

170902

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YABANI VE YENİLEBİLİR BİR MANTAR OLAN MACROLEPIOTA MASTOİDEA' DA
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Yakup KOLCUOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"Yüksek Lisans Kimya"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03. 01. 2005

Tezin Savunma Tarihi : 28. 01. 2005

Tez Danışmanı : Y.Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ

Jüri Üyesi : Y. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2005

ÖNSÖZ

“Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepiota mastoidea*'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde yardımını ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam Y. Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a; tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Saadettin GÜNER'e; çalışma esnasında kullandığımız mantarların toplanmasında ve tanımlanmasında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ' ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında benden desteklerini esirgemeyen sayın Öğr. Gör. Barbaros DİNÇER, Arş.Gör. Melike YILDIRIM ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yakup KOLCUOĞLU

Trabzon, Ocak, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1.GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.2.1. <i>Macrolepiota mastoidea</i> (Fr.) Singer, Lilloa 22: 417(1951) [1949] Makromantarının Morfolojik Özellikleri.....	4
1.2.2. Makromantarların Bazı Kullanım Alanları.....	5
1.3. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları.....	7
1.4. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları.....	9
1.4.1. Polifenol Oksidaz Enzimi İçeren Organizmalar ve Özellikleri.....	10
1.4.2. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması.....	14
1.4.3. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi.....	19
1.4.4. PFO İnhibisyonu.....	20
1.5. Çalışmanın Amacı	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	23
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.3. Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisi.....	24
2.4. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	24
2.5. Protein Tayini.....	25
2.6. PFO Aktivitesi Tayini.....	25
2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	26

2.8. SubstratÖzgünlüğü.....	26
2.9. Optimum pH.....	26
2.10. Optimum Sıcaklık.....	27
2.11. Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi.....	27
2.12. Optimum Substrat Konsantrasyonunun, V_{maks} ve K_m 'nin Belirlenmesi.....	27
2.13. Isıl Kararlılık.....	28
2.15. İnhibitör etkisi.....	29
3. BULGULAR.....	30
3.1. Kullanılacak Mantarın Belirlenmesi.....	30
3.2. Substrat Özgünlüğü.....	31
3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	31
3.4. Protein Tayini.....	32
3.5. Optimum pH.....	33
3.6. Optimum Sıcaklık.....	34
3.7. <i>M. mastoidea</i> monofenolaz ve difenolaz aktivitesine protein miktarının etkisi	35
3.8. Substrat konsantrasyonunun <i>M. Mastoidea</i> monofenolaz ve difenolaz aktivitesi üzerine etkisi.....	36
3.9. <i>M. mastoidea</i> monofenolaz ve difenolazının ısı kararlılığı.....	38
3.10. pH kararlılığı	42
3.11. <i>M. mastoidea</i> Monofenolaz ve Difenolaz Aktivitesine Genel PFO İnhibitörlerinin ve Metal İyonlarının Etkisi.....	43
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	46
5. ÖNERİLER.....	51
6. KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÖZET

Bu çalışmada, yabani ve yenilebilir bir mantar polifenol oksidaz potansiyeli açısından değerlendirildi. İlk çalışma olarak; Maçka Lişer Yaylası'ndan (Trabzon) birkaç mantar türü toplandı ve ham özütler hem monofenolaz hem de difenolaz aktiviteleri için spektrofotometrik olarak analiz edildi. Bu yabani mantar türlerinin yenilebilenleri arasından *Macrolepiota mastoidea*'nın en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Bu türden elde edilen ham özütün *L*-dihidroksifenilalanin ile boyanan doğal elektroforezi ile polifenol oksidaz potansiyelini destekleyen ve R_f değerleri 0,38 (soluk) ve 0,47 (baskın) olan iki bant gözlemlendi. Ham özüt hem 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA) e karşı monofenolaz aktivitesi ve hem de 4-metil katekol (4-MK) e karşı difenolaz aktivitesi gösterdi. *M. mastoidea*' dan hazırlanan enzim özütünün optimum pH değerleri monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için sırasıyla pH 6.0 ve pH 4.0 olarak belirlendi. Enzim özütü bu pH değerlerinde 4 °C de 24 saat bekletildiğinde başlangıç monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin %90 oranında korunduğu gözlemlendi. Termodinamik verilerden monofenolaz aktivitesinin difenolaz aktivitesinden daha yüksek termal kararlılığa sahip olduğu sonucuna varıldı. Her iki enzimin kendi substratları varlığında elde edilen substrat doyum eğrilerinden bu enzimlerin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu gözlemlendi. Monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin katalitik etkinliği sırasıyla 15,2 dk⁻¹ ve 72,6 dk⁻¹ olarak hesaplandı. Bazı genel polifenol oksidaz inhibitörlerinin ham özütte bulunan her iki aktiviteyi de inhibe ettiği tespit edildi. Monofenolaz için tiyöre ve askorbik asit, difenolaz için ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid'in oldukça potansiyel inhibitörler olduğu belirlendi. Buna ilave olarak her iki enzim aktivitesinde metal iyonlarına karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi. Sonuçlar açıkça göstermektedir ki *M. mastoidea*' dan hazırlanan enzim özütü ilgi çekici özellikleri olan polifenol oksidaz aktivitelerine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol Oksidaz, Monofenolaz, Difenolaz, *M. mastoidea*, Mantar

SUMMARY

Characterization of Polyphenoloxidase Activities from a Wild and Edible Mushroom, *Macrolepiota mastoidea*

In this study, a wild edible mushroom was evaluated for its polyphenoloxidase potentials. As a previous work, seven mushroom species were collected from the Lişer High Plateau-Maçka (Trabzon) and crude extracts were spectrophotometrically analyzed for either monophenolase or diphenolase activities. Of these mushroom species, *Macrolepiota mastoidea* as a wild edible mushroom species was determined to possess the greatest enzyme activities. Native electrophoresis stained by *L*-dihydroxyphenylalanine of the crude extracts from this species showed two bands having R_f values of 0.38 (minor) and 0.47 (major) supporting a polyphenoloxidase potential. The crude extracts were able to possess both monophenolase activity against 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (PHPPA) and diphenolase activity against 4-methylcatechol as substrates. Monophenolase and diphenolase activities of enzyme extract prepared from *M. mastoidea* showed pH optimum values at pH 6,0 for monophenolase and at pH 4,0 for diphenolase activities. When enzyme extracts were incubated at these pH values for 24 hours at 4 °C, it was observed that the extracts retained about 90% of their original monophenolase and diphenolase activities. It was estimated from thermodynamic data that monophenolase activity had higher thermal stability than that of diphenolase. Substrat saturation curves obtained for both enzymes in the presence of each individual substrate indicated that both enzymes followed simple Michaelis-Menten kinetics. Catalytic efficiencies for both enzyme activities were 15,2 dk⁻¹ and 72,6 dk⁻¹ for monophenolase and diphenolase, respectively. Some general polyphenoloxidase inhibitors inhibited both activities in the crude extracts. However, thiourea and ascorbic acid were highly potential inhibitor for monophenolase, and ascorbic acid and sodium metabisulphide for diphenolase activity. In addition, both enzyme activities were very sensitive to metal ions. It is clear from the present results, the enzyme extracts prepared from *M. mastoidea* possesses polyphenoloxidase activities with interesting properties.

Key words: Polyphenoloxidase, Monophenolase, Diphenolase, *M. mastoidea*, Mushroom

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Macrolepiota mastoidea</i> mantarı.....	5
Şekil 2. Enzimatik olmayan esmerleşmeler için önerilen Maillard Şeması.....	8
Şekil 3. PFO'nun bakır merkezleri.....	15
Şekil 4. <i>M. mastoidea</i> mantarındaki PFO izoenzimlerin <i>L</i> -DOPA substratıyla boyanmış doğal poliakrilamid jel elektroforezi.....	32
Şekil 5. Protein tayininde kullanılan BSA kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 6. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının pH bağımlılık eğrisi.....	33
Şekil 7. <i>M. mastoidea</i> difenolazının pH bağımlılık eğrisi.....	33
Şekil 8. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi.....	34
Şekil 9. <i>M. mastoidea</i> difenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi.....	34
Şekil 10. <i>M. Mastoidea</i> monofenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi.....	35
Şekil 11. <i>M. Mastoidea</i> difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi.....	35
Şekil 12. <i>M.mastoidea</i> 'nın monofenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi.....	36
Şekil 13. <i>M.mastoidea</i> 'nın difenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi.....	37
Şekil 14. <i>M. mastoidea</i> 'nın monofenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi.....	37
Şekil 15. <i>M. mastoidea</i> 'nın difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi.....	38
Şekil 16. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının ısıl kararlılık eğrisi.....	39
Şekil 17. <i>M. mastoidea</i> difenolazının ısıl kararlılık eğrisi.....	39
Şekil 18. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi.....	39
Şekil 19. <i>M. mastoidea</i> difenolazının zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi.....	40
Şekil 20. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının 1/T-lnk eğrisi.....	40
Şekil 21. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının 1/T-lnk eğrisi.....	41
Şekil 22. <i>M. mastoidea</i> monofenolazının pH kararlılık eğrisi.....	42
Şekil 23. <i>M. mastoidea</i> difenolazının pH kararlılık eğrisi.....	43

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Mantar ve bazı gıda maddelerinin taze ağırlık üzerinden yüzde olarak besin maddeleri içeriği.....	3
Tablo 2. PFO içeren bazı organizmalarla ilgili özet veriler.....	13
Tablo 3. Kullanılan mantarların spesifik aktivite değerleri.....	30
Tablo 4. <i>M. mastoidea</i> özütünde monofenolik ve difenolik substratların % Bağlı Aktivite değerleri.....	31
Tablo 5. PFO aktivitesinin bazı enzim kinetiği değerleri.....	36
Tablo 6. <i>M. mastoidea</i> monofenolaz aktivitesi için hesaplanan bazı termodinamik parametreler.....	41
Tablo 7. <i>M. mastoidea</i> difenolaz aktivitesi için hesaplanan bazı termodinamik parametreler.....	42
Tablo 8. <i>M. mastoidea</i> monofenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi.....	44
Tablo 9. <i>M. mastoidea</i> difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi.....	44
Tablo 10. <i>M. mastoidea</i> monofenolaz aktivitesine metal iyonu etkisi.....	45
Tablo 11. <i>M. mastoidea</i> difenolaz aktivitesine metal iyonu etkisi.....	45

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkilerde ve memelilerde genel adıyla esmerleşme veya kararırma olarak bilinen en yaygın oksidasyon reaksiyonlarından biri sarı, kahverengi ve siyah şeklinde oluşabilen renk dönüşümleriyle sonuçlanan fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonudur. Oluşan bu kinon bileşikleri canlılarda bulunan en reaktif ara ürünler olup enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonlarıyla hızlı şekilde ve kolayca polimerleşerek koyu renkli suda az çözünen ve melanin olarak bilinen polimerik yapılara dönüşümleri sağlanmış olur.

Fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile oluşan kinonik ürünlerin ökaryotları, bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı savunmada rol oynadığı tahmin edilmekle birlikte, enzimle katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olduğu da bilinmektedir (Ikehata vd., 2000; Thygesen, 1994).

Besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi esnasında bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan renk değişimleri çoğu kez istenilen seviyede durdurulamamaktadır. Bunun sonucunda besinlerin fiziksel görünüşlerinde ve besinsel değerlerinde değişimler olmaktadır. Bu da besinin ekonomik ve besinsel değerini kaybetmesine ve hem de raf ömrünün kısalmasına sebep olarak ciddi bir problem teşkil etmektedir. Ancak enzimatik esmerleşme her zaman istenmeyen bir durum değildir. Şöyle ki; bu reaksiyonlar kuru üzüm, kuru erik, kahve, çay ve kakao'da istenilen renk ve lezzetin kazanılmasında oldukça yardımcı olurlar.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının tamamı bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin olgunluğuna göre değişim gösterirken esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlıdır. Bunun yanında esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif Polifenol oksidaz (PFO) konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir. Bunlardan birinin reaksiyon ortamında bulunmaması veya optimum değerinden uzak olması reaksiyonu durdurabilir veya hızını azaltabilir.

Gıdalarda, bu türden reaksiyon mekanizmalarının ortaya konması ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonu ile oluşan ürünlerin istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak mümkün olabilecektir.

1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

İnsanlık tarihi boyunca besin sorunu her zaman var olmuştur. Makromantarlar insanların ilgisini Milattan önceki yıllarda çekmiş ve çok çeşitli alanlarda günümüze kadar onlara faydalı olabilmıştır (Boztok, 1990).

Mantar çok eski tarihlerden beri bir besin maddesi olarak değerlendirilmektedir. Milattan önce 470-400 yılları arasında yaşayan Hipokrat mantarın tıbbi yönden öneminden bahsetmiştir. Milattan sonra ikinci yüzyılda yaşayan Galen ise, Roma İmparatorluğu döneminde çayırardan toplanan mantarların satışını kanunlarla düzenlendiğini belirtmektedir (Boztok, 1990).

Araştırmalar halusinogenetik mantarların dünyanın çeşitli bölgelerindeki bazı izole toplumlarda önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Kızılderililer dini törenlerinde bu mantarları Tanrının gerçeklerini ve mesajlarını anlamak için kullanmışlardır (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

Mantar çok eski zamanlardan beri bilinen bir besin olmasına karşın yetiştiriciliğinin ilk kez 16. yüzyılda Fransa'da yapılmaya başlandığı pek çok kaynak tarafından bildirilmektedir. Başlangıçta mevsime bağlı olarak açıkta yetiştirilmeye başlanan mantar 19. yüzyılın başlarında taş ocakları, mağara ve tünel gibi sıcaklık ve nemin oldukça düzenli olduğu kapalı alanlarda ilkel yöntemlerle üretilmiştir. 20. yüzyılın başlarında doku kültüründen misel üretiminin gerçekleştirilmesi yeni tekniklerin gelişmesiyle mantar bu amaçla kurulmuş özel işletmelerde yetiştirilmeye başlanmıştır (Erkel, 1992; Sesli, 1994).

Karbohidrat sentezi bakımından ototrofik ve heterotrofik organizmalar olarak ikiye ayrılan bitkiler aleminde mantarlar heterotrofik organizmalar grubunda yer alırlar.

Fruktifikasyon organı veya mantar meyvesi olarak da bilinen şapka *Basidiomycetes* sınıfında Basidiokarp, *Ascomycetes* sınıfında Askokarp adını alır. *Basidiomycete* sınıfında mantarların en gelişmiş türleri bulunur. Şapkali mantar, raf mantarı, kuş yuvası mantarı v.s. gibi halk arasında bir çok isime sahip olan yüksek formlu mantarlar bu sınıf altında toplanırlar (Boztok, 1990).

Mantarların toprak altı kısmını miseller, toprak üstü kısmını ise şapka oluşturur. Toprak altı kısmını oluşturan miseller bitkilerdeki kökler gibi ortamdan su ve besin maddelerinin alınarak başka noktalara nakli görevini üstlenirler. Ancak, yüksek bitkilerde toprak üstü kısmını oluşturan plumula ve toprak altı kısmını oluşturan radikula tohumda hemen hemen aynı anda oluşurken, mantarda üretim birimi olan spor çimlenmesi ile önce

miseller ve daha sonra misellerden şapka oluşmaktadır. Mantarlarda sap veya şapka yeterince besin maddesi toplayarak belli bir noktada yoğunlaşan sekonder misellerden meydana gelir. Yoğunlaşan sekoder misellere tersiyer misel adı verilir. Basidiokarp'ın oluşumu sırasında sap kısmındaki hücrelerin içerdiği nukleus sayısı yirmiye kadar çıkar. Esas olarak basidiokarp'ın yapıtaşı hif adı verilen tüp şeklinde iplikçiklerdir. Hücre çeperinin yapısında başlıca kitin, seluloz, lignin ve diğer bazı organik bileşikler bulunur. Hücre çeperinin bileşimi, hücrenin yaşına ve çevre koşullarına, sıcaklığa, ortamın pH'sına göre farklılık gösterir. Hücrenin içi protoplazma ile doludur. Renksiz ve saydam olan stoplazma lipidik granuller ve çubuk şeklinde oluşumlar içerir. Vakuoller hücrenin gaz alış verişini düzenler, hem de stoplazmanın artıklarını barındırır (Boztok, 1990).

Hifler uç kısımdan gelişen ve lateral dallanma yeteneğine sahip olan tek diziden ibaret ipliklerdir. Hif büyümesi, hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hifler, çevre koşullarının sürekli vegetatif büyüme için uygun olduğu dönemlerde, dallanmış veya dallanmamış olarak besin ortamında tek tek görülürler. Uygun değişiklikler meydana geldiğinde hifler kümeleşerek daha sonra meyveyi oluşturacak olan misel ipliklerini meydana getirir. Misel iplikleri üzerinde oluşan küçük modüller de gelişerek şapkayı meydana getirir (Boztok, 1990).

Mantarın alt kısmında gençken pembe, daha sonra ise üzerinde taşıdığı sporların olgunlaşarak renk değiştirmesi nedeniyle koyu kahverengi renk alan lameller bulunur. Mantarın şapka kısmında, lameller üzerinde bulunan basidiosporlar olgunluğa ulaştınca doğaya yayılırlar. Bu sporlar uygun bir ortam bulduğunda çimlenerek mantarı oluşturmaya başlar (Boztok, 1990).

Tablo 1. Mantar ve bazı gıda maddelerinin taze ağırlık üzerinden yüzde olarak besin maddeleri içeriği (Boztok, 1990).

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

Mantarlar sadece günlük diyetinde değil ayrıca güzel aromaları ve tatları sebebiyle bir lüks olarak çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından tüketilmektedir. Ortalama %92 oranında su içeren taze mantarın esas olarak besin değeri açısından diğer sebzelerden pek farkı yoktur (Tablo 1). Yenilebilen mantarların protein, yağ, karbohidrat, mineral ve vitamin bakımından değerleri iyi, tadı hoş ve sindirimleri kolaydır. Hatta bir çok kimseler onun et kadar değerli olduğuna inanırlar. Yapılan analizler kültür mantarlarının sahip oldukları protein, et ve balığinkine nazaran çok küçük fakat bir çok sebzeninkine nazaran yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mantarların ihtiva ettikleri yağ, karbohidrat, mineral ve vitamin değerleri de sebzelerle mukayese edilebilecek seviyededir (Boztok, 1990).

Mantar proteinin hazmolma değeri % 72-83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. İnsan beslenmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermesine rağmen triptofan seviyesi kısmen düşüktür. Ayrıca mantar brom, mangan, çinko, sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindir (Boztok, 1990).

Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyet etkili olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre mantar kandaki şeker seviyesini düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler kolesterolü düşürücü özelliği ile kalp ve damar hastalıklarında da diyet olarak kullanılacaklarını göstermiştir (Boztok, 1990).

1.2.1. *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer, Lilloa 22: 417(1951) [1949] Makromantarının Morfolojik Özellikleri

Yenilebilir, şapkalı bir mantar olan *M. mastoidea* Basidiomiset sınıfına ait olup, yaz ve sonbahar dönemlerinde yetişir ve yapraklarını dökmeyen dağ ormanlarında, çayır veya otlakların sınırlarında tek ya da küçük gruplar halinde yaşar (Şekil 1). Şapka kısmı 50-80(100) mm genişliğinde, gençken yarı küresel ilerleyen dönemlerde konveks düzlem halini alır. Yaşamı boyunca yüzeyi yoğun bir şekilde beyaz, merkezi bulanık gri-kahverengimsi girinti ve çıkıntılarla kaplı, gençken şapka uçları fibrilli bir örtüyle kaplıdır. Etli kısmı şapka merkezine doğru incelen ve uç kısmına doğru kalınlaşan kesildiğinde rengi değişmeyen yada hafifçe kızaran, tadı hafif ve herhangi bir karakteristiği

olmayan bir yapıya sahiptir. Lamel kısmı, enli, L=95-120, I=1-3, serbest, gençken beyazımsı daha sonra kremden hafif pembeye dönüşür; çürümeye başladığında kahverengi-kırmızı noktalar oluşur. Sap kısmı 70-150 x 8-10 mm, tabana yaklaştıkça incelen içi boş, sağlam, elastik bir yapıya sahiptir. Yüzeyin altında ve üstünde beyaz, bulanık ve sonunda beyazımsı-fibriloz, flakkoz sürtüldüğünde ve yaşlandığında kahve-kırmızımsı, odunsu membranlı bir yapıdadır(Breitenbach ve Kränzlin, 1995).



Şekil 1. *Macrolepiota mastoidea*'nin fruktifikasyon organları

Makromantarların Bazı Kullanım Alanları

Mantarların geleneksel bir ilaç olarak yan etkilerden uzak olması nedeniyle çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilmesi ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Araştırmalar fungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici olarak kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaşmalarına sebep

olmuştur. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak kullanılmışlardır (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

Birçok mantarın biyoaktif bileşimi incelenmiş olup Basidomisetlerin klinik uygulamalarına ilişkin birkaç örnek aşağıda sunulmuştur.

Ganoderma lucidum (Curt. ex Fr.) Karst., genel kırıklık, iştahsızlık ve uykusuzluk problemlerine karşı kullanılır. Son yıllarda klinik yönde oldukça ilgi çeken bu mantarın belli bir terapötik dozu kalp hastalıklarını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda mantarın hipolidemik bir madde içerdiği ve serum kolesterolü düşürdüğü ortaya çıkmıştır. Mantarın ayrıca radyasyon zararlarına karşı koruyucu etkisi vardır. Klinik testlerde tümör büyümesini önleyen karbohidratlar içerdiği ortaya çıkmıştır (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

Fomitopsis officinalis (Fr.) Bond.& Sing. küçük dozajları uyku sırasında ağır terlemeyi kontrol etmek için, yüksek dozajları ise müshil olarak kullanılır. Mantar ayrıca pnömoni, kanser ve kötü huylu ülserin iyileştirilmesi için kullanılır. Kurt mantarı, kanamayı durdurucu olarak kullanımlarına ilaveten harici ve dahili olarak daha birçok rahatsızlık için kullanılırlar. Sporlar su ve balla karıştırılıp içildiği zaman boğaz acılarını, larenjit ve boğaz enfeksiyonlarını iyileştirmektedir. Karışım aynı zamanda iyi bir balgam söktürücüdür. Sporların kulak, göz enfeksiyonlarını ve çıbanları iyileştirici etkisi vardır.

Wolfiporia sp. Mantarı genel bir yatıştırıcı olarak merkezi sinir sistemine etki ederek kalp çarpıntılarını kontrolünde kullanılır. Mantarın diğer önemli kullanım alanları idrar söktürücü ve deri iltihaplarını önleyici olarak kullanımıdır. Çinliler mantarı meme ve rahim kanserlerini tedavi için kullanmaktadır (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

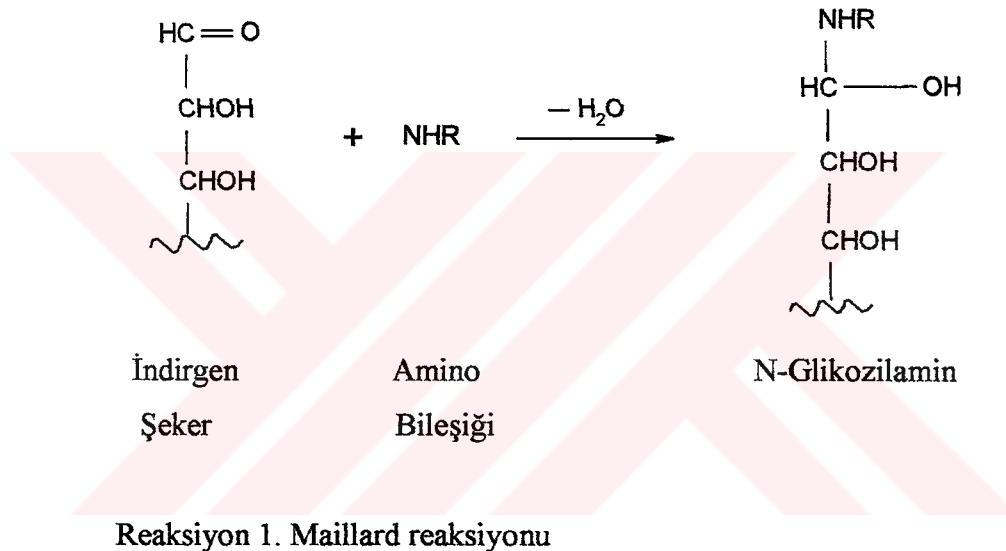
Auricularia auricula (Hook.) Underwood'ın kanın pıhtılaşmasını önleyici özelliği vardır. *Cordyceps* türleri, bazı doğu memleketlerinde genç kalmak için, bir takım şifalı otlarla karıştırılarak hastalıklardan sonra bünyenin kuvvetlendirilmesi, ciddi öksürükleri tedavi edici ve genel bir yatıştırıcı olarak kullanılırlar. Bazı *Polyporus* türlerinin yeraltı *Sclerotium*'unun içerdiği mylittine enzimi bağırsaklardaki şerit solucanlara karşı etkilidir. Ergonovine'nin düz kasları uyarıcı, Ergotoxine'nin kan damarlarını genişletici etkisi vardır. Ergocornine döllenen yumurtanın uterus duvarına yapışmasını önlediğinden bir doğum kontrol etkenidir (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

Mantar bileşiklerinin insanın bağışıklık sistemini uyararak kanserlere karşı etkili olduğu günümüzde bilinen bir gerçektir. Antikanser mantarların bir çoğu aynı zamanda

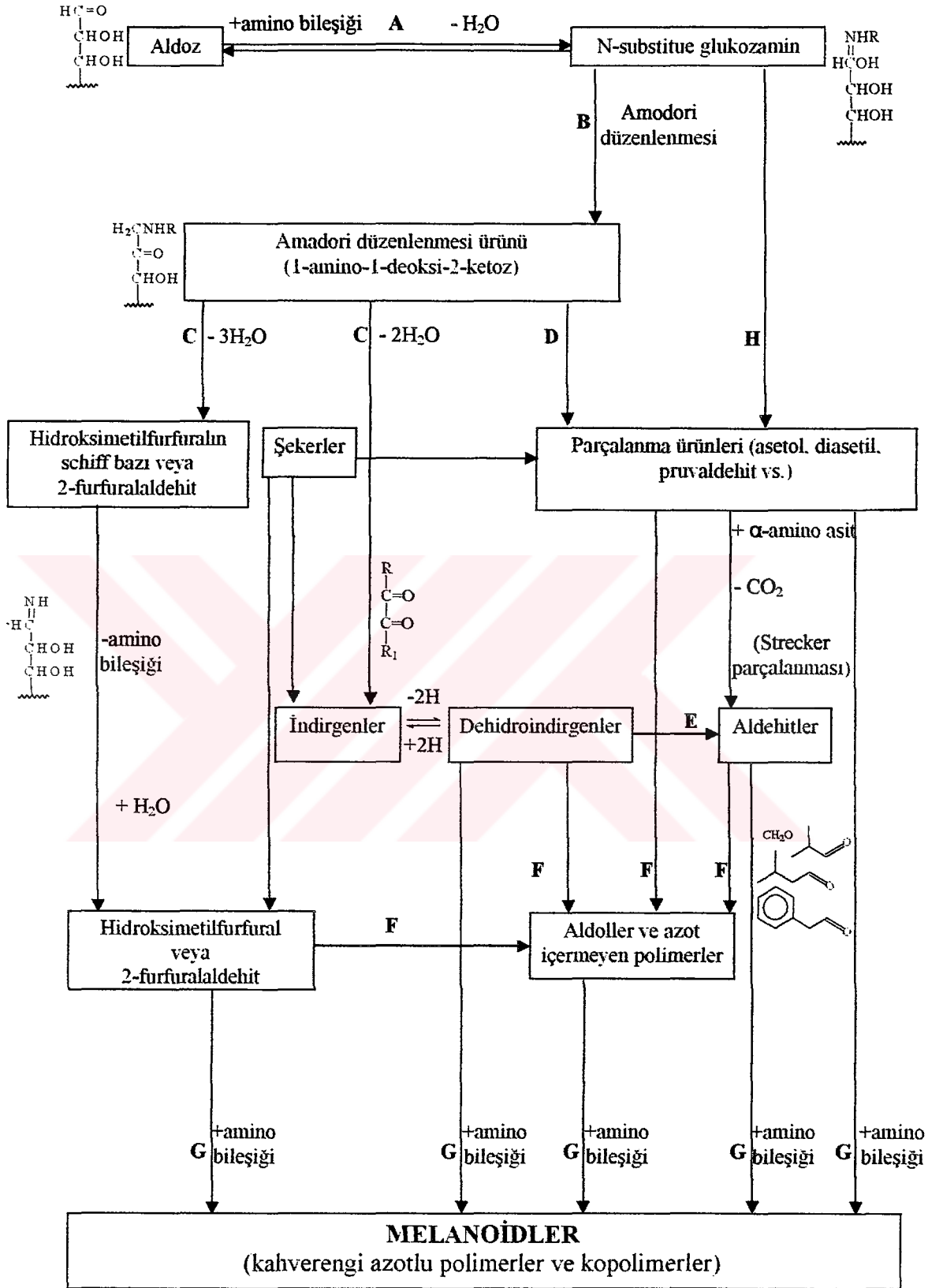
kolesterolü azaltan bileşiklere sahip olduğundan kardiyovasküler hastalıkların kontrolünde kullanılırlar (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

1.2. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları genelde Maillard reaksiyonu olarak bilinmekle birlikte basit şekerlerin (karbonil gurupları) ve amino asidlerin (serbest amino gurupları) reaksiyonunu içerir. Bu işlem karamelizasyondan daha düşük sıcaklıkta ve daha sulu ortamda oluşmaya başlar.



Şekil 2’de şematik olarak gösterilen Maillard reaksiyonu üç basit evreye sahiptir. Başlangıç reaksiyonu indirgen şekerin (aldoz) karbonil grubuyla proteinlerin veya amino asidlerin serbest amino gurubunun kondenzasyonudur. Bu esnada N-substitue glukozamin oluşurken bir molekül su açığa çıkar (Adım A). Bu yapı kararsız olduğundan “amadori düzenlenmesi” gerçekleşerek 1-amino-1-deoksi-2-ketoz (ketoaminler olarak bilinir) oluşur (Adım B). Amadori düzenlenmesiyle oluşan ketozamin ürünleri ikinci safhada 3 yolla tepkiyebilir. Birincisi daha fazla dehidrasyonla (2 molekül su kaybedilir) indirgenler ve dehidro indirgenlerin oluşumudur (Adım C). Bunlar esaslı “karamel” ürünleridir ve inidirgen halleri güçlü antioksidandır. İkincisi diasetil, asetol, privaldehid gibi kısa zincirli hidrolitik parçalanma ürünlerinin oluşumudur (Adım D). Bunu takiben aldehidler için amino asidlerin “strecker indirgenmesi” (Adım E) ve daha sonra da aldoz ve yüksek



Şekil 2. Enzimatik olmayan esmerleşmeler için önerilen Maillard Şeması

molekül ağırlıklı azot içermeyen polimerlerin oluşumu için amino bileşiklerinin yokluğunda aldoz kondenzasyonu gerçekleşir (Adım F). Üçüncü yol schiff bazı /furfural yoludur. Bu adım ketoamin bileşiğinden üç molekül su kaybını (Adım C) ve ardından oluşan amino bileşiğinin amino asid ve suyla reaksiyonu içerir. Bütün bu ürünler Melanoidler olarak adlandırılan esmer azot polimer ve kopolimer formunu oluşturmak için üçüncü safhada yeniden amino asidlerle reaksiyona girerler (Adım G). Bu reaksiyonlar lezzet kaybı (acılık) aroma kaybı (yanık, ekşime) veya olumlu aroma (malt, karamel, kahve, kızartma) ile sonuçlanabilir.

Şekil 2'deki H adımı ARP (Amadori düzenlemesi ürünleri) olmaksızın parçalanma ürünü olan N-substitue glikozaminlerin oluşumunu gösterir. Maillard reaksiyonu etkileyen faktörler aşağıda belirtildiği gibidir.

a. Zaman ve sıcaklık: Model sistem üzerinde yapılan çalışmalar, ısınma miktarının ve/veya zamanın artırılması sonucu görülen renk gelişimi, karbon-azot zincirinin varlığını, doymamışlığın ve kimyasal aromatikliğin arttığını göstermektedir

b. Sistemin bileşimi: Pentoz şekerleri (örn. Riboz) hekzoslardan çok daha hızlı reaksiyon verir ki bu da disakkaritlerden (örn. laktoz) daha reaktiftir

Lisin, ϵ -amino grubundan dolayı en hızlı renklenmeyi sağlarken, sistein ise en az renklenmeye neden olur. Bu yüzden protein içeriği lisin birimince zengin olan besinler (örn. süt proteinleri) genelde hızlı bir şekilde esmerleşir.

Şeker-amino bileşiği zincirleri renkli ürünlerden oldukça etkilenir. Örneğin, %65 su içeren glukoz-glisin model sistemi 65 °C' de saklandığında glukoz-glisin zincirinin renk dönüşümünün hızlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

c. Su aktivitesi: Şekil 2 de suyun Maillard reaksiyonu esnasında olduğu görülmektedir. Bu yüzden kütle yasaları gereğince, yüksek su miktarı içeren bileşiklerde reaksiyon oldukça yavaş gerçekleşmektedir (URL-1, 2004).

1.3. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkilerde iki farklı şekilde gözlenebilir (Friedman 1996, 1997). Bunlardan birisi meyve ve sebzelerde bulunan fenol bileşiklerinin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan kinon yapılı bileşikler, daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlarla koyu renkli melanin pigmentlerine polimerleşir. Meyve ve sebzeler soyulduğunda veya

kesildiğinde enzim içeren bitki dokusu serbest hale gelir. Havadaki oksijen varlığında PFO enzimi hücre fenolik bileşiklerinin *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler. Oluşan bu kinonlar oldukça reaktif olup esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşir.

Meyve paslı bir bıçakla kesildiğinde veya bakır bir kasede karıştırıldığında bu olay kolayca gözlenebilir. Armut, muz, patates, marul ve meyve sularında klorojenik asidin böyle oksidasyonu ile oluşan kahverengi ve siyah lekeler bu tür pigment oluşumunu gösterir. Diğer enzimatik esmerleşme türü ise fenolik bileşiklerden türemiş kinonların serbest aminoasit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır. Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları bu türden işlemlerdir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkinin çeşidine, türüne, yetiştiği bölgeye, meyvenin olgunluğuna göre değişim gösterir ve buna sebep olan başlıca faktörler bitki vakuollerinde bulunan fenolik substratlar, PFO enziminin aktivitesi ve bitki dokularında bulunan oksijendir. Bu faktörlerden birinin ortadan kaldırılmasıyla enzimatik esmerleşme reaksiyonları azaltılabilir veya durdurulabilir.

Bitkilerde meydana gelen enzimatik esmerleşme işlemlerinin en önemli enzimi katekolaz, difenol oksidaz, monofenolaz, kresolaz olarak bilinen PFO'dur. Bu türden bir işlemin meydana gelebilmesi için ortamda enzim, enzime bağlı bakır iyonları, fenolik substrat ve oksijen bulunmalıdır. En düşük düzeyde işlenmiş meyve ve sebzelerin hazırlanması, kabuklarının soyulması veya bunların kesilmesiyle hücre membranları parçalanır ve uygun substratlar yükseltgenme - indirgenme reaksiyonlarını katalizleyebilen bu tür bir enzimle etkileşir. Oksijen varlığında, fenollerin *o*-kinonlara enzimatik oksidasyonundan dolayı esmerleşmesi hızlı bir şekilde meydana gelir (Laurila vd., 1998).

1.4.1. Polifenol Oksidaz Enzimi İçeren Organizmalar ve Özellikleri

Polifenoloksidazlar (trosinaz) oksidoredüktaz sınıfına üye (EC 1.14.18.1) bakır içeren bir metaloenzim olup memeliler, bakteriler, sebze, meyve, deniz ürünleri ve mantarlara kadar çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunurlar ve aynı organizmanın farklı organlarında farklı karakteristik özellik gösterirler (Robb, 1984; van Gelder vd., 1997).

Polifenol oksidazların bitki ve mantarlarda ki en önemli fonksiyonu, hastalıklara karşı koruma ve fenollerin kinonlara okside ederek bitkilerin proteinlerini ve besinsel

değerlerini kısıtlamasıyla bitki yiyen böceklerle karşı savunmada rol oynamasıdır. Bitkilerdeki fenolik substratlar vakuollerde bulunmasına karşılık bitki dokularının çoğunda PFO enzimi plastidlerde yerleşmişlerdir. Bu dokular kesildiğinde, zarar gördüğünde veya hastalıklı dokular oluştuğunda ya da dokular böceklerin saldırısına uğradığında bu enzim aktif hale geçmektedir. Plastidlerde yerleşmiş olan bu enzim bir membran proteini olmasına karşın integral membran proteini değildir (Mazzafera ve Robinson, 2000; Vaughn vd., 1988).

Sebzelerin ve meyvelerin saklanması ve depolanması esnasında esmerleşme reaksiyonları oldukça yaygın bir problemdir (Zhow ve Feng, 1991). Malatya kayısı (*Prunus armeniaca* L.) Türkiye’de yetiştirilen çeşitler içinde en iyisidir ancak depolama esnasında dış yüzeyi kararmaktadır ve bu ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında PFO’nun fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Augustin vd.,1985). Malatya kayısından elde edilen enzimin aktivitesinin pH 8.5’te maksimuma ulaştığı, 40 °C’de 40 dakika ısıtıldığında enzim aktivitesinde önemli bir kaybın söz konusu olmadığı ancak 60 °C ‘de 47 dakika ve 80 °C de 16 dakika ısıtıldığında aktivitenin % 50 kayba uğradığı gözlenmiştir. Ayrıca enzimin monofenolaz aktivitesine sahip olmadığı, askorbik asit ve 2-merkaptoetanolün bu enzim için en iyi inhibitör olduğu belirtilmiştir (Arslan vd.,1998).

Karayemiş bitkisinin (*Laurocerasus officinalis* Roem.) henüz olgunlaşmamış meyvelerinde yapılan incelemede doğal elektroforez de Rf değeri 0,50 ve 0,57 olan iki band gözlenmiş buna bağlı olarakta meyvedeki PFO’nun en az iki izoformunun olduğu sonucuna varılmıştır (Colak, 2004). 3-(3,4-dihidrosifenil)propionik asid (DHPPA) varlığında optimum pH’ın 5 olduğu ve alkali pH’larda enzimin %80 oranında aktivitesinin kaybolduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklığın 40 °C olduğu ve aktivitenin askorbat ve metabisülfite karşı hassas olduğu gözlenmiştir (Colak vd., 2004).

Filipinlerde yetiştirilen bir muzda yapılan araştırmada meyvenin soyulmuş etli kısmında yüksek miktarda dopamine rastlanmış ve bu maddenin ham veya kısmen saf PFO tarafından oksidasyona uğratıldığı bildirilmiştir (Riggin vd., 1976). Karakterizasyon ve saflaştırma esnasında yapılan işlemlerde oksidasyonun en hızlı gerçekleştiği dopaminin en iyi substrat olduğu anlaşılmıştır. Muzdan elde edilen enzimin substrat spesifitesi Japon armudu (Tono vd.,1986), lahana (Fujita vd.,1991) ve patlıcandan (Fujita ve Tono,1998) farklılık göstermektedir. Saflaştırılmış enzimde dopamin için K_m 2,8 mM ve optimum pH 6,5 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca pH 3-11 arasındaki pH’larda enzimin 48 saatlik

inkübasyonundan sonra pH 5-11 arasında başlangıç aktivitesini %90 oranında koruduğu gözlenmiştir. Saf enzimin optimum sıcaklığının 30 °C olduğu ve 70 °C üzerinde 10 dakika ısıtıldığında aktivitenin %80 oranında kaybolduğu bildirilmiştir. Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ gibi metal iyonlarının zayıf inhibitörler olduğu, L-askorbik asid ve sisteinin 1 mM konsantrasyonunun tamamen inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir (Galeazzi vd., 1981; Sojo vd., 1998). SDS-PAGE elektroforezinde molekül ağırlığı 42 kDa olan saf enzime ait tek bir band görülmüş ve jel filtrasyon yöntemiyle de bu proteinin molekül ağırlığı yaklaşık 41 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuç saf enzimin bir monomer olabileceğini göstermektedir.(Yang vd., 2000)

Monofenolaz aktivitesi, avakado bitkisinde tespit edilmiş olup, bu bitkideki PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980). Avakadoda monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan özütler kullanılarak tayin edilmiş ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. Ayrıca avakado monofenolaz aktivitesi çeşitli substratlar varlığında radyometrik ve spektrofotometrik metodlar yardımıyla tespit edilmiştir. Triton X-114 kullanılarak kısmen izole edilen avakado PFO'su 4-hidroksi anisol kullanılarak karakterize edilmiştir (Espin, 1997).

PFO kahvenin (*Coffea arabica* L.) yapraklarından ve meyve endospermilerinden (PFO-E) ekstrakte edilerek karakterize edilmiş ve bir çok bitkide olduğu gibi erken gelişme safhasında yaprak ve endospermelerde yüksek olduğu gözlenmiştir (Ratjen ve Robinson, 1992; Dry ve Robinson, 1994). Kahvede, kahve kalitesiyle PFO arasındaki ilişki tam olarak bilinmemesine rağmen düşük kalitedeki kahvelerde düşük aktivitede PFO olduğu bilinmektedir (Amorim ve Melo, 1991). Yaprak ve endosperm için optimum PFO aktivitesinin pH 6-7 de ve optimum sıcaklığın 20-30 °C arasında olduğu gözlenmiştir. Klorojenik asidin bitkinin her iki kısmı için de en iyi substrat olmasına rağmen, 4-metilkatekol durumunda PFO'ın yapraklarda yüksek aktivite fakat endospermde düşük aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Kahve PFO proteinlerinin katalitik olarak aktif bölge dışında proteolitik olarak duyarlı bir bölge içerdiği ortaya konmuştur (Mazzafera ve Rabinson, 2000).

Çay bitkisinin (özellikle filizlerinin) PFO'ca oldukça zengin olduğu ve çayın fermantasyonunda anahtar enzim olduğu bilinmektedir. PFO çay bitkisinin hemen hemen tüm bölümlerinde bulunur ve çay kalitesi bu enzimin çay filizlerindeki içeriği ile doğrudan ilişkilidir (Biswas, 1971). Çay bitkisinin çeşitli organlarından hazırlanan enzim özütleri

kullanılarak yapılan enzimatik deneyler, enzimin çözüner haldeki ve membran bağı formlarının içeriklerinin bir tür içerisinde farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (Singh, 1994). Bitkiden hazırlanan PFO ve peroksidaz enzimleri ile yeşil çay yapraklarından izole edilen flavanoller *in vitro* muamele edilmiş, oluşan reaksiyon ve ürünleri HPLC ile izlenmiştir. Bu iki enzimin çayın fermentasyonuna ya da kararmasına etkisi araştırılmış ve PFO varlığında çayın kalitesinden sorumlu olan thaflavin ve thearubigin bileşenleri daha yüksek düzeylerde gözlenmiştir (Finger, 1994).

PFO'nun etkili olduğu bitki türlerinden birisi de mantarlardır. Endüstriyel olarak en az düzeyde işlenmiş mantarın saklama esnasında enzimatik esmerleşmeden dolayı raf ömrü birkaç gün ile sınırlıdır. Mantardaki esmerleşmeye sebep olabilecek enzimler olan PFO, lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri Portabella mantarında çalışılmış ve PFO'nun mantar dokularındaki en bol enzim olduğu ve hem de kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO'dan kaynaklandığı bulunmuştur (Zhang, 1997; Ratcliffe, 1994). Polifenol oksidaz enzimi içeren bazı organizmalarla ilgili bilgiler Tablo 2' de toplu halde verilmiştir.

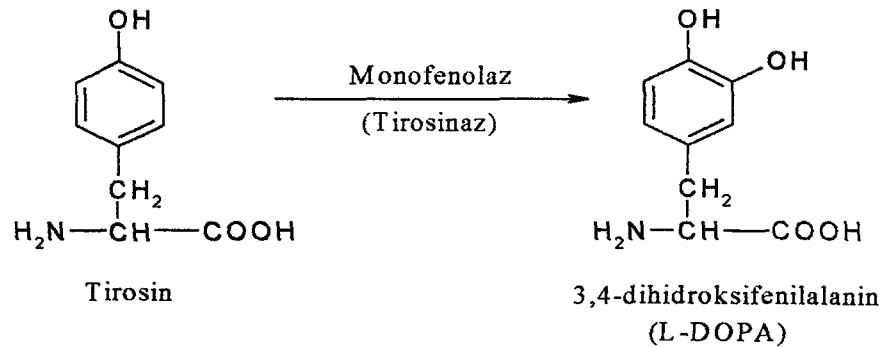
Tablo 2. PFO içeren bazı organizmalarla ilgili özet veriler

Bulunduğu organizma	Kullanılan substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık
Erik(Espin vd.,1996)	PHPPA, DHPPA	4.3	25 °C
Yaban Gülü (Şakiroglu vd., 1996)	4-MK	8.5	20 °C
Elma (Espin vd., 1995)	PHPPA	4,6	25 °C
Dut (Arslan vd., 2004)	4-MK	7.5	20 °C
<i>E.coli</i> (Kong vd., 2000)	L-DOPA	7.5	37 °C
Ispanak (Yelena vd.,1996)	4-MK	8.0	30 °C
Prunus meyveleri (Fraigner vd., 1995)	4-MK	4-5.5	25 °C
Trametes sp. MS.39401 (Motoda vd.,1999)	4-MK	4,5-5	35 °C
Döngel (Dincer vd., 2002)	4-MK,	6,5	35 °C
Karayemiş (Colak vd., 2004)	3-(3,4-dihidrosifenil) propionik asid	7.0	50, 40 °C

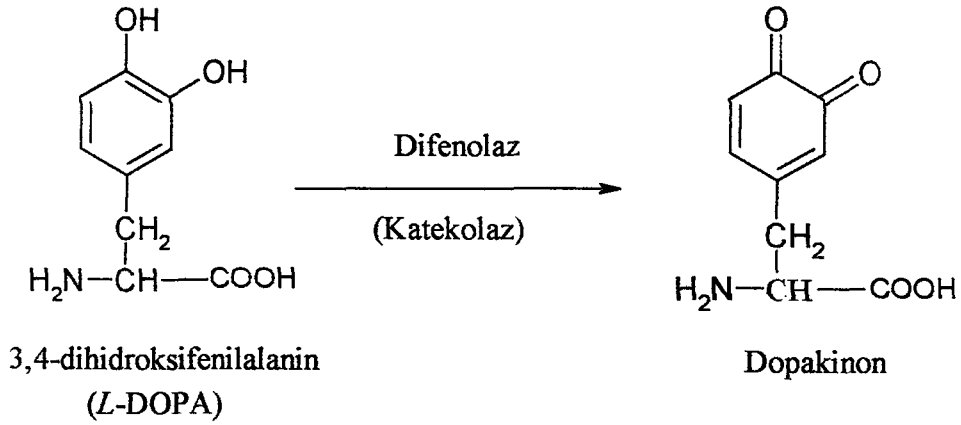
Gönen kaplıcalarından izole edilen ve termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4^T bakterileri üzerinde yapılan incelemelerde difenolaz aktivitesine rastlanmıştır ve bu aktivitenin 4-metil katekol substratına karşı oldukça yüksek ilgiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu mikroorganizmalardan hazırlanan hücre içi enzim özütünün sahip olduğu difenolaz aktivitesinin karakterizasyonu için yapılan çalışmalarda, 4-MK varlığında optimum pH'ın 9,5 optimum sıcaklık değerinin ise 70°C ve 80 °C olduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklıkta *A. kestanbolensis* K4^T bir saat bekletildiğinde sahip olduğu difenolaz aktivitesini kaybetmediği ancak K1 suşu durumunda ise aynı aktivitenin 80°C' de arttığı gözlemlenmiştir. Her bir suşta bulunan difenolaz aktivitesi alkali pH değerinde oldukça yüksek kararlılık göstermiştir. Difenolaz aktivitesi K1 ve K4^T suşlarında 0,01 mM sodyummetabisülfid, askorbik asid ve L-sistein ilavesiyle tamamen inhibe edildiği; 1mM Mn²⁺ ortama ilave edildiğinde ise aktivitenin 6,4 ve 5,3 misli arttığı bildirilmiştir (Yıldırım vd., 2004).

1.4.2. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması

Uluslararası Biyokimya Derneği (IUB) enzim komisyonuna göre PFO birbiriyle ilişkili yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını içeren üç çeşit aktiviteye sahiptir. Bunlar: katekoloksidaz veya *o*-difenol:oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.1); lakkaz veya *p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.2) ve kresolaz veya monofenol oksijenaz (EC 1.14.18.1) dir (Yelana vd.,1996). Bu bilgilerin ışığında enzimin iki farklı tür reaksiyonu katalizlediği sonucuna varılabilir. Bu reaksiyonlar; *o*-difenollerin oluştuğu monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (kresolaz/monofenolaz aktivitesi) ve bunu takiben *o*-difenollerin *o*-kinonlara (katekolaz/difenolaz aktivitesi) oksidasyonudur (Fenoll vd., 2000; Fontecave ve Sunduran, 1998).

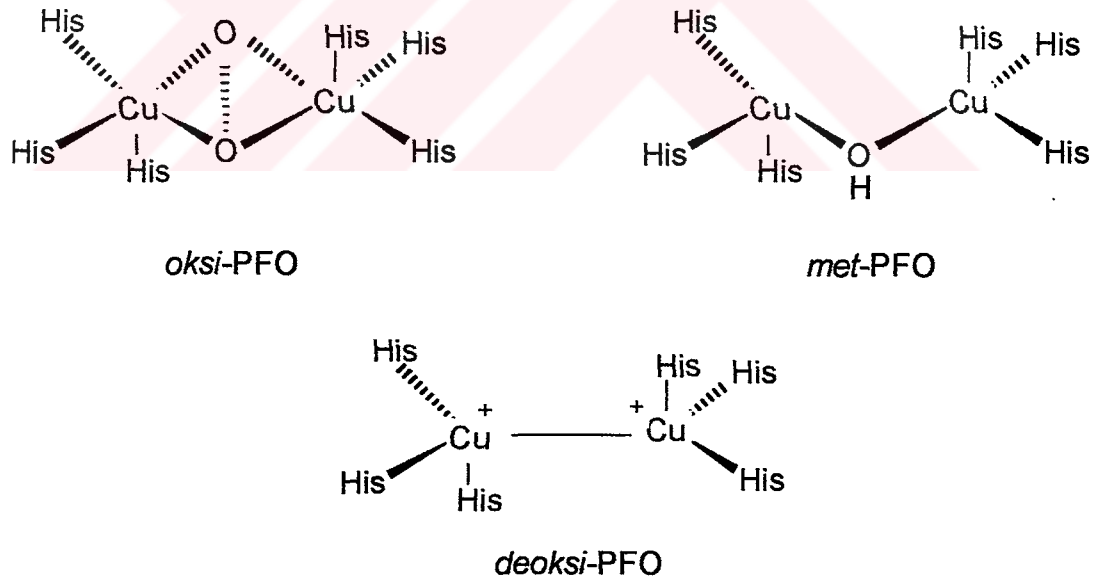


Reaksiyon 2. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)



Reaksiyon 3. *o*- difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)

PFO için yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu ele geçen bulgular aktif bölgenin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğunu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir.



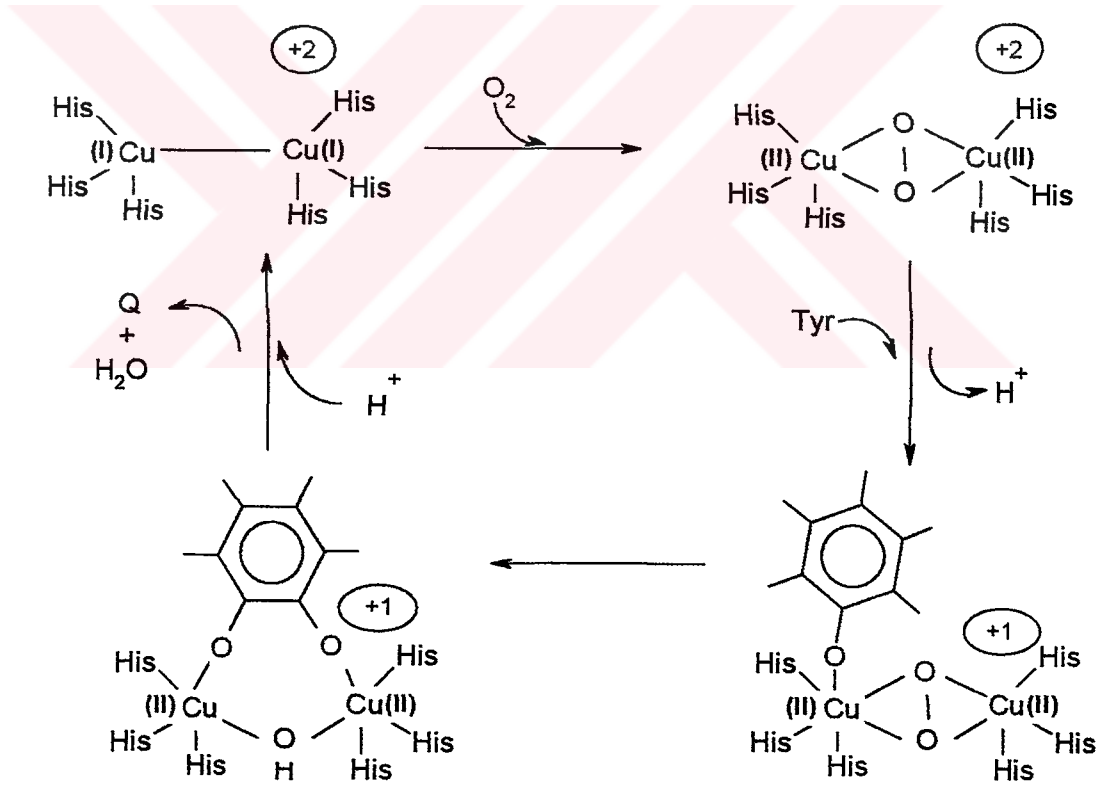
Şekil 3. PFO'nun bakır merkezleri

Oksijenlenmiş form (*oksi-PFO*), her biri iki kuvvetli ekvatoryal ve bir zayıf aksiyal N_{His} ligandlarıyla koordine olmuş iki tetragonal Cu(II) atomundan oluşmuştur. Eksojen oksijen molekülü peroksit olarak bağlanır ve iki bakır atomu arasında köprü oluşturur.

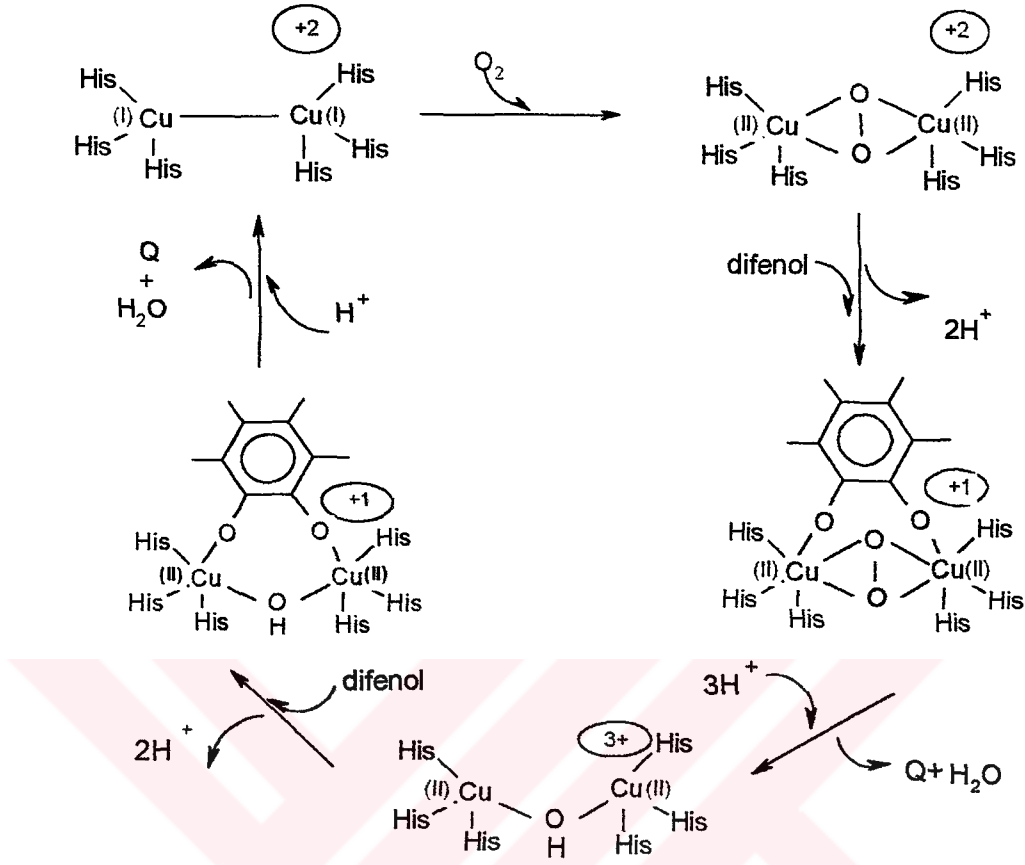
Met-PFO formu *oksi*-form gibi endojen köprüyle antiferromagnetik şekilde çiftleşmiş iki tetragonal Cu(II) atomu içerir. *Deoksi*-PFO bikuprik yapıya sahiptir. [Cu(I)-Cu(I)] PFO'nun aktif bölgesindeki bakır içeren bu üç form monofenollerin *o*-hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyon mekanizması için bir modeldir (Duran vd., 2002; Klabunde vd.,1998).

Fizyolojik fonksiyonları farklı olmasına rağmen PFO ve hemosiyanin aktif bölgesi birbirine benzerlik göstermekte ve bu model sistemler üzerinde yapılan çalışmalar monofenollerin PFO ile katalizlenen dönüşümlerinin substratın enzimin *oksi*-formuna bağlanmasıyla başladığını ortaya koymaktadır (Decker ve Tuczek, 2000).

Monofenolaz çevriminde oluşan difenol (kresolaz reaksiyonu) ve ardından oluşan bu difenolun difenolaz çevriminde (katekolaz reaksiyonu) kullanılması nedeniyle PFO'nun monofenolaz ve difenolaz çevrimlerinin birbiriyle bağlantılı olduğu söylenir.

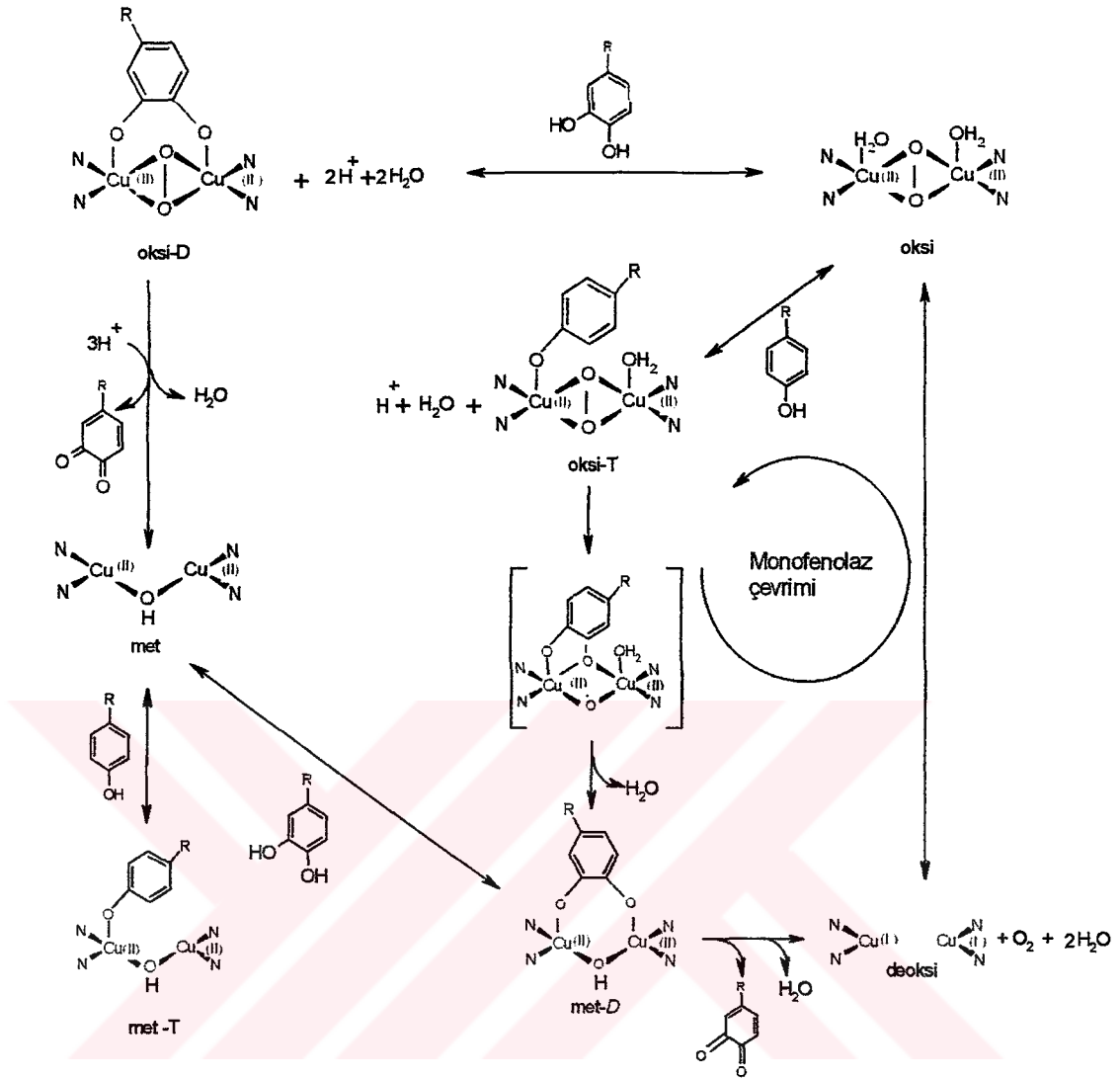


Reaksiyon 4. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi



Reaksiyon 5. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Q: *o*-kinon)

PFO'nun katalitik aktivite mekanizmasında *deoksi*-formundaki enzim bir oksijen molekülüyle birleşerek *oksi*-PFO formuna dönüşür. [Cu²⁺-O₂²⁻-Cu²⁺] Fenolik substrat *oksi*-PFO'nun bakır atomlarından biriyle aksiyal konumdan koordinasyonu sağlar. Monofenolaz aktivitesinin gerçekleşmesi için ortamda *oksi*-formu içeren enzim mutlaka bulunmalıdır (Sung-Yum Seo, 2003). Daha sonra substratın 5 koordinasyonlu ara ürününün yeniden düzenlenmesiyle fenolün *o*-hidroksilasyonu sağlanır, su kaybı ile difenolik ürünün oluşumu gerçekleşmiş olur. Molekül içi elektron transferi sonucu *o*-benzokinon ürünü oluşurken *deoksi*-forma dönen enzimin aktif bölgesi yeni bir katalitik çevrime girmek için hazır hale gelir.



Reaksiyon 6. PFO için önerilen monofenolaz ve difenolaz katalitik çevrimi (Sanchez-Ferrer vd., 1995).

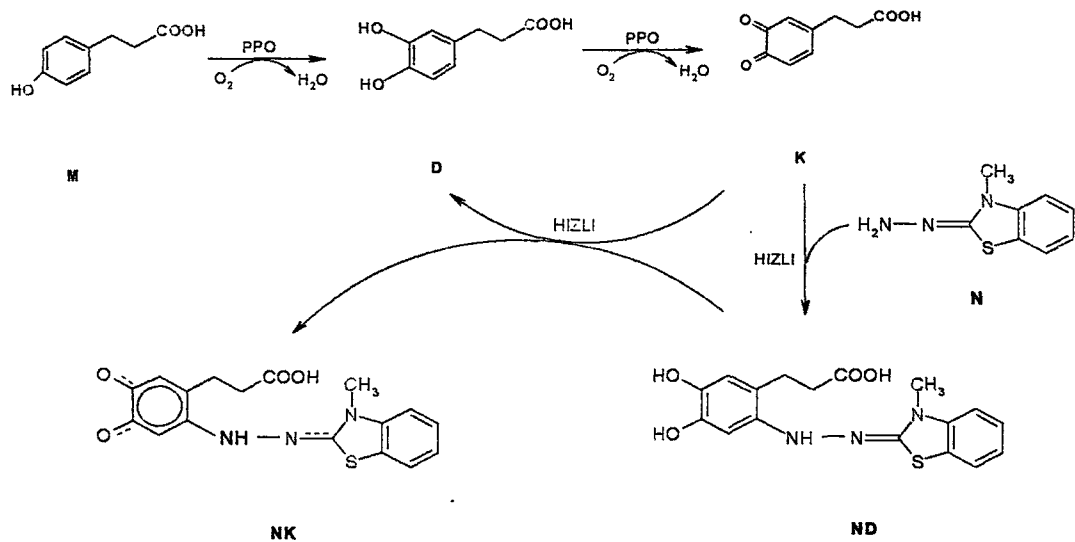
Oluşan *o*-kinon bileşikleri, canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı ve kolayca polimerleşerek koyu kahve renkli suda az çözünen polimerik yapılara dönüşüm gerçekleşir. Böylece esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşur.

Çeşitli organizmalarda yapılan çalışmalar PFO'nun ortalama 55-60 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu patates, tütün ve mantarda bakır içeriğinin %0,2-0,3 değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Taze hazırlanan enzim özütünde bakırın Cu(I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu(II) şekline yavaşça okside olduğu ve bu değişimin aktivitede bir kayba yol açmadığı belirlenmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değildir. Ancak Cu(II) ilavesiyle aktivite geri kazanılabilmektedir (Kertesz, 1962). Apoenzim saf

enzimin sulu çözeltisinin potasyum siyanür içeren çözeltiliye karşı diyaliz edilmesi ile hazırlanabilmiştir. Saf PFO enzimi nötral pH değerinde oldukça kararlıdır ve -25 °C de aktivitesinde kayıp olmaksızın birkaç ay saklanabilir.

1.4.3. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında manometrik, palografik, kronometrik ve spektrofotometrik gibi çeşitli teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir. Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O₂, bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak yada bir oksijen elektroduyla palografik olarak ölçülebilir. Kronometrik metotta ise askorbik asit varlığında reaksiyon sırasında rengin ilk görüldüğü an tespit edilir. Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızını ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972). Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen pahalı teçhizat gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmazlar.



Reaksiyon 7. Polifenol oksidazın kromojenik nükleofil (MTBH) varlığında Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: Monofenol, D: Difenol, K: o-kinon, N: Kromojenik nükleofil, ND: Nükleofil-difenol renksiz Katılma ürünü, NK: Nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü)

PFO aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil varlığında oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metodda, nükleofilin yokluğunda ve varlığında PFO tarafından üretilen *o*-kinonlar, nükleofil ile renkli katılma ürünleri verirler ve bu katılma ürünleri 500 nm'deki karakteristik absorpsiyonları ile belirlenirler (Reaksiyon 7). Bu metodun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuş olup (Rodriguez, 1994) elma ve avakado meyvelerindeki PFO aktivitelerinin tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Espin, 1995; 1997).

1.4.4. PFO İnhibisyonu

Enzimatik esmerleşme mantarların ve diğer besinlerin olgunlaşması, depolanması veya işlenmesi esnasında ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Günümüzde esmerleşmeyi önlemek için inhibitörlere başvurulmaktadır. Kullanılan inhibitörler yiyeceklerde enzimsel esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan materyaller olmalıdır (Ferrari ve Walker, 1996). Bugün en sık başvuru alan inhibitör sülfittir. Bunun dışında O₂ ve fenolik substratların ikisinin veya birisinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla da esmerleşme önenebilir. Ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda sülfid kullanımına izin verilmez (FDA, 1996). Sülfidlerin, besinleri yıkıcı özelliği yanında bitki ve meyvelerde doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir. Yayınlanan bir çok rapora göre bazı insanların özellikle astım hastalarının sülfid bileşiklerine karşı hassas olabilecekleri belirtilmiş ve bu yüzden dünyada sülfid kullanımına ortak kısıtlama getirilmiş hatta birçok gelişmiş ülkede de yasaklanmıştır (Ding vd.; 2002).

Yapılan araştırmalar sonucunda inhibitörleri doğal ve sentetik orijinli olarak iki ana grupta toplamak mümkündür. Doğal kaynaklı inhibitörler polifenoller, aldehidler ve türevleri olarak iki alt grupta toplanabilir.

1. Doğal orijinli inhibitörler:

a. Polifenoller; doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir ve bir çok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak ta bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kök, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze meyve, sebze ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel PFO inhibitörleri kompferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir (Kubo vd.,1992, 1999; Chen vd., 2002; Ha vd., 2001). Bu

çalışmalara göre flavanoidlerin inhibisyon özelliği aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir.

b. Aldehidler ve türevleri; çok sayıda aldehid ve türevinin PFO için izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Örneğin trans sinnamaldehid, 2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, aris aldehid, kumik asid, 3,4-dihidroksi sinnamik asid gibi (Lee vd., 2000, 2002; Kubo vd., 1988, 1999). Aldehid grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple etkisinin enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı formasyonu oluşturmasından ileri geldiği söylenmektedir.

2. Sentetik orijinli inhibitörler:

Şimdiye kadar çok çeşitli sentetik orijinli inhibitör rapor edilmiştir. İlginç olarak bunların bazıları ilaçtır. Diğerleri ise basit kimyasallardır

a. İlaçlar; Antidepresif olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkapt-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkaptimidazol) (Espin ve Wichers 2001; Andraicus ve Kahn, 1996).

b. Kimyasallar; hidrojen peroksit, hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asitler gibi bir çok kimyasal inhibitör olarak PFO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahiptir.

1.5. Çalışmanın Amacı

Kozmetik ve ilaç üretiminde enzimlere ve enzimler aracılığıyla sentezlenen ya da modifiye edilen ürünlere olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Enzim katalizsiz reaksiyonlarla sentezlenen ürünler pahalı olmalarının yanında reaksiyon sonucu oluşan ve istenmeyen yan ürünleri de taşımaktadır. Oluşan bu yan ürünler insan sağlığı açısından genelde sakıncalar doğurmaktadır.

Günümüzde besinlerin sağlıklı bir şekilde korunmasına ve raf ömürlerinin uzatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyeceklerin, sentetik yoldan elde edilmiş kimyasallarla ya da farklı yöntemlerle korunmaları sonucu gıdalarda lezzet ve besin değeri kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Bu türden oluşumlar da insan sağlığını tehdit ettiğinden bu konularda dünya çevre ve sağlık örgütleri hassasiyet göstermekte olup gelişmiş ülkelerde enzimlerle elde edilen yeni ürünlerin ya da bilinen ürünlerin yeniden modifiye edilmesi çalışmalarına hız verilmektedir.

Yapılan bu çalışmada oksidoredüktaz sınıfı olan bir enzimin varlığı, biyokimyasal ve kinetik özellikleri Trabzon'un Lişer Yaylasından toplanan *M. mastoidea* (Fr.) mantarında incelenmiştir. Mantarların terapatik amaçlı kullanımı ve bir çok yenebilir mantarın monofenolaz aktivitesi ile trosini *L-DOPA*'ya dönüştürebilme yeteneği beyinde tümör oluşumunu ve Parkinson hastalığını önlemesi ayrıca kansere sebep olan radikallerin oluşumunu kısıtlamasıyla birlikte antioksidan özellik göstermesi mantarlara olan talebi gün geçtikçe arttırmaktadır (Vogel vd., 1977; Husain ve Hadi, 1995; Morin vd., 1998; Shi vd., 2002).

Bu çalışmanın amacı, gıda endüstrisi ve klinik uygulamalar açısından önemli olması nedeniyle ilimiz Maçka ilçesi Lişer yaylasından toplanan bazı mantar türlerinden hazırlanan özütlerde, yine değişik endüstri kolları için önemli bir enzim olan PFO aktivitesinin tayin edilmesi ve etkili bir PFO kaynağı olduğu tespit edilen *M. mastoidea*'dan hazırlanan enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonunun yapılmasıdır. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, enzimin pH ve ısıl kararlılığı, monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin optimum pH ve sıcaklığı, metal iyonlarının ve genel PFO inhibitörlerinin varlığının, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşabilmektir. Endüstrinin çokça ilgi ve ihtiyaç duyduğu monofenolaz aktivitesinin, mikrobiyal kaynaklardan yüksek oranlarda elde edilememesi ve bir çok bitkisel organizmada bulunmaması mantarlara olan ilgiyi arttırmaktadır. Dolayısıyla PFO enziminin mantarlardan saflaştırılıp ileri derecede karakterize edilmesini içeren çalışmalar endüstrinin bu ihtiyacına cevap verebilmesi açısından önem kazanmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan, TritonX-114 (TX-114) deterjanı, fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), 4-metil katekol (4-MK), katekol, *L*-3,4-dihidrosifenilalanin (*L*-DOPA), trosin, 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA), epikatekin, 3-metil-2-benzotiyazolinon (MBTH), sığır serum albumin (BSA), sodyumdodesil sülfat (SDS) ve folin kimyasalları Sigma Chemical Co., St Louis (MO, USA) firmasından, tampon çözelti hazırlamada ve diğer işlemlerde kullanılan dipotasyum hidrojenfosfat, potasyum dihidrojenfosfat, sodyum asetat, asetik asit, etilendiamintetra asetik asit (EDTA), magnezyum klorür, tris(hidroksimetil)amino metan (TRIS), dimetilformamid (DMF), askorbik asit, histidin, tiyüöre, sodyum metabisülfid, benzoik asit, sodyum azid, fenilalanin kimyasalları Merck A.G. (Darmstadt, Germany), glisin reaktifi KARE Kimya ve dış Tic. Ltd. Şti.' den sağlanmıştır.

Santrifüjleme işlemi Sigma 2-16 K marka santrifüj cihazında, spektrofotometrik ölçümler ATI Unicam UV2-100 spektrofotometre cihazı, elektroforez işlemi Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA USA) elektroforez cihazı ile, doku homojenizasyonu Braun marka parçalayıcı, pH ölçümleri Jenway 3010 pH-metresi ile yapılmıştır.

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM fosfat tamponu; 0,4060 g KH_2PO_4 'ün saf suda çözünerek hazırlanan 1 litrelik çözeltisinin 100mL' si pH 6.0 oluncaya kadar 0,0254 g K_2HPO_4 'ün saf suda çözünerek hazırlanan 100 mL'lik çözeltisiyle titre edilmesiyle hazırlandı. 3,314g K_2HPO_4 100mL suda çözülerek yine 100 mL saf suda hazırlanan 4,214g KH_2PO_4 çözeltisiyle pH 7.0 oluncaya kadar titre edilmesiyle hazırlandı.

50 mM asetat tamponu için 4,1 g sodyum asetat 700 mL saf suda çözüldükten sonra 50 mM asetik asit ile pH 4.0 ve 5.0 oluncaya kadar ayrı ayrı titre edildi ve çözelti saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

50 mM glisin-HCl tamponu ise 3,7535 g glisinin 700 mL saf suda çözünmesiyle hazırlanan çözeltinin, 0,05 M'lık HCl çözeltisi ile pH 3.0 oluncaya kadar titre edilmesi ve daha sonra çözeltinin hacminin saf suyla 1L'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

50 mM Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) tamponu 6,057g (0,05 mol) Trizma bazının 700 mL saf suda çözünmesinden sonra 0,05 M'lık HCl çözeltisi ile ayrı ayrı pH 8.0 ve 9.0 olacak şekilde titre edilmesi ve daha sonra da her bir çözeltinin hacminin 1L'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

2.3. Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisi

80 mL asetat tamponu (pH 4.0) içerisinde nihai konsantrasyonları %6 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF olacak şekilde belirtilen kimyasalların ilavesiyle oluşturulan çözeltinin hacminin aynı tamponla 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

2.4. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Trabzon'un Maçka ilçesinin Lişer Yaylasından toplanan *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer,, Lilloa 22: 417(1951) [1949]; *Lepista nuda* (Bull.:Fr.) Corumooke; *Hypholoma fasciculare* (Huds.) Quél.,Führer fürPilzfreunde (Zwickau): 21, 72 (1871); *Handkea excipuliformis* (scop.) Pers., Nova Hedwigia 48 (3-4): 283 (1989); *Amanita rubescens var. rubescens* (Pers.) Gray, Tent. disp. meth. Fung.: 71 (1797); *Boletus erythropus* Fr.; *Cantharellus lutescens* isimli mantarlar sıvı azot içerisinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra -30 °C 'deki derin dondurucuda iki gün bekletildi. Özüt hazırlama işlemi esnasında bu mantarların her birinden 10 g alınarak Dewar kabındaki sıvı azot içinde hücre membranlarının parçalanması için 15 dakika tutuldu. Mantarlar 50 mM 10'ar mL farklı pH'lardaki (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) ham özüt hazırlama çözeltisi içinde parçalayıcı yardımıyla 10 dakika iyice parçalandıktan sonra 4 °C' de adi süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntüler 4 °C'de 17000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Ayırma işlemi sonunda oluşan sıvı kısımlarda protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Yenebilir ve yüksek PFO aktivitesine sahip olması nedeniyle *Macrolepiota mastoidea* bu çalışmaya materyal olarak seçildi. Bu mantardan 30 g alınıp, sıvı azot içinde bekletildikten sonra en

yüksek aktiviteyi gösterdiği pH' da (pH 4.0 olan 30 mL asetat tamponu kullanarak) enzim özütü hazırlandı. Hazırlanan ham enzim özütü 1mL'lik porsiyonlara ayrılarak plastik tüplerde -30 °C' de çalışma süresi boyunca muhafaza edildi.

2.5. Protein Tayini

Hazırlanan mantar özütlerinin protein içeriği Lowry metoduna göre tayin edildi (Lowry, 1951). 10 µL özüt, %0,1 sodyumdodesil sülfat içeren 490 µL 0,1 N NaOH çözelti ile 500 µL'ye seyreltilerek bazikleştirildi. Bu çözeltiye, eşdeğer oranlarda karıştırılmış %0,2 Na₂CO₃'ın 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12,5 mL) ve %2 sodyumpotasyum tartaratın içeren %1 lik CuSO₄ çözeltisinden (0,25 mL) 1 mL ilave edildi. 5-10 dakika çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µL ilave edildi ve 30 dakika olgunlaşmaya bırakıldıktan sonra 650 nm' deki absorbanları okundu. Kalibrasyon grafiği, aynı işlemlerin tekrarlandığı BSA standart protein çözeltileri kullanılarak hazırlandı ve bu grafikten yararlanılarak özütlerin protein içerikleri tayin edildi.

2.6. PFO Aktivitesi Tayini

PFO aktivitesi spektrofotometrik olarak 4-MK için 494 nm' de diğer tüm substratlar için 500 nm'de absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin,1995). Belli hacimlerdeki substrat çözeltisi (100 mM stok substrat çözeltisi), aynı hacimde MBTH çözeltisi (stok 10 mM) ve %2 (v/v) DMF içeren reaksiyon karışımı tampon çözeltiyle 950 µL' ye tamamlandıktan sonra bu karışıma 50 µL enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Oluşan üründen dolayı reaksiyon karışımının absorban değişimi 2 dakika boyunca belirtilen dalga boyunda izlendi ve aktivite hesabı yapıldı. Bir ünite (U) PFO aktivitesi, 1 mL reaksiyon karışımında 1 dakikada oluşan 1 µM ürün miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgün aktivite ise, hazırlanan enzim özütündeki 1 mg protein başına hesaplanan enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Kong vd., 2000).

2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (PAGE)

Doğal PAGE Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA USA) elektrofözezi cihazı ve %8' lik poliakrilamid jel kullanılarak yapıldı. Ham özütteki proteinler 1:1 oranında aseton ile çöktürölerek Sigma 2-16 K marka santriföljle 5 dakika santriföljlendi. Katı kısım alınarak asetonun ortamdan uzaklaşması için 24 saat 4 °C' de bekletildikten sonra fosfat tamponunda (50 mM, pH 6.0) çözüdü ve elektrofözeze hazır hale getirildi. Elektrofözezi işlemi için örnekler, 16 mA' lik bir akımda 3 saat boyunca yürütölüdükten sonra çıkarılan jel 24 mM L-DOPA çözültisi ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle boyandı ve bantların varlığı gözlemlendi.

2.8. Substrat Özgünlüğü

PFO aktivitesi, substrat olarak 4-MK, katekol, L-DOPA, trosin, PHPPA, epikatekin kullanılarak optimum pH değerindeki tamponlarda MBTH ile maksimum absorpsiyonu verdikleri dalga boylarında absorbanstaki artış olarak belirlendi. (Espin, 1997) En yüksek PFO aktivitesi PHPPA (monofenolaz aktivitesi) ve 4-MK varlığında (difenolaz aktivitesi) bulundu ve bundan sonraki denemelerde monofenolaz ve difenolaz aktivitesini kıyaslamak için bu sustratlar kullanıldı.

2.9. Optimum pH

PFO aktivitesi, pH' ın bir fonksiyonu olarak 50 mM Glisin-HCl tamponunda pH 3.0; 50 mM asetat tamponunda pH 4.0 ve pH 5.0; 50 mM fosfat tamponunda pH 6.0 ve pH 7.0; 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8.0 ve pH 9.0 değerleri için monofenolik substrat olarak PHPPA ve difenolik substrat olarak 4-MK kullanılarak belirlendi. Elde edilen pH değerleri optimum substrat konsantrasyonu, protein miktarının aktivite üzerine etkisi ve diğer parametrelerin belirlenmesinde kullanıldı.

2.10. Optimum Sıcaklık

M. mastoidea'dan hazırlanan enzim özütündeki monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10-70 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde bir su banyosu yardımıyla ölçüldü. Tampon ve her bir substrat çözeltisi karışımları substratlar için belirlenen optimum pH değerlerinde ve yukarıda belirtilen sıcaklık aralığında 5 dakika inkübe edildi. Tampon ve substrat karışımının küvete boşaltılması esnasında meydana gelebilecek sıcaklık değişimini önlemek amacıyla küvetler birkaç dakika su banyosunda bekletildi. Karışıma enzim özütü ilave edilerek ölçümler mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde yapıldı.

2.10. Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim özütündeki monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin maksimum absorbans verdiği optimum protein miktarını belirlemek için her bir substratın optimum pH'larında sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarındaki (PHPPA için 0,01-0,5 mg/mL; 4-MK için 0,005-0,25 mg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirilerek enzimin doyumluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu.

2.11. Optimum Substrat Konsantrasyonunun, V_{maks} ve K_m 'nin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için daha önce belirlenen optimum şartlarda (protein miktarı, pH ve sıcaklık) özütün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için her bir substratın değişen konsantrasyonlarına (0,01-10 mM monofenolaz, 0,01-20 mM difenolaz için) karşı ölçülen hız değerleri grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan substrat doyumluk eğrilerinden her bir enzim aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi. Kinetik verilerin eldesi için ise yukarıda bahsedilen deney sonuçları kullanılarak Lineweaver-Burk eğrileri hazırlandı ve bu eğrilerden yararlanılarak yine her bir enzim aktivitesi için V_{maks} ve K_m değerleri belirlendi.

2.13. Isıl Kararlılık

PFO ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, enzim özütü ependorf tüpleri içerisinde bir su banyosunda 20-80 °C aralığında farklı sıcaklıklarda 10 °C artışlarla 60 dakika inkübe edildi ve 20 dakikalık aralıklarla bir buz banyosunda oda sıcaklığına soğutulduktan sonra daha önceden optimize edilen protein konsantrasyonlarına göre ısıtılan enzim özütüne yine daha önceden optimize edilen substrat konsantrasyonuna bağlı olarak substrat , MBTH ve DMF ilave edilerek kalan PFO aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Kalan yüzde PFO aktiviteleri ısıtılmamış enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

M. mastoidea monofenolaz ve difenolazının her bir sıcaklıktaki hız sabitleri (k) aşağıdaki (1) eşitliği ile hesaplandı.

$$k = -\frac{1}{\text{zaman (sn)}} \ln (\Delta_t/\Delta_o) \quad (1)$$

k= hız sabiti

Δ_t =kalan aktivite

Δ_o =ısıtma işleminden önceki aktivite

Monofenolaz ve difenolazın aktivasyon enerjisi (E_a), her bir sıcaklığın Kelvin cinsinden değerlerinin tersine karşılık, her bir sıcaklıktaki $\ln k$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun eğiminin $-E_a/R'$ ye (R , ideal gaz sabiti; $8,3145 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) eşitlenmesiyle hesaplandı.

Her bir sıcaklıktaki her iki enzimin serbest enerji değişimleri (ΔG) aşağıdaki (2) eşitliği hesaplandı.

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{k \times T}{K \times h} \right) \quad (2)$$

ΔG : serbest enerji

R : ideal gaz sabiti

T : sıcaklık (K)

k : hız sabiti

K : Boltzman sabiti ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

h : Planck sabiti ($6,6261 \times 10^{-34} \text{ Js}$)

Her iki enzimin her bir sıcaklıktaki entalpi değişimi (ΔH) aşağıdaki (3) eşitliği ile hesaplanmıştır.

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3)$$

Her iki enzimin her bir sıcaklıktaki entropi değişimi (ΔS) (4) eşitliği ile hesaplandı.

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (4)$$

2.15. İnhibitör etkisi

M. mastoidea hazırlanan enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin, uygun substratlar varlığında, Sodyum azid (1-40 mM), Benzoik asit (1-4 mM), Sodyummetabisülfid (0,01-1 mM), Askorbik asit (0,01-1 mM), Tiyüre (0,01-5 mM), Sistein (0,01-5 mM) ve Fenilalanin (0,01-5 mM) gibi genel PFO inhibitörlerinin belirtilen konsantrasyonlardaki varlığında, ayrıca nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde Al^{3+} , Mn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} gibi monovalent divalent ve trivalent metal iyonlarının mevcudiyetinde değişimi izlendi. İnhibitör konsantrasyonunun %kalan aktiviteye karşı grafiğe geğirilmesinin ardından %50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu I_{50} değeri olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Kullanılacak Mantarın Belirlenmesi

Çalışmalar esnasında kullanacağımız mantarın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda materyal olarak kullandığımız yedi cins mantar olan *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer., *Lilloa* 22: 417(1951) [1949]; *Lepista nuda* (Bull.:Fr.) Corumooke; *Hypholoma fasciculare* (Huds.) Quél., Führer für Pilzfreunde (Zwickau): 21, 72 (1871); *Handkea excipuliformis* (scop.) Pers., Nova Hedwigia 48 (3-4): 283 (1989); *Amanita rubescens var. rubescens* (Pers.) Gray, Tent. disp. meth. Fung.: 71 (1797); *Boletus erythropus* Fr.; *Cantharellus lutescens* için farklı pH' larda (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) özütler hazırlanmış ve bu özütlerin her birinde aktiviteler spektroskopik yöntemle tespit edilerek elde edilen sonuçlardan yüksek polifenol oksidaz aktivitesine sahip ve yenilebilir bir mantar türü olan *M. Mastoidea*'nın çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Kullanılan mantarların spesifik aktivite değerleri

Mantar ismi	Yenebilirlik	Spesifik Aktivite ($\mu\text{M}/\text{mg protein}$)				
		Asetat Tamponu (50 mM)		Fosfat Tamponu (50 mM)		Tris-HCl Tamponu (50mM)
		pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>M. mastoidea</i>	Yenebilir	163.7	145.4	78.9	17.3	10.2
<i>L. nuda</i>	Pişince yenebilir	99.5	99.4	82.1	77.4	75.2
<i>H. fasciculare</i>	Yenmez	186.3	396.2	76.3	49.1	18.0
<i>H. excipuliformis</i>	Pişince yenebilir	17.2	15.0	4.3	3.7	—
<i>A. rubescens</i>	Pişince yenebilir	97.2	83.7	—	—	—
<i>C. lutescens</i>	Pişince yenebilir	227.7	116.7	164.7	61.0	76.4
<i>B. erythropus</i>	Pişince yenebilir	—	506.6	127.6	103.9	1.8

3.2. Substrat Özgünlüğü

Karakterizasyon çalışması için seçilen *M. mastoidea* mantarından hazırlanan ham özütte bulunan Polifenol oksidaz enzimi (PFO) için substrat olarak 4-metil katekol (4-MK), katekol, *L*-3,4-dihidrosifenilalanin (*L*-DOPA), tirozin, 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA) ve epikatekin kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. *M. Mastoidea* özütünde monofenolik ve difenolik substratların %Bağlı Aktivite değerleri

	Bağlı Aktivite (%)
<i>Monofenolik substratlar</i>	
PHPPA	100
Tirosin	1.8
<i>Difenolik substratlar</i>	
4-MK	100
Katekol	66,8
<i>L</i> -DOPA	13.5
Epikatekin	0.9

Elde edilen bu sonuçlar neticesinde enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu monofenolik substrat olan PHPPA ve difenolik substrat olan 4-MK bundan sonraki çalışmalarda monofenolaz ve difenolaz enzimlerinin karakterizasyonunda substrat olarak kullanılmıştır.

3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

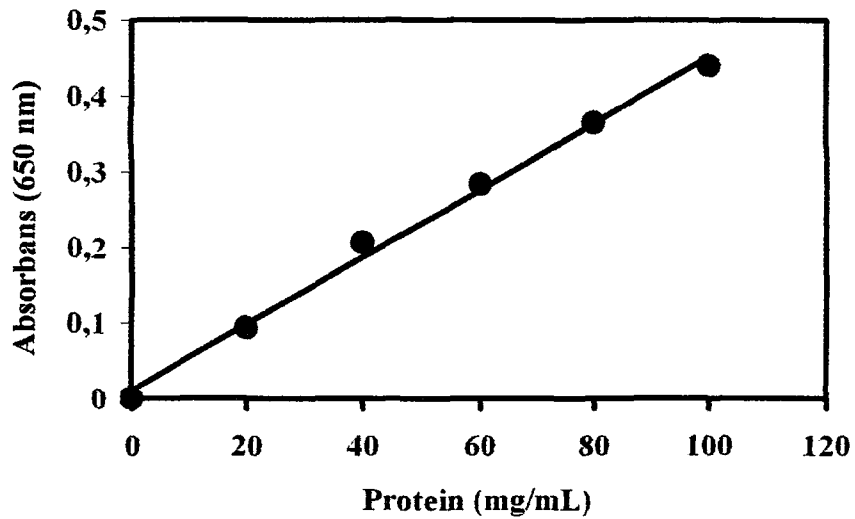
Macrolepiota mastoidea (Fr.) mantarından hazırlanan enzim özütü için doğal protein elektrofrez uygulandıktan sonra elektrofrez jelinin 24 mM *L*-DOPA ile boyanması sonucunda elde edilen diyagramda Rf değerleri sırasıyla 0.38 (soluk) ve 0.47 (baskın) olan birbirinden farklı iki bandın varlığı gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *M. mastoidea* mantarındaki PFO izoenzimlerin *L*-DOPA substratıyla boyanmış doğal poliakrilamid jel elektroforezi.

3.4. Protein Tayini

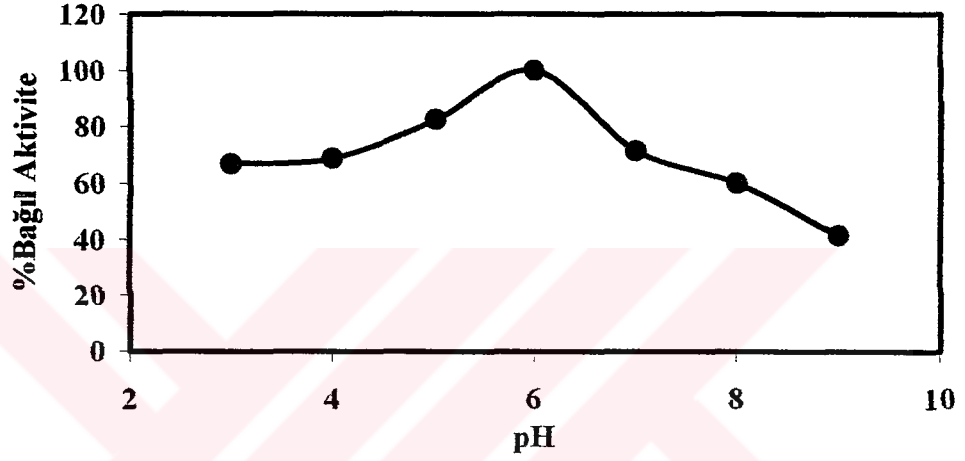
Kullanılan mantardan taze olarak hazırlanan özütün protein içeriği Lowry yöntemine göre yapıldı ve BSA standartları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden (Şekil 5) ham özütteki protein miktarı 2,976 mg/mL olarak bulundu.



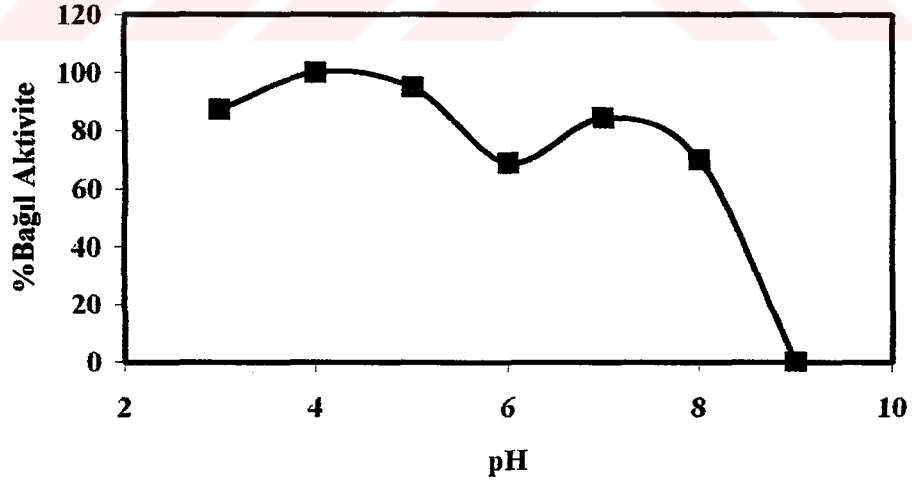
Şekil 5. Protein tayininde kullanılan BSA kalibrasyon grafiği

3.5. Optimum pH

M. mastoidea'nin sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin optimum pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, 4-MK substratı varlığında difenolaz ve PHPPA substratı varlığında monofenolaz aktiviteleri için pH-%Bağıl Aktivite eğrileri hazırlandı. Buna göre, ham enzim özütündeki difenolaz aktivitesi için optimum pH değeri 4.0, monofenolaz aktivitesi için 6.0 olarak bulunmuştur (Şekil 6 ve 7).



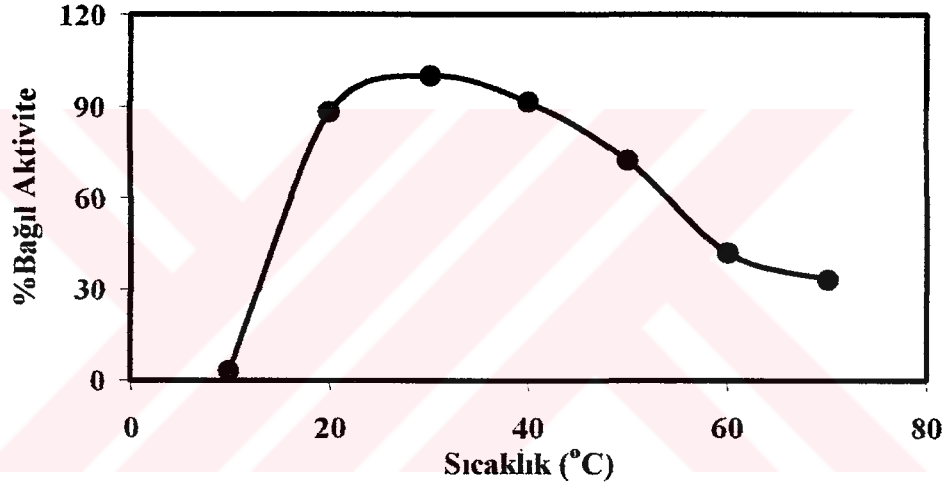
Şekil 6. *M. mastoidea* monofenolazının pH bağımlılık eğrisi



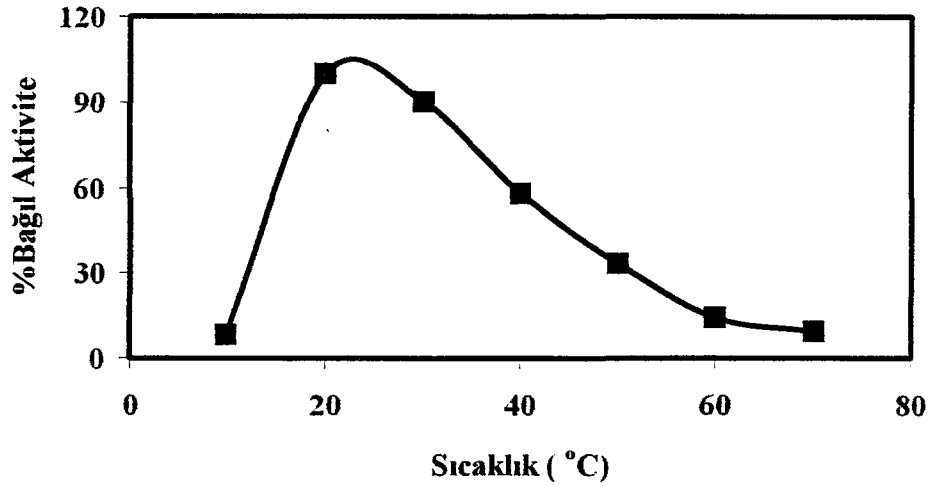
Şekil 7. *M. mastoidea* difenolazının pH bağımlılık eğrisi

3.6. Optimum Sıcaklık

M. mastoidea monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 10-70°C arasında denenmiş Sıcaklık-%Bağlı Aktivite grafikleri Şekil 8 ve Şekil 9' da gösterilmiştir. Buna göre monofenolaz aktivitesi için optimum sıcaklık değerinin (30 °C) elde edildiği eğri, 30 °C'ye kadar artan ve daha sonra bir omuz şeklinde 70 °C'ye kadar azalan olduğu gözlenmiş olup 70 °C'de bağlı aktivitesini %30 oranında koruduğu tespit edilmiştir. *M. mastoidea* difenolazının Sıcaklık-%Bağlı Aktivite grafiği incelendiğinde ise optimum sıcaklık değeri 20 °C olan bir çan eğrisi verdiği ve 70 °C'de bağlı aktivitesini yaklaşık %10 oranında koruyabildiği gözlenmiştir.



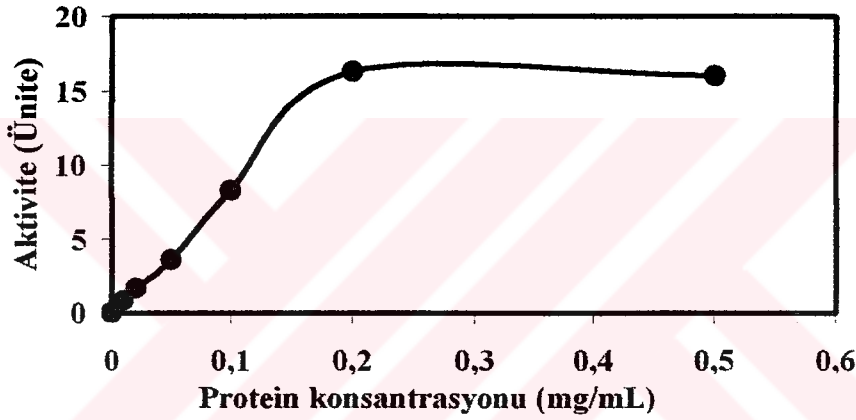
Şekil 8. *M. mastoidea* monofenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi



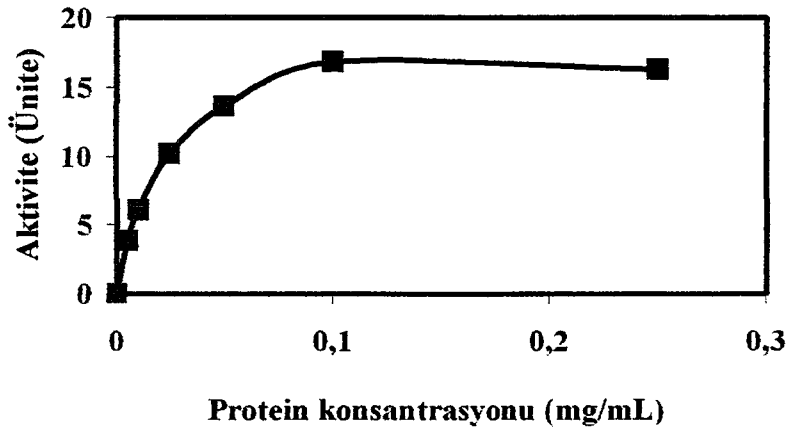
Şekil 9. *M. mastoidea* difenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi

3.7. *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolaz aktivitesine protein miktarının etkisi

M. mastoidea'dan hazırlanan ham enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin, her bir aktivite için önceden belirlenen uygun bir substratın sabit bir konsantrasyonunda reaksiyon karışımındaki protein miktarına bağlı olarak değişimi incelendi. Elde edilen hiperbolik eğrilerden monofenolaz aktivitesi için optimum protein miktarının 0,2 mg/mL ve difenolaz aktivitesi için ise 0,1 mg/mL olarak belirlendi (Şekil 10 ve Şekil 11). Monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin daha sonraki ayrıntılı karakterizasyonu çalışmalarında reaksiyon karışımları, nihai konsantrasyonları belirtilen miktarlarda protein içerecek şekilde hazırlandı.



Şekil 10. *M. Mastoidea* monofenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi



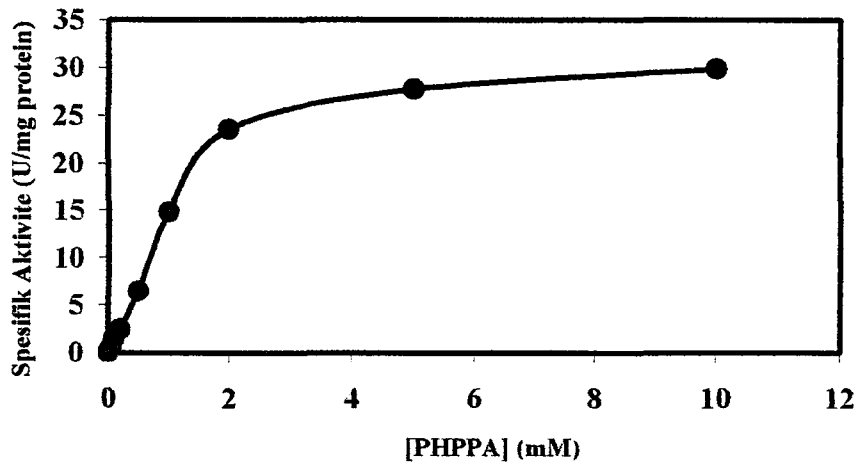
Şekil 11. *M. Mastoidea* difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

3.8. Substrat konsantrasyonunun *M. Mastoidea* monofenolaz ve difenolaz aktivitesi üzerine etkisi

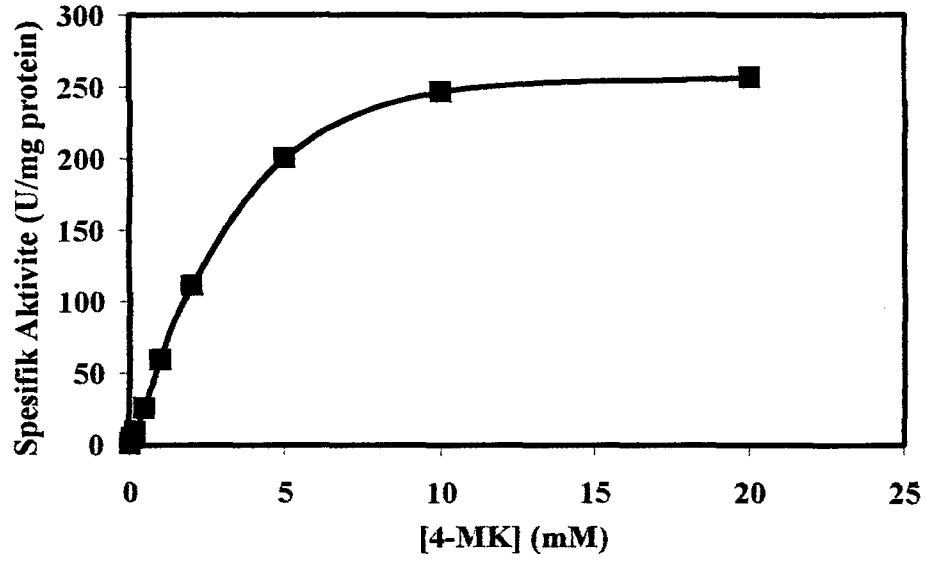
Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, *M. Mastoidea*'nın sahip olduğu monofenolaz ve difenolazın çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacıyla nihai konsantrasyonu monofenolaz aktivitesi için 0,01-10 mM ve difenolaz aktivitesi için 0,01-20 mM olacak şekilde sırasıyla PHPPA ve 4-MK substratları kullanılarak oluşan oksidasyonun ürünlerinin oluşum hızları belirlendi. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için substrat doygunluk eğrileri (Şekil 12, 13), kinetik veriler için ise Lineweaver-Burk eğrileri çizildi (Şekil 14, 15). Substrat doygunluk eğrilerinden her iki enzim aktivitesinin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu, etkili bir aktivitenin gözlenmesi için monofenolaz aktivitesi durumunda 5 mM PHPPA, difenolaz aktivitesi durumunda da 10 mM 4-MK gerektiği gözlemlendi. Lineweaver-Burk eğrilerinden monofenolaz aktivitesi için PHPPA substratı varlığında V_{maks} değeri 41 ($\mu\text{M}/\text{dak mg}$ protein) ve K_m değeri 2.7 mM olarak, difenolaz aktivitesi için ise 4-MK substratı varlığında V_{maks} değeri 384.6 ($\mu\text{M}/\text{dak mg}$ protein) ve K_m değeri 5.3 mM olarak tespit edildi. Bu kinetik veriler toplu bir şekilde Tablo 5. de verilmektedir.

Tablo 5. PFO aktivitesinin bazı enzim kinetiği değerleri

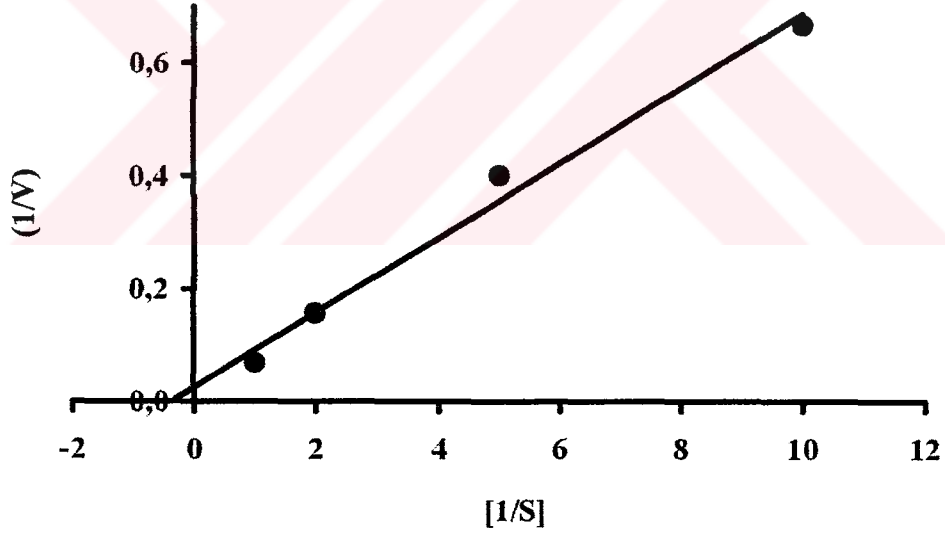
Aktivite türü	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak mg}$ protein)	K_m (mM)	$V_{maks}/K_m(\text{dk}^{-1})$
Monofenolaz	41	2,7	15,2
Difenolaz	384,6	5,3	72,6



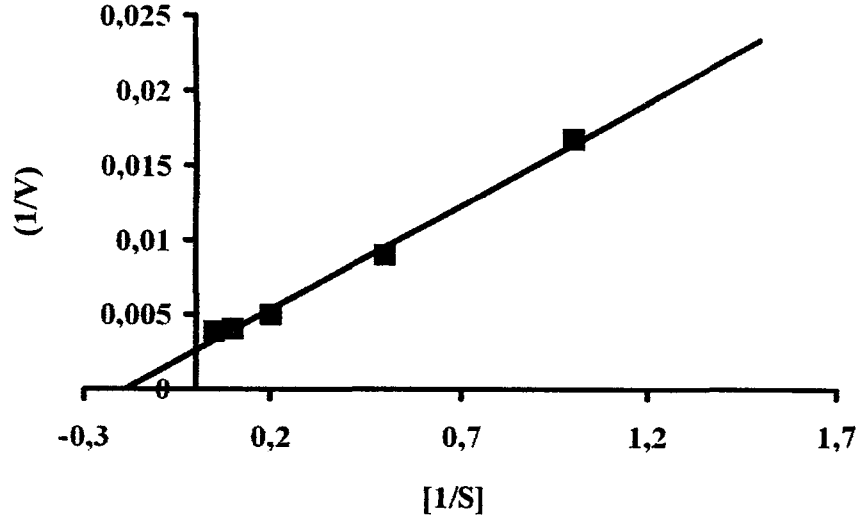
Şekil 12. *M. mastoidea*'nın monofenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 13. *M. mastoidea*'nın difenolaz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi



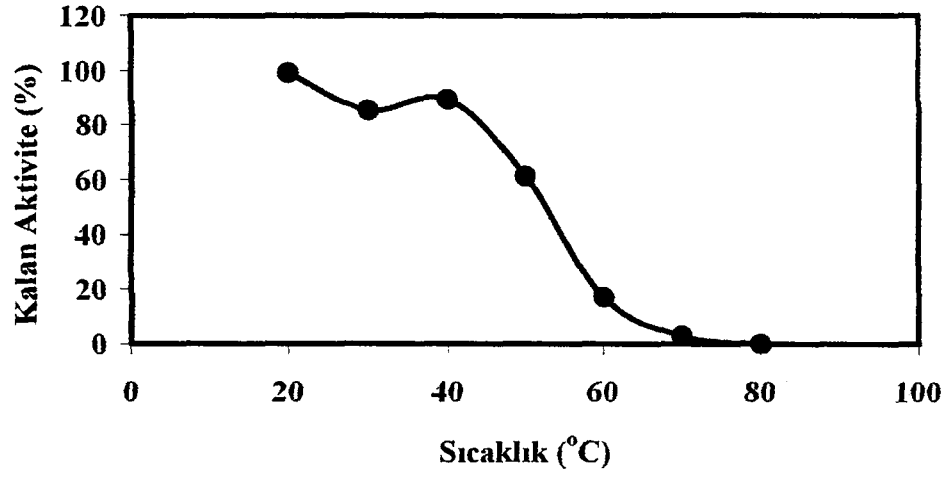
Şekil 14. *M. mastoidea*'nın monofenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi



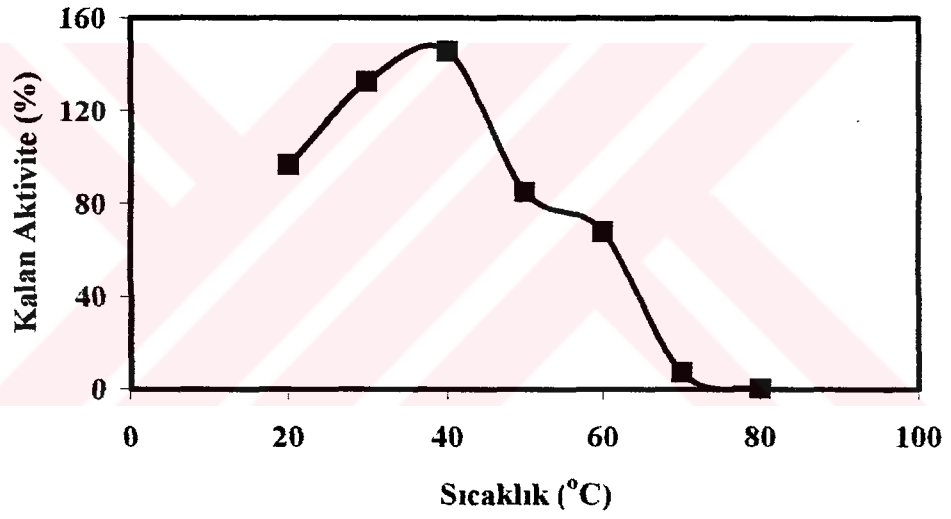
Şekil 15. *M. mastoidea*'nın difenolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

3.9. *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolazının ısı kararlılığı

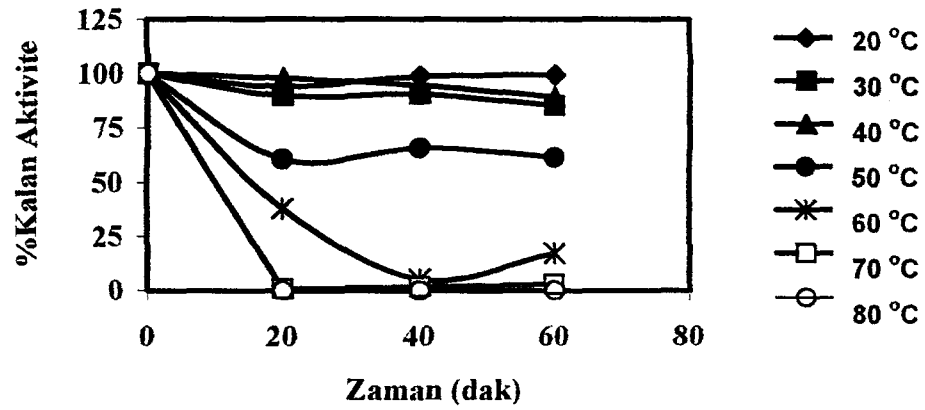
%Kalan monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin tayini için ham enzim özütünün 20-80 °C aralığında 10 °C' lik artışlarla 60 dakika bekletildiğinde gözlenen kalan aktiviteler sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçildi (Şekil 16, 17). Bu eğrilerden monofenolaz aktivitesi, optimum sıcaklığında (30 °C) başlangıç aktivitesinin %80 ini korurken sıcaklık artışı ile birlikte enzim kararlılığını kaybetmekte ve 80 °C de ise aktivitesini tamamiyle yitirmektedir (Şekil 16). *M. mastoidea*'dan hazırlanan enzim özütünün difenolaz aktivitesi ise optimum sıcaklığında (20 °C) başlangıç aktivitesini korurken sıcaklığın artışıyla birilikte enzim aktivitesini giderek kaybetmekte ve 80 °C de ise yine benzer şekilde enzim aktivitesini tamamiyle yitirmektedir (Şekil 17). Monofenolaz aktivitesi denenen sıcaklıklar içerisinde 20 °C de 60 dakika boyunca başlangıç aktivitesini muhafaza ederken 80 °C de 20. dakikada başlangıç aktivitesini tamamiyle kaybetmektedir (Şekil 18). Difenolaz aktivisinde ise enzim en yüksek kararlık gösterdiği sıcaklık olan 40 °C de 60 dakika boyunca %150 lere varan bir aktiviteye sahip iken 80 °C de 20. dakikada başlangıç aktivitesi tamamiyle kaybolmuştur (Şekil 19).



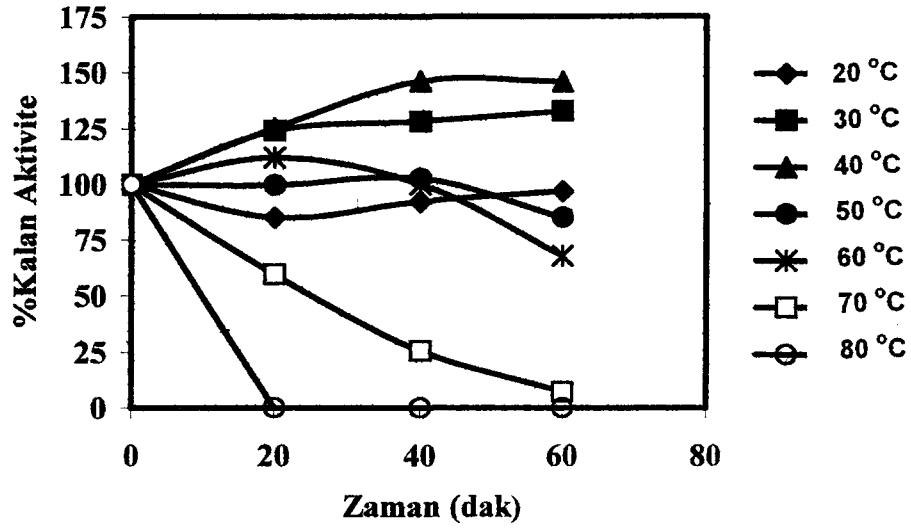
Şekil 16. *M. mastoidea* monofenolazının ısı kararlılık eğrisi



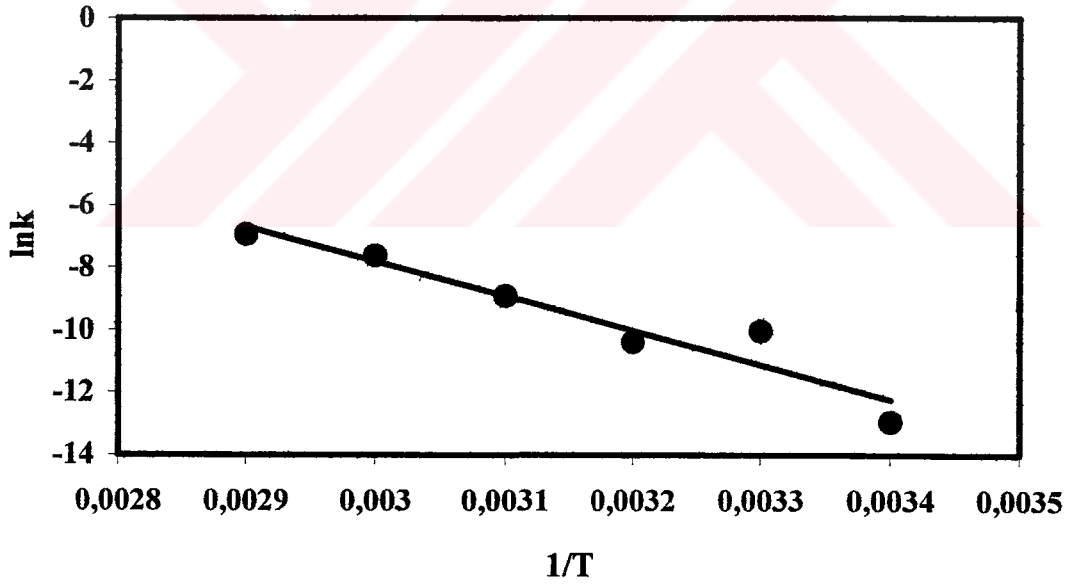
Şekil 17. *M. mastoidea* difenolazının ısı kararlılık eğrisi



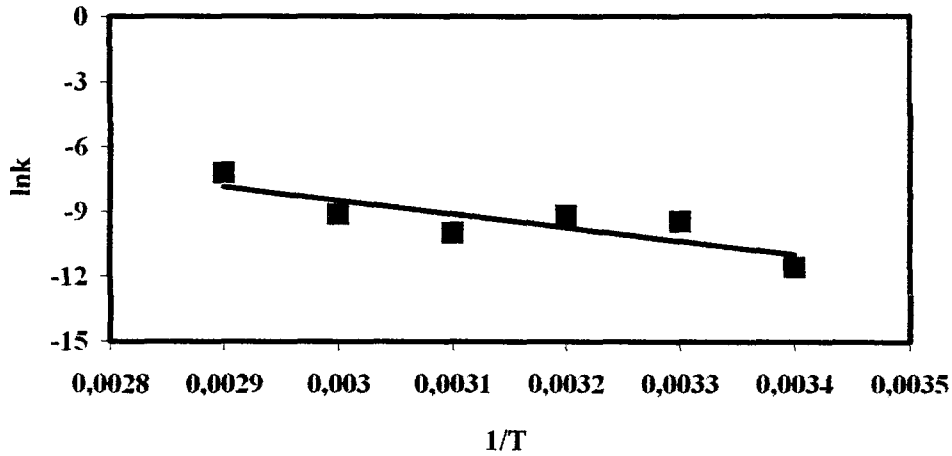
Şekil 18. *M. mastoidea* monofenolazının zamana bağlı ısı kararlılık eğrisi



Şekil 19. *M. mastoidea* difenolazininin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi



Şekil 20. *M. mastoidea* monofenolazininin 1/T-lnk eğrisi



Şekil 21. *M. mastoidea* difenolazının 1/T-lnk eğrisi

M. mastoidea'dan hazırlanan ham enzim özütünün 20-80 °C aralığındaki farklı sıcaklıklarda gösterdiği monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için (1) eşitliği yardımıyla bulunan hız sabiti (k) değerlerinin logaritmasının sıcaklık değerinin tersine (1/T) karşı çizilen grafikten elde edilen doğruların eğimi ayrı ayrı hesaplanarak monofenolaz (PHPPA substratı varlığında) ve difenolaz (4-MK substratı varlığında) aktiviteleri için aktifleşme enerjileri sırasıyla (E_a) 92066,4 J/molK ve (E_a) 52239,2 J/molK olarak belirlendi (Şekil 20, 21).

M. mastoidea monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin bazı termodinamik parametrelerle olan ilişkisinin belirlenmesi amacıyla, ham enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz katalizli reaksiyonların farklı sıcaklıklarda hesaplanan hız sabitleri (k) ile diğer termodinamik parametreler olan ΔG , ΔH , ΔS sırasıyla (2), (3), (4) eşitlikleri kullanılarak hesaplandı (Tablo 6,7).

Tablo 6. *M. mastoidea* monofenolaz aktivitesi için hesaplanan bazı termodinamik parametreler

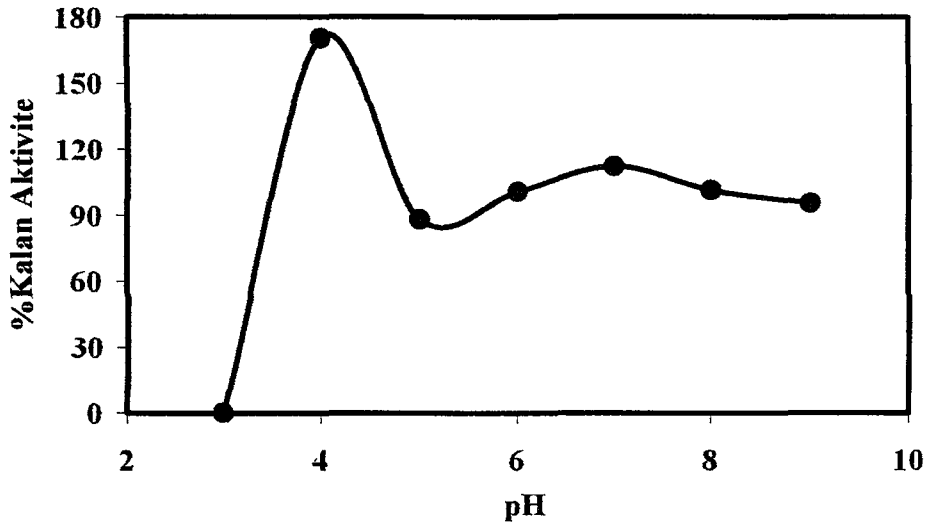
Sıcaklık (°C)	$k \times 10^{-5} (s^{-1})$	$\Delta G (J mol^{-1})$	$\Delta H (J mol^{-1})$	$\Delta S (J mol^{-1}K^{-1})$
20	0,24	296659	89630	-706
30	4,38	314185	89547	-741
40	3,13	323764	89464	-748
50	13,6	338138	89381	-770
60	48,9	352234	89298	-790
70	97,5	364864	89214	-804
Ortalama değer		331641	89422	-759

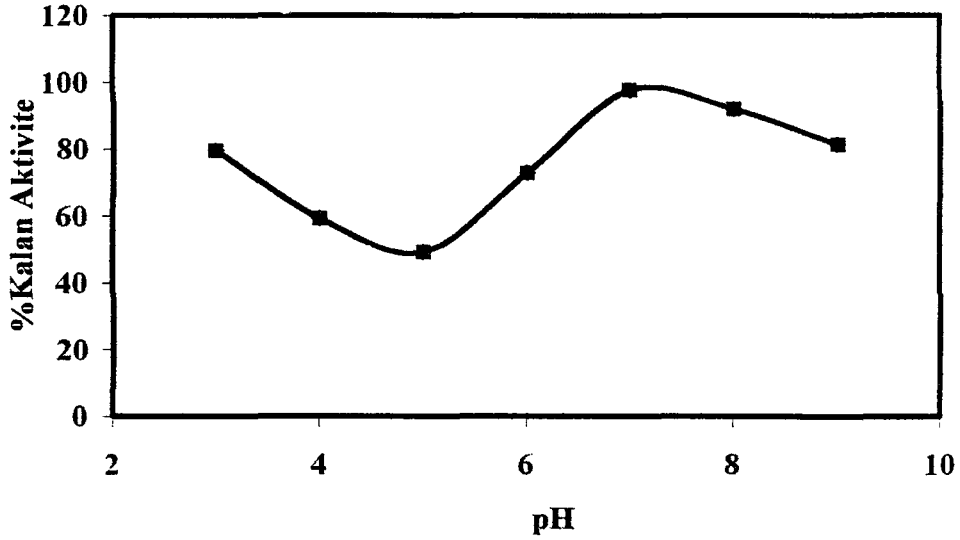
Tablo 7. *M. mastoidea* difenolaz aktivitesi için hesaplanan bazı termodinamik parametreler

Sıcaklık(°C)	$k \times 10^{-5} (s^{-1})$	$\Delta G (J mol^{-1})$	$\Delta H (J mol^{-1})$	$\Delta S (J mol^{-1}K^{-1})$
20	0,932	299964	49803	-854
30	7,82	315646	49720	-878
40	10,3	326864	49637	-886
50	4,51	335173	49554	-884
60	10,7	348027	49470	-896
70	73,5	364058	49387	-917
Ortalama değer		331622	49595	-886

3.10. pH kararlılığı

%Kalan monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin tayini için enzim özütü 4°C'de 24 saat inkübe edildiği pH değerlerinde (pH 3.0-9.0) gözlenen kalan aktiviteler pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 22, 23). Bu eğrilere göre, *M. mastoidea* monofenolazı, pH 4.0'de orijinal aktivitesinin %70 oranında arttığı, fizyolojik pH ve denenen bazik pH değerlerinde başlangıç aktivitesinin hemen hemen tamamıyla korunduğu gözlenmiştir. *M. mastoidea* difenolazının ise monofenolaza benzer şekilde fizyolojik pH değerlerinde başlangıç aktivitesini tamamıyla koruduğu tespit edilmiştir.

Şekil 22. *M. mastoidea* monofenolazının pH kararlılık eğrisi



Şekil 23. *M. mastoidea* difenolazının pH kararlılık eğrisi

3.11. *M. mastoidea* Monofenolaz ve Difenolaz Aktivitesine Genel PFO İnhibitörlerinin ve Metal İyonlarının Etkisi

M. mastoidea monofenolaz ve difenolaz aktivitesine 1-40 mM konsantrasyon aralığında sodyum azid, 1-4 mM aralığında benzoik asid, 0,01-1 mM konsantrasyon aralığında sodyummetabisülfid ve askorbik asit, 0,01-5 mM aralığında ise tiyoüre, sistein ve fenilalanin gibi bazı genel PFO inhibitörlerinin etkisi incelendi. Bundan başka nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde Mn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} gibi monovalent, divalent ve trivalent metal iyonlarının da *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolazı aktiviteleri üzerine etkisi araştırıldı. I_{50} değerleri, her bir inhibitör varlığında, hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesinde başlangıç aktivitelerinin yarıya düştüğü inhibitör konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. I_{50} değerleri incelendiğinde monofenolaz aktivitesi için tiyoüre ve sistein gibi kükürt içeren bileşikler ile askorbik asidin en etkili inhibitör olduğu, fenilalaninin ise yüksek konsantrasyonlarda dahi düşük bir inhibisyona sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 8). Difenolaz aktivitesinde ise yine I_{50} değerleri incelendiğinde sodyummetabisülfid ve askorbik asidin etkili birer inhibitör olduğu fakat sistein durumunda difenolaz aktivitesinin zayıf inhibisyonunun söz konusu olduğu tespit edilmiştir. Fenilalanin ise difenolaz aktivitesinde bir azalmaya neden olmamıştır (Tablo 9). *M. mastoidea* monofenolaz aktivitesine Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları yaklaşık %100 inhibisyonla etki ederken Co^{2+} nın monofenolaz aktivitesini yaklaşık %50

oranında aktive ettiği gözlemlendi (Tablo 10). Difenolaz aktivitesine ise yalnızca Cu^{2+} iyonunun, çalışılan konsantrasyonda, %4.5 oranında zayıf bir inhibisyonla, Cd^{2+} durumunda yaklaşık %56 oranında ve denenen diğer metal iyonları durumunda değişik oranlarda aktivitenin artışı şeklinde etki ettiği belirlendi (Tablo 11).

Tablo 8. *M. mastoidea* monofenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	% inhibisyon	I_{50} (mM)
Sodyum azid	10.0	95.3	1.40
Benzoik asit	4.0	67.8	0.84
Sodyummetabisülfid	1.0	92.3	0.47
Askorbik asit	0.1	95.3	0.04
Tiyüüre	5.0	99.1	0.01
Sistein	5.0	100.0	0.37
Fenilalanin	5.0	56.2	3.80

Tablo 9. *M. mastoidea* difenolaz aktivitesine genel PFO inhibitörlerinin etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon	I_{50} (mM)
Sodyum azid	10.0	99.4	0.27
Benzoik asit	4.0	87.0	0.64
Sodyummetabisülfid	1.0	99.7	0.06
Askorbik asit	0.1	98.5	0.04
Tiyüüre	5.0	100.0	0.26
Sistein	5.0	47.6	4.90
Fenilalanin	Yok	Yok	Yok

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Enzimler doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Protein yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle oksidoredüktaz sınıfı enzimler üzerinde çok fazla çalışılmamış ancak Polifenoloksidaz (PFO) enzimi son 30 yıl içerisinde bir çok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Seo vd., 2003). PFO enzimi içinde bulunduğu organizmaya ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak aynı organizmanın farklı çeşitlerinde bile farklı oranlarda aktivite gösterebilir. Bitkilerde meyvenin ham veya olgun olması bu enzimin katalizlediği reaksiyonu etkileyen bir unsurdur. Enzim özütü bir çok izoenzim kombinasyonunu ve enzim olmayan protein karışımlarını içerebilir. Bu durum yiyecek endüstrisinde oldukça tercih edilen bir durumdur (Duangmal, 1999).

Gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer, Lilloa 22: 417(1951) [1949] (*M. mastoidea*) mantarında oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin varlığı, biyokimyasal, kinetik ve bazı termodinamik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler bilinen diğer organizmalardaki PFO'lar ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan %8'lik doğal protein poliakrilamid jel elektroforezinde *M. mastoidea* mantarına ait Rf değerleri 0.38 (soluk) ve 0.45 (baskın) iki bandın gözlenmesi söz konusu mantardan hazırlanan ham enzim özütünün PFO aktivitesi gösteren iki izoenziminin veya substratın yükseltgenmesini sağlayacak farklı enzim aktivitelerinin varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4). Daha önce meyve, sebze ve farklı organizmalarda yapılan çalışmalar sonucu ikiyle dört arasında PFO izoenziminin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları; kayısı, zerdali, erik (Fraigner, 1995), kiraz (Pifferi ve Culterera, 1974), karayemiş (Colak vd.,2004), döngel (Dincer vd., 2002), papaya (Cano vd., 1996), *A.kestanbolensis* K1 ve K4^T (Yildirim vd., 2004).

Yapılan ön çalışmalar sonucunda yüksek PFO aktivitesine sahip olması ve bir çok ülkede önemli ölçüde tüketiliyor olması nedeniyle *M. mastoidea*'da diğer mantarlara tercih edilmiştir(Tablo 3). Ayrıca bu çalışmada denenen bütün difenolik ve monofenolik substratlar olan katekol, 4-metil katekol (4-MK), L-3,4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA),

trosin, 3-(4-hidroksifenil)-propionik asit (PHPPA) ve epikatekin'in *M. mastoidea*'da bulunan PFO enzimi tarafından yükseltildiği görülmüştür. En yüksek aktiviteler monofenolik substrat olarak PHPPA ve difenolik substrat olarakta 4-MK varlığında gözlenmiştir (Tablo 4). Bu denemeler sonucu elde edilen veriler enzim aktivitesi diğer bitki kaynaklarından farklı ancak bir çok mantar kaynağına benzer olarak monofenolaz ve difenolaz aktivitelerini bir arada bulundurduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 1997; Ratcliffe vd., 1994; van Rensburg vd., 2000; Fenoll vd., 2000; Seo vd., 2003).

Enzimlerde optimum pH değerleri kullanılan materyalin kaynağına, ekstraksiyon metoduna ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir (Jiang vd., 1999). *M. mastoidea* optimum monofenolaz aktivitesi PHPPA substratı varlığında pH 6.0'da (50 mM fosfat tamponu) ve optimum difenolaz aktivitesi ise 4-MK substratı varlığında pH 4.0'de (50 mM sodyum asetat tamponu) gözlenmiştir (Şekil 6, 7). Ayrıca ham enzim özütünün sahip olduğu difenolaz aktivitesinin pH 7.0 civarında ikinci bir pik göstermesi özütte bulunabilecek izoenzimlerin varlığına atfedilebilir. Değişik organizmalardan hazırlanan ham özüt veya saf enzimlerin sahip olduğu monofenolaz aktivitesi için önceden yapılan çalışmalarda, optimum pH değerinin patlıcan için 5.5 (Perez-Gilabert ve Carmona, 2000), avokado için 6.8 (Espin vd., 1997) olduğu belirtilmiştir. Değişik organizmalardaki difenolazların karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ise taro ve patates için optimum pH değerinin 4.6 ve 6.8 (Duangmal vd., 1999), loquat için 4.5 (Ding vd., 1998), elma için 5.0-7.5 (Rocha vd., 2001) ve kayısı için 7.0-8.5 (Arslan vd., 1998) olduğu bildirilmiştir. Buna göre, *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolazı önceden bildirilen monofenolaz ve difenolazlarla pH optimumu açısından uygunluk göstermektedir.

M. mastoidea'dan hazırlanan ham enzim özütü farklı pH'larda 4 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldığında hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitelerinde genel olarak ciddi kayıpların olmadığı dolayısıyla özütün özellikle sahip olduğu monofenolaz aktivitesi açısından yüksek pH kararlılığına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 22, 23). Ham enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz aktivitesi, özütün pH 4.0 da 4°C'de 24 saat inkübasyonun ardından, başlangıç aktivitesine göre %70 oranında bir artış göstermekte olup daha yüksek pH değerlerinde ve fizyolojik pH değerlerinde ise başlangıç aktivitesini korumaktadır. Özütteki difenolaz aktivitesinin, pH kararlılığı incelendiğinde önceden bildirilen difenolazlara benzer şekilde, fizyolojik pH değerlerinde orijinal aktivitesini koruduğu fakat enzimin genel olarak bazik pH'larda asidik pH'lara göre daha kararlı olduğu gözlenmiştir. 4°C'de 24 saat inkübasyonun ardından asidik pH değerlerinde orijinal

aktivitesini % 40 oranında, bazik pH değerlerinde ise orijinal aktivitesini büyük oranda koruduğu gözlenmiştir (Ding vd., 1998; Colak vd., 2004).

Ham enzim özütünün monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan incelemelerde optimum sıcaklığın monofenolaz ve difenolaz aktivitesinde farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 8, 9). *M. mastoidea*'dan elde edilen enzim özütünde en yüksek monofenolaz aktivitesi 30 °C'de ve difenolaz aktivitesi 20 °C'de gözlenmiştir. Farklı bitki türlerinde PFO enziminin optimum sıcaklıkları *M. mastoidea* ile benzerlik göstermekle birlikte; erikte 37 °C (Siddiq vd., 1992), döngel meyvesinde 35 °C (Dincer vd., 2002), karayemişte 40-50 °C (Colak vd., 2004), taro ve patates de 25-30 °C (Duangmal vd., 1999) olarak, bazı bakteri PFO'ları için ise *T. roseum* 50 °C (Kong vd., 2000), *A. kestanbolensis* K1 ve K4^T 80 °C ve 70 °C (Yildirim vd., 2004) olarak bildirilmiştir.

M. mastoidea monofenolaz aktivitesi optimum sıcaklık değerine yakın sıcaklıklarda başlangıç aktivitesini korurken, sıcaklığın artışı ile birlikte monofenolaz aktivitesi tedricen azalmaktadır. Buna karşılık difenolaz aktivitesi, optimum sıcaklık değerinden itibaren 40 °C' ye kadar başlangıç aktivitesinde %70 lik bir artış gösterirken yüksek sıcaklıklarda kalan aktivite monofenolaz aktivitesinde olduğu gibi kademeli olarak azalmaktadır. Her iki enzimin gösterdiği bu davranışlar, sıcaklığın etkisi ile enzimin 3 boyutlu yapısında negatif değişimlerin olmasıyla ilişkilendirilebilir (Duangmal vd., 1999; Jiang vd., 1999; Amiza ve Apenten, 1994; Vamos-Vigyazo, 1981; Arslan vd., 1997, 1998).

Monofenolik ve difenolik substratlar olan PHPPA ve 4-MK'ün her biri için çizilen substrat-doygunluk eğrilerinden *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolazının basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça gözlenmiştir (Şekil 12, 13). Her bir substrat varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinden (Şekil 14, 15) bulunan enzimin substrata ilgisini açıklayan K_m ve katalitik etkinliği ortaya koyan (V_{maks}/K_m) değerleri dikkate alındığında veya literatürle karşılaştırıldığında seçilen substratların monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için son derece uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, difenolazlar için 4-MK gibi küçük molekül ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar oldukları da belirtilmektedir (Perez-Gilabert vd., 2000; Palmer, 1995; Walker, 1995; Duangmal vd., 1999; Dincer vd., 2002; Yildirim vd., 2004).

E_a , ΔG , ΔS , ΔH gibi bazı termodinamik parametreler, enzimin termal kararlılığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen farklı sıcaklıklardaki bir saatlik inkübasyonun ardından her bir substrat için altmışıncı dakikadaki kalan aktiviteler kullanılarak

hesaplanmıştır (Tablo 6, 7). Monofenolaz aktivitesi için PHPPA substratı varlığında hesaplanan bu termodinamik parametreler sonucunda 20-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda hesaplanan ΔH değerlerinin ortalamasının yüksek olması literatürde de belirtildiği gibi bu aktivitenin difenolaz aktivitesine nazaran sıcaklığa karşı daha kararlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca ΔH değeri transisyon halinin oluşumunda kovalent olmayan bağların kırılması için gerekli olan enerjinin bir ölçüsüdür (Duangmal vd., 1999; Amiza ve Apenten, 1994; Galani ve Apenten, 1997; Mazzafera ve Robinson, 2000)

Mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında meydana gelen enzimatik esmerleşme mantar endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bunu önlemek amacıyla en sık başvurulan yol inhibitörlerin kullanımudur. Yakın zamana kadar bu amaçla inhibitör olarak en çok SO_2 kullanılmış ancak insan sağlığına verdiği zararlardan dolayı tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Yapılan çalışmada bir çok bitki PFO'su için inhibitör olarak denenен sodyummetabisülfid, sodyum azid, benzoik asid, sistein, askorbik asid, fenilalanin ve tiyoüre *M. mastoidea*'dan elde edilen PFO enzimi içinde denenmiş ve her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 8, 9). En yüksek bağlanma ilgisi 4-MK substratı varlığında askorbik asit ve bunu takiben sodyummetabisülfid'te gözlenmiştir. PHPPA substratı varlığında ise en yüksek bağlanma ilgisi tiyoüre ve bunu takibinde askorbik asit olarak tespit edilmiştir. (Duangmal vd., 1999; Ding vd., 1998; Zhang vd., 1997; Yang vd., 2000; Ros vd., 1993; Sapers vd., 1987; Hsu vd., 1988; Dudley vd., 1989). Askorbik asit ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden enzim aktivitesini kısıtlayabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Ayrıca askorbat difenolaz enzimi tarafından üretilen kinonoid bileşiklerin üretimini bu bileşiklerle veya enzimin bakır merkezli aktif bölgesiyle şelat oluşturarak kısıtlayabilmektedir (Martinez ve Whitaker, 1995; Sapers, 1993; Zawistowski vd., 1991). Kükürt grubu içeren bileşiklerin inhibisyon mekanizmasının uzun süredir devam eden tartışmaların ardından iki şekilde olabileceğine karar verilmiştir. Bunlardan birincisi kinon bileşikleri ve kükürt atomu arasında konjugat meydana gelerek bu bileşiklerin çökmesi ve dolayısıyla melanin pigmentlerinin oluşmamasıdır. İkinci görüş ise bu bileşiklerin içerdiği kükürdün yüksek bir ilgiyle enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır atomuna ve histidin birimlerine dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla inhibisyonun gerçekleşmesidir (Ding vd., 2002). Bu çalışmada, önceden de denenerek çeşitli PFO aktiviteleri üzerine etkisi bildirilen, bazı metal iyonlarının *M. mastoidea* monofenolaz ve difenolaz aktivitesi üzerine etkileri

incelendi ve benzer sonuçlar tespit edildi (Kong vd., 2000; Yildirim vd., 2004). Monofenolaz aktivitesi için Mn^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} aktivasyona sebep olurken K^+ , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} inhibisyona sebep olmuştur. Difenolaz aktivitesinde ise Cu^{2+} ve Hg^{2+} inhibisyona sebep olurken diğer metal iyonları aktivasyona sebep olmuştur. PHPPA substratı varlığında en yüksek aktivasyon Co^{2+} metal iyonu varlığında 4-MK substratı varlığında ise en yüksek aktivite Cd^{2+} metal iyonu varlığında gözlenmiştir (Tablo 10, 11). Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu yüzden proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler. Buna ilave olarak aktivasyona ve inhibisyona sebep olma gibi farklı durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu enzim yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabilir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001).



5. ÖNERİLER

Enzimlerin ılımlı reaksiyon şartlarında yüksek katalitik güç ve seçicilik göstermeleri gibi üstün özellikleri, enzimleri endüstriyel uygulamalarda ve terapötik amaçlı kimyasalların sentezi reaksiyonlarında kullanımları açısından günden güne yaşamın vazgeçilmezleri haline getirmektedir. Oksidoredüktaz sınıfı enzimler göz önüne alındığında bu güne kadar sadece birkaç enzimin bu türden uygulamalarda kullanıldığı görülmektedir. Bu sebeple, Polifenol oksidaz gibi ve yeni bazı enzimlerin farklı organizmalardan saflaştırılıp karakterize edilmesi ve bu enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması sonucu elde edilen verilerden yeni bir takım ürünlerin sentezi mümkün olabilecektir.

PFO enzimini içeren bir çok sebze, meyve ve mantarda meydana gelen esmerleşme reaksiyonları gıdalarda görüntü, lezzet ve besinsel değerlerin kaybına buna bağlı olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Enzimatik esmerleşmenin derecesi aktif tirozinaz konsantrasyonuna, fenolik bileşiklere, oksijen varlığına, pH' ya ve dokuların sıcaklığı gibi şartlara bağlıdır. PFO enzimini inaktive etmek amacıyla güncel olarak kullanılan ticari yöntemler olan otoklavlama, ağartma, mikrodalga enerji, derin dondurucuda saklama gibi işlemler enzimin aktivitesini engelleyebilmektedir ancak bunun yanında özellikle mantarlarda dış dokunun ve lezzetin bozulmasına ve ayrıca iç suyun buharlaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle PFO enziminin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonlarının durdurulması ve bu olayın gerçekleşmesini katalizleyen mekanizmanın aydınlatılması günümüzde oldukça büyük bir ihtiyaç olmuştur.

Uzun yıllardan beri mantar tirozinazı, gıda sektöründe olduğu gibi kozmetik sektöründe ve klinik uygulamalarda memeli tirozinazına benzerliği nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmekte ve büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, ticari yollarla sentezlenmesi oldukça güç olan ve toksik maddeler kullanılmadan elde edilen fenolik bileşiklerin fonksiyonel polimerlerinin PFO ile sentezi, bu alandaki çalışmalarını hızlandırmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli tehlikeler oluşturan fenolik bileşiklerin, özellikle monofenollerin, atık sularla kirlenen akarsularda ve bunlarla sulanan topraklarda varlığını tespit etmek amacıyla, çevreye ekstra kirlilik vermeyen ve oldukça hassas olan biosensörlerin mantar tirozinazının immobilize edilmesiyle kullanımı oldukça ilgi çekicidir.

Bütün bu bilgilerin ışığında son otuz yıl içinde araştırmacılar arasında oldukça ilgi gören, önemi her gün biraz daha artan mantar PFO enzimi kolay ulaşılabilir olması, etkin klinik kullanımı ve endüstriyel uygulamaları nedeniyle daha bir çok araştırmacıya konu olacak gibi görölmektedir.

PFO' nun bütün bu uygulamaları nedeniyle *Macrolepiota mastoidea* (*M. mastoidea*) monofenolaz ve difenolazının saflaştırılıp daha ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Bunun yanında, organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği de ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır.

M. mastoidea mantarı yılın belli zamanlarda bulunabilmesi ve henüz kültürü yapılamaması nedeniyle kolay ulaşılabilen bir tür olması, bu türden elde edilen difenolaz ve özellikle tıpta saf kimyasalların sentezinde kullanılan monofenolaz enzimlerinin saflaştırılması için çok uygun bir kaynak olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, bu mantarın kültürünün yapılabilirliği incelenebileceği gibi, bu organizmada monofenolaz ve difenolaz enzimini kodlayan genin belirlenip, uygun bir organizmaya klonlanarak ileri derecede ekspres edilmesi sağlanabilir ki bu da enzimin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi anlamına gelmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Amiza, M.A. ve Aparenten, R. K. O., 1994. Thermal inactivation parameters for alkaline proteinases from North Sea cod (*Gadus Morhua*) and α -chymotrypsin bovine. J. Sci. Food Agric. 66,389-391.
- Andrawis, A., Kahn, V., 1996. Effect of methimazole in the activity of mushroom tyrosinase. Biochem. J. 235,91-96.
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., 1997. Polyphenol oxidase from *Allium sp.* J. Food Agric. 45,1091-1096.
- Arslan, O., Temur, A., ve Tozlu, I., 1998. Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) J. Agric. Food Chem. 46,1239-1241.
- Augustin, N.A., Hasanah, M.G., Hasimah, H., 1985. Polyphenoloxidase from guava (*Psidium guajava* L.). J. Sci. Food Agric. 36,1259-1265.
- Baydar, S., Tohumuz Bitkilerin Sistematığı, Cilt 1, Baskı 1, A.Ü Fen Fakültesi Yayınları, Erzurum, 1979.
- Biswas, A.K., Sarkar, A.R., 1971. Biological and chemical factors affecting the valuation of North East Indian plains teas. J. Sci. Food Agric. 22,196-204.
- Blackwell, W. H., Poisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall, New Jersey, 1988.
- Bock, W. C., Katz, A.G., Markham, G. D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions. J. A. Chem. Sci. 121,7360-7372.
- Boztok, K., Mantar üretimi tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 1990.
- Breitenbach, J., Kranzlin, F., Fungi of Switzerland. Edition Mykologia, P.O. Box 165, CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 1995.
- Cano, M.P., Lobo, M.G., de Ancos, Galeazzi, M.A.M., 1996. Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits. J. Agric. Food Chem. 44,3075-3079 .
- Chen, Q.X., Kubo, I., 2002. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. J. Agric. Food Chem. 50,4108-4112.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S., Ayaz, F. A., 2004. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at an early stage of maturation. Food Chem. In press.

- Decker, H. ve Tuczek, F., 2000. Tyrosinase / catecholoxidase activity of hemocyanins: sutructural basis and molecular mechanism. J. Biol. Chem. 25,392-397.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenol oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Roseceae). Food Chem. 77,1-7.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y., Wang, C.Y., 2002. Inhibition of loquat anzmatic browning by sulfhydril compounds. Food Chem. 76,213-218.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of metal ion binding.1. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. Biochemistry. 40,5338-5344.
- Dry, I. B. ve Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. Plant Molecular Biology. 26,495-502.
- Duangmal, K. ve Owusu Apenten, R.K., 1999. A comperative study of polyphenol oxidases from taro (*Colacasia esculenta*) and patato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). Food Chem. 64,351-359.
- Dudley, E. D., Hotchkiss, J. H., 1989. Cysteine as an inhibitor of ppolyphenol oxidase. J. Food Biochem. 13,65-75.
- Duran, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental. 28,83-99.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Granfreda, L., 2002. Aplications of laccase and tyrosnases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Tech. 31,907-931.
- Erkel, İ., Dünyada ve Türkiye'de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, 2-4 Kasım 1992, İstanbul, Bildiriler Kitabı, Cilt 1, 2-8.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., 1997. Improvoment of a continious spectrophotometric for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. J.Agaric.Food Chem. 45,1084-1090.
- Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1995. A continious spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. Analitycal Biochemistry. 43,2807-2812.

- Espin, J.C., Trujano, M.F., Tudelo, J., Garcia-Canovas, F., 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas Avacado. J. Agric. Food Chem. 45,1091-1096.
- Espin, J.C., Wichers, H.J., 2001. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. Biochem. Biophys. Acta. 1554,289-300.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenol, G.L., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, A.P., Varon, R., Garcia-Canovas, F., 2000. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. Eur. J. Biochem. 267,5865-5878.
- Fenton, D.E., Biocoordination Chemistry, Oxford University Press. New York, 1995
- Ferrari, P.H. ve Walker, J.R.L., 1996. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study. Journal of Food Biochemistry. 20,15-30.
- Finger, A., 1994. *In-vitro* studies on effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation polyphenolic black tea constituents. J. Sci. Food Agric. 66,293-305.
- Fraigner, M.P., Marques, L., Fleuriet, A. ve Macheix, J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *prunus*. Food Chem. 43,2375-2380.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview, J. Agric. Food Chem. 44,631-653.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, J. Agric. Food Chem. 45,1523-1540.
- Fujita, S., Tono, T., 1998. Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*). J. Sci. Food Agric. 46,115-123.
- Fujita, S., Tono, T., Kawahara, H., 1991. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*) J. Sci. Food Agric. 55,643-651.
- Galani, D., ve Apenten, R.K.O., 1997. The comparative heat stability of bovine β -lactoglobulin in buffer and complex media. J. Sci. Food Agric. 74,89-98.

- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C., 1981. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). J. Food Sci. 46,150.
- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C., 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). J. Food Sci. 46,1404-1406.
- Galeazzi, M.A. M., Sgarbieri, V. C. J. ve Constantinidies, S.M., 1981. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.) J. Food Sci. 46,150-155.
- Galeazzi, M.A.M. ve Sgarbieri, V.C.J., 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana. (*Musa cavendishii*, L.). J. Food Sci. 46,1404-1406.
- Ha, T.J., Yang, M.S., Jang, D.S., Choi, S.U., Park, K.H., 2001. Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophore flarescens* for melanogenesis. Bull. Korean Chem. Soc. 22,97-99.
- Hsu, A. F., Shieh, J. J., Bills, D.D., White, K., 1988. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. J. Food Sci. 53,765-767.
- Husain, S., Hadi, S.M., 1995. Strand scission in DNA induced by L-DOPA in the presence of Cu (II). FEBS Lett. 364,75-78.
- Ikehata, K. ve Nicel, J.A., 2000. Characteriation of Tyrosinase for the Treatment of Aqueous Phenols. Bio. Tech. 74,191-199.
- Jiang, Yue-Ming 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. Food Chem. 66,75-79.
- Kertesz, D. ve Zito, R., 1962. Phenolase, In: Oxigenases, Hayaichi, O., Academic Pres., New York.
- Khan, V., Pomerantz, S.H., 1980. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase, Phytochemistry. 19,379-385
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., Krebs, B., 1998. Crystal structure of plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nature Structural Biology. 5-12.
- Kobayashi, S., Kurioka, H. ve Uyama, H., 1996. Enzymatic synthesis of a soluble polyphenol derivative from 4,4'-biphenyldiol. Macromolecular Rapid Communications. 15,507-510.

- Kong, K.H., Hong, M.P., Choi, S.S., Kim, Y.T., Cho, S.H., 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. Biotechnol. Appl. Biochem. 31,113-118.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., 1999. Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. J. Agric. Food Chem. 47,4121-4125.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., 1998. Tyrosinase inhibitors from cumin. J. Agric. Food Chem. 46,5338-5341.
- Kubo, I., Yokokawa, Y., 1992. Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from *Buddleia coriacea*. Phytochemistry. 31,1075-1077.
- Laurila, E., Hurme, E., ve Ahvenainen, R., 1998. The shelf-life of sliced raw potatoes of various cultivar varieties-substitution of bisulphites. J. Food Protec. 9,53-66.
- Lee, H.S., 2002. Tyrosinase inhibitors of from *Pulsatilla cernua* root-derived materials. J. Agric. Food Chem. 50,1400-1403.
- Lee, S.E., Kim, M.K., Lee, S.G., Ahn, Y.J., Lee, H.S., 2000. Inhibitory effects of *Linnamomen cassia* bark-derived materials on mushroom tyrosinase. Food Sci. Biotechnol. 9,330-333.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. A. Chemical Sci. 56,658-660.
- Lowry, O.H., Rosebraugh, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Bio. Chem. 193,265-275.
- Martinez, M. ve Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci. and Tech. 6,195-200.
- Mayer, A.M. ve Harel, E., 1981. Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Rhodes, Academic Pres. New York.
- Mazzafera, P., ve Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry. 55,285-296.
- Morin, B., Davies, M.J., Dean, R.T., 1998. The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. Biochem. J. 330,1059-1067.
- Palmer, T., 1995. Kinetics of single-substrate enzyme catalysed reactions. In Understanding Enzymes, 4th edn. pp. 107-127. Prentice Hall / Ellis Harwood, Hertfordshire.

- Perez-Gilabert, M. ve Garcia-Carmona, F., 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. J. Agric Food Chem. 48,695-700.
- Pifferi, P.G. ve Cuterera, R., 1974. Enzymatic deredation of anthocyanines: the role of sweet cherry polyphenol oxidase. J. Food Sci. 39,786-791.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J., Dawley, R., 1994. Tyrosinase, Laccase, and Peroxidase in mushroom. J. Food Sci. 59-4.
- Rathjen, A.H. ve Robinson, S.P., 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a varited grapevin mutant. Plant Physiology. 99,1619-1625.
- Riggin, R.M., McCarthy, M.J., Kissenger, P.T., 1976. Identification of salsolinol as a major dopamin metabolite in the banana. J. Agric. Food Chem. 24,189-191.
- Robb, D.A., 1984. Tyrosinase In R. Lontie (Ed.) Copper proteins and copper enzymes. 2, 207-241. Boca Raton, FL: LRC Press.
- Rocha, A.M.C.N. ve Morais, A.M.M.B., 2001. Characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. Food Control. 12,85-90.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Escribano, J. ve Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. Analitical Biochem. 216,205-212.
- Ros, J.R., Rodriguez-Lopez, J.N., garcia-Canovas, F., 1993. Effect of l-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. Biochem. J. 295,309-312.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive reviewof its mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1247,1-11.
- Sapers, G. M., (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. Food Tech. 47,75-81.
- Sapers, G.M., Ziolkowski, M. A., 1987. Comprasion of erythorbic acid and ascorbic acid as inhibitors of enzmatic browning in apple. J. Food Sci. 52,1732-1733.
- Sesli, E. Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantralar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1994.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. J. Agarc. Food Chem. 51,2837-2853.

- Shi, Y.L., James, A.E., Benzie, L.F.F., Buswell, J.A., 2002. Mushroom- derived preparations in the prevention of H₂O₂ induced oxidative damage to cellular DNA. Teratog. Curcinog. Mutagen. 22,103-111.
- Siddiq, M., Sinha, K. ve Cash, J.N., 1992. Characterization of polyphenol oxidase from stanley plums. . J. Food Sci. 57,1177-1179.
- Singh, H.P., Ravindranath, S.D., 1994. Occurence and distribution of PPO activity in floral organs of some standard and local cultivars of tea. J. Sci. Food Agric. 64,117-120.
- Sojo, M.M., Nuez,- Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 1988. Partial purification of banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8.000 for removal of polyphenols. J.Agaric. Food Chem. 46,4924-4930.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B.,Robinson, S.P., 1994. Polyphenol oxidase in potato tubers. In W.R. Belknap, M.E. Vayda, W.D. Park, eds., *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, Ed 2. CAB International, Wallingford, UK, pp 151-159.
- Tono, T., Fujita, S.Kawasagi, H. ve Li, Z.E., 1986. Prufication and high *L*-epicatecin oxidase activity in polyphenol oxidase of Japanese pear. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 60,705-712.
- URL-1, Food Colourants, www.agsci.ubc.ca. 25.10.2004
- Uyama, H. ve Kobayashi, S., 2002. Enzyme-catalyzed polimerization to functional polymers, Journal of Molecular Catalysis. 19,117-127.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase in fruits and vegetables. Critical Reviews in Food Science Nutrition. 9,49-127.
- van Rensburg, W.J., Ferreria, D., Malon, E., Steenkamp, J.A., 2000. Tyrosinase catalysed biphenil construction from flava3-ol substrates. Phytochemistry. 53,285-292.
- van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. Phytochemistry. 45,1309-1323.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. ve Duke, S.O., 1988. Polyphenol oxidase: The chloroplast enzyme with no established fuction. Physiologia Plantarum. 72,659-665.
- Vogel, F.S.,Kemper, L.A., Jeffs, P.W., Cass, M.W., Graham, D.G., 1977. γ -L- Glutaminyl-4-hydroxybenzene, an inducer of cryptobiosis in *Agaricus bisporus* and a source of specific metabolic inhibitors for melanogenic cells. Cancer Res. 37,1133-1136.

- Walker, J.R.L., 1995. Enzymatic browning in fruits: Its biochemistry and control. *In Enzymatic Browning and Prevention*, ed. Y.L. Chang and J.R. Whitaker, 8-22, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC.
- Whitaker, J.R., 1972. Principles of enzymology for the food science, Fennema, O.R., Marcel Dekker, New York.
- Yang, C.D., Shuji, F., Ashrafuzzman, M.D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. J. Agric. Chem. 48,2732-2735.
- Yelana, G., Sheptovitsky ve Brudving, G. V., 1996. Isolation and characterization of spinach phospholipase II membrane -associated catalase and polyphenol oxidase. Biochem. 35,16255-16263.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. ve Beldüz, A.O., 2004. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* strains K1 and K4^T. World J. Microbiol. Biotech. In Pres
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. ve Eskin, N.A.M., 1991. Polyphenol oxidase. In D.S. Robinson ve N.A.M. Eskin. *Oxidative Enzymes in Foods* (217-273). London: Elsevier.
- Zhang, X., Flurkey, W.H., 1997. Phenoloxidase in *Portabella* mushrooms, J.Food Sci. 62,97-100
- Zhou, H., Feng, X., 1991. Polyphenoloxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). J. Sci. Food Agric. 57,307-313.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1996 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı ve 2000 yılında bu programdan kimyager unvanı ile mezun oldu. 2001-2002 yılları arasında askerlik görevini ifa etti. 2003-2004 Eğitim-Öğretim yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.

