside. Polyphenol oxidase enzyme was extracted from this mushroom, partially purified and its biochemical characterization was performed. Enzyme extraction variables were optimized, after that, proteins that exist in the extract were precipitated by ammonium sulfate. Precipitate was cleaned by dialysis then, partially purified with affinity method by application to the gel chromatography column. Enzyme solution protein content was determined, activity studies for enzyme in this solution was performed. Yield and purification degree were found as 11,30% and 9,33 respectively. For the purpose of investigation of substrate relationship of *Russula cyanoxantha* polyphenol oxidase enzyme, nine different substrates were tried, as a result of activity measurements performed with these substrates, highest activities were observed with catechol and L-Dopa. In the measurements performed in the existence of catechol and L-Dopa, optimum measurement pH and optimum

temperature were found as 7.0 and 10 °C for catechol and as 7.0 and 30 °C for L-Dopa. Enzyme's optimum extraction pH, pH and thermal stability were observed with catechol substrate. *Russula cyanoxantha* polyphenol oxidase enzyme's kinetic parameters, V_{\max} (maximum reaction rate) and K_m (substrate affinity) were searched, these values were found as 1,965 $\mu\text{mol min}^{-1}$ and 1,769 mM by catechol and 1,369 $\mu\text{mol min}^{-1}$ and 15,193 mM by L-Dopa. It has been found that the enzyme's activity has not been lost during 12 months at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Key Words : Polyphenol oxidase, enzyme extraction, purification, *Russula cyanoxantha*.

Science Code : 20107

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanabilmesi için değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine her danıştığımda bana vakit kazandıran, büyük bir sabır ve ilgiyle elinden geldiğince yardımcı olmaya çalışan hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Elif BÜYÜKBAYRAM'a teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Diğer tüm bölüm hocalarıma, 2 yıllık yüksek lisans sürem boyunca bana kattıkları ve gelecekte söz söylememi sağlayacak bilgileri sağladıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek öğrenimim esnasında desteği ve yardımıyla yanımda olan Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü arkadaşlarıma ve personeline saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Hayatımın her anında olduğu gibi tezim boyunca da bana verdiği destek, moral ve güç için, beni her zaman başarabileceğime inandırdığı ve sabırla beklediği için sevgili eşim Salam Al-Mamoori'ye teşekkür ederim.

Hayatımda ve özellikle bu çalışmada bana ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyen, benim için tüm fedakarlıkları yapan ve yanımda olan sevgili aileme tüm kalbimle minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. MANTARLAR HAKKINDA GENEL BİLGİ	3
2.1.1. Mantar Türleri.....	4
2.1.2. Mantarlar ve İnsan Sağlığına Etkisi.....	6
2.1.3. <i>Russula Cyanoxantha</i> Mantarının Morfolojik Özellikleri.....	7
2.2. ENZİMLER.....	9
2.2.1. Genel Özellikler.....	10
2.2.2. Enzimlerin Kinetiği	11
2.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	13
2.3. POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ.....	17
2.3.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması	18
2.3.2. PPO Enziminin Kaynakları ve Doğadaki Dağılımı	19
2.3.3. PPO Enziminin Katalizlediği Tepkimeler	19
2.3.4. Polifenol Oksidazın Substratları.....	22
2.3.5. PPO Enziminin İnhibitörleri.....	24

	<u>Sayfa</u>
2.3.6. Enzimatik Kararma	25
2.3.7. PPO Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları.....	27
2.4. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA TEKNİKLERİ	29
2.5. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	31
2.6. ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ	35
BÖLÜM 3	36
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR.....	36
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	36
3.1.2. Homojenizatör	36
3.1.3. Santrifüj Cihazı.....	37
3.1.4. Çalkalamalı Su Banyosu.....	37
3.1.5. UV – VIS Spektrofotometre	37
3.2. KULLANILAN METOTLAR	37
3.2.1. Ham Enzim Ekstraktı Eldesi 1. Yöntem.....	37
3.2.2. Ham Enzim Ekstraktı Eldesi 2. Yöntem.....	38
3.2.3. Proteinlerin Tuzla Çöktürülmesi ve Diyalizle Temizlik.....	39
3.2.4. Sephadex G-100 Afinite Kolonuyla Saflaştırma	41
3.2.5. Spektrofotometre ile Enzim Aktivitesi Tayini.....	43
3.2.6. Protein Tayini	43
3.2.7. Polifenollerin Tayini	44
3.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi ve Kinetik Parametrelerin Tayini	45
3.2.10. Enzim Aktivitesi ve Sıcaklık	46
3.2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi.....	46
BÖLÜM 4	47
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. ENZİM ELDESİ.....	47
4.1.1. Ham Enzim Özütünün Elde Edilmesi.....	47
4.1.2. Ham Enzim Özütüne PVP Derişiminin Etkisi.....	47
4.1.3. Ham Enzim Özütüne Triton X-100 Derişiminin Etkisi.....	48

	<u>Sayfa</u>
4.2. SAFLAŞTIRMA İŞLEMLERİ	49
4.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürerek Ayırma ve Diyaliz	49
4.2.2. Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma	49
4.2.3. Protein Tayini	51
4.2.4. Polifenoliklerin Tayini.....	52
4.3. pH VE SICAKLIK OPTİMİZASYONLARI.....	53
4.3.1. Ölçümlerde Kullanılan pH Optimizasyonu	53
4.3.2. Ekstraksiyonlarda Kullanılan pH Optimizasyonu	54
4.3.3. Enzimin pH Kararlılığı	55
4.3.4. Termal Kararlılık	56
4.3.5. Enzimin Depolanması.....	57
4.4. ENZİMİN KİNETİK KARAKTERİZASYONU.....	57
4.5. FARKLI SUBSTRATLARIN ARAŞTIRILMASI	59
4.5.1. Enzim-Substrat İlişkisi.....	60
4.5.2. L-DOPA-Ölçümlerde Kullanılan pH.....	61
4.5.3. L-DOPA ile Sıcaklık Optimizasyonu	62
4.5.4. L-DOPA ile Kinetik Parametrelerin Tayini.....	62
4.6. İNHİBİTÖR ETKİSİ.....	63
BÖLÜM 5	65
SONUÇ	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Mantarların genel yapısı.	3
Şekil 2.2. <i>Russula Cyanoxantha</i> 'nın Türkiye'deki Yayılışı.....	8
Şekil 2.3. <i>Russula Cyanoxantha</i>	9
Şekil 2.4. Anahtar-Kilit Modeli.	11
Şekil 2.5. Michaelis-Menten Grafiği.....	12
Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği.....	13
Şekil 2.7. En elverişli ısı.	15
Şekil 2.8. pH etkisi.	15
Şekil 2.9. Enzim ve substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına tesiri.	16
Şekil 2.10. Enzimatik tepkime hızı üzerine substrat konsantrasyonunun tesiri.	16
Şekil 2.11. Polifenol oksidazın farklı yönlerden gösterimi (A,B,C,D,E).....	18
Şekil 2.12. Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz Aktivite).	20
Şekil 2.13. <i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu (Difenolaz Aktivite).....	20
Şekil 2.14. Polifenol oksidazın kataliz mekanizması	21
Şekil 2.15. Polifenol oksidazın bakır merkezleri.	21
Şekil 2.16. Polifenol oksidazın bazı doğal substratları.	22
Şekil 2.17. Flavonoidlerin genel yapısı ve bazı flavonoller a) kuersetin, b) mirisetin...	23
Şekil 2.18. a) Kateşin, b) Epikateşin.	23
Şekil 3.1. Diyalizin uygulaması: a) Diyaliz düzeneği, b) Diyaliz	41
Şekil 3.2. Değişik ağırlıktaki maddelerin jel filtrasyon kolonu ile ayrıştırılması.	42

Sayfa

Şekil 4.1. Triton X-100 konsantrasyonu ve enzim aktivitesi	49
Şekil 4.2 Kolon elusyon profili.	50
Şekil 4.3. Sığır serum albümini kalibrasyon eğrisi	51
Şekil 4.4. Folin-Ciocalteu yöntemi kalibrasyon eğrisi.	53
Şekil 4.5. Enzim aktivitesine ölçüm pH'ı etkisi.....	54
Şekil 4.6. Enzim aktivitesine ekstraksiyon pH'ı etkisi	55
Şekil 4.7. PPO enzimi pH kararlılık grafiği	55
Şekil 4.8. Sıcaklık ve bekletmenin enzim aktivitesine etkisi.....	56
Şekil 4.9. Michaelis – Menten grafiği (birinci yöntemle elde edilen ham özüt).....	57
Şekil 4.10. Lineweaver – Burk grafiği (birinci yöntemle elde edilen ham özüt).....	58
Şekil 4.11. Michaelis – Menten grafiği (ikinci yöntemle elde edilen ham özüt).	58
Şekil 4.12. Lineweaver – Burk grafiği (ikinci yöntemle elde edilen ham özüt)	59
Şekil 4.13. Substrat-enzim aktivite ilişkisi.....	61
Şekil 4.14. L-Dopa ile ölçümlerde kullanılan pH ve enzim aktivitesi.	61
Şekil 4.15. L-Dopa ile yapılan enzim aktivite ölçümleri ve sıcaklık.....	62
Şekil 4.16. L-Dopa Michaelis – Menten grafiği	63
Şekil 4.17. L-Dopa Lineweaver – Burk grafiği.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Mantarın ve Bazı Gıdaların İçerdiği Besin Değerleri.....	6
Çizelge 4.1. PVP derişiminin enzim aktivitesine etkisi.	48
Çizelge 4.2. Saflaştırma verimi ve saflaştırma derecesi sonuçları.	51
Çizelge 4.3. Ham özüt ve saf enzim çözeltisinin protein içerik değerleri	52
Çizelge 4.4. Saflaştırma aşamalarında polifenolik madde miktarları.	53
Çizelge 4.5. PPO kinetik parametreleri.	59
Çizelge 4.6. Substratların özellikleri.	60
Çizelge 4.7. İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi.	64
Çizelge 4.8. İnhibitör varlığında görülen bağıl enzim aktiviteleri.	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TX-100	:	Triton X-100
PVP	:	Polivinil pirolidon
PMSF	:	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
kDa	:	Kilodalton
PPO	:	Polifenol oksidaz enzimi
SA	:	Spesifik aktivite (U/mg protein)
BSA	:	Sığır serum albümini
E.C.	:	Enzimin kodu
L	:	Litre
M	:	Molarite
mM	:	Milimolar
μ M	:	Mikromolar
rpm	:	Devir/dk
U	:	Enzim ünitesi
K_m	:	Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	:	Maksimum reaksiyon hızı
mL	:	Mililitre
μ m	:	Mikrometre
μ L	:	Mikrolitre
nm	:	Nanometre
g	:	Gram
mg	:	Miligram
sn	:	Saniye
$^{\circ}$ C	:	Derece santigrat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enzimler, endüstri ve tıp başta olmak üzere yaşamın birçok alanında yer almaya başladı. Enzimler özellikle gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Mantarlar, besin değerlerinin yüksekliği ve kolay bulunabilmeleri nedeniyle yıllardır önemli bir gıda olarak tüketilmektedir. Mantarlar, yüksek kalitesi, ucuzluğu ve gıda olarak tüketilmesi nedeniyle polifenol oksidaz (PPO) eldesinde ve birçok endüstriyel sektörde kullanılmaktadır [1]. Özellikle gıda endüstrisinde polifenol oksidaz enzimi bu alanın çalışanlarını cezbetmiştir, ve enzimatik kararına durumunu engellemek için birçok çalışma yapılmıştır. Meyve ve sebzeler kesildiğinde veya soyulduğunda hasar, bozulmalar ve ürünün renginde değişiklik oluşur. Renk pembeden mavimsi siyaha değişir ve bu durum “esmerleşme” olarak adlandırılır. Tirozinaz enziminin faaliyeti ve fenolik maddelerin mevcudiyeti sebebiyle enzimatik kararına ortaya çıkar [2]. Tirozinaz enziminin ayırma veya izolasyon özellikleri, PPO kaynağına göre değişmektedir [1]. Polifenol oksidaz enziminin enzimatik kararına reaksiyonlarını engellemek için PPO enziminin iyi bir inhibitörünün kullanılması gerekmektedir [3,4]. Bu sebeple, inhibitör kullanmadan evvel sebze ve meyvelerde var olan polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonunun yapılması ve kinetik özelliklerinin, en elverişli pH, en elverişli sıcaklık ve sıcaklık kararlılığının iyi bilinmesi gerekmektedir.

Polifenol oksidaz enzimi birçok reaksiyona katalizör olarak girer ve reaksiyon bitiminde olumlu ya da olumsuz sonuçlar oluşabilir. Buna bir örnek, siyah çay veya kakao üretiminde kullanılan ve PPO enzimi tarafından katalize edilen oksidatif reaksiyondur ve siyah bir renk verdiği için istenen sonuçlardır. Ancak meyvelerde bozulma oluşur ve renk değişirse sonuç istenmeyen bir sonuç olur. Burada fenoller oksidasyonla kinonlara dönüştürülür ve bu olumsuz sonuçlara sebep olur. Bu çalışmada *Russula cyanoxantha* (sırtıgökçe) mantarında polifenol oksidaz enziminin

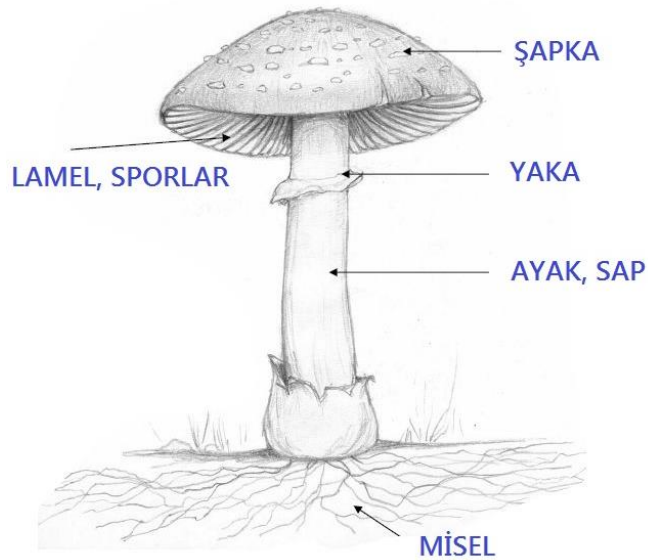
varlığı, kinetik ve biyokimyasal özellikleri tetkik edilmiştir. Araştırmanın hedefi Karabük ormanlarından elde edilen *Russula cyanoxantha*'dan PPO enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve detaylı olarak karakterize edilmesidir. Karakterizasyon çalışmalarında PPO enziminin optimum pH ve optimum sıcaklığı, ısı ve pH kararlılığı, substrat derişiminin enzim üzerindeki tesirinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda elde edilecek veriler, enzimatik esmerleşmenin azaltılması, enzimin muhafaza yönteminin iyileştirilmesi, optimum depolama koşullarının belirlenmesi amacına hizmet edecektir.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. MANTARLAR HAKKINDA GENEL BİLGİ

Mantarlar, bir hücreli ve çok hücreli ökaryotik organizmaları içeren biyolojik bir âlemin ismidir. Bu canlıların küf, maya ve mantar gibi birçok grubu olmakla birlikte halk arasında genellikle mantar olarak bilinirler ve en yaygın olarak kullanılan isimlendirme budur. Bugüne kadar yüz binlerce mantar türü kaydedilmiştir, ancak sadece yaklaşık olarak 100 türü insan tüketimine uygundur [5]. Mantarlar uzun zamandır bilinmesine rağmen, on altıncı yüzyılda ilk kez Fransa'da çoğaltılmaya başladı. Önceleri mevsime göre açık havalarda yetiştirilmiş, on dokuzuncu yüzyılda ise ilk defa nemli ve kapalı yerlerde imal edilmeye başlanmıştır [6]. Şekil 2.1 mantarın temel kısımlarını vermektedir. Mantarların toprağın altında bulunan parçasına misel, toprağın üstünde kalan parçalarına sap ve şapka adı verilir. Tıpkı bitki kökleri gibi, mantarlardaki miseller de su ve besin maddelerini topraktan alarak diğer parçalara iletirler.



Şekil 2.1. Mantarların genel yapısı.

Mantarın altındaki plakalar gençken pembedir, ancak taşıdıkları bu sporlar zaman içinde olgunlaştıkça koyu kahverengiye döner. Mantarın şapkasında, plakalarda yayılan bazal sporlar, olgunluğa ulaştıklarında ve ortam uygun olduğunda çimlenerek yeni bir mantar oluştururlar [6]. Mantarların, lezzetli tadı ve güzel aroması nedeniyle günlük beslenmemizde büyük önemi vardır. Mantarların içeriğinde %92 su vardır ve besinsel olarak sebzelerle aynı değerlere sahiptir. Mantarlar gelişmek için en az 20 °C sıcaklıkta, %60 nem içeren, pH'ı 4-7 arasında olan, oksijen içeren bir ortama ve az miktarda ışığa ihtiyaç duyarlar. Türkiye'de doğada mantarlar için en uygun ortam ilkbahar ve sonbahar aylarında oluşur. Yirminci yüzyılda doku kültüründen mantar imalatının başarılması ve yeni tekniklerin geliştirilmesi, bu amaçla oluşturulan özel kurumlarda mantar yetiştiriciliğini başlatmıştır [7,8].

Mantarlar ekosistemin önemli parçalarıdır. Klorofilleri yoktur. Üreme organları ve yapısı iplik gibi "Hif" denen minik borucuklardan meydana gelir. Hifler bir araya gelerek miselleri oluşturur. Eşeyli ve eşeysiz olarak üreyebilirler ve her iki hâlde de spor oluşturarak ürerler. Toprağa dökülen sporlar rüzgârla veya böceklerle taşınır ve yağmurdan sonra nemli ortamda çimlenerek gelişirler. Klorofil ihtiva etmediklerinden, şeker, yağ ve nişasta gibi organik maddeler meydana getirmezler. Bunun için öteki canlılara ihtiyaçları vardır. "Mikoriza" adı verilen ortaklıklar teşkil ederek bitkilerin köklerine asılırlar ve buradan karbonhidrat alırlar. Bitki de mantarın hifleri yardımıyla topraktan su ve suda eriyen tuzları alır. Karadaki bitkilerin %80'inden fazlasında kökler mantarlarca sarılmıştır.

2.1.1. Mantar Türleri

Mantarlar yenilebilir, yenilemeyen ve zehirli olmak üzere 3 çeşittir. Yenilebilir mantarlar, insanların doğadan topladıkları ve lezzet olarak tercih ettikleridir. Gıda ihtiyacının karşılanması yönünden kaydadeğer yiyecek kaynaklarından birini teşkil ederler. Dünyada gıda gereksiniminin fazlalaşmasıyla birlikte mantarların kültür mantarı şeklinde üretimi yaygınlaşmıştır. Yenilebilen mantarların içerisinde nişasta ve gerçek selüloz bulunmadığı, buna karşın vitamin ve mineral maddeleri ihtiva ettikleri için iyi bir besin kaynağı olarak tercih edilirler [9,10]. Yeryüzünde kaç tür mantar bulunduğu henüz bilinmiyor. Lakin kayıt altında olan 10.000'den fazla mantar türü

vardır. Bu türler arasında sadece %1'i öldürücüdür, %20'si ciddi zehirlenmelere sebep olur. Bunların haricinde kalanlar ise yenilebilir mantar türleri olarak kabul edilir. Yenilebilir mantar türleri şunlardır: Kuzugöbeği mantarı (*Morchella* çeşitleri), ayı mantarı (*Boletus edulis*), sığırdili mantarı (*Hydnum repandum*), domalan mantarı (*Tuber sp.*), keme mantarı (*Terfezia sp.*), kanlıca mantarı (*Lactarius deliciosus*), Yumurta mantarı (*Cantharellus cibarius*), Sezar veya imparator mantarı (*Amanita caesarea*).

Mantarın, yararları kadar zararları da vardır. Zehirli mantarların rahatlıkla tanınmasını temin eden pratik bir metot bulunmamaktadır. İyi tanınmayan, yabani mantarların yenilmesi ölümlü sonuçlanacak tehlikeli sağlık problemlerine sebep olabilir. En yaygın zehirli mantar türleri, *Amanita phalloides*, *Amanita muscaria*, *Lepiota bruneoincarnata* (*Agaricales/Lepiotaceae*), *Omphalotus olearius* (*Agaricales/Tricholomataceae*)'dir.

Mantar dünyası 7 gruba ayrılır:

- *Ascomycota*
- *Basidiomycota*
- *Blastocladiomycota*
- *Neocallimastigomycota*
- *Glomeromycota*
- *Microsporidia*
- *Chitridiomycota*

Bu çalışmada incelemesi yapılan *Russula cyanoxantha* L. türü *Basidiomycota* şubesine aittir.

Basidiomycota: Tüm mantarlar arasında en çok bilinen, en geniş gruptur. Bu türün büyük bir kısmı toprak içine yerleşmiştir, fakat gövde kısmı toprak üstündedir. *Basidium* adı verilen spor keselerinde *basidiospor* denilen eşeyli üremeyi temin eden sporlar ürer. Yeşil alanlarda, gübreli ve humuslu toprakta iyi yetişen şapkalı mantarlar (çayır mantarları, jölemsi tremella mantarları, parmaksı uzantıları olan beyaz kurt

mercanları) bu gruptandır. Saprofit yahut parazittirler. Kimi çeşitleri çok zehirlidir. Küf mantarları da bu gruba girer.

2.1.2. Mantarlar ve İnsan Sağlığına Etkisi

Çoğu yenilebilir mantar türü proteinler, vitaminler ve mineraller yönünden zengindir ve bütün bu maddeler insanlar için faydalı ve gereklidir. [9,10]. Mesela iğne mantarı, *Pleurotus eryngii* ve istiridye mantarları günlük gıdalarımızda kullanılıyor, ancak *Ganoderma lucidum* ve *Cordyceps sinensis* mantarları daha çok doğal tedavilerde tüketilmektedir. Mantarlardan elde edilen ilaçlar, Güney Kore ve Japonya gibi çağdaş ve gelişmiş ülkelerde klinik uygulamalarda tüketilmektedir [11]. Yenilebilir mantarlar kolayca sindirilebilir, lezzetli yiyeceklerdir ve iyi miktarda mineral, vitamin, protein, karbonhidrat ve yağ içerir. Mantarlardaki protein %72-83 arasındaki oranlarda sindirilebilmektedir. Mantar sebze ve meyvelere göre iyi bir arginin, histidin, lizin ve treonin kaynağıdır. Çizelge 2.1 mantarların ve kimi gıdaların içerdiği besin maddelerinin ağırlıkça yüzdesini göstermektedir [6]. Mantarlar çinko (Zn), brom (Br), sodyum (Na), manganez (Mn), klor (Cl), bakır (Cu), demir (Fe), potasyum (K), fosfor (P), kalsiyum (Ca), riboflavin, nikotinik asit ihtiva eder ve iyi bir folik asit kaynağıdır [6].

Çizelge 2.1. Mantarın ve bazı gıdaların içerdiği besin değerleri.

Gıda maddesi	Su	Protein	Yağ	Karbohidrat	Mineraller	Cal/100gr
Mantar	92	3.5	0.3	40.5	1.0	25
Ispanak	93	2.2	0.3	1.0	1.9	15
Kuşkonmaz	95	1.8	0.1	2.7	0.6	20
Patates	75	2.0	0.1	21.0	1.1	85
Süt	87	3.5	3.7	4.8	0.7	62
Et	68	18.5	13.3	0.5	0.5	189

Folik asit eksikliği kansızlığa sebep olur ve bu sebeple mantarlar kansızlık tedavisi için verilen diyetlerde yer alır. Araştırmalara göre mantar, kan şekerini ve kolesterolü düşürdüğü için kalp hastalığı olan kişiler için önemlidir [6]. Mantarlar bir besin

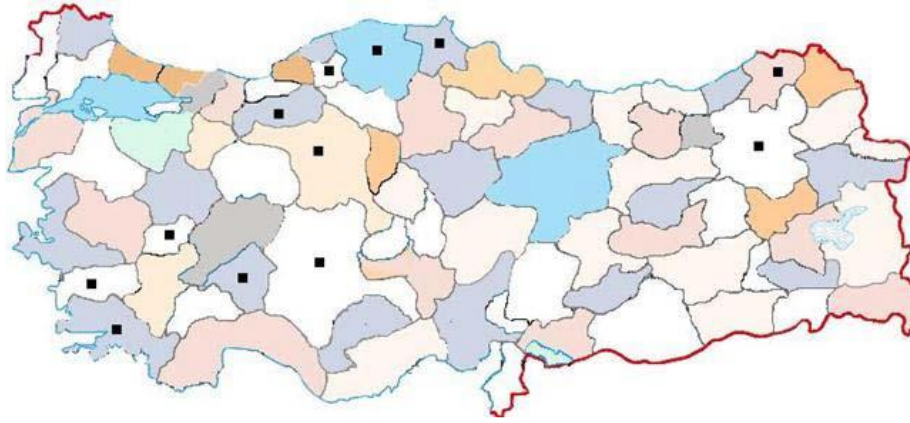
kaynağı olmanın yanı sıra birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve yan etkileri olmayan bir tedavi olarak her geçen gün daha çok önemsenmektedir. Doğal bir ürün olan mantar, kolay ve ucuz yöntemlerle yetiştirilir, dolayısıyla bilimsel araştırmalarda ve tıbbi deneylerde rahatlıkla kullanılabilirler. Mantarlar, günümüzde bazı antibiyotikler için de önemli bir kaynaktır.

Bir kişi güneş ışığının etkisi altında cilt üzerinde D vitamini üretebilir, ama bu günlük D vitamini tüketimine yetmez. Bu özellikle kuzey bölgelerinde yaşayanlar için geçerlidir. D vitamini menopozda, kemik hastalıkları, osteomalazi ve osteoporoz konusunda insanlara yardımcı olur. Hayvansal kaynaklar dışında mantarlar, D vitamininin ana bitkisel kaynağıdır, çünkü doğal olarak büyük miktarlarda D vitamini içeren çok az gıda vardır. Birçok yabancı mantar türü D₂ vitamini açısından zengindir [12]. Mantarlar az miktarda şeker ve yağ içerir. Bu nedenle mantarlar diyet yemeklerinde özel bir yer tutar. Yüz gram taze mantar yenildiğinde sadece 20-40 kalori alınır. Bu sebeple mantar, kilo vermek ve diyetle ilgili kalmak isteyenler için ideal bir besindir. Mantarların kansere karşı etkisi üzerine araştırmalar yapılmıştır, buna bir örnek akciğer kanseridir. Mantarların çeşitli kabileler tarafından tıbbi amaçlarla kullanımı tıp alanında dikkat çekmiş ve modern tıp araştırmalarında araştırmacıları mantarlara yöneltmiştir. Bitkisel tedavinin uygulandığı ülkelerde mantarlar, yan etkisi olmadığı için diğer mantar türleri veya şifalı bitkilerle karıştırılmaktadır [13,14].

2.1.3. *Russula Cyanoxantha* Mantarının Morfolojik Özellikleri

Yenilebilir şapkalı bir mantar olan *Russula cyanoxantha* mantar dünyasının *Basidiomycota* grubu, *Agaricomycetes* türü, *Russulales* cinsi, *Russulaceae* ailesine aittir (Şekil 2.3). *Russula* cinsinin dünyada yaklaşık 700, ülkemizde de 100'e yakın türü kayıt altına alınmıştır. Yenilebilir mantar türleri açısından *Russula* ailesinin oldukça fazla türü vardır. Genel özellikleri, saplarının kalın ve tebeşir gibi kırılğan olması, büyük bir şapkaya sahip olmaları ve renklerinin parlak olmasıdır. *Russula* ailesine ait türleri birbirinden ayırt etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Bunlardan birkaçı, lamellerin rengine, şapka zarının soyulma yüzdesine, şapka rengine, FeSO₄ ile ovulduğunda aldığı renge bakılmasıdır. *Russula cyanoxantha* 1762'de Jacob Christian

Schaeffer tarafından *Agaricus cyanoxanthus* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1863'te İsveçli büyük mikolog Elias Magnus Fries, bu türü *Russula* cinsine aktararak bu mantara şu anda kabul edilen bilimsel adı *Russula cyanoxantha*'yı vermiştir. Yurt dışında bu mantar türü Charcoal Burner olarak bilinir. Tüm *Russula*'lar gibi mikorizal bir mantardır. *Russula cyanoxantha* hafif asidik fakat besin açısından zengin toprakta büyür. En yaygın olarak meşe ve kayın ormanlarında bulunur. Mayıs ayından kasıma kadar yağış oranına bağlı olarak oldukça geniş zaman aralığında bulunabilir. Halk arasında sırtıgökçe mantarı olarak bilinir. Bazı kaynaklarda kömürocağı kırılğan mantarı olarak da geçer. Ülkemizde en çok görüldüğü yerler Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *Russula cyanoxantha*'nın Türkiye'deki yayılışı.

Genç sırtıgökçelerde renk daha koyu kahverengiye yakındır, yaşlandıkça koyu yeşil renge döner. Diğer *Russula*'lardan ayırt edici özelliği lamellerinin sık ve esnek olmasıdır. Demir tuzuyla ovulduğunda yeşil renk verir, diğer *Russula*'ların çoğu ise bu işlemde somon rengini alır. Üst zarı kolayca soyulur ve yemeği yapılacağı zaman üst zarı soyulmazsa acı bir tat verir. Çok fazla kurtlandığından genç sırtıgökçeleri zamanında toplamak önemlidir. Şapka 4–15 cm genişliğindedir, ilk başta dışbükeydir, daha sonra düzleşerek içbükey halini alır. Lamelleri yağlı, esnek ve sıktır. Sap kısmı saf beyazdır, yüksekliği 10 cm'ye kadar çıkabilir ve çapı 1,5-3 cm'dir. Sporlar beyazdır. Belirgin kötü bir kokusu yoktur ve hafif, hoş bir tadı vardır.



Şekil 2.3. *Russula cyanoxantha*.

2.2. ENZİMLER

Enzimler, organizmalarda biyokimyasal tepkimeleri katalize eden protein formundaki biyolojik katalizörlerdir. Bir organizmada metabolizma dediğimiz tüm biyokimyasal dönüşümler enzimler sayesinde mümkündür. Organizmada organik madde üretimi ve yok edilmesi, teneffüs ve kas hareketleri gibi fizyolojik eylemler enzimlerin etkisiyle yerine getirilir. Enzimler günümüzde önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde enzimler gıda, tedavi ve kimya endüstrilerinde, deri, boya ve temizlik maddeleri gibi özel alanlarda, biyoloji ve biyoteknolojide, tıpta, tarımda ve veterinerlikte yaygın şekilde tüketilmektedir. Gıda sektöründe pastörizasyon ve sterilizasyonun doğru yapılıp yapılmadığını belirlemek amacıyla enzim tayinleri kullanılmaktadır.

Reaksiyonların laboratuvarında gerçekleşmesi uzun zaman alır, kimi zaman tepkimenin ortaya çıkması için yüksek sıcaklık, basınç, alkali veya asidik çevre gibi özel durumlar gerekir, ama enzimler kullanıldığı zaman reaksiyonlar birkaç saniyeden daha az zamanda gerçekleşir. Enzim katalizli reaksiyonlarda, enzim reaksiyon sabitini ve reaksiyon dengesini değiştirmez, fakat reaksiyonu hızlandırır. Enzimler substratlarla birleştiğinde, reaksiyonun sonuçlarına enzimin substratla birleşmesi sonucu oluşan madde veya maddeler denir. Enzimleri adlandırırken, bazı enzimler, -az ilavesiyle substratın adından türetilir, bazıları ise enzimi keşfeden bilim adamının adını alır.

2.2.1. Genel Özellikler

Enzimler çok spesifik ve tesirli biyokatalizörlerdir. Enzimlerin öteki kimyasal biyokatalizörlere göre birçok avantajı vardır. Enzimler ve normal katalizörler arasındaki en mühim fark enzimlerin spesifik olmalarıdır. Genellikle enzimler bazı spesifik maddeler arasında yer alan belli tepkimelerin katalizörlüğünü yaparlar. Enzimlerle tepkime hızı 10^{20} 'ye kadar artırılabilir, ama normal katalizörlerle 10^2-10^3 kadar arttırılabilmektedir. Enzimle modifiye edilmiş malzemeye “substrat” denir. Substratlar enzim ile enzimin özel bölgesinde bağlanır ve buraya “faal merkez” denir. Burası katalitik aktivitenin nedeni olan polipeptit zincirinin belli bölümlerine sahip özel katmanlar ile meydana gelen canlı bir merkezdir. Bazı enzimler kendi başlarına aktiftir, ancak enzimlerin çoğu faal olmak için kofaktör adı verilen moleküllere ihtiyaç duyar. Kofaktörler vitamin yapıları, mineral iyonları ya da organik moleküllerdir. Enzimle kofaktöre beraber “Holoenzim” denir ama kofaktör olmadan sadece protein kısmına “Apoenzim” denir. Apoenzim, kendi başına hareket etmediği için kofaktör ile katalitik bir hareketlilik kazanır. Vitaminler koenzim olarak önemli bir rol oynarlar. Mesela redoks reaksiyonlarında bulunan koenzimlerden biri nikotinamid adenin dinükleotiddir (NAD^+), bir nikotinamid halkası içerir ve peramid redoks reaksiyonu burada devam etmektedir. Amino grup taşınmasında yer alan bazı koenzimler piridoksal, piridoksin ve piridoksamindir (B6 vitamini) [15]. Kimi enzimler sadece proteinlerden ve amino asitlerden yapılır, ancak tüm enzimler protein içerir, çünkü özgülük ve katalitik aktivite protein kısmından kaynaklanır. Bu enzimlerin örnekleri amilaz, tripsin, pepsin, üreaz'dır. Bazı enzimler proteinin yanı sıra organik veya inorganik (kofaktör) kısımlar taşır. Apoenzimlerin protein kısmında amino asit ve serileri farklılık oluşturur. Bu nedenle enzim nitelikleri apoenzim ile belirlenir. Kofaktörler, koenzim ve inorganik iyonlar olmak üzere iki türe sahiptir. Koenzim küçük organik moleküllerdir. Kofaktörler olarak hareket eden inorganik katyonlar ise Cu^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Na^+ , K^+ 'dur ve anyonlar F^- , I^- , Cl^- , Br^- 'dir.

1894'te Alman kimyager Emil Fischer, anahtar-kilit teorisini ve bunun enzim-substratı (ES) ile irtibatını ortaya çıkardı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Anahtar-kilit teorisi.

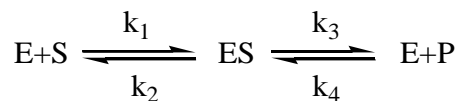
Enzimin moleküler yapısı genellikle substrata göre daha büyüktür. Enzim substrat ile birleşip (E-S) kompleks oluştuğunda faal merkez meydana gelir ve bu da kofaktör ile oluşur. Enzim molekülü içinde yer alan bu özel bölge hareketli bölge olarak isimlendirilir. Hareketli bölgede enzim ve substrat, enzim-substrat (E-S) kompleksini meydana getirir. Substrat bir ürüne dönüşür, daha sonra enzim üründen ayrılır ve yeniden serbest kalır. Enzimin yer aldığı tepkime aşağıda görüldüğü gibidir:



Enzimin protein bölgesinde faal merkez vardır ve belirli bir sayı ve seriye sahip amino asitlerden meydana gelir. Hareketli merkezlerin sayısı birden çok olabilir ve hareketli merkezlerin total büyüklüğü enzim yapısına göre çok küçüktür. Substrat faal merkezle zayıf bir şekilde bağlanır. Bu bağlanmaya örnek olarak, H-bağları, Van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik kuvvetler verilebilir.

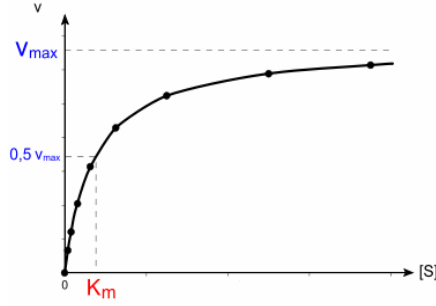
2.2.2. Enzimlerin Kinetiği

Bir enzim ve onun substratı ürüne dönüştürülmeden evvel bir enzim-substrat bileşkesi oluşur, ardından substrattan ürün meydana gelir ve enzim reaksiyondan ayrılarak serbest kalır. Enzim tepkimelerindeki kinetik mekanizma aşağıda gösterilmiştir.



ES bileşkesi, k_1 hızında E ve S'den meydana gelir. Ters reaksiyon, (E-S)'nin k_2 hızında ayrışmasıyla gerçekleşir ve k_3 hızında enzim üründen ayrılır. Reaksiyon kararlı bir

duruma ulaştığında, ES'nin oluşumu “Kararlı Hal İlkesine” göre ayrışmasına eşittir, yani konsantrasyonu değişmez. Enzim reaksiyonlarının kinetiği üzerine ilk kapsamlı incelemeleri 1913 tarihinde Michaelis-Menten ortaya koymuştur. Michaelis-Menten kinetiğine göre, enzim konsantrasyonu sabit olduğunda, tepkime süratinin substrat konsantrasyonu ile ilişkisi incelenirken bir hiperbol elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Michaelis-Menten grafiği.

Maksimum sürat, hiperbolde substrat konsantrasyonu ile artık değişikliğin gözlenmediği bölgedeki sabit y değeridir ve V_{max} ile gösterilir. K_m (Michael Menten sabiti) ise maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat konsantrasyonu ile belirtilir. Enzim aktivitesini belirleyen önemli sabitler V_{max} ve K_m 'dir. Parabol, Michaelis-Menten formülü ile verilir:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

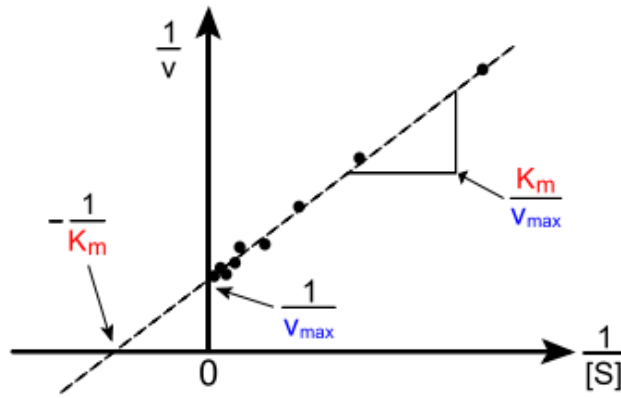
Michaelis-Menten grafiğinde 3 kısım bulunur. İlk kısımda ($[S] \ll K_m$) substrat konsantrasyonu daha az olduğu için grafik doğrusaldır. İkinci kısımda, çok büyük substrat konsantrasyonları ihmal edilemez, tepkime kompleks bir düzende ilerler. Üçüncü kısımda, substrat konsantrasyonu çok fazladır ($[S] \gg K_m$), $V = V_{max}$ olur ve tepkime değişmeyen bir hızda ilerler.

Hiperbol Michaelis-Menten grafiği kullanılarak sağlandığından, uygulamalarda kolaylık olması için bir doğru denklemine dönüştürülmesi gerekir. Bu maksatla eksen ölçükleri uygun şekilde değiştirilerek çeşitli şekillerde doğru formülüne çevrilebilir.

Bu denklemlerden en yaygın olarak kullanılanı aşağıdaki Lineweaver-Burk formülüdür [16].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Formüle göre koordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ olan bir doğru sağlanır. Bunun eğimi ise K_m / V_{max} 'dır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği.

2.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Biyolojik çevrede çok az oranda bulunmaları sebebiyle enzimlerin tayin edilmesi çok zordur. Enzimlerin varlığını, mekanizmasını, miktarını ve saflığını belirlemenin en etkili yolu aktivitelerini ölçmektir. Enzim aktivitesi birçok faktöre bağlı olduğundan ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur. Bu faktörlerin başında enzimin saflığı, fiziksel ve kimyasal özellikleri, katalize ettiği reaksiyonun türü, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, ölçümün hassasiyeti gibi etkenler gelmektedir.

Optimum şartlarda, bir dakikada $1\mu\text{mol}$ ürünün meydana gelmesini (veya $1\mu\text{mol}$ substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarı “Enzim Ünitesi” olarak tanımlanır (International Unit, IU).

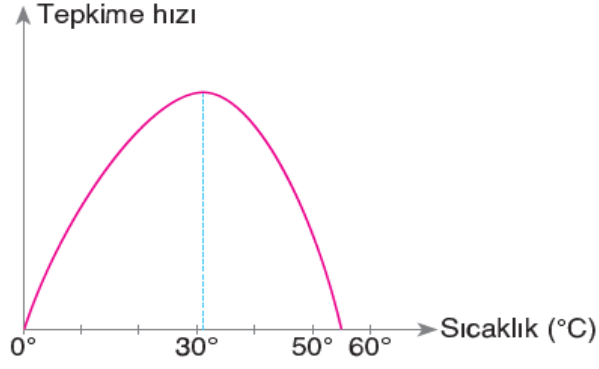
“Spesifik faaliyet”, bir enzimin faaliyetini tanımlamak amacıyla kullanılan başka bir birimdir. 1 miligram proteine düşen enzim ünitesi sayısı olarak tanımlanır. Enzim saf

iken spesifik faaliyet değişmez ve bu değer o enzime has bir değerdir. Birim terimi, yaygın olarak bir enzim aktivitesi birimi olarak kullanılır. Ancak IUCN'nin Enzim Alt Komitesince önerilen bir diğer birim ise “Katal” (Kat) dır. Optimal koşullar altında, bir katal, bir mol substratı bir saniyede ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır. Katal, yüksek ölçeklidir. Bu sebeple faaliyetleri nitelemek için nanokatal ve pikokatal birimleri kullanıma daha fazla elverişlidir.

Enzim faaliyetini etkileyen unsurlar şunlardır:

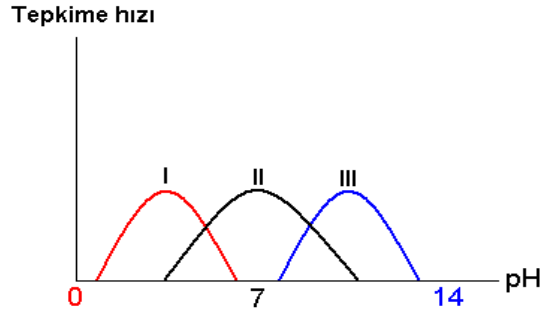
- Sıcaklık
- pH
- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- Vakit
- İnhibitör
- Muhtelif iyonların derişimleri ve nitelikleri
- Işık ve öteki fizikî faktörler

Sıcaklık: Fazlalaşan hararetle katalitik enzim tepkilerinin sürati de fazlalaşır. Enzim reaksiyonu, hararetteki her 10 °C'lik artışla iki kez hızlanır. Ancak sıcaklık belirli bir değere yükseldiğinde enzimin moleküler yapısında değişiklik olur. Bu değişim, enzimin katalizör olarak aktivitesini değiştirir ve reaksiyonu yavaşlatır veya durdurur (Şekil 2.7). Bitki kaynaklı enzimler 50-60 °C arasında, hayvan kaynaklı enzimler ise 40-50 °C arasında en elverişli hararete yükselir [17,18].



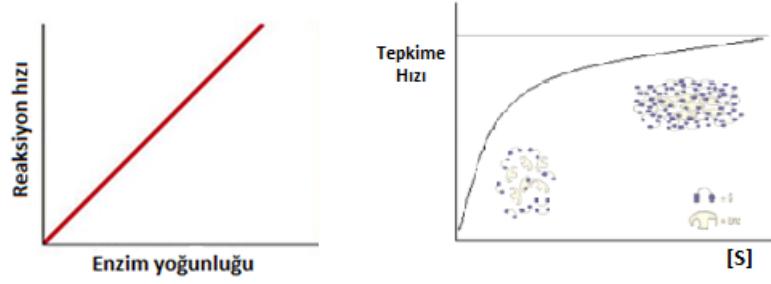
Şekil 2.7. En elverişli ısı.

Ortam pH'ı: Tüm enzimler belli bir pH aralığında faaliyet gösterirler. Bir enzimin azami faaliyet gösterdiği pH, o enzim için en elverişli pH olarak adlandırılır (Şekil 2.8.). Bir enzim, amin ve karboksil gruplarına sahip, protein tarafından düzenlenen bir moleküldür. Amin ve karboksil grupları çevrenin pH'ına göre belli derecelerde iyonlaşırlar. Bu iyonizasyon yapıların stabilitesinde değişiklikler oluşturur ve enzimin faal kısımlarında değişiklikler ortaya çıkar. Enzimatik reaksiyon çoğu zaman en elverişli pH değerinin iki tarafındaki alanlarda yavaşlar. Bu sebeple enzimatik araştırmalar tampon eşliğinde en elverişli pH'da yapılır.



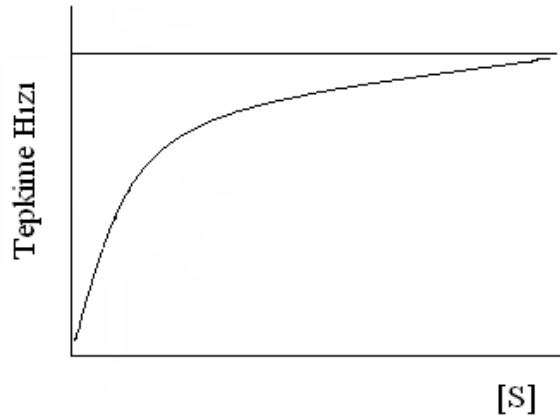
Şekil 2.8. pH etkisi.

Enzim derişimi: Substrat miktarı yeterli olduğu sürece enzim derişiminin artması reaksiyon hızını artırır. Çevredeki enzim miktarı ne denli yüksekse, tepkime o kadar hızlı olur. Enzim, molekül sistemi bozuluncaya dek substratı aktive etmeyi sürdürür (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Enzim ve substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına tesiri.

Substrat konsantrasyonu: Substrat konsantrasyonu, belli bir süre boyunca reaksiyon hızını doğrusal olarak artırır. Bu artış, enzim substratına karşı doygunluğa ulaşmaya kadar sürer. Bu durumda substrat derişiminin yükseltilmesi artık tepkime hızını değiştirmez ve enzim azami hızla (V_{max}) çalışıyor demektir (Şekil 2.10). Enzimin azami hızla çalıştığı durumda enzim derişiminin $\frac{1}{2}$ 'sine karşılık gelen substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti (K_m) adı verilmektedir ve bu durumda tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. K_m değeri enzimle substratı arasındaki ilgiyi ifade eder. K_m değeri enzimin substratına olan ilgisiyle ters orantılıdır [17].



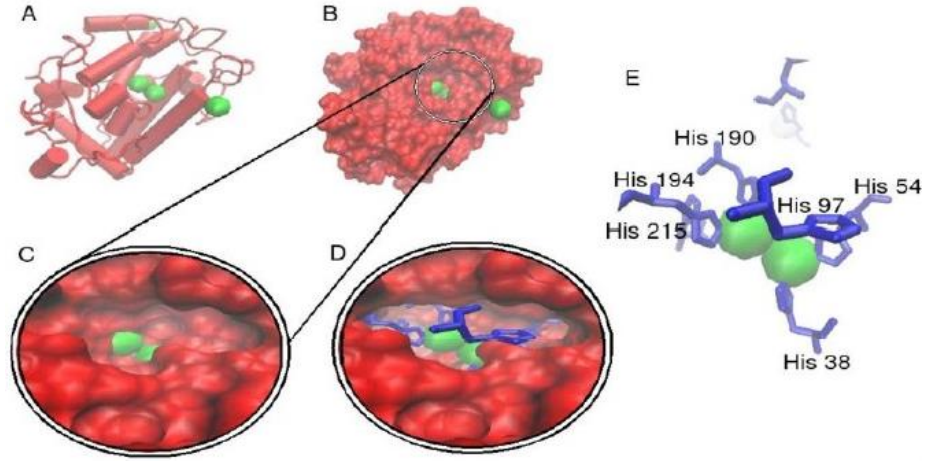
Şekil 2.10. Enzimatik tepkimenin sürati üzerine substrat konsantrasyonunun tesiri.

Sürenin tesiri: Enzimatik tepkimenin hızı belirli bir sürede üretilen ürünün miktarıyla tayin edilmektedir. Reaksiyon devam ettikçe reaksiyon hızı zamanla azalır. Bunun nedeni, reaksiyonun devamı sırasında oluşan ürünler, bunların kombinasyonu ile ters reaksiyon oluşması, enzimin zamanla inaktivasyonu ve substrat konsantrasyonunun azalması gibi etkenlerdir. Bu etkileri yok etmek amacıyla enzim çalışmaları genellikle reaksiyonun ilk aşamasında gerçekleştirilir, burada substratın yaklaşık %10'u tüketilir.

İnhibitör: İnhibitörler, bir enzimin faal merkezine bağlanarak enzimatik reaksiyonların hızını azaltan ve enzim substrat kompleksinin oluşumunu engelleyen maddelerdir. İnhibitörler tersinir ve tersinir olmayan şekilde tasnif edilir. Doğrudan faal bölgeye bağlanan ve faal bölgeyi tahrip eden veya enzim molekülünün şeklini değiştiren inhibitörler, geri dönüşü olmayan eylemi sergilerler. Michaelis-Menten sabitini artıran veya azami reaksiyon hızını düşüren inhibitörler, bu eylemi enzime substrat gibi bağlanarak ve tersinir bir inhibisyon oluşturarak gösterirler [19].

2.3. POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ

PPO, aktif bölgesinde bakır içeren oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. PPO, oksijen ile monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu temin eden tepkimeleri katalize eder. Ortaya çıkan kinon yapılarından kahverengi, kırmızı ya da siyah polimerik pigmentler teşekkül eder. [20,21]. PPO içeriği bitkinin türüne ve ekimine bağlı olarak değişebilir. Bu enzimin bitki hücrelerindeki yeri, bitki ve meyvelerin olgunluk derecesine bağlı olarak da değişebilir. Polifenol oksidazın moleküler yapısı, aktif merkezin sayısına ve saflaştırma için kullanılan yöntemlere göre farklı olabilir [22]. PPO enzimi içeren kaynaklar muhtelif fenolik bileşikler içerir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin çoğu, söz konusu enzimin substratları değildir [23]. Polifenol oksidazı ilk defa 1856 tarihinde Schobenbein mantarlarda bulmuştur. Polifenol oksidaz, iki adet bakır ve her bir bakıra bağlı üç histidin amino asit grubu içerir ve bu sistem aktif noktada bulunur. İki oksijen atomu, aktif noktada iki bakır atomu ile reaksiyona girer. Şekil 2.11'de polifenol oksidaz enziminin sistemi sunulmaktadır. Yeşil küreler bakır atomlarını gösterir. Moleküler yüzey kırmızı ile, aktif merkezde bakır atomlu histidin koordineli amino asitler ise mavi çizgilerle gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Polifenol oksidazın farklı yönlerden gösterimi (A,B,C,D,E).

2.3.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması

Enzim adlarında karışıklığa mani olmak amacıyla bitki polifenol oksidaz enzimlerinin isimlendirilmesinde değişiklikler yapılmıştır. EC.1.14.18.1 polifenol oksidazı (monofenol mono oksijenaz), EC.1.10.3.2 katekol oksidazı (katekolaz, difenoloksidaz), EC.1.10.3.1 ise lakkazı temsil eden enzim kodlarıdır [24]. Kimi kaynaklarda, Lakkaz enziminden bir PPO enzimi sınıfı olarak bahsedilmektedir. Lakkaz, metoksi ikameli polifenoller ve aromatik diaminler gibi birçok terkinin oksidasyon tepkimelerini katalize eden bir enzimdir. Lakin tirozinaz tarafından oksitlenen tirozini okside edemez [25].

Polifenol oksidaz (E.C.1.14.18.1) sisteminde bakır kofaktörünü ihtiva eden oksido redüktaz grubu enzimlerdendir ve bifonksiyoneldir. Oksijen ortamda moleküler olarak bulunduğu iki tepkimeyi katalize eder. Monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve *o*-fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) [26]. Enzimin sistematik adı, monofenol, L-dopa: oksijen oksido redüktaz'dır. Bundan başka bu enzimin katalizörlük yaptığı substrata göre daha az verilen isimler de vardır. Bunlardan bir kısmı, *o*-difenolaz, fenolaz, kresolaz, difenol oksidaz, monofenol oksidaz, tirozinaz, katekol oksidaz, dopa oksidaz, *o*-difenol oksido redüktaz, monofenol monooksidaz, pirokatekol oksidaz, difenol oksidaz ve klorogenik oksidaz'dır [27].

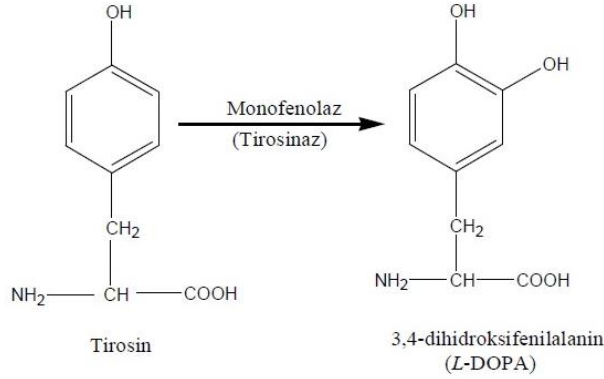
2.3.2. PPO Enziminin Kaynakları ve Doğadaki Dağılımı

Polifenol oksidaz enzimi ile birlikte gelen polifenoller bitkilerde de çokça bulunur. Mikroorganizmalarda, bilhassa mantarlarda ve kimi hayvan organizmalarında da bulunabilir. Bu enzimin varlığı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karideste, küçük karideste) tespit edilmiştir [28]. Bazı topraklarda PPO enzimi yanı sıra glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz tipi enzimlerin varlığı ve aktivitesi bildirilmiştir [29]. Farklı bitkilerin PPO içeriği, farklı türlere ve bitki yetiştirme yöntemine göre değişir. Hatta aynı organizmanın değişik uzuvlarında bile farklı özellikler gösterebilirler. Doğada yaygın olarak bulunan ve doku yaralanmaları sonrası istenmeyen enzimatik koyulaşmaya neden olan bu enzim, bitkilerde kloroplast thylakoids zarlarında lokalizedir. Mekanik işlemler bitkilerde, meyvelerde ve mantarlarda “esmerleşme” denilen renk değişimlerine sebebiyet verir. Bu enzimatik siyah renk belli bir noktadan sonra durdurulamaz ve gıdanın lezzetini ve kalitesini düşürür. Bu istenmeyen durumların önüne geçebilmek için enzimin inhibe edilmesi ve enzimin hareketliliğinin düşürülmesi veya ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu da ancak enzimin kinetik yapısının çok iyi tanınmasıyla mümkün olur [30,31]. Bu yapıyı tanıyabilmek için mantar, muşmula, ananas, muz, enginar, çay, şeftali, patlıcan, elma, tütün, Napoleon üzümü, dut, vanilya domates, yeşil fasulye, patates, armut, elma, tohumu, enginar, kaju fıstığı, kiraz, brokoli, göbek marul, kayısı gibi farklı besinlerden PPO enzimi saf hale getirilmiştir [30,32]. PPO enziminin moleküler yapısı, aktif merkez sayısına ve saflaştırma için tatbik edilen yöntemlere göre değişiklik gösterebilir [22].

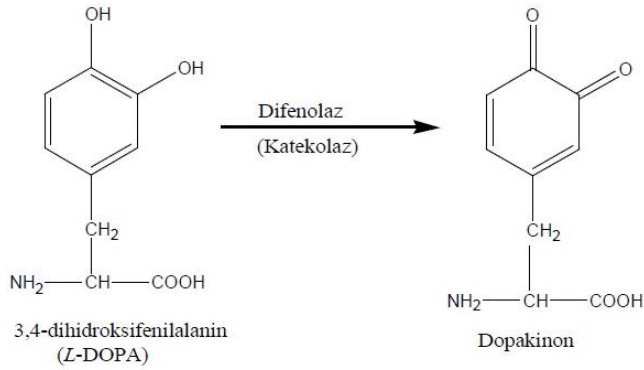
2.3.3. PPO Enziminin Katalizlediği Tepkimeler

Milletlerarası Biyokimya Derneği'ne bağlı enzim kurulunca belirlenen tasnifte, tüm PPO'lar, redox reaksiyonlarını katalizlemeleri sebebiyle birinci sınıf enzim olarak tespit edilmiştir. Bu tasnife göre muhtevasında bakır bulunan polifenol oksidaz moleküler oksijen mevcut olduğunda tamamen farklı iki reaksiyon oluşturur. Bu reaksiyonlardan biri, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme tepkimesidir (E.C.1.14.18.1) ve bu faaliyet, monofenolaz veya kresolaz aktivite şeklinde adlandırılır. Öteki ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu tepkimesidir

(E.C.1.10.3.2) ve bu aktivite de difenolaz veya katekolaz aktivite olarak adlandırılır. (Şekil 2.12 ve Şekil 2.13.) [33].

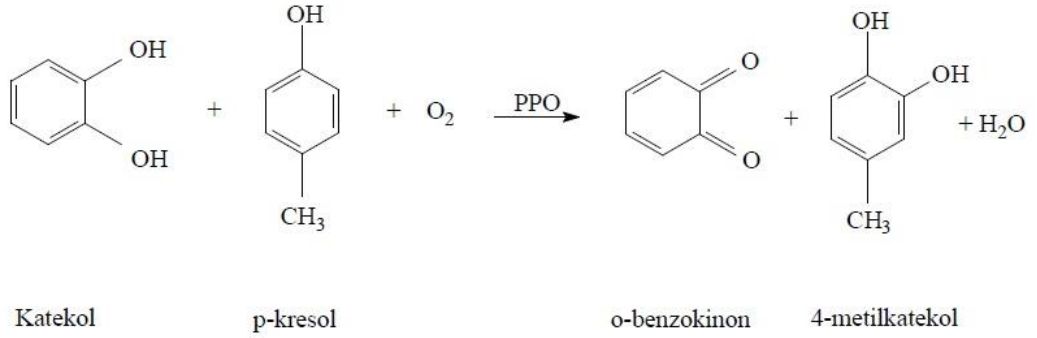


Şekil 2.12. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (monofenolaz faaliyeti).



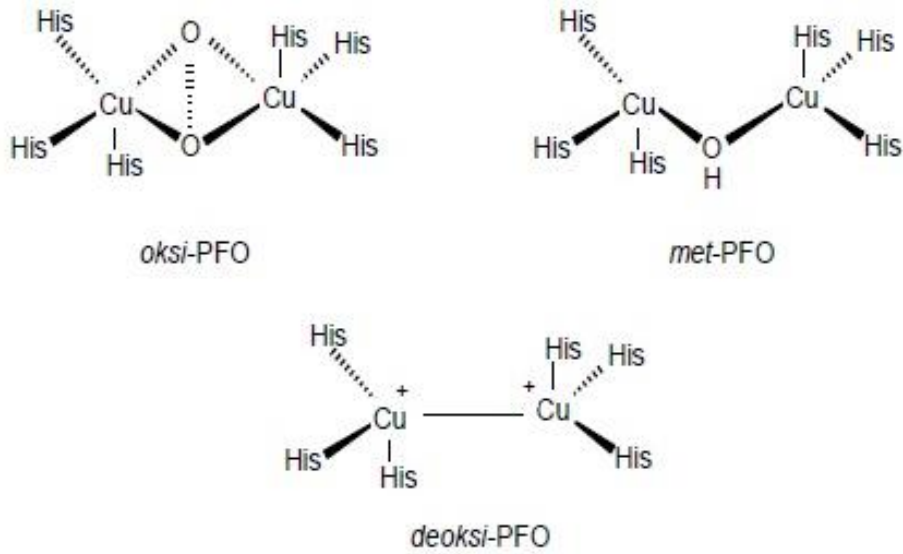
Şekil 2.13. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (difenolaz faaliyeti).

Değişik kaynaklardan temin edilen enzim ekstraktlarının her iki aktivitesi de değişik oranlardadır [34]. Patates, elma, şekerpancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi çoğu PPO ekstraktının her iki aktivitesi de mevcutken, çay yaprakları, tütün, muz, armut ve kiraz polifenol oksidazının monohidroksifenoller üzerinde hiçbir etkisi yoktur [35]. Vamos-Vigyazo tarafından PPO enzim katalizi ile ilgili reaksiyon aşağıdaki gibi verilmiştir (Şekil 2.14.) [22]. Monofenolün hidrolizi sonucu oluşan dihidroksifenol, polifenol oksidaz tarafından katalizlenen bir tepkimede kinonlara çevrilir. Kendiliğinden ortaya çıkan kinon yapıları, protein ve indirgeyici şeker türü bitki bileşenleri ile birbirleriyle yoğunlaşarak kararmaya neden olan yüksek moleküler ağırlıklı polimerler oluşturur [35].



Şekil 2.14. Vamos-Vigyazo'nun önerdiği polifenol oksidaz kataliz reaksiyonu.

Kimyasal ve spektroskopik araştırmalar, polifenol oksidazın çift çekirdekli bakır bileşeni ihtiva eden faal bir kısmının bulunduğunu ortaya koymuştur. Polifenol oksidazın faal merkezi, Tip3 bakır merkezi diye tanınmaktadır. Bakır elementinin merkezi yerleri sırasıyla “metoksi”, “deoksi” ve “oksi” durumlarıdır [36]. Metoksi halinde enzim, Cu⁺²—Cu⁺² aktivite bölgesi içeren metpolifenol oksidaz şeklindedir. Deoksi şeklinde enzim, Cu⁺¹—Cu⁺¹ bölgesi içerir ve polifenol oksidazın indirgenmiş şeklidir. Oksi halinde Cu⁺²—O₂⁻—Cu⁺² faal bölgesi içeren oksipolifenol oksidaz şeklindedir (Şekil 2.15).

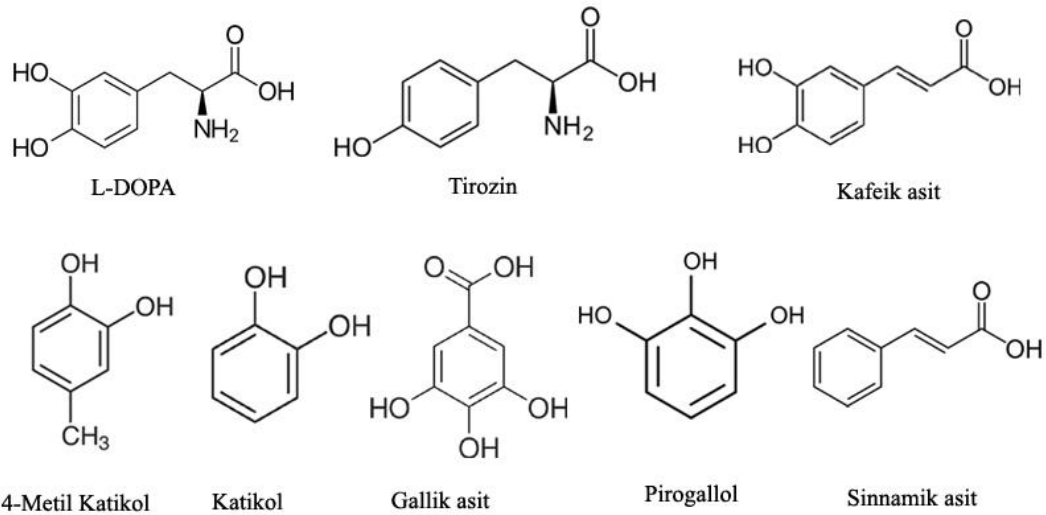


Şekil 2.15. Polifenol oksidazın bakır merkezleri.

Birincisi monofenol yapısındaki substrat, oksijen merkezin aksiyal mevkiindeki bakır atomlarından birine bağlanır [37]. Üçüncül bir dipiramid ara maddesinde yeniden düzenlenme, monofenolün peroksit, su akışı yoluyla hidrolizine ve bileşiğin deoksi olarak oluşumuna yol açar [38]. Ortaya çıkan durum katekolaz döngüsünün ilk adımı olan serbest difenolü verir veya aktif kısma bağlanan ara bisfenoller, bir kinon ve bir indirgenmiş bakır (deoksi) enzimi üretmek üzere oksitlenir. Moleküler oksijen bu şekilde bağlandıktan sonra oksijen-PPO yeniden üretilir.

2.3.4. Polifenol Oksidazın Substratları

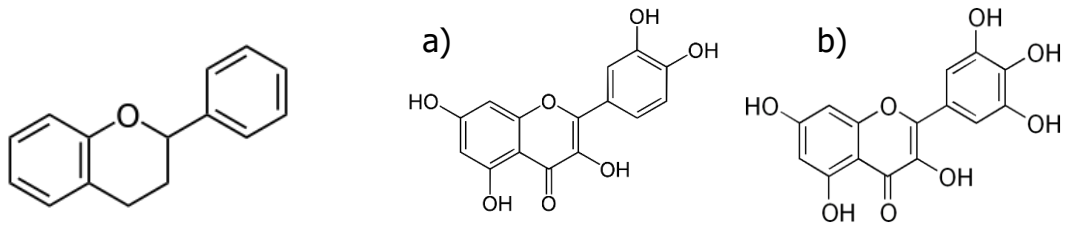
Meyve ve sebzeler, flavonoid türü kompleksler, sinamik asit türevleri ve basit fenoller gibi çeşitli fenolik bileşikler içerirler ve bu fenolik bileşiklerin bir kısmı polifenol oksidaz enziminin substratıdır [39,40]. Bu bileşikler, vakuollerde yoğun olmak üzere bitkilerin hemen hemen her bölgesinde bulunur. PPO'nun substratları katekol, 4-metil katekol, pirogallol, gallik asit, L-DOPA, tirozin, kafeik asit ve sinamik asit esterleri (klorojenik asit ve kafeik asit) dir (Şekil 2.16).



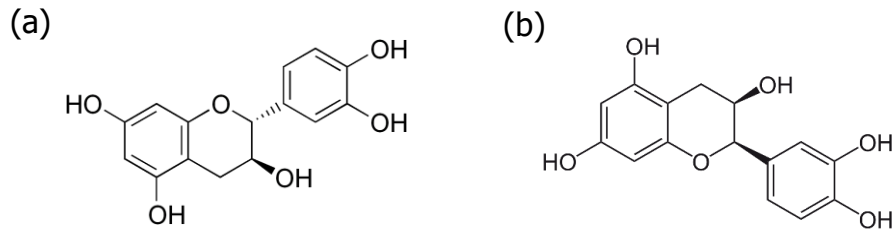
Şekil 2.16. PPO enziminin bazı doğal substratları.

Enzimatik oksidasyon çalışmalarında genellikle model substrat olarak katekol (*o*-dihidroksi fenol) kabul edilmektedir. Dopa ve tirozin de neredeyse tüm bitki dokularında var olan aminoasitler oldukları için PPO enziminin yaygın olarak

kullanılan substratlarıdır [41,42]. Bir merkezden temin edilen PPO enziminin en iyi substratı, o merkezde var olan substratdır. Sebze ve meyvenin türü ve ekimi ve enzimin ekstrakte edildiği bitkinin alanı gibi unsurlar enzimin substrat özgülüğünü tayin eder. Çeşitli pH'larda yapılan faaliyet ölçümleri, pH'ın kullanılan substrata etkileri olduğunu göstermiştir [42]. Flavonoidler bitkilerin yenilebilir kısımlarında ve bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum bölümlerinde bulunur. Bütüncül yapıları Şekil 2.17'de verilmektedir. Kateşinler flavonoidlerin 3-hidroksi çeşitleridir. Kateşinler doğada (+)-kateşin ve onun stereoizomeri olan (-)- epikateşin şeklinde yer alırlar (Şekil 2.18) [43].



Şekil 2.17. Flavonoidlerin genel yapısı ve bazı flavonoller: a) kuersetin, b) mirisetin.



Şekil 2.18. a) Kateşin, b) Epikateşin.

Tüm bitkilerde var olan tirozin ve aynı zamanda proteinlerin yapısını teşkil eden amino asitlerden birisidir. Bitki dokularında bulunan L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) ve dopaminden (3,4-dihidroksifeniletamin) tirozinin PPO ile (hidroksilasyonu) oluşmaktadır (Şekil 2.17). Elma gibi kimi besinlerden sağlanan polifenol oksidaz, L-DOPA'yı dehidrojene eder fakat tirozine karşı aktivite göstermez, ancak *p*-kresol'ü hidroksilasyona uğratar. Şeker pancarından elde edilen polifenol oksidaz, tirozine karşı aktivite göstermez, L-DOPA'yı dehidrojene eder. Ancak şeker pancarı dokuları büyük miktarlarda L-DOPA içermez, bunun yerine büyük miktarlarda tirozin içerir [44]. Bu, bazı araştırmacılar tarafından "PPO enziminin sağlandığı bitkilerin her zaman PPO

için en iyi substratları içermediği” tezini teyit etmektedir. L-DOPA, 1967'den beri Parkinson hastalığını tedavi amacıyla tüketilmektedir. Bu hastalığın nedeni dopamin nörotransmitterinin noksanlığıdır. L-DOPA, kan-beyin bariyerini geçebilen bir dopamin öncüsüdür. Artık L-DOPA, Knowles metodu kullanılarak ticari ölçekte kimyasal olarak imal edilmektedir. L-DOPA'nın ticari değeri yüksektir ancak imalat maliyetinin de yüksek olması sebebiyle bu tedavi için alternatif üretim metotları araştırılmaktadır. Alternatif yöntemlerden biri polifenol oksidazın tutuklanması ve enzim tarafından L-Tirozinin L-DOPA'ya dönüştürülmesidir. Bu yöntem, pahalı bir enzim olan PPO'yu yeniden kullanmayı, enzimi tutuklayarak üretim maliyetini düşürmeyi amaçlamaktadır.

2.3.5. PPO Enziminin İnhibitörleri

Taze sebze ve meyve satışı ve servis yapılması esnasında oluşan enzimatik kararım, müşteriler için arzu edilmeyen bir durum olup, gıda işleme ve depolama esnasında mali zararlara sebep olmaktadır. Bu nedenle enzimatik esmerleşmenin kontrolü gıda işleme sektöründe çok mühim bir yere sahiptir ve araştırmacıların da ilgisini çekmektedir. Çağımızda gıda endüstrisinde PPO'nun neden olduğu enzimatik esmerleşmeyi engellemek amacıyla farklı PPO inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu maksatla kullanılan inhibitörler toksik olmamalı, ekonomik olarak uygun olmalı ve ürünlerin tadı, kokusu ve kalitesini etkilememelidir. PPO aktivitesini inhibe etmek için kullanılan inhibitörler, etki tarzlarına göre 6 gruba ayrılabilir [44]:

- İndirgeyici faktörler (sülfidler, askorbik asit ve analogları)
- Şelat yapıcı faktörler (EDTA, sodyum dietilditiyokarbamat (DIECA), sodyum azid)
- Bileşik yapıcı faktörler (siklodekstrinler, kitosan)
- Asitlik tanzim ediciler (Malik asit, fosforik asit, askorbik asit, sitrik asit)
- Enzim inhibitörleri (substrat analogları, halojenürler)
- Başka enzimlerle karışım (proteazlar, *o*-metiltransferaz)

İndirgeyici faktörler gıda sektöründe yoğun şekilde kullanılmaktadır. Bu faktörler *o*-kinonların teşekkülünü engeller ve sonuç olarak melanin oluşumunu engeller veya

renksiz ve stabil ürünler oluştururlar. En yaygın enzimatik esmerleşme inhibitörleri kükürt dioksit ya da sülfürlerdir, bilhassa sodyum sülfür, sodyum bisülfid ve sodyum metabisülfittir. Sülfatların yaygın olarak PPO inhibitörü olarak kullanılmasına rağmen, bitki ve meyvelerin tadını yumuşattığı ve etkilediği bilinmektedir. Askorbik asit ve izomeri eritorbik asit, sülfürlerin yerine geçen indirgeyici maddelerdir ve meyve suyu, püreler, dondurulmuş ve dilimlenmiş meyveler ve konserve meyve ve sebzelerin imalinde esmerleşmeyi engelleyici maddeler olarak kullanılır. Askorbik asit ürettiği asidik ortam ile enzimin katalitik aktivitesini etkiler. Sitrik asit ayrıca şelatlama özelliği ile bir PPO inhibitörü olarak görev yapar [41]. Bir başka etkili PPO inhibitörü sisteindir. Sisteinin, difenolaz aktivitesi ile oluşturulan *o*-kinonlarla tiyol konjugatları oluşturarak etki ettiğine inanılmaktadır. PPO, prostetik grubu bakır olan bir enzim olduğundan, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietilditiyokarbamat, merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol ve potasyum azid yahut metilksantat gibi mineral şelatlayıcı reaktifler tarafından inhibe edilir.

Besinlerde PPO enzimini inhibe eden polifenoller ve aldehitler de bulunmaktadır. Bitkilerdeki bazı PPO inhibitörleri kuersetin, kampferol, luteolin gibi flavonoidlerdir [45]. Flavonoidlerin inhibisyonu, faal bölgede bakır ile şelat oluşturma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Trans-sinamaldehit, anisaldehit ve komenaldehit gibi muhtelif aldehit türevleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır ve inhibitör etkisinin, enzimin birincil amino gruplarıyla bir Schiff bazı oluşumundan kaynaklandığına inanılmaktadır [45,46]. Birkaç PPO inhibitörü tanınmaktadır. Bunlar hidrojen peroksit, tiyoller, hidroksilamin, aromatik karboksilik asit türü kimyasalları ve lignanlar ve kimi alkaliler gibi tabii bileşikler içerir [47]. Bu çalışmada PPO inhibitörü olarak benzoik asit, askorbik asit, KCN, EDTA, sodyum sülfid, sodyum metabisülfid, sodyum azid ve L-sistein kullanılmıştır.

2.3.6. Enzimatik Kararma

Depolanan meyve ve sebzelerde bu esnada yapılan soyma ve parçalara ayırma benzeri mekanik işlemler sonucunda bazı renk değişiklikleri meydana gelmektedir. Renk esmerleşme denilen pembeden mavimsi-siyaha değişmektedir. Polifenol oksidaz enzimi, normalde sebze ve meyvelerde var olan fenolik bileşenlerin oksidasyonunu

katalize ederek onları *o*-kinonlara oksitler. Bunların polimerizasyonu, enzimatik esmerleşmeye sebep olan kahverengi melanin pigmentlerinin birikimine yol açar [26]. Meyve, sebze ve dondurulmuş meyve sularının endüstriyel amaçlarla hazırlanması sırasında meydana gelen bu tür reaksiyonlar ürünün kalitesini düşürmekte ve aynı zamanda piyasa kıymetini de düşürmektedir. İlaveten karides, ıstakoz ve yengeç gibi kabuklu deniz ürünlerinin hazırlanması ve depolanması esnasında kabuğunun çatlaması sonucu oluşan siyah noktalar, polifenol oksidaz enziminin etkisi sonucu, ürün değerini düşürür [48]. Esmerleşme renk reaksiyonuna yol açan nedenler aşağıdaki gibi üç gruba ayrılır;

- Enzimlerin neden olduğu kararlık reaksiyonları.
- Enzimsiz oksidatif kararlık.
- Maillard reaksiyonundan kaynaklanan esmerleşme.

Bu reaksiyonlardan en yaygın olanı enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Enzimatik kararlık, sebzelerde, meyvelerde ve tahıllarda tabii şekilde polifenol oksidaz enzimi tarafından oluşturulan bir oksidasyon tepkimesidir. Yerleşik durumlarda enzim hücrede oksijenle birarada yer almaz. Lakin bir meyve ya da sebze kesildiğinde enzim hücreyi terk eder ve oksijen mevcut olduğunda bazı fenolik bileşiklerle tepkimeye girerek renkli bileşikler teşkil eder [49,50].

Enzimatik esmerleşmenin oluşması için polifenol oksidaz enziminin etkilediği polifenol ve moleküler oksijenle birlikte aynı yerde olması gerekir. İlaveten pH ve sıcaklık gibi enzim faaliyetini doğrudan etkileyen koşulların da uygun düzeyde olması gerekmektedir. Enzimatik kararlılığı azaltmak veya durdurmak için ortamdaki üç faktörden (fenolik madde, oksijen, polifenol oksidaz) birinin kaldırılması gerekmektedir. Esmerleşme reaksiyonları, ısıl inhibisyon yapılarak, substratları uzaklaştırarak, askorbik asit ve sodyum sülfid ekleyerek ve ortamın yüksek basıncını veya pH'ını düşürerek de engellenebilir [51].

2.3.7. PPO Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları

Bugün polifenol oksidazın gıda, tıp, ilaç ve kozmetik alanında çeşitli uygulamaları bulunmaktadır. Tirozinaz, sebze ve meyvelerin işlenmesinden sonra enzimatik kararmaya ve maddi kayıplara neden olduğu için gıda endüstrisini araştıran araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu sahadaki araştırmacılar, işleme sonrasında enzim faaliyetini azaltmak amacıyla birçok araştırma ortaya koymuşlardır. Bilhassa çay demlemede tirozinaz aktivitesinin çok mühim bir işlevi vardır. Yüksek tirozinaz aktivitesi çayın kalitesini artıran bir durumdur.

Kozmetik ve tıbbi uygulamalardaki değeri nedeniyle tirozinazın saflaştırılması son dönemlerde artan bir ilgiye maruz kalmıştır [52]. Birçok tarımsal gıda maddesi, tirozinaz muhtevası sebebiyle enzimatik kararmaya uğrar ve bu da düşük ürün kalitesine neden olur. Özellikle sebze ve meyvelerin proses sürecinde O₂ ile temasa sebebiyet verecek herhangi bir zamanda, polifenol oksidaz aktivitesi ile kararma oluşmakta ve maddi zararlara yol açmaktadır. Bu sebeple gıda endüstrisi için muhtelif inhibitörler kullanılarak PPO enziminin faallığının kontrol edilmesi ve bununla ilintili olarak enzimin kararmasına mâni olunması çok mühimdir. Tirozinaz faaliyetini inhibe edebilen birkaç kompleks tanınmasına rağmen, bu inhibitörlerin enzimatik esmerleşmeyi önleme kabiliyeti inhibitöre, substrat ve O₂ derişimine, sıcaklığa, pH'a ve enzimin merkezine göre değişmektedir. PPO enzimini, tropolon, karbon monoksit, sodyum dietilditiyokarbamat, siyanür, 2-merkaptobenzotiyazol, azid ve EDTA gibi değişik maddeler inhibe edebilir. Bazı inorganik iyonlar tirozinazı inhibe edebilmesine rağmen, sodyum klorür dışında bu komplekslerin çoğu toksik olduğundan kullanım alanları sınırlıdır. Taze soyulmuş meyve ve sebzelerin esmerleşmesini engellemek amacıyla kullanışlı olan sodyum klorür, düşük derişimlerde zayıf bir inhibitördür [53,54].

Enzim aktivitesi bazı gıda ürünleri ile ilgili olarak engellenmesi icap eden bir faaliyet olmasına rağmen, faal tirozinaz çay, kakao, kahve, kuru erik, kuru üzüm, kuru incir vb. gıda ürünleri için çok önemlidir. Bilhassa enzim faaliyetinin yüksek olması çayın kalitesini arttıran bir avantajdır. Tirozinaz faaliyeti ile meydana gelen bazı çözünür boyalar gıda renklendiricileri olarak kullanılmaktadır. Tirozinaz, melanin

oluşumundaki rolü sebeple tıp sektöründe de dikkat çekmiştir. Suda çözünmeyen heterojen bir polimer olan melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden meydana gelir ve kozmetik endüstrisi eliyle güneşin ultraviyole ışınlarından korunması için özel olarak üretilir. Ayrıca tirozinazın kanser hücrelerindeki aktivitesinin bazı kanser türlerinde önemli ölçüde artması ve enzimin bu özelliğinin bu kanser türlerinin tedavisinde kullanımını ortaya çıkmıştır. Memelilerde, tirozinazın faal formu, melanositlerde bulunan ve granüler yapıya sahip melanozomlarda bulunur. Dewey vd., bir tirozinaz substratı olan 4-hidroksianisolün, farelerde Harding-Passey melanomunun küçülmesini sağladığını bildirdiler. Tirozinazın yer aldığı bir diğer saha ise Parkinson hastalığını tedavi etmek amacıyla kullanılan L-DOPA imalidir [55].

Fenoller (C_6H_5OH) aromatik gruplar içinde mühim bir organik madde grubudur. Beyaz kristal yapıda ve karakteristik bir kokuya sahiptir. Ancak havada oksitlenir ve pembeye döner. Ayırt edici ve benzersiz bir tada ve aromaya sahiptirler. Fenollere hidroksibenzen türevleri denir. Monohidroksibenzen gibi bir hidroksil grubuna giren fenoller hoş ve tatlı bir kokuya sahipken, çift hidroksil grubuna (difenol) giren fenoller hafif bir kokuya sahiptir ve üç veya daha fazla hidroksil grubuna (polifenoller) sahip fenoller tamamen kokusuzdur. On dokuzuncu yüzyılda İngiliz cerrah Joseph Lister, fenolün sağlık sektöründe antiseptik niteliğinde tüketilebileceğini söyledi. O zamana dek enfeksiyon sebebinin mikroorganizmalar değil, kokular olduğuna inanılıyordu ve dezenfektan kullanılmadı. Bugün, daha az tahriş edici bileşikler, antiseptik olarak fenolün yerini almıştır. Bununla birlikte, birçok modern dezenfektan hala fenol grupları içermektedir [56,57].

Fenolün dünyada ve Türkiye'de en önemli kullanımını fenolik reçine imalidir. Fenolik reçineler kâğıt endüstrisinde, kauçuk işleme endüstrisinde ve aşırı aşınma direncine sahip yalıtım malzemelerinin imalatında kullanılır. Fenol, Bisfenol BPA üretiminde de lazımdır ve bu malzemede epoksi, polikarbonat ve polisülfonat reçineleri ile aşınmaya dayanıklı polyeester imalatında tüketilmektedir.

İlaçlar, boya ve reçine imalatında tüketilen klorofenoller ve antioksidanlar, plastikleştiriciler ve yüzey faal maddelerde tüketilen alkil fenoller, fenolden elde edilen önemli bileşiklerdir.

2.4. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA TEKNİKLERİ

İstenilen moleküler grubu öteki maddelerden ayırarak saf halde sağlamak amacıyla bir dizi işlem uygulanmaktadır. Bu işlemler, bir karışımdaki moleküler grupların çözünürlük özelliklerine veya fiziksel özelliklerine göre örneğin yoğunluk, elektrik yükü veya başka moleküllerle afinitesi gibi birbirinden ayrılmasını sağlayan yöntemleri içermektedir.

Enzimin, enzim kaynağından eldesi: Her meyve, sebze için farklı yöntemlerle yapılmaktadır. Örneğin, bakteriler için sonikasyon kullanılabilirken, bitkiler için ezme kullanılabilir.

Filtrasyon: Karışımın bir filtre malzemesinden geçirilerek süspansiyondaki partiküllerin sıvı bölümden ayrıştırılmasıdır. Bu yöntemde kullanılan gözeneklerin çapına bağlı olarak filtreden geçen bölümde belirli büyüklükte partiküller olabilir ve hepsi filtre üzerinde kalabilir.

Santrifüj işlemi: Bu yöntem, yüksek hızla dönen bir alette parçacıkların merkezkaç kuvveti ile ayrılması esasına dayanır. Hücre organellerini ve büyük parçacıkları uzaklaştırmak için uygulanan bir yöntemdir.

Çökeltme işlemi: Bu metotta, istenen veya istenmeyen partiküller solvent ortamında çökeltilir ve katı formda ayrıştırılır. Bunun için yaygın olarak amonyum tuzları ve sodyum sülfat tuzları kullanılır ve proteinler çökeltilir. Değişik moleküler ağırlıktaki proteinler, belirli bir doyumluk derecesi ile amonyum sülfat ortamında çökeltilir. Bu çökeltme esnasında istenilen aralıktaki doyumluk elde edilmişse enzim çökeltilir ve öteki proteinlerden ayrılır.

Diyaliz yöntemi: Bu teknik, küçük partikülleri geçiren ve büyük partiküllerin geçmesini engelleyen bir membrandan yapılmış bir diyaliz tüpü ile uygulanır. İstenmeyen küçük maddeleri uzaklaştırmayı hedefleyen bir faaliyettir. Solüsyon bir diyaliz tüpüne yerleştirilir ve arıtılmış su ya da bir tampon çözelti içine konulur. Küçük partiküller diyaliz tüpünden çıktığında, ayrılacak büyük molekülün konsantrasyonunu bir çözeltisi içinde kalır.

Isıtma: Gerekli enzimin özelliklerine göre ısıtma işlemi belli bir dereceye kadar yapıldığında işe yaramayan diğer proteinler elimine edilir.

Kromatografi: Bu yöntemde ayrılacak maddeler biri dinamik diğeri durağan iki faz arasında hareket eder ve kromatografik kolondan geçer. Bu hareket sırasında, farklı adsorpsiyon dereceleri, farklı dispersiyon özellikleri veya iyon değişimi nedeniyle moleküller ayrılır. Proteinler genellikle kolon kromatografisi ile ayrılır. Bu yöntemde, protein karışımını ihtiva eden solüsyon, gözenekli bir durağan faz içeren bir kolondan geçirilir. Kolondaki durağan fazın türüne bağlı olarak kromatografik metot iyon değişimi, afinite kromatografisi veya jel filtrasyonu şeklinde isimlendirilir. Saf hale getirme yöntemleri arasında maksimum saflaşma yüzdesini veren metottur.

2.5. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Fan ve Flurkey, *Potabella* mantarından tirozinaz ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonunu incelediler. Tirozinaz enzimi pH 3,3'ün üstünde aktivite göstermiştir. Difenol yapısındaki substratlarla deneyler yapılmış, en iyi enzim aktivitesi katekolle elde edilmiştir. Kinetik çalışmada, katekol ile yapılan deneylerde, K_m ham ekstrakt için 5,3 mM, saflaştırma işleminden sonra ise 4,3 mM olarak saptanmıştır. Saflaştırılmış tirozinaz molekül ağırlığı 75 kDa olarak bulunmuştur [58].

Yang vd., yüzey aktif maddelerle mantardan tirozinaz enzimini ekstrakte etmişler ve bu maddelerin enzimin aktivitesi ve kararlılığı üstüne etkisini incelemişlerdir. Bu hedefle anyonik AOT, noniyonik Brij52 ve katyonik CTAB deterjanlarını deneyerek, bu yüzey aktif maddelerin tesirini belirleyip karşılaştırmışlardır [59].

Nunez-Delicado vd., yüzey faal maddesi Triton X-114'ü kullanarak iki fazlı sulu bir sistemde mantardan kısmi tirozinaz saflaştırması gerçekleştirmişlerdir. Tirozinaz enzimi saflaştırma oranı 5,5, verimse %84'tür. Bu çalışma sırasında katyonik ve anyonik deterjanlar denenmiş, kinetik karakterizasyon ve inhibitörlerin etkisi incelenmiştir. En yüksek inhibisyon tropolonla elde edilmiştir [60].

Kolcuoglu vd., *Macrolepiota mastoidea* mantarından elde edilen PPO'nun difenolaz, monofenolaz faaliyetini incelemişlerdir. Ham ekstrakt için optimum pH'lar, monofenolaz aktivite için pH 6,0'da, difenolaz aktivite içinse pH 4,0'de bulunmuştur. Monofenolaz aktivite pH 6,0'da % 100 korunmuş, difenolaz aktivite ise pH 4,0'te %60 korunmuştur. Askorbik asit ve tijoüre, monofenolaz aktivitesine karşı en etkili inhibitörler olarak bulunmuş, difenolaz aktivitesi içinse sodyum metabisülfid ve askorbik asit en etkin inhibitörler olarak saptanmıştır. [61].

Özel vd., *Boletus erythropus* mantarından ekstrakt edilen polifenol oksidazı araştırmışlar ve enzimin organik çözücülerdeki katalizör etkisini incelemişlerdir. Enzim, Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit afinite kolonuyla saf hale getirilmiştir. Optimum sıcaklık ve optimum pH sırasıyla 20°C ve 8,0 olarak bulunmuş, bu çalışmada substrat olarak 4-metilkatekol kullanılmıştır. PPO, çeşitli pH'larda

inkübe edilmiş, 24 saatlik bekleme süresinden sonra pH 3,0 ile 9,0 arasında sabit bir durum gözlenmiştir. 4 saatlik inkübasyondan sonra 10 ile 30 °C arasında kararlı olduğu görülmüştür. K_m 2,8 mM, V_{max} 1430 U/mg protein olarak hesaplanmış, PPO aktivitesi, sodyum azid, benzoik asit, sodyum metabisülfid ve askorbik asit inhibitörleri kullanılarak bastırılmıştır. PPO diklorometan, toluen ve dikloroetanda kaydadeğer katalitik etki göstermiştir [62].

Kolcuoglu, *Macrolepiota gracilentia* mantarından polifenol oksidaz enziminin ekstraksiyonunu yapmış, Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonu ile saflaştırma yapılmış ve PPO'nun monofenolik ve difenolik faaliyetlerinin karakterizasyonunu yapmıştır. PPO'nun monofenolaz aktivitesi için optimum pH 7,0 ve difenolaz aktivite için optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur. K_m değerleri ise monofenolaz aktivite için 0,8 mM, difenolaz aktivite için 1,0 mM olarak elde edilmiştir. V_{max} değeri 2000 U/mg protein şeklinde bulunmuştur. PPO'nun optimum pH'ta 5 gün inkübasyonu sonucunda monofenolaz ve difenolaz aktiviteler sırasıyla %40 ve %60 oranında korunmuştur. Tiyoüre en iyi inhibitör olarak bulunmuştur [63].

Colak vd., 3 mantar türü kullanmış, *Armillaria mellea*, *Lepista nuda* ve *Hypholoma fasciculare* mantarlarını araştırmışlar, ham ekstrakttaki polifenol oksidaz enziminin 4-metilkatekol substratıyla aktivite gösterdiğini görmüşlerdir. Optimum pH'ı 3 mantarın PPO enzimi için de 7,0 olarak saptamışlardır. Optimum pH'da inkübasyon yaparken 24 saattan sonra enzim aktivitesi *Lepista nuda* için %26 ve *Hypholoma fasciculare* enzim aktivitesi %18 eksilmiş ve *Armillaria mellea* enzim aktivitesi ise %11 yükselmiştir. Optimum sıcaklık *Armillaria mellea* için 30 °C, *Lepista nuda* için yine 30 °C ve *Hypholoma fasciculare* için 20 °C olarak bulunmuştur. Cr^{+3} ve Cu^{+2} ile her biri için inhibisyon görülmüş, askorbik asit ve sodyum metabisülfid ise en iyi inhibitör tesirini ortaya çıkarmıştır [64].

Ali ve Zaidi, *Pleurotus ostreatus* ve *Agaricus bisporus* mantarlarından tirozinaz enzimini saf hale getirmiş ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Tirozinaz, amonyum sülfatla çöktürmeye tabi tutulmuş, diyaliz edilmiş ve Sephadex G-100 jel filtrasyonu ve DEAE Selüloz iyon kromatografileriyle saf hale getirilmiştir. *Pleurotus ostreatus* ve *Agaricus bisporus* mantarları için sırasıyla verim %20,3 ve %26,6 olarak, spesifik

aktiviteler 46,4 U/mg ve 52,19 U/mg olarak ve saflaştırma derecesi 16,36 olarak bulunmuştur. *Pleurotus ostreatus* mantarı PPO'sunun molekül ağırlığı 75 kD ve *Agaricus bisporus* mantarı PPO'sunun molekül ağırlığı 95 kDa'dur. Saflaştırılmış tirozinazın optimum pH değerleri yine sırasıyla 6,0 ve 7,0, optimum ısı ise 35 °C'dır. İki mantarın enzimi de en iyi aktiviteyi L-DOPA substratıyla vermiş, K_m verileri ise sırasıyla 0,119 mM, 0,933 mM olarak bulunmuştur [65].

Dedeoglu ve Guler, *Lactarius salmonicolor* mantarından polifenol oksidaz enzimini 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit afinite kolonuyla saflaştırmış ve katekol, 4-metilkatekol, pirogallol substratlarıyla V_{max} ve K_m verileri hesaplanmıştır. Optimum sıcaklık ve optimum pH elde edilmiş, farklı inhibitörler kullanılarak IC50 değerleri hesaplanmış, en iyi inhibisyon L-tirozinle gözlenmiştir [66].

Öz vd., polifenol oksidaz enziminin 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit afinite kolonuyla *Lactarius piperatus* mantarından ekstraksiyonunu yapmışlar ve saflaştırmışlardır. En elverişli sıcaklık ve optimum pH katekol substratıyla 20 °C ve 7,0 olarak saptanmıştır. PPO aktivitesini pH te, 7,0'de ve 4 °C'de 72 saat boyunca muhafaza etmiş, 20 °C'de ise 4 saatlik inkübasyon sırasında yine kararlılığını muhafaza ettiği bulunmuştur. K_m ve V_{max} verileri, 1 mM ve 25 U/mg protein şeklinde saptanmış, inhibitörlerin taramalarında ise en etkili inhibisyon askorbik asitle gözlenmiştir. Bu enzim toluen, diklorometan ve heptan ortamında da etkili bir biyokatalizördür [67].

Benmansour ve Gouzi, *Agaricus bispora* mantarından polifenol oksidazı kısmen saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. PPO difenolaz ve monofenolaz aktivite vermiş, amonyum sülfat çöktürmesinde ise 2 kat saflaştırıldığı bulunmuştur. Difenolaz ve monofenolaz aktiviteleri sırasıyla 189,3 EU/mL ve 3,35 EU/mL olarak hesaplanmıştır. Polifenol oksidaz -15 °C'de 44 gün kararlılığını korumaktadır. 35 °C üzerindeki sıcaklıklarda bozulmaya başlar ve aktivitesi azalmaya başlamaktadır. Substrat olarak pirogallol kullanıldığında, polifenol oksidaz enzimi iki optimum pH (pH 5,3 ve 7,0) göstermiştir. Pirogallol ve katekol substratlarının kinetik parametreleri sırasıyla V_{max} için 78 EU/min/mL ve 168 EU/min/mL, K_m için yine sırasıyla 1,4 mM ve 0,40 mM olarak saptanmıştır. İnhibitör araştırmasında ise sodyum azit, benzoik asit

yarıřmalđ inhibisyon, sodyum florit ve L-sistein ise bileşik tŸr inhibitŸr etkisi vermişlerdir [68].

Zaidi vd., ıstridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) kullanmışlar, ekstrakt edilen enzimi amonyum sŸlfatla ŸktŸrmŸřler, Sephadex G-100 ve DEAE kromatografileriyle saflaştırmışlardır. Saflaştırılan tirozinaz enziminin spesifik aktivitesi 46,4 U/mg, verim ise %20,3 olarak saptanmıştır. Istridye mantarı PPO'sunun mol kŸtlesi 75 kDa olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık ve pH, 35  C ve 6,0'tır [69].

Matsumoto-Akanuma vd., *Agaricus brasiliensis* mantarını kullanarak polifenol oksidazđ kısmi olarak saflaştırmışlardır. Triton X-114 ile iki fazlı ayırma yapmışlar ve amonyum sŸlfat ŸktŸrmesiyle enzimi ayırmışlardır. SDS/PAGE araştırmasından mol kŸtleleri 70 kDa ve 45 kDa şeklinde elde edilmiştir. PPO enzimi 1,6 mM SDS kullanılarak aktif hale getirilmiş, bu aktivasyon V_{max} değerini 2 katına çıkarmıştır, K_m değeri ise sabit kalmıştır [70].

Saki vd., polifenol oksidaz enzimini *Lepiota procera* mantarından Ÿç fazlı sistemi deneyerek kısmi olarak saf hale getirmişler ve saflaşmayı 8,4 kat olarak saptamışlardır. SDS/PAGE ile saflaştırılmış polifenol oksidazın mol kŸtlesi 35 kDa şeklinde bulunmuştur. Farklı substratların denendiği çalışmada, polifenol oksidaz L-DOPA'la yŸksek aktivite gŸstermiř ve K_m değeri 0,12 mM olarak, kafeik asit ile K_m 0,27 mM olarak ve 4-metilkatekol ile K_m 0,46 mM olarak saptanmıştır. Optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık 40  C olarak bulunmuştur [71].

Wu vd., *Agaricus bispora*'dan polifenol oksidazđ amonyum sŸlfat ŸktŸrmesi ile ve DEAE-Sepharose ve Phenyl Sepharose CL-4B afinite kolonuyla saflaştırmıştır. Saflaştırılmış polifenol oksidazın molekŸl aęırlıęđ 43 kDa, optimum pH 6,5-7,0 ve optimum sıcaklık 20  C olarak hesaplanmıştır. Enzimin 30  C ve 40  C'ta 1 saat inkŸbasyon sonucu stabilitesini koruduğu bulunmuştur. Katekol substratının kinetik değerleri ise K_m 0,67 mM, V_{max} 3333 U/mL dak⁻¹ olarak hesaplanmıştır [72].

2.6. ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ

Bu araştırmanın hedefi, polifenol oksidaz enziminin Karabük sırtıgökçe mantarından ekstraksiyonu ve saf hale getirilmesidir. Bu maksatla evvela polifenol oksidaz enziminin, sırtıgökçe mantarından ekstraksiyonu yapılmış, sonrasında amonyum sülfatla çöktürülmüş, diyaliz yöntemi ile saflaştırılmış ve istenmeyen partiküller uzaklaştırılmış ve afinite kromatografi kolonuyla da kısmi olarak saflaştırılmıştır. PPO'nun kinetik özellikleri incelenmiş, optimizasyonları ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Russula cyanoxantha L. mantarı (Sırtıgökçe) Karabük civarından elde edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan tampon malzemeleri sodyum asetat, asetik asit, sodyum hidroksit, Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ 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-terciyerbütilkatekol Sigma-Aldrich markalıdır. Coomassie Brilliant Blue G-250, *p*-krezol, pirogallol TCI kimyasaldan temin edilmiştir. Macherey-Nagel filtre kağıtları kullanılmıştır.

3.1.2. Homojenizatör

PPO enzimi ekstraksiyonu yapılacak olan *Russula cyanoxantha* mantarına ekstraksiyon çözeltisi eklendikten sonra blender ile homojenize edilmiştir. Blender mantarı parçalamak amacıyla aralıklı olarak 5 defa 10 saniye süreyle çalıştırılmıştır ve bu çalışmada Philips marka (Philips HR1316) blender kullanılmıştır.

3.1.3. Santrifüj Cihazı

PPO enziminin ekstraksiyonunda ve amonyum sülfatla yapılan çöktürme işlemlerinde 20 dakika 15000 rpm’de santrifüjleme yapılmıştır. Bu işlemlerde Nüve marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.4. Çalkalamalı Su Banyosu

Ekstrakte edilen *Russula cyanoxantha* PPO enziminin sıcaklık optimizasyonu su banyosu farklı sıcaklıklara ayarlanarak yapılmıştır ve +4 °C ve 70 °C arasındaki sıcaklıklar kullanılmıştır. Enzim belirli sürelerde ayarlanan sıcaklıkta bekletilerek enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Nuve ST 30 çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.

3.1.5. UV – VIS Spektrofotometre

Enzim aktivite tayinleri, enzimin katalitik aktivitesi sonucunda oluşan kinonoik ürünün 410 nm’de verdiği absorbansa dayanır. Zamana karşılık ölçülen absorbans değerleri ürünün oluşumuyla orantılıdır ve enzim aktivitesi bu grafikten elde edilen reaksiyon hızıyla hesaplanır. Enzim aktivite ölçümlerinde Shimadzu UV-1201V model spektrofotometre kullanılmıştır. Protein miktar tayinleri ise 280 nm’de yapılmış ve Thermo Fisher GEN 10S spektrofotometre kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN METOTLAR

3.2.1. Ham Enzim Ekstraktı Eldesi 1. Yöntem

Russula cyanoxantha mantarları Karabük civarından elde edildi. Sonra çamurları temizlenip daha küçük parçalara bölündü. 2,5 gramlık örnekler şeklinde -18 °C’da muhafaza edildi.

1. 2,5 g mantar alınarak üzerine 1 mM PMSF içeren 50 ml 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu eklenir ve homojenizatör yardımıyla parçalanır. Bu işlem +4 °C’ta buz banyosunda yapılır.

2. Karışım tülbentden süzülür.
3. Süzüntü 15000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir. Süzüntüler hava almayacak şekilde kapaklı santrifüj tüpleri kullanılır.
4. Santrifüj tüplerindeki süzüntü alınır ve elde edilen enzim çözeltileri şişelenir.

3.2.2. Ham Enzim Ekstraktı Eldesi 2. Yöntem

1. 2,5 g mantar alınarak % 0,5 polivinil piroolidon ve % 2 Triton X-100 ve 1 mM PMSF içeren 50 ml 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu eklenir, +4 °C'ta, blenderda parçalanarak homojenize edilir.
2. Karışım tülbentden süzülür.
3. Süzüntü 15000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir. Süzüntüler hava almayacak şekilde kapaklı santrifüj tüpleri kullanılır.
4. Santrifüj tüplerindeki süzüntü alınır ve elde edilen enzim çözeltileri şişelenir.

Burada PVP optimizasyonu yapılmıştır. Ortama fenolik maddeleri çöktürmek amacıyla eklenen PVP %0,05 ile %5 arasında farklı yüzdelerde kullanılarak ekstraksiyonlar yapılmış ve en iyi aktivite gösteren PVP yüzdesi saptanmıştır. Bu kısımda, ortama enzim ekstraksiyon verimini artırması beklenen Triton X-100 ve PMSF eklenerek ekstraksiyonlar yapılmıştır. Triton X-100 hücre çeperlerini parçalayarak hücre içi enzimin de ekstrakte edilmesini sağlar. PMSF ise proteaz enzimini inhibe ederek PPO'nun parçalanmasını engeller. Triton X-100 %0,1 ile %2,5 değerleri arasında yer alan yüzdelerle ayarlanarak ekstraksiyonlar yapılmış ve optimum Triton X-100 yüzdesi saptanmıştır. Literatürde çok kullanılan PMSF derişimi 1 mM seçilerek deneyler bu derişimle devam ettirilmiştir.

Yukarıdaki polifenol oksidaz ekstraksiyon yöntemleri incelenmiş ve değişkenler değiştirilerek optimum koşullar saptanmıştır. Bu koşullarda verimi en yüksek olan prosedür seçilerek ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere bu yöntemle enzim eldesi yapılmıştır.

3.2.3. Proteinlerin Tuzla Çöktürülmesi ve Diyalizle Temizlik

Tuzlar (amonyum sülfat, magnezyum sülfat, sodyum sülfat), ısı, organik çözücüler, asit ve bazlar proteinlerin çöktürülmesi için kullanılabilir fakat tuz kullanımı dışındaki işlemlerle yapılan çöktürmelerde proteinler denatürizasyona uğrar ve doğal şekillerini kaybederler. Tuz kullanılarak yapılan çöktürme işleminde ise proteinler denatüre olmaz. Tuz molekülleri proteinlerin etrafında yer alan su moleküllerini çekerek uzaklaştırır böylece birbirine yaklaşıp birleşen protein molekülleri çöker.

Amonyum sülfat diğer tuzlara göre daha ucuzdur, çözünürlüğü daha yüksektir ve pek çok enzim için kullanılabilen zararsız bir tuzdur. Bu avantajlarıyla amonyum sülfat bazen çözültiden istenmeyen proteinlerin çöktürülerek uzaklaştırılmasında, bazen de istenen proteinlerin yine çöktürülerek çözültiden ayrılmasında kullanılır. Amonyum sülfatla yapılan çöktürmelerde elde edilen saflık derecesi genellikle 10'dan düşüktür ama bu yöntem saflaştırma işlemlerinin başında çözelti hacmini düşürmek amacıyla kullanılır. Enzim çöktürülür ve daha sonra daha küçük hacimli tamponda tekrar çözülerek daha küçük hacme alınmış olur. Bu yöntemde kullanılan tuzlar, çöktürülen proteinlerden diyalizle uzaklaştırılır ve proteinler saflaştırılır.

Diyaliz işleminde kullanılan membran, bir elek gibi rol oynar, küçük molekül ağırlıklı proteinlerin geçişine izin verir, büyük moleküllerin ise tutulmasını sağlar. Diyalizle temizlik saflaştırma aşamalarında sıklıkla kullanılır ve tuzla çöktürme işleminden gelen tuzlar, organik çözücüler veya küçük moleküllü inhibitörler bu yöntemle enzim çözeltisinden uzaklaştırılır.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile kolon saflaştırması yapılacak olan ham özüt hazırlanırken 40,0 gram *Russula cyanoxantha* mantarı alınarak 1 mM PMSF içeren 100 ml 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ile homojenizasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında santrifüj işlemiyle ham özüt ayrılmış ve amonyum sülfat eklenerek özütteki proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Amonyum sülfat doygunluğu tek veya iki aşamalı yapılabilir. İki aşamalı prosedürde önce düşük doygunluk elde edilir (%25-35), santrifüj sonrası çöken çökelek yani küçük molekül ağırlıklı proteinler atılır ve sıvı kısımlar toplanır. Bu sıvı kısım daha sonra yüksek amonyum sülfat doygunluğuna

getirilir ve santrifüj sonrası çöken çökeklele enzim proteinleri elde edilmiş olur. Çöktürme esnasında kullanılan amonyum sülfat gramı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır [73].

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

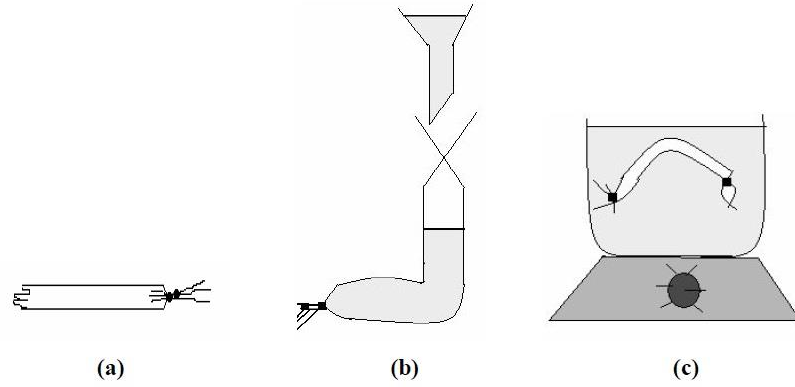
V : süpernatant hacmi.

S₁ : l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu.

S₂ : l'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu.

Çöktürme sırasında 0,1 M pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. İlk kademedede %35'lik çöktürme işlemi yapılmıştır. Amonyum sülfat ilavesinden önce ham özüt sıcaklığı 4°C'a getirilmiştir. (NH₄)₂SO₄ karıştırılarak yavaş yavaş eklenir ve her eklemekten önce bir önceki amonyum sülfatın iyice çözünmesi beklenir. (NH₄)₂SO₄ eklendikten sonra karışım 1 saat boyunca buz banyosunda karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 15000 devir dk⁻¹'da 20 dakika santrifüj yapılarak süzüntü ve çökelti birbirinden ayrılmıştır. Süzüntüye tekrar amonyum sülfat eklenerek amonyum sülfat doygunluğu %80'e yükseltilmiş, bu işlem +4°C'ta yavaş yavaş yapılmıştır. Ekleme bittikten sonra karışım yine 1 saat +4°C'ta karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 15000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılarak süzüntü ve çökelti birbirinden ayrılmış, çökelti şeklinde çöken enzim proteinleri toplanarak biraraya getirilmiştir [74].

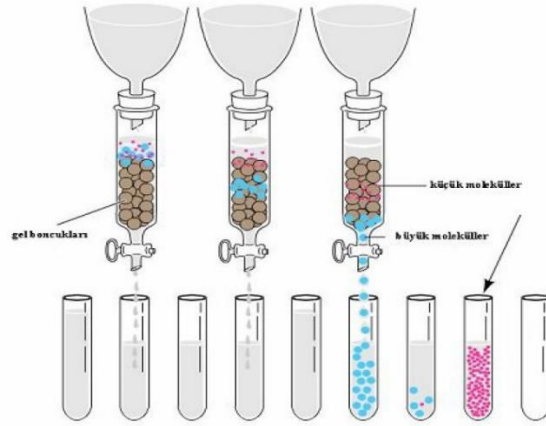
Enzim %80 amonyum sülfat doygunluğuyla çökelek olarak elde edildikten sonra toplanan çökeltilere çok az 0,1 M pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi eklenerek 5,0 ml'ye tamamlanmış ve içerdiği amonyum sülfat tuzunu uzaklaştırmak amacıyla diyaliz yapılmıştır. Diyaliz işleminden önce diyaliz tüpleri şartlandırılmıştır. Bu amaçla tüpler 6 cm boyunda kesilmiş, %2 NaHCO₃ ve %0,05 EDTA içeren çözeltide 10 dakika kaynatılmış, daha sonra ise saf suda 10 dakika kaynatılmıştır (2 defa). Bu şekilde şartlandırılan tüpe çökelek konularak iki ucundan bağlanmış ve 0,01 M pH 7,0 fosfat tamponuyla diyalize tabi tutulmuştur (Şekil 3.1). Diyaliz için diyaliz tüpü 5 litre tampon çözeltisi içinde sabit duracak şekilde yerleştirilmiş ve tampon çözelti devamlı karıştırılmak suretiyle +4°C'ta 6 saat süreyle diyaliz yapılmıştır. Tampon çözeltisi değiştirilerek bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır [75].



Şekil 3.1. Diyalizin uygulanışı: a) Diyaliz düzeneği, b) Tüpün çözelti ile doldurulması, c) Diyaliz.

3.2.4. Sephadex G-100 Afinite Kolonuyla Saflaştırma

Jel filtrasyon kromatografisinde maddeler molekül büyüklüklerine (molekül ağırlıklarına) göre ayrıştırılır. Burada kullanılan Sephadex jelleri farklı şişme özelliklerine sahiptir. Sephadex® (Sefadeks) modifikasyonlu bir dekstrandır. Dekstran üç boyutlu polisakkarid ağından oluşan bir makromoleküldür. Dekstranların bileşiminde glukoz bulunur ve bu glukozlarda yer alan hidroksil gruplarının çok olması Sephadex'e yoğun hidrofilik karakter kazandırır ve bu nedenle Sephadex suda şişme özelliği gösteren bir jeldir. Farklı boncuk büyüklüğüne sahip çeşitli Sephadex tipleri mevcuttur ve bunlar farklı şişme özellikleri gösterir. Sephadex'in boncuk büyüklüğü saflaştırılması istenen proteinin molekül büyüklüğüne göre seçilir. Sephadex'i oluşturan boncuklar gözenekli bir yapıya sahiptir ve bu boncuk yapıları arasında da boşluklar yer alır. Yüksek molekül ağırlıklı proteinler gözeneklere giremez ve boncuklar arasındaki boşluklardan geçerek yürür, daha küçük proteinler ise, boncuklardaki gözeneklere girip çıkarak ilerler, gözeneklerde bir süre kalır sonra çözücü tarafından sürüklenir ve ilerler, bu durum küçük moleküllerin daha yavaş ilerlemesine neden olur. Böylece elüsyon esnasında, önce bu yüksek molekül ağırlıklı proteinler elue olur daha sonra düşük molekül ağırlıklı proteinler gelir. Sonuç olarak proteinler kolondan azalan molekül büyüklüğüne göre elue olurlar. Jel filtrasyon metoduna "size-exclusion chromatography" (molekül büyüklüğüne göre ayrılma) adı da verilir (Şekil 3.2). Sephadex jel malzemeleri kullanıldıktan sonra temizlenip tekrar kullanılabilirler.



Şekil 3.2. Değişik büyüklüğe sahip maddelerin afinite kolonu ile ayrıştırılması.

Diyalize tabi tutulan enzim çözeltisi kolon kromatografisi (jel geçirgenlik kromatografisi) ile daha ileri düzeyde saflaştırılır. Bunun için 50 cm uzunluğunda ve 1,0 cm çapında kolon kullanılmıştır. Dip kısmına cam pamuğu yerleştirilir. Kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-100 kullanılmıştır. Bu dolgu maddesi literatürde polifenol oksidaz enziminin ayrıştırılmasında en sık tercih edilen kolon dolgu malzemesidir ve bu nedenle burada da aynı malzeme kullanılmıştır. 2 gram Sephadex G-100 alınarak 40 mL 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içinde 2 gün jelleşmesi için bekletilmiş ve daha sonra boşluk kalmayacak şekilde kolona yerleştirilmiştir. Kolon işlem öncesi 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ile şartlandırılmıştır. Şartlandırma işlemi yukarıdan eklenen tampon ile aşağıdan alınan tamponun pH'ı aynı olana kadar devam edilip akış hızı $0,3 \text{ mL dk}^{-1}$ 'a ayarlanmıştır. Daha sonra diyaliz tüpünden alınan enzim çözeltisi kolona beslenmiş ve sonra ayırma işlemi bitene kadar kolondan devamlı kolona 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu geçirilmiştir. Bütün işlemler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. 3'er mL'lik eluatlar toplanarak ve her birinin 280 nm'de absorbans değerlerine bakılmıştır ve son toplanan eluatlardaki protein miktarı sıfırlanincaya kadar eluat toplanmasına devam edilmiştir. Bu dalga boyunda absorbans gösteren eluatların enzim aktiviteleri kontrol edilmiştir. Substrat çözeltisi olarak 0,1 M pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ katekol çözeltisi kullanılmış, aktivite ölçümü kuvartz küvete 1,0 mL enzim çözeltisi ve üzerine 2,0 mL substrat çözeltisi eklenerek yapılmıştır. Aktivite gösteren eluatlar seçilerek birleştirilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere enzim kaynağı olarak -18°C 'de saklanmıştır [76,77].

Saflaştırma sonuçları % verim ve saflaştırma derecesi hesaplanarak verilir.

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{Toplam Aktivite (U)}}{\text{Toplam Protein (mg)}} \quad 3.1$$

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Saf Enzimin Toplam Aktivitesi (U)}}{\text{Ham Özütün Toplam Aktivitesi (U)}} \quad 3.2$$

$$\text{Saflaştırma Derecesi} = \frac{\text{Saf Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)}}{\text{Ham Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)}} \quad 3.3$$

3.2.5. Spektrofotometre ile Enzim Aktivitesi Tayini

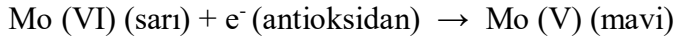
Çözeltiler toplam hacim 3 mL olacak şekilde enzim çözeltisi, substrat çözeltisi ve 0,1 M pH 7 fosfat tampon çözeltisi karıştırılarak hazırlanır. Substrat çözeltileri 0,1 M pH 7 fosfat tamponunda hazırlanır. 0,1 mL enzim çözeltisi kuvarz küvete konur ve üzerine 2,9 mL substrat çözeltisi eklenir. Eklendiği an kronometre çalıştırılarak 410 nm'de 90 saniye boyunca oda sıcaklığında absorbans ölçümleri yapılır. Böylece enzimin substratla bir araya gelmesi sonucunda oluşan enzimatik reaksiyonun sonucunda oluşan ürün miktarındaki artış ölçülmüş olur [78]. Bütün ölçümler 3 kere tekrarlanır ve ortalama değer alınır. Absorbansa karşılık zaman grafiğinin başlangıçtaki doğrusal kısmından tepkime hızı saptanır. Bir ünite PPO enzim aktivitesi, 25 °C'da 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

3.2.6. Protein Tayini

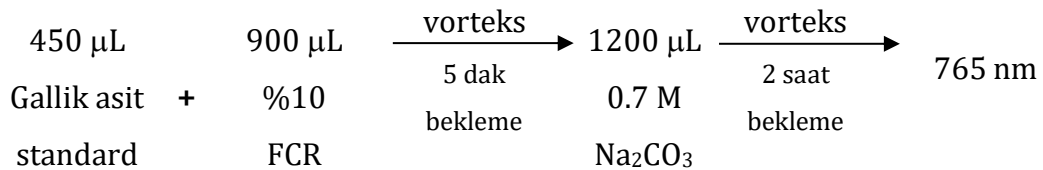
Ham özüt ve jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen eluatlarda kantitatif protein tayini yapılmıştır. Eluatların 280 nm'de absorbans ölçümleri yapılmış, sığır serum albümini (BSA) ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak eluatlardaki protein miktarları saptanmıştır. Sığır serum albümininden derişimleri 0,05 – 1,00 mg mL⁻¹ arasında olan 7 adet standart hazırlanmıştır. Protein moleküllerini oluşturan bazı amino asitlerde aromatik halka bulunur ve bu halka bu proteinlerin 280 nm'de UV ışınlarını absorplamalarına neden olur.

3.2.7. Polifenollerin Tayini

Topam fenolik madde miktarını tayin etmek için kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi Singleton ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [79]. Yöntemde, su ve organik çözücülerde çözülmüş bulunan polifenolik bileşikler bazik ortamda Folin reaktifi ile renkli kompleks oluşturur ve bu komplekslerin absorbansları ölçülerek fenolik madde içeriği saptanır. Bir molibdofosfotungstik heteropoliasit ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) olan bu reaktif Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) olarak adlandırılır ve yöntem de bu isimle anılır. Mo (VI) reaktifin aktif merkezidir.



Yöntem uygulanırken ortamın pH'ı Na_2CO_3 çözeltisiyle 10'a ayarlanır. Fenolik bileşikten bir proton ayrılarak, FCR'yi indirgeyebilen fenolat anyonu oluşturur ve fenolatlarla FCR birleşerek mavi kompleksler oluşturur. FCR'yi fenolikler dışında pekçok madde indirgeyebilir dolayısıyla bu yöntem fenoliklere özgü değildir ve aslında numunenin indirgeme kapasitesini ölçer. Numunede bulunabilecek askorbik asit ve benzeri indirgen maddelerle de indirgenebilir [80]. Folin-Ciocalteu yöntemi, bu dezavantaja rağmen sık kullanılır çünkü basit, duyarlı, kesinliği ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemdir. Yöntemde kullanılan standart fenolik madde genellikle gallik asittir ve analiz sonuçları gallik asit eş değeri şeklinde verilir. 0,5 – 2,5 mM aralığında farklı derişimlerde gallik asit standartları hazırlanır. Standartlardan 450 μL alınır ve aşağıdaki yöntem uygulanır. 2 saat beklendikten sonra çözeltilerin 765 nm'de absorbansları ölçülür ve kalibrasyon grafiği oluşturulur. Numunelerin ölçümünde standart yerine 450 μL örnek alınır ve yöntem aynı şekilde uygulanır. Kör için 450 μL distile su kullanılır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinde numunelerin absorbansı yerine konarak total polifenol derişimleri gallik asit eşdeğeri olarak saptanır.



3.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi ve Kinetik Parametrelerin Tayini

Enzimin kinetik parametrelerini yani maksimum tepkime hızı (V_{max}) ve Michaelis sabitini (K_m) tayin etmek için Michaelis – Menten yöntemi kullanılmıştır. Birinci ve ikinci yöntemle yapılan ekstraksiyondan elde edilen ham enzim özütleri için katekol derişimi sırasıyla 0,001 – 0,100 M aralığındaki ve 0,0001 – 0,0200 M aralığındaki değerlere ayarlanarak PPO tepkime hızı ölçümleri yapılmıştır (enzimin katekole reaksiyonu sonucu oluşan kinonoik ürünün absorbtivitesi, $\epsilon = 1623 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [65]. Tepkime hızına (V) karşılık substrat derişimi ($[S]$) alınarak Michaelis – Menten grafiğı çizilmiştir. Bu grafikten Lineweaver – Burk grafiğı yani $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiğı elde edilmiş, bu grafikten de V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.2.9. Enzim Aktivitesi ve pH

Enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan substratın hazırlandığı tampon pH'ı 3,0 – 9,0 aralığında taranmış ve optimum ölçüm pH'ı saptanmıştır. pH 3,0 – 5,5 arası $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$ tamponuyla, pH 6,0 – 7,5 arası $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponuyla, pH 8,0 – 9,0 arası ise $\text{TrisHCl} - \text{TrisBase}$ tamponuyla ayarlanmış, tüm tamponlar 0,1 M derişiminde hazırlanmıştır. Katekol substratı $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ olacak şekilde kullanılmış ve aktivite ölçümlerinde 0,5 mL ham enzim çözeltisine 2,5 mL katekol çözeltisi eklenmiştir.

Optimum ekstraksiyon pH'ını saptamak amacıyla ekstraksiyonlar pH'ı 3,0 – 9,0 değerleri arasına ayarlanmış tamponlarla yapılmış ve yukarıda verilen tamponlar kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde substrat çözeltisi pH'ı 6,8 olarak alınmış (0,1 M fosfat tamponu), $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ derişiminde katekol çözeltisi kullanılmış ve aktivite 0,5 mL ham enzim çözeltisine 2,5 mL katekol çözeltisi eklenerek ölçülmüştür.

pH kararlılık deneyinde ham enzim özütü, pH'ı 3,4 – 10,0 arasındaki değerlere ayarlanan tampon çözeltide bekletilmiştir. Bunun için 0,5 mL enzim çözeltisine 2,0 mL 0,1 M tampon eklenmiş, 24 saat beklemenin ardından 0,5 mL katekol çözeltisi (son derişim $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ olacak şekilde ve bekletme tamponunda hazırlanmış) eklenerek aktivite ölçümü yapılmıştır. pH 3,4 – 5,5 arası $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$

tamponuyla, pH 6,0 – 7,5 arası NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 tamponuyla, pH 8,0 – 9,0 arası TrisHCl – TrisBase tamponuyla, pH 9,5 – 10,0 arası ise NaHCO_3 – Na_2CO_3 tamponuyla ayarlanmış, tüm tamponlar 0,1 M derişiminde hazırlanmıştır.

Ölçüm pH'ı optimizasyonunda ve pH kararlılık deneyinde kullanılan ham enzim özütü 2,5 g mantara 50 mL ekstraksiyon çözeltisi (1 mM PMSF içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu) eklenerek hazırlanmıştır.

3.2.10. Enzim Aktivitesi ve Sıcaklık

Sıcaklığın enzim aktivitesine olan etkisini incelemek amacıyla ham enzim ekstraktı hazırlanmıştır. Ekstraksiyon 2,5 g mantara 50 mL ekstraksiyon çözeltisi (1 mM PMSF'e sahip 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu) eklenerek yapılmıştır. Ölçümlerde kullanılan katekol çözeltisi $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ olacak şekilde pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Ham enzim ekstraktı 0 – 60 °C arasındaki sıcaklıklara ayarlanmış su banyosunda 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 60 dakika boyunca bekletilmiş ve ardından aktivite ölçümü yapılmıştır.

3.2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

İnhibitörlerin etkisini araştırmak amacıyla sodyum sülfid, sodyum metabisülfid, hidrokinon, NaCl , EDTA, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, salisilik asit, tartarik asit, tiyoüre, sodyum benzoat, sodyum azid kullanılmıştır. 10 mM katekol varlığında inhibitör derişimi, 0,2 – 10,0 mM aralığındaki derişimlere ayarlanarak enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır.

BÖLÜM 4

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. ENZİM ELDESİ

Polifenol oksidaz enziminin eldesi çok aşamalı ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri gerektirir. Bu işlemler pekçok basamak içerir ve bu durum enzimin maliyetini yükseltir. Bu nedenle enzim eldesinde işlem basamaklarının basitleştirilmesi ve verimin artırılması üzerine çalışmalar devam etmekte ve bu yolla maliyet düşürülmeye çalışılmaktadır. Burada Karabük Sırtıgökçe mantarından polifenol oksidaz enziminin eldesi üzerine çalışılmış ve çalışmalar verimin artırılması yönünde olmuştur.

4.1.1. Ham Enzim Özütünün Elde Edilmesi

Ekstraksiyon verimini artırması beklenen malzemeler denenerek ham özütü en iyi enzim aktivitesinin elde edildiği ekstraksiyon prosedürü belirlenmiştir. Buna göre ham enzim özütünün hazırlanmasında kullanılan 2. yöntemin daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği, kinetik parametrelere bakıldığında ise daha yüksek V_{max} ve daha düşük K_m elde edildiği görülmüştür.

4.1.2. Ham Enzim Özütüne PVP Derişiminin Etkisi

Polivinilpirolidon polifenolik maddelerle hidrojen bağı yapan bir yapıya sahiptir ve PVP ile birleşen polifenolikler ortamda çökelti oluşturur. Ham enzim özütü hazırlanırken homojenizasyondan sonra bu çökelti süzülerek ortamdan uzaklaştırılır ve bu yolla ortam polifenoliklerden temizlenmiş olur. Polivinilpirolidon derişimi %0,05–1,00 değerleri arasında değiştirilerek her bir yüzdeyle ekstraksiyonlar yapılmıştır ve ekstraksiyonların sonunda yapılan enzim aktivite ölçümleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.

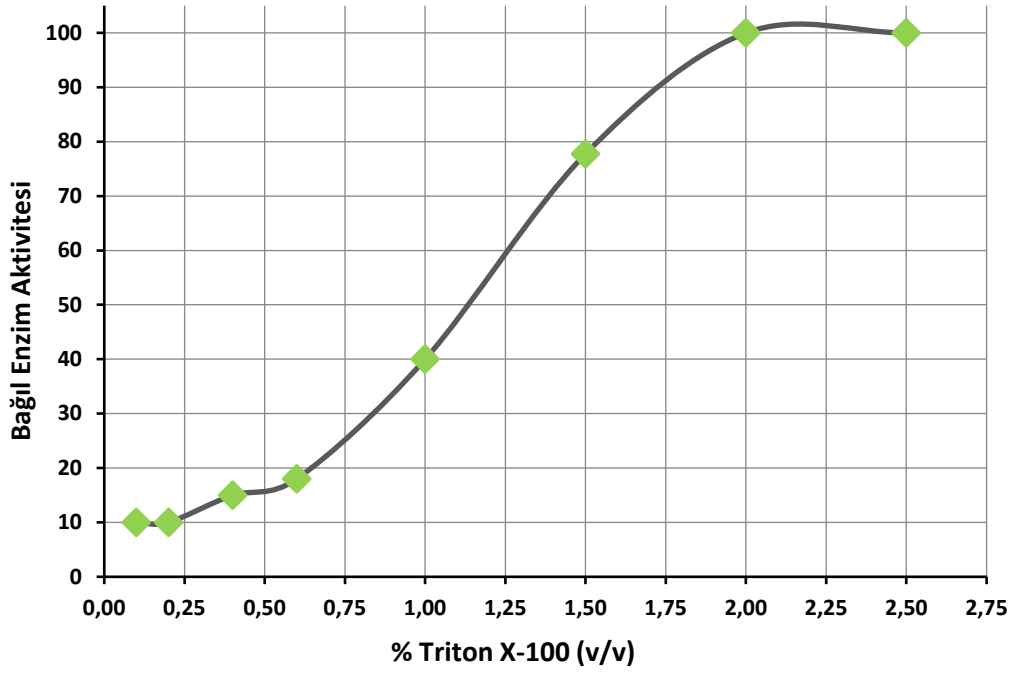
Çizelge 4.1. PVP derişiminin enzim aktivitesine etkisi.

PVP (%)	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mL}^{-1}$)
0,05	2,140
0,10	2,063
0,20	2,174
0,40	2,085
0,60	2,118
0,80	2,074
1,00	2,118

Enzim aktiviteleri birbirine yakın çıkmış ve kayda değer bir fark gözlenmemiştir. PVP etkisinin ekstraksiyondan hemen sonra görülmemesi normaldir ve bu etki zamanla raf ömrü incelemeleriyle belirlenebilecek bir parametredir. Bu nedenle literatürde çok kullanılan PVP yüzdesi %0,5 seçilerek deneyler bu yüzdeyle devam ettirilmiştir.

4.1.3. Ham Enzim Özütüne Triton X-100 Derişiminin Etkisi

Enzim saflaştırma araştırmalarında en çok kullanılan yüzey aktif maddelerden biri Triton X-100'dür. Ekstraksiyonda elde edilen enzim miktarını artırmak amacıyla kullanılır. Burada, yüzey aktif maddenin ekstraksiyon verimine etkisini araştırmak amacıyla, %0,1– 2,5 (v/v) aralığındaki derişimlerde Triton X-100'e sahip ekstraksiyon çözeltileri kullanılmış, herbir derişimde ekstraksiyon yapılarak alınan ham özütlerle aktivite tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi yüzey aktif maddenin konsantrasyonu değiştirilerek enzim aktivitesi takip edilmiş ve maksimum aktivite %2 Triton X-100 derişiminde görülmüştür. Triton X-100'ün ekstraksiyon enzim miktarını artırmasının yanında enzimin dayanımını artırdığı da gözlenmiştir. Bu yüzey aktif madde ilave edilmeden hazırlanan ham özütler birkaç gün dayanabilirken, Triton X-100 ile hazırlanan ham özütlerin dayanımı daha yüksek olmakta ve +4 °C'de bir aya yakın süreler bozulmadan kalabilmektedir.



Şekil 4.1. Triton X-100 derişimi ve enzim aktivitesiyle ilişkisi.

4.2. SAFLAŞTIRMA İŞLEMLERİ

4.2.1. Amonyum Sulfatla öktürerek Ayırma ve Diyaliz

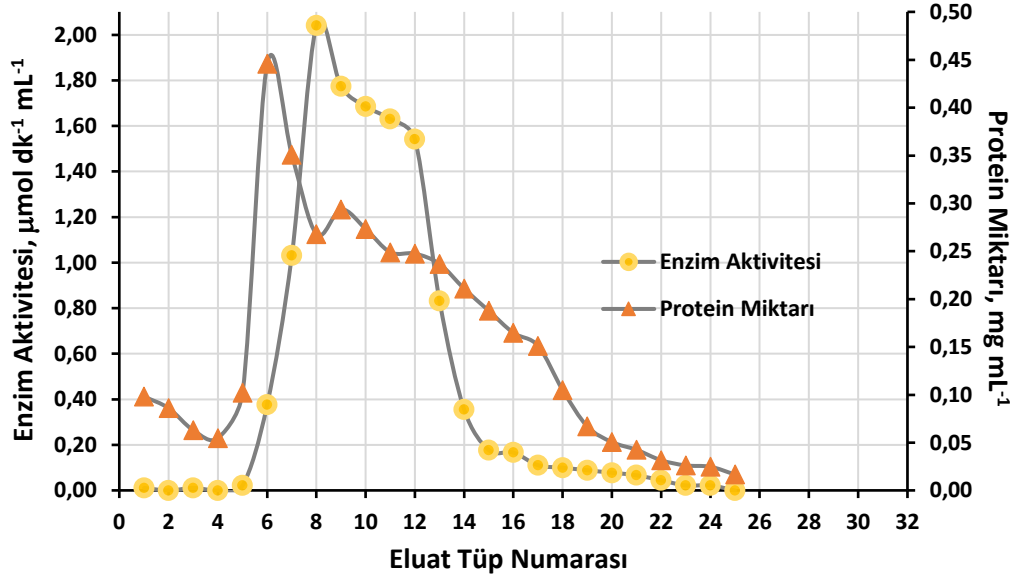
Saflaőtırmanın ilk aőaması olarak amonyum sulfat çöktürmesi yapılır. Daha sonra diyalize konur. Diyalizden çıkan enzim çözeltisi diyaliz tüpünden alınarak 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu eklenerek 5,0 mL'ye tamamlanır.

Tüm örneklerde enzim aktivite ölçümü ve protein analizi yapılmış ve beklenen aktivitenin ökeltelerde olduğu saptanmıştır. Bu sonuca dayanarak saflaştırma işlemleri çökeltilere uygulanarak devam edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda düşük doygunluk aőamasına gerek olmadığı, yüksek doygunluk aşamasında ise %80 amonyum sulfat doygunluğunun yeterli olduğu saptanmıştır.

4.2.2. Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma

Diyalizden alınan enzim çözeltisi jel kromatografisi ile saflaştırılır. Sephadex G-100 dolgu maddesi ile hazırlanan kolona enzim çözeltisi uygulanır ve 0,1 M pH 7,0 fosfat

tamponu 0,3 mL dk⁻¹ hızla kolondan geçirilerek eluatlar toplanır. Toplam 25 adet 3 ml'lik eluat toplanmış, her birinin 280 nm'de absorbansına bakılarak protein miktarları hakkında fikir edinilmiştir. Aynı şekilde her eluatın enzim aktivitesine de bakılmış ve Şekil 4.2'de görülen kolon elusyon profili elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi eluat no 8-12'de gözlenmiştir. Jel kromatografisi sonucu elde edilen yüksek aktiviteli eluatlar birleştirilmiş ve saf enzim çözeltisi elde edilmiştir.



Şekil 4.2 Kolon elusyon profili.

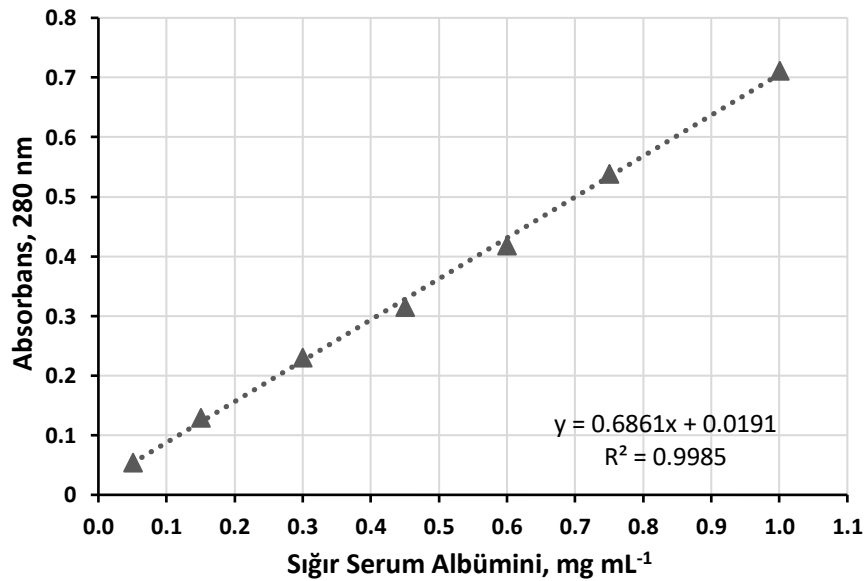
Ekstraksiyon ve kromatografik saflaştırma işlemlerinden alınan verim ve saflaştırma sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Saflaştırma verimi % 11,30 olarak hesaplanmış ve 9,33 kat saflaştırma gerçekleştiği saptanmıştır.

Çizelge 4.2. Saflaştırma verimi ve saflaştırma derecesi.

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
Ekstraksiyon (ham özüt)	38,00	6,10	231,80	8,90	338,20	0,69	—	—
Kromatografi (saf enzim)	15,00	1,74	26,10	0,27	4,05	6,44	11,30	9,33

4.2.3. Protein Tayini

Ham özüt ve eluat çözeltilerinde kantitatif protein tayini yapılmıştır. 280 nm’de ham özüt ve eluatların absorbansı ölçülmüş, sığır serum albümini ile hazırlanan ve Şekil 4.3’de verilen kalibrasyon grafiğinde bu absorbans değerleri yerine konarak çözeltilerdeki protein içeriği mg mL^{-1} olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir. Sığır serum albümini çözeltileri 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



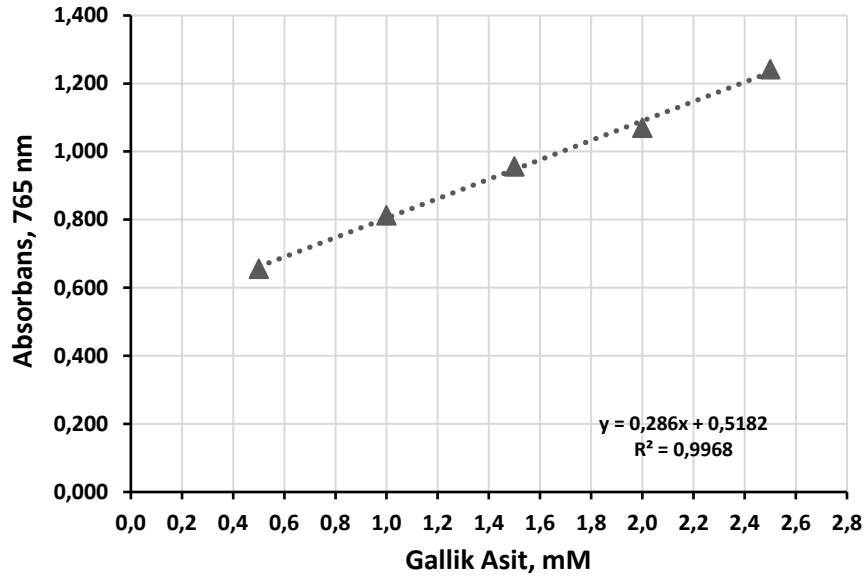
Şekil 4.3. Sığır serum albümini kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 4.3. Ham özüt ve saf enzim çözeltisinin protein içerik değerleri.

	Protein Derişimi, mg mL ⁻¹
Ham Özüt	8,903
Saf Enzim Çözeltisi	0,266

4.2.4. Polifenoliklerin Tayini

Polifenoller PPO enzimi etkisiyle kinonoik yapılara dönüşür. Bu yapılar polimerleşir ve kırmızımsı kahverengi pigmentler oluşturur. Kinonların ayrıca enzimi inhibe edici etkisi vardır. Bu inhibisyonu engellemek ve pigment oluşumuna mani olmak için polifenoliklerin PPO çözeltisinden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla ekstraksiyon esnasında çözeltiye PVP eklenir. PVP ile ayrılamayan polifenolik maddelerin bir kısmı diyaliz esnasında temizlenir, geri kalanlar ise kromatografik ayırma sırasında uzaklaştırılır ve saflaştırılmış enzim elde edilir. Enzimin saflaştırma aşamalarından elde edilen ham özüt, diyaliz sonrası enzim çözeltisi ve kromatografi sonrası elde edilen saf enzim çözeltisinde polifenolik madde miktarlarını saptamak amacıyla Folin-Ciocalteau yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla gallik asit standartlarına Folin-Ciocalteau yöntemi uygulanarak kalibrasyon grafiği hazırlanmış (Şekil 4.4), aynı şekilde ham özüt ve saf enzim çözeltisine de aynı yöntem uygulanarak bu çözeltilerdeki toplam polifenolik miktarı tayin edilmiştir. Değerler Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ekstraksiyon sırasında PVP ile bağlanan ve süzülerek uzaklaştırılan polifenoliklerden geriye kalan miktar ham özütde 3,43 mM gallik asit eşdeğeridir. Bu miktar da kolonda temizlenmiş, kromatografi sonrası saf ve polifenoliklerden arınmış enzim çözeltisi elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Folin-Ciocalteu yöntemi kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 4.4. Saflaştırma aşamalarında polifenolik madde miktarları.

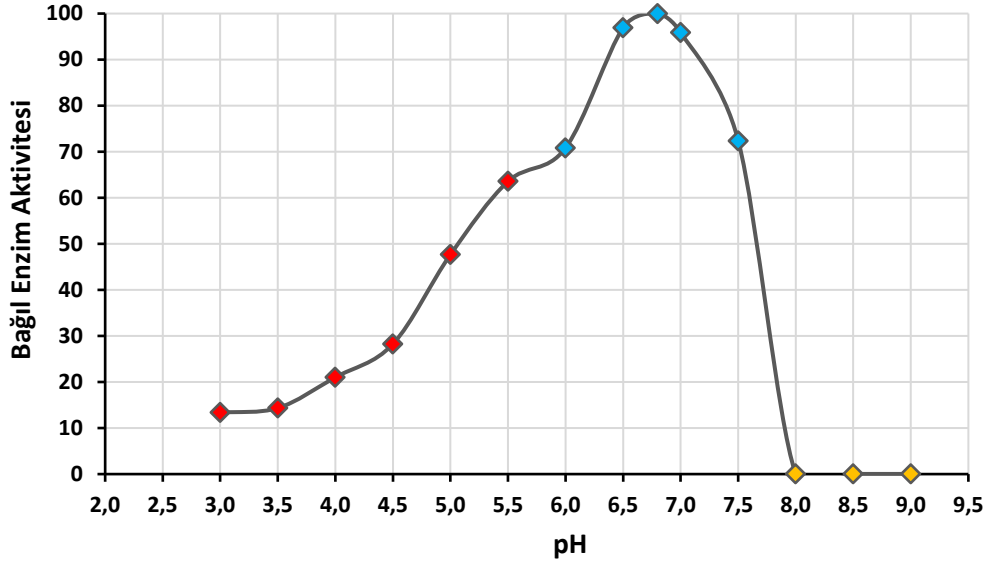
	Polifenol Derişimi, mM (gallik asit eşdeğeri)
Ham Özüt	3,43
Saf Enzim Çözeltilisi	0.00

4.3. pH VE SICAKLIK OPTİMİZASYONLARI

4.3.1. Ölçümlerde Kullanılan pH Optimizasyonu

Enzimin aktivite ölçümü sırasında kullanılan substratın hazırlandığı tampon pH'ı enzimle substrat bir araya geldiğinde enzimin yüklerini değiştirerek yapısını etkileyebilmektedir. Tampon pH değerleri 3,0 – 9,0 arasında taranmış ve optimum ölçüm pH'ı 6,8 olarak bulunmuştur. pH 6,5'a kadar aktivite giderek artmış, pH 6,5 – 7,0 arası ise yüksek aktivite görülmüştür. pH 6,8 ve 7,0 den alınan ölçümler birbirine çok yakındır ve bu bulguya dayanarak ölçümler pH 7,0 tamponuyla yapılmıştır (Şekil

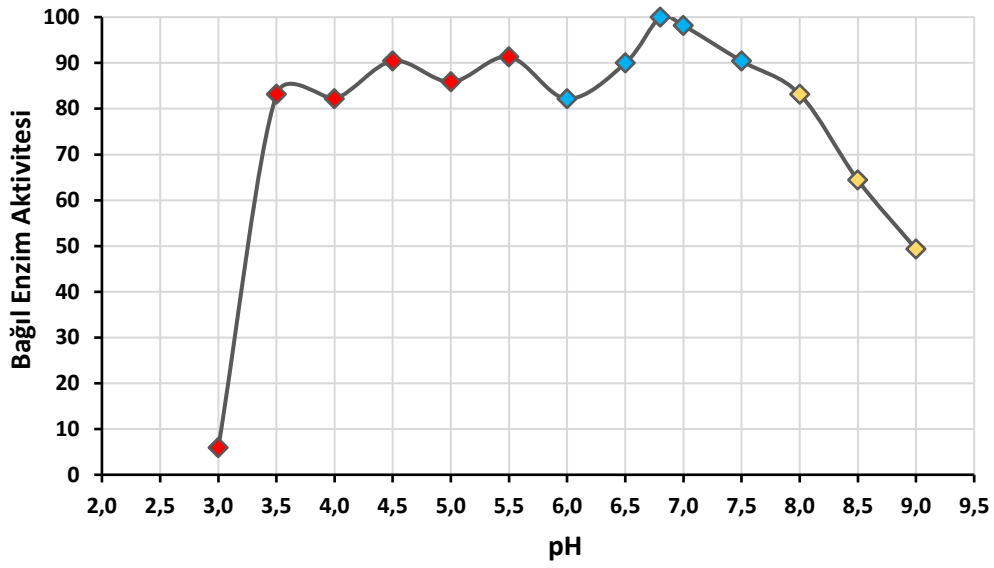
4.5). Literatürde PPO enzim çalışmalarında genellikle fosfat tamponu kullanıldığı için bu çalışmada da pH 7,0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ tamponu tercih edilmiştir.



Şekil 4.5. Enzim aktivitesine ölçümlerde kullanılan pH etkisi.

4.3.2. Ekstraksiyonlarda Kullanılan pH Optimizasyonu

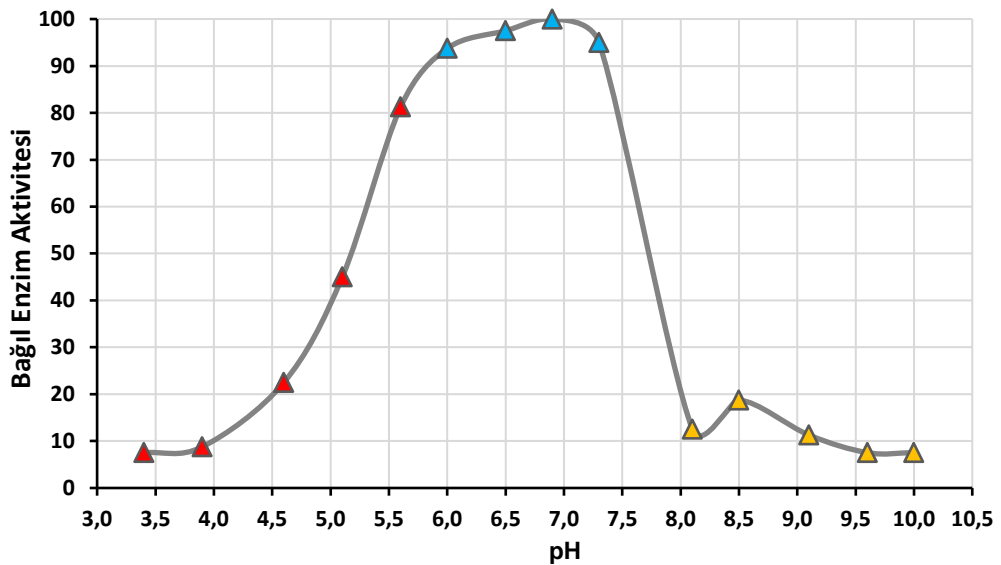
Enzim ekstraksiyonlarının yapıldığı tamponun pH'ı 3,0 – 9,0 değerleri arasında değiştirilmiştir. Herbir pH değerinde ayrı ayrı ekstraksiyon yapıp her pH için ham özüt elde edilmiş, bu özütlerle enzimin aktivite tayinleri yapılmış ve elde edilen grafik Şekil 4.6'da verilmiştir. Ekstraksiyonlar sonucunda yapılan aktivite tayinlerine bakılarak en iyi aktivite gösteren ekstraksiyon pH değeri pH 6,8 – 7,0 olarak saptanmıştır. pH 3,0'den sonra aktivite hızlı bir şekilde yükselmiş ve pH 3,5 – 8,0 arasındaki pH değerlerinde birbirine yakın aktivite değerleri çıkmıştır. pH 8,0'den sonra ise aktivite düşüşe geçmiştir.



Şekil 4.6. Enzim aktivitesine ekstraksiyon pH'ı etkisi.

4.3.3. Enzimin pH Kararlılığı

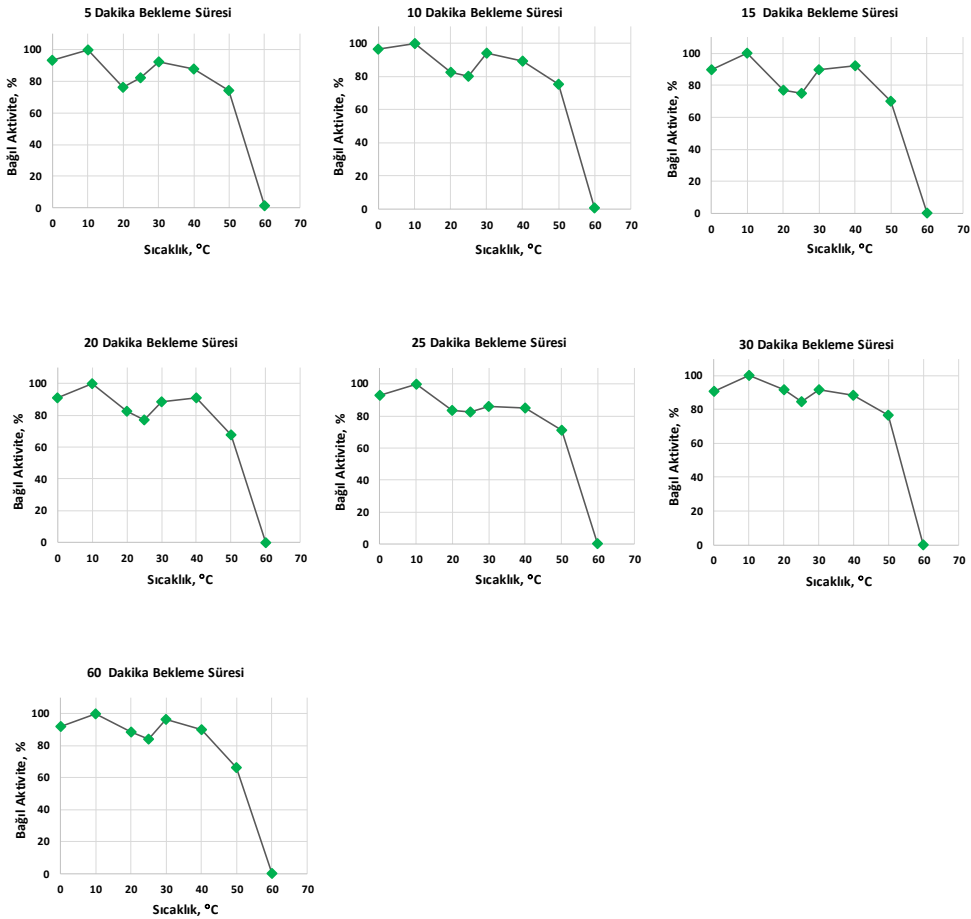
Russula cyanoxantha PPO enzimi kararlılık deneyi için tamponlar pH 3.4–10.0 arası değerlerde hazırlanmış ve bu tamponlarda +4 °C'da 24 saat bekletilen enzimlerle aktivite ölçümleri yapılarak enzimin pH kararlılık davranışı saptanmıştır (Şekil 4.7). Buna göre, enzim pH 6,0 – 7,3 arasındaki değerlerde en yüksek aktiviteyi göstermiş, pH 8,0'den sonraki pH'larda bekletilen enzim ise aktivitesini tamamen kaybetmiştir.



Şekil 4.7. PPO enzimi pH kararlılık grafiği.

4.3.4. Termal Kararlılık

Russula cyanoxantha mantarı PPO enziminin termal kararlılık deneyi için enzim çözeltilisi su banyosunda ayarlanan sıcaklıkta 60 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. 30 dakika boyunca her 10 dakikada bir ve en son 60 dakika dolduğunda ölçüm alınmış, katekolle yapılan tepkime hızı ölçümleriyle PPO aktivitesi saptanmıştır. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi 60 dakikaya kadar olan bekleme süreleri enzim aktivitesinde değişiklik yapmamış, enzim aktivitesini % 20 – 40 ’lık bir azalmayla 50 °C’ye kadar korumuş, 60 °C’de ise denaturizasyona uğrayarak aktivitesini tamamen kaybetmiştir. En yüksek aktivite 10 °C’de gözlenmiştir.



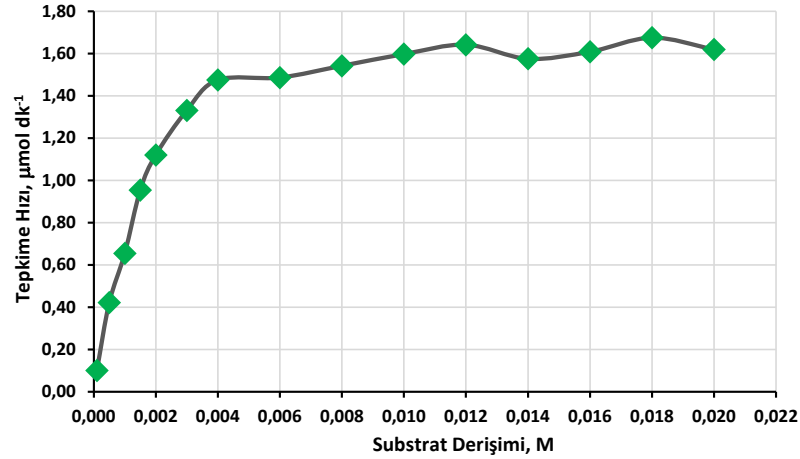
Şekil 4.8. Sıcaklık ve bekleme süresinin enzim aktivitesine etkisi.

4.3.5. Enzimin Depolanması

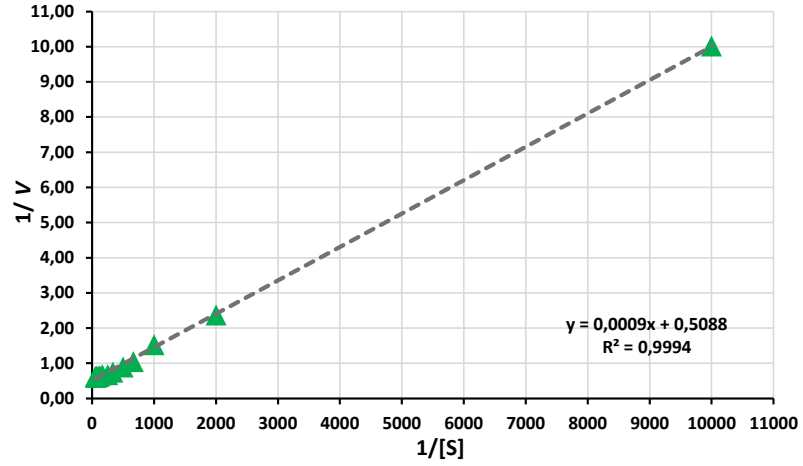
Yapılan deneylere göre *Russula cyanoxantha* PPO enzimi +4 °C'ta bir ay boyunca aktivite gösterebilmektedir. Bunun yanında, ölçümler enzimin –18 °C'ta aktivitesini koruyabildiği sürenin bir sene olduğunu göstermiştir.

4.4. ENZİMİN KİNETİK KARAKTERİZASYONU

Birinci yöntemle ekstrakte edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik parametrelerini (V_{max} ve K_m) tayin etmek için Michaelis – Menten yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 0,1 – 20,0 mM arasında konsantrasyona sahip olan katekol çözeltileri hazırlanmış ve 1,0 mL enzim çözeltisine 2,0 mL katekol eklenerek yapılan ölçümlerle tepkime hızına (V) karşılık substrat derişiminden ($[S]$) Michaelis – Menten grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.9). Daha sonra bu grafiğin x ve y değerlerinin resiprokalleri alınmış, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği (Lineweaver – Burk grafiği, Şekil 4.10) çizilmiştir. Lineweaver – Burk eşitliği kullanılarak bu grafikten elde edilen V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1,965 $\mu\text{mol dak}^{-1}$ ve 1,769 mM'dır (Çizelge 4.5).

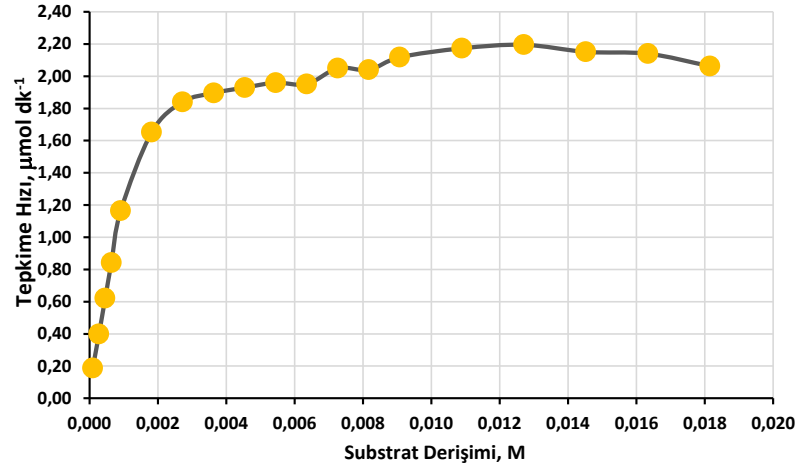


Şekil 4.9. Michaelis – Menten grafiği (birinci yöntemle elde edilen ham özüt).

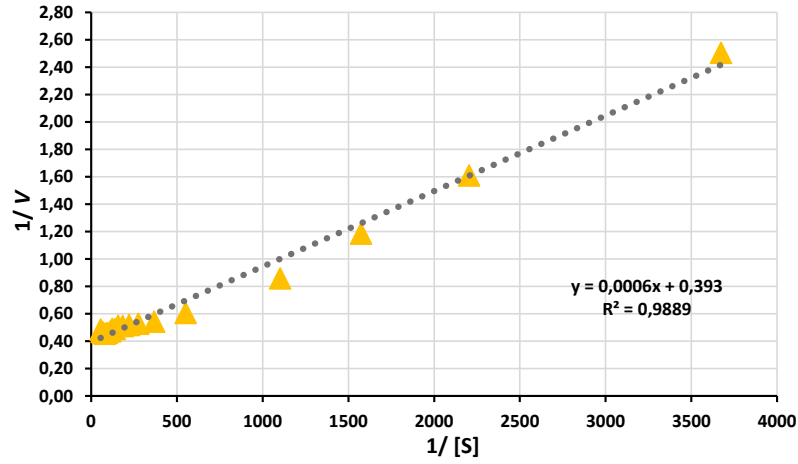


Şekil 4.10. Lineweaver – Burk grafiği (birinci yöntemle elde edilen ham özüt).

Aynı şekilde ikinci yöntemle ekstrakte edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik parametrelerinin tayini için 0,1 – 18,0 mM arasında konsantrasyona sahip olan katekol çözeltileri hazırlanarak herbir derişimle tepkime hızı ölçümü yapılmış ve Şekil 4.11’de görülen Michaelis – Menten grafiği çizilmiştir. Buradan Lineweaver – Burk grafiği (Şekil 4.12) elde edilerek V_{max} ve K_m değerleri $2,545 \mu\text{mol dak}^{-1}$ ve 1,530 mM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).



Şekil 4.11. Michaelis – Menten grafiği (ikinci yöntemle elde edilen ham özüt).



Şekil 4.12. Lineweaver – Burk grafiği (ikinci yöntemle elde edilen ham özüt).

Birinci ve ikinci yöntemle elde edilen ham özütlerin kinetik parametreleri karşılaştırıldığında, ikinci yöntemle elde edilen ham özütten elde edilen V_{max} değerinin birinciye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum ikinci yöntemle daha fazla enzimin ekstrakte edildiğini gösterir. Burada ikinci yöntemde kullanılan Triton X-100 yüzey aktif maddesi ekstraksiyon verimini artırmıştır. K_m değeri ise ikinci yöntemle elde edilen ham özütte azalmış yani enzimle substratı arasındaki afinite artmıştır. Bu durum, enzimin ikinci ekstraksiyon ortamında yani Triton X-100 varlığında substratıyla daha kolay buluşabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.5. PPO kinetik parametreleri.

	V_{max} ($\mu\text{mol dk}^{-1}$)	K_m (mM)
Ham Özüt (birinci yöntem)	1,965	1,769
Ham Özüt (ikinci yöntem)	2,545	1,530

4.5. FARKLI SUBSTRATLARIN ARAŞTIRILMASI

Russula cyanoxantha PPO enziminin farklı substratlara karşı davranışını gözlemlemek amacıyla katekol dışındaki bazı substratlar da denenmiştir. Substrat olarak fenol, *p*-

krezol, L-tirozin, 4-metilkatekol, 4-tertiyerbütilkatekol, L-DOPA, pirogallol ve gallik asit kullanılarak enzim aktiviteleri saptanmıştır.

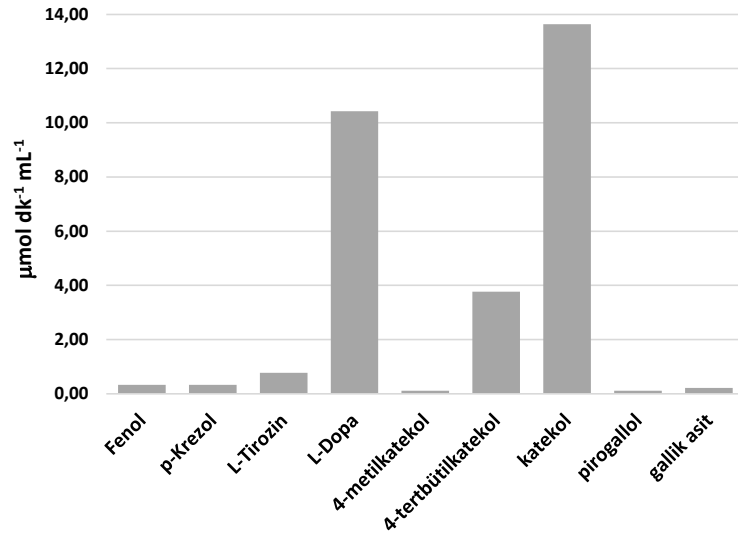
4.5.1. Enzim-Substrat İlişkisi

Enzim aktivite ölçümlerinde herbir substrattan oluşan kinonoik ürün farklı olduğu için aktivite ölçümünde her substrat için farklı dalgaboyunda absorbans ölçülür. Kinonoik ürünler birbirinden farklı olduğu için maksimum absorbans dalgaboyları da farklıdır. Substratlar katekolde olduğu gibi 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Çizelge 4.6’da substratların özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.6. Substratların özellikleri.

Substrat		λ (nm)
Fenol	Monofenol	410
L-Tirozin	Monofenol	475
p-Krezol	Monofenol	400
Katekol	Difenol	410
4-metilkatekol	Difenol	410
4-tertiyerbütilkatekol	Difenol	410
L-dopa	Difenol	475
Pirogallol	Trifenol	334
Gallik Asit	Trifenol	380

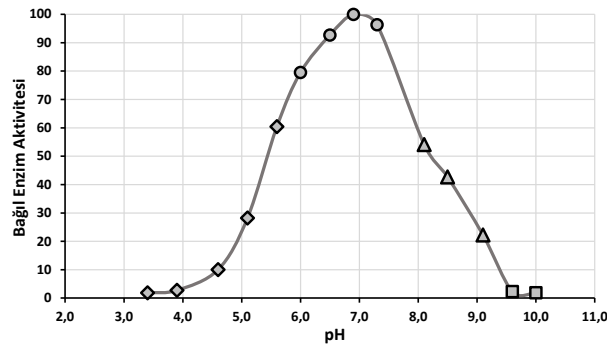
Şekil 4.13’de görüldüğü gibi *Russula cyanoxantha* PPO enziminin difenollerden L-Dopa ve katekole karşı aktivitesi yüksek çıkmış, monofenol ve trifenollere karşı ise aktivite göstermemiştir. En yüksek aktiviteyi katekol gösterdiği için bu çalışmada substrat olarak katekol tercih edilmiştir. L-DOPA ise ikinci en yüksek aktivite gösteren substrat olduğu için L-Dopa’nın da optimum pH ve sıcaklık değerleri saptanmış ve kinetik parametreleri tayin edilmiştir.



Şekil 4.13. Substratların enzim aktiviteleri.

4.5.2. L-DOPA-Ölçümlerde Kullanılan pH

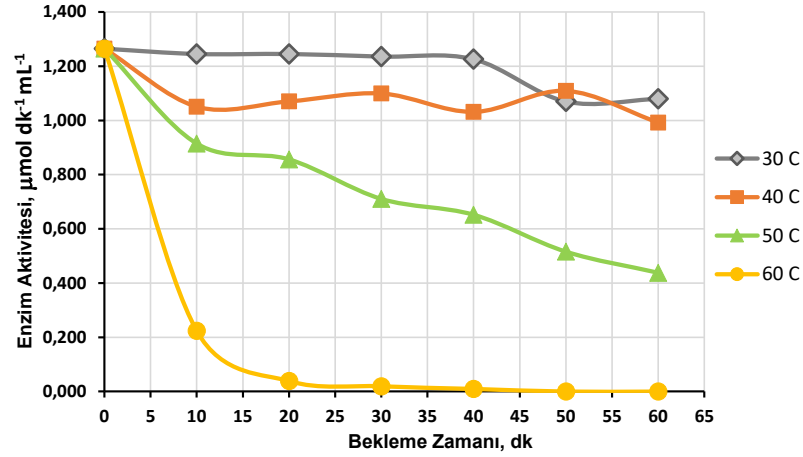
pH 3,4 – 10,0 arasındaki değerlerde tampon çözeltileri hazırlanmıştır. pH 3,4 – 5,5 arası $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$ tamponuyla, pH 6,0 – 7,5 arası $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponuyla, pH 8,0 – 9,0 arası $\text{TrisHCl} - \text{TrisBase}$ tamponuyla, pH 9,5 – 10,0 arası ise $\text{NaHCO}_3 - \text{Na}_2\text{CO}_3$ tamponuyla ayarlanmış, tüm tamponlar 0,1 M derişiminde hazırlanmıştır. Bu tamponlarla 10 mM derişiminde hazırlanan L-Dopa çözeltileriyle enzim aktivite ölçümleri yapılmış, ölçümlerde 0,5 mL enzime 2,5 mL L-Dopa çözeltisi eklenmiştir. Şekil 4.14’de verildiği şekilde maksimum aktivite ölçüm pH’ı 7,0 olduğunda elde edilmiştir. Daha aşağı ve daha yukarı pH değerlerinde aktivite azalmış, uç değerlerde ise aktivite enzim denatürizasyonu sebebiyle sıfırlanmıştır.



Şekil 4.14. L-Dopa ile ölçümlerde kullanılan pH ve enzim aktivitesi ilişkisi.

4.5.3. L-DOPA ile Sıcaklık Optimizasyonu

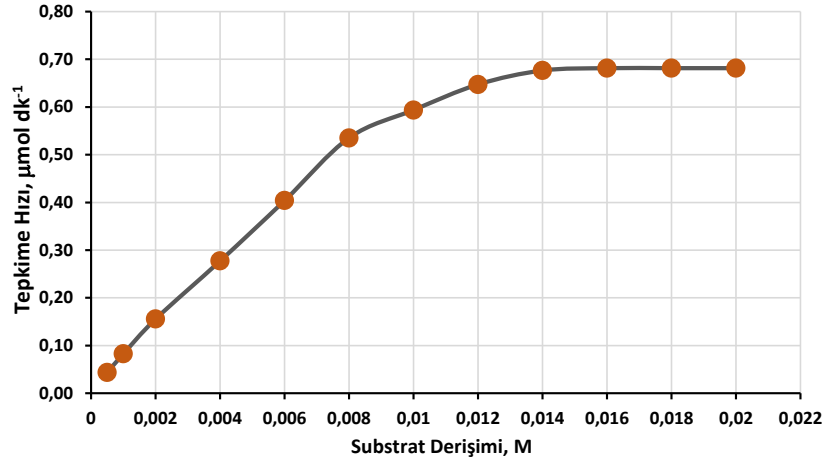
30 – 60 °C arasındaki sıcaklıklar taranmış ve enzim çözeltisi her bir sıcaklıkta 60 dk bekletilerek 10 dakikada bir 10 mM L-Dopa çözeltisiyle, 0,5 mL enzime 2,5 mL L-Dopa çözeltisi eklenerek ölçümler alınmıştır (Şekil 4.15). 30 °C’da bekletilen enzim 40 dk boyunca aktivitesini korumuştur. 40 °C’da ise enzim aktivitesi azalmış ama 50 dk boyunca aktivitesini devam ettirmiştir. 50 °C’da bekletilen enzim çözeltisi 60 dakika boyunca giderek azalan bir aktivite davranışı göstermiş, enzim çözeltisi 60 °C’da bekletildiğinde ise çok hızlı bir şekilde aktivitesini kaybetmiş ve enzim tamamiyle denatürize olmuştur.



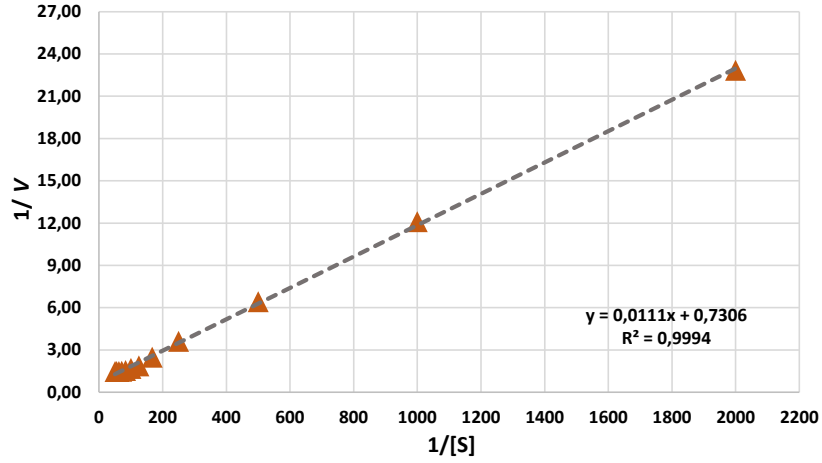
Şekil 4.15. L-Dopa ile yapılan enzim aktivite ölçümlerine ve sıcaklık.

4.5.4. L-DOPA ile Kinetik Parametrelerin Tayini

pH 7,0 fosfat tamponuyla 0,5 – 20,0 mM derişimleri arasında hazırlanan L-Dopa çözeltileri tepkime hızı ölçümlerinde kullanılarak Michaelis – Menten grafiği çizilmiş (Şekil 4.16), bu grafikten de Lineweaver – Burk grafiği (Şekil 4.17) elde edilerek kinetik parametreler saptanmıştır ($\epsilon_{L-DOPA} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [81]. V_{max} ve K_m sırasıyla $1,369 \text{ } \mu\text{mol dk}^{-1}$ ve $15,193 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16. L-Dopa Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.17. L-Dopa Lineweaver – Burk grafiği.

4.6. İNHİBİTÖR ETKİSİ

Katekol 10 mM derişimle kullanıldığında enzim aktivitesi (inhibitörsüz) 0,0206 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Aynı derişimdeki katekolün tabloda verilen inhibitörler varlığında gösterdiği aktivite Çizelge 4.7’de verilmiştir. NaCl’ün etkisi olmamış, diğer inhibitörlerin hepsi farklı oranlarda etki etmiş ve enzim aktivitesini düşürmüşlerdir. İnhibitör varlığında görülen enzim aktivitesinin, inhibitörsüz katekolle görülen enzim aktivitesine oranı alınarak Çizelge 4.8’de inhibitör varlığında görülen enzim aktivitelerinin % değerleri verilmiştir. İnhibitörsüz katekolle görülen enzim aktivitesi %100 olarak alınmıştır.

Çizelge 4.7. İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi.

	Enzim Aktivitesi, $\mu\text{mol dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$												
	Sodium Sulfite	Sodium Metabisulfite	Hydro quinone	NaCl	EDTA 2Na	Ascorbic Acid	Citric Acid	Benzoic Acid	Salycilic Acid	Tartaric Acid	Thiourea	Sodium Benzoate	Sodium Azide
0,2 mM	0,0184	0,0201	0,0192	0,0206	0,0214	0,0177	0,0220	0,0224	0,0216	0,0229	0,0083	0,0195	0,0192
0,5 mM	0,0180	0,0149	0,0042	0,0206	0,0215	0,0000	0,0216	0,0221	0,0215	0,0229	0,0019	0,0186	0,0165
1,0 mM	0,0000	0,0000	0,0011	0,0199	0,0188	0,0000	0,0205	0,0226	0,0206	0,0188	0,0018	0,0192	0,0139
2,0 mM	0,0000	0,0000	0,0008	0,0194	0,0222		0,0201	0,0177	0,0212	0,0185	0,0005	0,0201	0,0106
4,0 mM			,0008	0,0188	0,0211		0,0189	0,0203	0,0221	0,0184	0,0000	0,0203	0,0000
6,0 mM			0,0008	0,0206	0,0201		0,0185	0,0221	0,0193	0,0176		0,0207	0,0000
10,0 mM					0,0181			0,0180	0,0179			0,0223	

Çizelge 4.8. İnhibitör varlığında görülen bağıl enzim aktiviteleri.

	İnhibitör Varlığında Görülen Bağıl Enzim Aktiviteleri, %												
	Sodium Sulfite	Sodium Metabisulfite	Hydro quinone	NaCl	EDTA 2Na	Ascorbic Acid	Citric Acid	Benzoic Acid	Salycilic Acid	Tartaric Acid	Thiourea	Sodium Benzoate	Sodium Azide
0,2 mM	89,32	97,57	93,20	100,00	96,40	97,00	100,00	99,12	100,00	100,00	40,29	0,02	93,20
0,5 mM	87,38	72,33	20,39	100,00	96,85	0,00	98,18	97,79	99,54	100,00	9,22	0,02	80,10
1,0 mM	0,00	0,00	5,34	96,60	84,68	0,00	93,18	100,00	95,37	82,10	8,74	0,02	67,48
2,0 mM	0,00	0,00	3,88	94,17	100,00		91,36	78,32	98,15	80,79	2,43	0,02	51,46
4,0 mM			3,88	91,26	95,05		85,91	89,82	102,31	80,35	0,00	0,02	0,00
6,0 mM			3,88	100,00	90,54		84,09	97,79	89,35	76,86		0,02	0,00
10,0 mM					81,53			79,65	82,87			0,02	

BÖLÜM 5

SONUÇ

Bu çalışmada *Russula cyanoxantha* mantarından elde edilen ve redoks tipi bir enzim olan polifenol oksidaz enziminin biyokimyasal özellikleri incelenmiş ve kinetik karakterizasyonu yapılmıştır. *Russula cyanoxantha* mantarı ekstraksiyon çözeltisi ile parçalanarak PPO enzimi ham özüt şeklinde elde edilmiş daha sonra enzim amonyum sülfatla çöktürülmüş ve diyalizle temizlendikten sonra jel kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırma verimi %11,30, saflaştırma derecesi ise 9,33 olarak elde edilmiştir.

PPO enziminin substrat grubu polifenolik maddelerdir ve çalışmada katekol substratının yanında diğer bazı fenolikler de araştırılmıştır. Bu amaçla monofenolik, difenolik ve trifenolikler incelenmiş, monofenolikler (fenol, L-tirozin, p-krezol) ve trifenoliklerin (pirogallol, gallik asit) *Russula cyanoxantha* PPO'su tarafından yükseltgenemediği gözlenmiştir. Buna karşın enzim, difenoliklerden (katekol, L-Dopa, 4-metilkatekol, 4-tertbütilkatekol) katekol ve L-Dopa ile kayda değer bir aktivite göstermiş, sonuç olarak enzimin monofenolaz aktivitesi olmadığı ama difenolaz aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. En yüksek aktivite katekolle görüldüğü için çalışma boyunca bu substrat kullanılmış fakat ikinci en yüksek aktiviteyi gösteren L-Dopa'nın da sıcaklık ve pH optimizasyonu ve kinetik karakterizasyonu yapılmıştır.

Katekolle yapılan optimizasyonlarda en yüksek aktivite pH 7,0'de ve sıcaklık olarak da 10 °C'de gözlenmiş, yanısıra pH 6,5 – 7,0 aralığının da kullanılabilceği ve enzimin aktivitesini 50 °C'ye kadar koruduğu görülmüştür. Ekstraksiyonların pH 3,5 – 8,0 arasında yapılabileceği gözlenmiştir. Enzim pH 6,0 – 7,3 arasındaki değerlerde 24 saat boyunca aktivitesini korumuştur. L-Dopa ile yapılan optimizasyonlarda en yüksek aktivite pH 7,0'de ve sıcaklık olarak da 30 °C'de gözlenmiştir. Kinetik karakterizasyon sonucunda katekolle elde edilen V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1,965 $\mu\text{mol dak}^{-1}$ ve

1,769 mM olarak bulunmuş, L-Dopa ile elde edilen V_{max} ve K_m değerleri ise 1,369 $\mu\text{mol dak}^{-1}$ ve 15,193 mM olarak bulunmuştur.

Enzimler kimyasal katalizörlere göre daha avantajlı olduğu için endüstriyel uygulamalarda kullanımı giderek artmaktadır ve bu nedenle enzimlerin farklı malzemelerden elde edilmesine yönelik araştırmalar da giderek gelişimini sürdürmektedir. PPO enzimi bazı klinik kimyasalların sentezinde ve kozmetik endüstrisinde kullanılması yanısıra atık sulardan fenolik kirleticilerin uzaklaştırılmasında ve yine çevre sularında fenoliklerin tayininde kullanılır. Bu kullanım alanları sebebiyle PPO enziminin farklı kaynaklardan elde edilmesi, izolasyonu ve saflaştırılma çalışmaları ve karakterizasyonu önemlidir. Bu kaynaklardan en önemlisi mantarlardır çünkü mantardaki enzim miktarı diğer bitkisel kaynaklara göre çok daha yüksektir. Bu nedenle mantardan enzim saflaştırması PPO'nun endüstriyel kullanımı üzerine yapılan incelemeler bakımından önem taşımaktadır.

PPO ile ilgili diğer önemli bir husus da esmerleşme tepkimeleridir. Enzim hücre dışına çıktığı zaman ortamda bulunan fenolik maddeleri kırmızımsı kahve renkli kinonoik bileşiklere çevirir ve bitki, meyve veya mantardaki bu renk değişimi ortamdaki fenolik bileşik miktarına ve enzimin aktivitesine bağlıdır. Dolayısıyla esmerleşme reaksiyonlarının kontrolü PPO aktivitesinin kontrolüyle mümkündür ve enzimin aktivitesinin kontrolü enzim aktivitesini etkileyen etkenlerin iyi incelenmesini gerektirir. Enzim aktivitesi kontrolünde önemli bir etken de inhibitör kullanımıdır ve çalışmada enzimi inhibisyon olasılığı olan maddelerin enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu nedenlerle özellikle mantarlardan yapılan enzim izolasyonu ve enzimin karakterizasyonu çalışmalarına ihtiyaç vardır ve bu çalışmalar önemsenmektedir. Bu amaçla, bu çalışmada *Russula cyanoxantha* mantarı polifenol oksidazı araştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] 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).
- [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, 105-124 (1960).
- [4] Pekyardımcı, Ş. and Balaban, M. O., “High pressure CO₂ treatment on polyphenol oxidase activity”, *Turkish Journal of Chemistry*, 16 (2): 153-163 (1992).
- [5] Chang, S. T. and Wasser, S. P., “The cultivation and environmental impact of mushrooms”, *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science* (2017).
- [6] Boztok, K., “Mantar Üretim Tekniği”, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, İzmir, 50-60 (1990).
- [7] Erkel, D., “Dünyada ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi”, *2-4 Kasım, İstanbul, Bildiriler Kitabı*, Cilt 1: 2-8 (1992).
- [8] Sesli, E., “Trabzon Yöresinde Yetisen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma”, Doktora Tezi, *KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon (1994).
- [9] 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).
- [10] Khan, M. A. and Tania, M., “Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: An Overview”, *Food Reviews International*, 28 (3): 313-329 (2012).

- [11] 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).
- [12] Mattila, P., Outila, T., Piironen, V. and Lamberg-Allardt, C., “Bioavailability of vitamin D from edible mushrooms (*Chanterellus tubaeformis*) as measured with human bioassay”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 94-98 (1999).
- [13] Sesli, E. “Trabzon Yöresinde Yetisen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma”, Doktora Tezi, *KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon (1994).
- [14] Blackwell, W. H., “Poisonous and Medicinal Plant”, *Prentice Hall*, New Jersey (1998).
- [15] Campbell, M. K., “Biochemistry”, *Saunders College Publishing*, Chicago (1991).
- [16] Lineweaver, H. and Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constant”, *Journal of the American Chemical Society*, 56: 658-662 (1934).
- [17] 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).
- [18] 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).
- [19] He, Q. and Luo, Y., “Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce”, *Stewart Postharvest Review*, 6 (3): 1-7 (2007).
- [20] Mayer, A. M. and Harel, E., “Polyphenol oxidases in plants”, *Phytochemistry*, 18 (2): 193-215 (1979).
- [21] Friedman, M., “Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1523-1540 (1997).
- [22] Vamos-Vigyazo, L., “Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14: 44-129 (1981).
- [23] 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).

- [24] Sekme, S., “Çeşitli Mantarlarda Polifenol Oksidaz İndüksiyonunun İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul (2011).
- [25] 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).
- [26] Laurila, E., Kervinen R. and Ahvenainen, R., “The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits”, *Postharvest News and Information*, 9 (4): 53-66 (1998).
- [27] White, J. S. and White, D. C., “Source Book of Enzymes”, *CRC Press LLC*, Florida, 33431 (1997).
- [28] 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).
- [29] Sarkar, J. M., Leonowicz, A. and Bollog, J. M., “Immobilization of enzymes on clays and soils, Soil Biol”, *Biochemistry*, 21 (2): 223-230 (1989).
- [30] Harel, E., Mayer, A. M. and Shain, Y., “Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition”, *Plant Physiology*, 17: 921-930 (1964).
- [31] Padron, M. P., Lorano, J. A. and Gonsales, A. G., “Properties of *o*-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendish*”, *Phytochemistry*, 14: 1959 (1975).
- [32] 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).
- [33] Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. and O’Conner, K. E., “Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 486-492 (2004).
- [34] Pendharkar, M. B. and Nair, P. M., “Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation”, *Phytochemistry*, 13: 1373 (1964).
- [35] Mayer, A. M., “Polyphenol oxidases in plants – Recent progress”, *Phytochemistry*, 26: 11-20 (1987).

- [36] 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).
- [37] 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).
- [38] Solomon, E. I. and Lowery, M. D., "Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry", *Science*, 259: 1575-1581 (1996).
- [39] Hermann, K., "Über die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes", *Erwerbsastbau*, 16: 1 (1974).
- [40] Swain, T., "Economic Importance of Flavonoid Compounds", The Chemistry of Flavonoid Compounds, *Pergamon Press*, 513 (1962).
- [41] Yoruk, R. and Marshall, R. M., "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review", *Journal of Food Biochemistry*, 27: 361-422 (2003).
- [42] Erzençin, M., "Farklı kaynaklardan afinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir (2002).
- [43] 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).
- [44] 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).
- [45] Kim, Y. J. and Uyama, H., "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future", *Cellulose and Molecular Life Science*, 62: 1707-1723 (2005).
- [46] Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S. and Bae, H., "Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries", *Phytotherapy Research*, 21: 805-816 (2007).
- [47] Khan, M. T. H., "Heterocyclic Compounds Against the Enzyme Tyrosinase Essential for Melanin Production: Biochemical Features of Inhibition" Bioactive Heterocycles III. Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol 9, Khan M. T. H. (ed), *Springer*, Berlin (2007).

- [48] Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D. and Hayashi, N., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1446-1449 (2001).
- [49] Mathewson, P. R., “Enzymes”, *Eagen Press Handbook Series*, 37-38 (2000).
- [50] Mcweeny, D. J., “The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites”, *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25: 735 (1974).
- [51] Labuza, T. P., Lillemo, J. H. and Taoukis, P. S., “Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes”, *Fruit Processing*, 2: 9-13 (1992).
- [52] Eskin, N. A., “Biochemistry of foods”, *Academic Press*, New York, 90-92 (1990).
- [53] Mayer, A. M. and Harel, E., “Polyphenol oxidases in plants”, *Phytochemistry*, 18: 193-215 (1979).
- [54] Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. and Eskin, N. A., “Oxidative enzymes in foods”, *Elsevier Applied Science*, London and New York, 217-273 (1991).
- [55] Dewey, D. L., Butcher, F. W. and Galphine, A. R., “Hydroxyanisoleinduced regression of the Harding-Passey melanoma in mice”, *Journal of Pathology*, 122: 117-128 (1977).
- [56] Othmer, K., “Encyclopedia of Chemical Technology”, *Wiley Interscience*, U.S.,17: 373-382 (1982).
- [57] Fessenden, R. J., Fessenden, J. S. and Logue, M. W., “Organik Kimya”, Tahsin Uyar, *Brooks/Cole Publishing Company*, Boston, 517 – 518 (2001).
- [58] Fan, Y. and Flurkey, W. H., “Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms”, *Phytochemistry*, 65: 671-678 (2004).
- [59] 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).
- [60] 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).
- [61] 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).

- [62] 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).
- [63] Kolcuoglu, Y., “Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentata*)”, **Process Biochemistry**, 47: 2449-2454 (2012).
- [64] 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).
- [65] 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 and Biotechnology Research Communications**, 8 (2): 161-170 (2015).
- [66] 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).
- [67] 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).
- [68] 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).
- [69] 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**, 203-206 (2015).
- [70] 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. (Agaricomycetidae)”, **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 13 (1): 73-82 (2011).
- [71] 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).
- [72] 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).

- [73] Ergün, A., “Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir (2016).
- [74] Lin, H., Ren Ng, A. W. and Wong, C. W., “Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from chinese parsley (*Coriandrum sativum*)”, **Food Science and Biotechnology**, 25: 91-96 (2016).
- [75] Ünal, M.Ü. and Şener, A., “Two-year comparison of the biochemical properties of polyphenol oxidase from Turkish alyanak apricot (*Prunus armenica* L.)”, **Food Chemistry**, 190: 741-747 (2016).
- [76] Sapan, C. V., Lundblad, R. L. and Price, N. C., “Colorimetric protein assay techniques”, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 29: 99-108 (1999).
- [77] Önez, Z., “Üzümnden (*Vitis vinifera* L.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi”, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, (2016).
- [78] Siddiq, M. and Dolan, K. D., “Characterization of polyphenol oxidase from blueberry”, **Food Chemistry**, 218: 216-220 (2017).
- [79] 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).
- [80] 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).
- [81] Muñoz, J. L., García-Molina, F., Varón, R., Rodriguez-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

Mina Abdulazeez, Irak'ın Anbar şehrinde dünyaya geldi. İlkokul öğrenimini Al-Burak, orta okul öğrenimini Al-Heraaer Ortaokulu'nda yaptı, 2009 yılında Al-Heraaer Lisesini bitirdi. 2010' da Anbar Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt oldu, 2014 senesinde mezun oldu. Mezun olduktan 5 sene sonra 2019'da Karabük Üniversitesi Yüksek Lisans programına kayıt oldu. Özel sağlık laboratuvarlarında çalıştı. Şu anda özel kozmetik firmasında çalışmaya devam etmektedir.