

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Russula delica (Russulaceae)*' DAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şaban KESKİN

**ŞUBAT 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Russula delica (Russulaceae)*'DAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Şaban KESKİN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.01.2009
Tezin Savunma Tarihi : 06.02.2009**

**Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

“*Russula delica (Russulaceae)*’dan polifenol oksidaz enzimi 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 sayın Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, kimya bilimini tanımamda ve bu alanda eğitim yapmamda büyük katkıları olan değerli hocam sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK’a, tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkıları olan Öğr. Gör. Yakup KOLCUOĞLU ve Arş. Gör. Melike YILDIRIM’a, çalışma esnasında kullandığımız mantarların toplanmasında ve tanımlanmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ’ye, Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (KTÜ-BAP) tarafından 2007.111.002.10 nolu projeyle desteklenmiştir. Çalışmaya olan desteklerinden dolayı KTÜ-BAP birimi çalışanlarına da teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, gösterdikleri anlayış ve sağladıkları kolaylıklardan dolayı İkizdere Şimşirli Köyü Halkına ve İkizdere Müftüsü Sayın Hasan Rahmi DÜZENLİ’ye de teşekkür ederim.

Varlık sebebim, her şeyim canım aileme ...

Şaban KESKİN

Şubat, 2009

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>Russula delica</i> Mantarının Morfolojik Özellikleri.....	4
1.3. Polifenol Oksidazların (PFO) Genel Özellikleri.....	5
1.4. Esmerleşme Reaksiyonları.....	7
1.4.1. Kimyasal Esmerleşme Reaksiyonları.....	7
1.4.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları.....	9
1.5. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması.....	10
1.6. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi.....	13
1.7. PFO İnhibitörleri.....	13
1.8. PFO'nun Bulunduğu Organizmalar.....	15
1.9. PFO Enziminin Endüstriyel Uygulamaları.....	18
1.10. Çalışmanın Amacı.....	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	21
2.1.1. Cihazlar.....	21
2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar.....	21
2.1.3. Kimyasallar.....	23
2.2. Deneysel Çalışmalar.....	23
2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	23
2.2.2. Doğal Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE).....	24

2.2.3.	Protein Tayini	24
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Tayini	25
2.2.4.1.	Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi.....	25
2.2.4.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	26
2.2.4.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	26
2.2.4.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi	26
2.2.4.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi.....	26
2.2.4.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	27
2.2.4.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi	27
2.2.4.8.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	27
2.2.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisinin İncelenmesi ve I_{50} Değerlerinin Bulunması.....	28
3.	BULGULAR	29
3.1.	Substrat Özgünlüğü	29
3.2.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE).....	29
3.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	30
3.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	31
3.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi	32
3.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	33
3.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi	34
3.8.	pH Kararlılığı	35
3.9.	Isıl Kararlılık	36
3.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	38
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
5.	ÖNERİLER	44
6.	KAYNAKLAR.....	45

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

“*Russula delica* (*Russulaceae*)’dan Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu” isimli bu çalışmada, yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Russula delica*’dan elde edilen ham özütteki Polifenol Oksidaz (PFO) enzimi spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak karakterize edilmiştir. Ham özütün 3,4-dihidroksi fenilalanin (*L*-DOPA) ile boyanan doğal elektroforezinde R_f değerleri 0,34 (koyu) ve 0,64 (soluk) olan iki bant gözlenmiştir. Ham enzim özütü hem 3-(4-hidroksifenil)-propionikasit (PHPPA) gibi monofenollerin hidroksilasyonunu ve hem de 4-metil katekol (4-MK) gibi difenollerin oksidasyonunu katalizlemiştir. *R. delica*’dan elde edilen ham özütün hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesi için optimum pH 5,0 olarak bulunmuş ve bu pH’da, 4 °C’de ve 24 saat sonunda enzimin her iki aktivitesini de % 90 oranında koruduğu gözlenmiştir. Monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için optimum sıcaklığın 30 °C olduğu ve bu sıcaklıkta 60 dak sonunda enzimin aktivitesini % 90 oranında koruduğu belirlenmiştir. Monofenolaz aktivitesi için PHPPA substratı varlığında V_{maks} 769.23 U/mg protein ve K_m 0,92mM olarak, difenolaz aktivitesi için ise 4-MK substratı varlığında V_{maks} 90 U/mg protein ve K_m 0,34 mM olarak belirlenmiştir. Askorbik asit, sodyum metabisülfid, sistein ve benzoik asit kullanılarak yapılan inhibisyon çalışmasında denenen tüm inhibitörlerin *R. delica* PFO’sunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, enzimin her iki aktivitesinin de metal iyonlarına karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi. Bu veriler ışığında *R. delica*’dan hazırlanan ham özütteki PFO enziminin genel PFO inhibitörleri ve bazı metal iyonlarına karşı hassas özellikler sergilediği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, *Russula delica*, İnhibitör, Monofenolaz, Difenolaz

SUMMARY

Characterization of Polyphenol Oxidase Activities from *Russula delica* (Russulaceae)

In this study, polyphenol oxidase (PPO) extracted from a wild edible mushroom *Russula delica* was characterized by using a spectrophotometric method. Native electrophoresis stained by *L*-dihydroxyphenylalanine of the crude extract from *R. delica* showed two bands having R_f values of 0.34 (major) and 0.64 (minor) respectively. The crude extract was able to catalyze both hydroxylation of some monophenols like 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid (PHPPA) and oxidation of some *o*-diphenols like 4-methylcatechol (4-MK). The crude extract showed pH optimum values at pH 5.0 for both monophenolase and diphenolase activities. After incubating at this pH point at 4 °C for 24 hours it was observed that the crude extract retained about 90% of its original monophenolase and diphenolase activities. The crude extract showed temperature optimum at 30 °C for both of activities. When incubated at this temperature for 60 min the crude extract retained about 90% of its original monophenolase and diphenolase activities. The V_{max} and K_m values were calculated 769.23 U/mg protein, 0.92 mM and 90 U/mg protein, 0.34 mM for monophenolase and diphenolase activities respectively. Ascorbic acid, sodium metabisulphide, cystein and benzoic acid were tested as the inhibitor and they all inhibited both of activities of the crude extract. Both of activities were highly sensitive to metal ions. Through these findings, it can be concluded that the polyphenol oxidase in crude extract from *R. delica* showed highly sensitive properties against some common PPO inhibitors and metal ions.

Key Words: Polyphenol oxidase, *Russula delica*, Inhibitor, Monophenolase, Diphenolase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>R. delica</i> 'nın früktofikasyon organları	5
Şekil 2. Polifenol Oksidaz (PFO)'nun katalizlediği reaksiyonlar	6
Şekil 3. Maillard reaksiyonu ve Amadori bileşiğinin oluşumu	8
Şekil 4. PFO'nun bakır merkezleri	10
Şekil 5. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi	12
Şekil 6. PFO için önerilen difenolaz çevrimi.....	12
Şekil 7. <i>R. delica</i> 'dan elde edilen ham özütün doğal poliakrilamid jel elektroforezi	30
Şekil 8. <i>R. delica</i> monofenolazının pH bağımlılık eğrisi.....	30
Şekil 9. <i>R. delica</i> difenolazının pH bağımlılık eğrisi.....	30
Şekil 10. <i>R. delica</i> monofenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi	31
Şekil 11. <i>R. delica</i> difenolazının sıcaklık bağımlılık eğrisi	32
Şekil 12. <i>R. delica</i> monofenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi.....	32
Şekil 13. <i>R. delica</i> difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi	33
Şekil 14. <i>R. delica</i> monofenolazı için Lineweaver-Burk eğrisi	34
Şekil 15. <i>R. delica</i> difenolazı Lineweaver-Burk eğrisi	34
Şekil 16. <i>R. delica</i> monofenolazı için pH kararlılık eğrisi	36
Şekil 17. <i>R. delica</i> difenolazı için pH kararlılık eğrisi	36
Şekil 18. <i>R. delica</i> monofenolazı için ısı kararlılık eğrisi	37
Şekil 19. <i>R. delica</i> difenolazı için ısı kararlılık eğrisi	37

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar.....	21
Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı	22
Tablo 3. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri....	24
Tablo 4. <i>R. delica</i> Polifenol oksidazı için substrat özgünlüğü.....	29
Tablo 5. <i>R. delica</i> monofenolazı üzerine metal iyonlarının etkisi	35
Tablo 6. <i>R. delica</i> difenolazı üzerine metal iyonlarının etkisi	35
Tablo 7. <i>R. delica</i> monofenolazı ve difenolazı I_{50} değerleri.....	38
Tablo 8. Farklı kaynaklardan elde edilen PFO'ların bazı substratlara karşı % bağlı aktiviteleleri.....	40
Tablo 9. Farklı organizmalardan elde edilen PFO'lar için optimum pH değerleri	41

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
DHPPA	: 3-(3,4-dihidroksifenil)-Propionik asit
DMF	: Dimetilformamid
DOPA	: 3,4-dihidroksifenilalanin
E.C.	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
MBTH	: 3-metil-2-benzotiyazolinon
4-MK	: 4-Metil Katekol
mM	: Milimolar
PAGE	: Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PFO	: Polifenol Oksidaz
PHPPA	: 3-(4-hidroksifenil)- Propionik asit
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
Q	: <i>o</i> - Kinon
[S]	: Substrat konsantrasyonu
SFM	: Sun Flower Meal (Ayçiçeği Yemi)
TEMET	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
TX-114	: Triton X-114 deterjanı
V_{maks}	: Maksimum Hız
μM	: Mikromolar
K_m	: Michaelis-Menten sabiti

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Birçok meyve ve sebzede, gerek hasat ve taşıma sırasında mekanik olarak zedelenmeden, gerekse işlenmeleri esnasında uygulanan doğrama, parçalama ve ezme gibi işlemlerden dolayı renk esmerleşmesi ve bozulmalar kaçınılmazdır. Bu olayın nedeni polifenol oksidaz (PFO) enzim aktivitesidir. PFO'lar oksidoredüktaz grubuna giren ve oksijen varlığında fenollerin kinonlara dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir (Vamos-Vigyazo, 1981; Lee vd., 1991). PFO enziminin katalizlediği enzimatik kararma reaksiyonları ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir. Ancak enzimatik esmerleşme her zaman istenmeyen bir durum değildir. Şöyle ki; bu reaksiyonlar kuru üzüm, kuru erik, kahve, çay ve kakaoda istenilen renk ve lezzetin kazanılmasında oldukça yardımcı olurlar (Lee vd., 1991). Bunun yanında, bu enzimler çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Tıpta Parkinson, lösemi ve fenilketonüri gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde (İkram-ul-Haq vd., 2002), atık su arıtımında, zararlı fenolik maddelerin giderilmesi amacı ile kullanılmaktadırlar. Ayrıca farmasötik endüstrisinde, immobilize polifenol oksidaz enzimi içeren elektrotlar ile morfinin kodeinden ayrılması mümkün olmaktadır (Çil vd., 2007).

Memelilerde, omurgasızlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan PFO'lar birçok biyolojik fonksiyona sahiptir. PFO'lar, memelilerde ilk olarak melanomas sentezindeki rolleri ve albinizm gibi pigmentasyon problemleri ile alakalı olarak karakterize edilmiştir (Riley, 1997). Mantarlarda PFO'lar esas olarak kararma ve pigmentasyonla ilişkilendirilirler. Fungusların hücre duvarlarındaki melaninler UV radyasyonları, serbest radikaller, gama ışınları, dehidrasyon ve yüksek sıcaklıklar gibi stres koşullarına karşı direnç ve savunma mekanizmaları oluştururlar (Riley, 1997) ve fungal hücre duvarlarının, hidrolitik enzimlere karşı hücresel parçalanmadan koruyucu direnç geliştirmelerine katkıda bulunurlar. Fungal pigmentler aynı zamanda sporların oluşumu ve kararlılıklarını sağlayıcı etkiler gösterirler (Flurkey, 2008). Fungal PFO'lar ilk olarak ürünlerin ticari değerini düşüren enzimatik kararma nedeni ile yenilebilir bir mantar türü olan *Agaricus bisporus*'tan karakterize edilmiştir (Jolivet vd.,1998). *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae* ve *Pycnoporus sanguineus* gibi diğer mantar türleri üzerine yapılan

daha ileri çalışmalar fungal tirozinazların biyokimyasal ve moleküler özelliklerine yeni bakış açıları kazandırmıştır.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkiden bitkiye ve bitkinin yetiştiği bölgeye göre farklılık göstermektedir. Bitkinin fenolik içeriği ise esmerleşme rengini belirlemektedir. Ayrıca, pH, sıcaklık, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif PFO konsantrasyonu da esmerleşmeyi etkileyen önemli faktörlerdir (Yoruk ve Marshall, 2003). Bu faktörlerin değişimi esmerleşme reaksiyonlarını yavaşlatabilir veya tamamen durdurabilir. Bundan dolayı gıdalarda, bu türden reaksiyon mekanizmalarının ortaya konması ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonu ile oluşan ürünlerin istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak mümkündür.

1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

Mantarlar, Çin ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde tıbbi yararları nedeniyle yüzyıllardan beri tüketilmektedir (Manzi vd., 2001). Mantarlar 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 ve yeni tekniklerin gelişmesiyle mantarlar, bu amaçla kurulmuş özel işletmelerde yetiştirilmeye başlanmıştır (Erkel, 1992).

Karbohidrat sentezi bakımından mantarlar heterotrofik organizmalar grubunda yer alırlar. Fruktifikasyon organı veya mantar meyvesi olarak da bilinen şapka, *Basidiomycetes* sınıfında basidiokarp, *Ascomycetes* sınıfında askokarp adını alır. *Basidiomycetes* sınıfında mantarların en gelişmiş türleri bulunur (Boztok, 1990).

Yabani olarak yetişen mantarlar dünya çapında yaygındır. Dünya üzerinde var olan mantar türlerinin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte on binler civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bilinen türlerin yüzde ondan daha az bir kısmının yenilebilir olduğu, buna yakın bir oranda türün ise zehirli olduğu düşünülmektedir (Toth, 1995). İnsanlar zehirli mantar türlerinden uzak durmayı deneme yanılma ile öğrenmişlerdir. Günümüzde gelişen kültürleme teknikleri sayesinde yıl boyu oldukça büyük miktarlarda kültür mantarı üretilip satılmaktadır. Kültürü yapılan iki yaygın mantar türü *Agaricus bisporus* ve *Lentinus*

edodes'tir (Shiitake). *A. bisporus* batı toplumlarında, *L. edodes* ise uzak doğu ülkelerinde yaygındır (Miles ve Chang, 1997).

Mantarlar düşük kalorili, protein, vitaminler ve mineraller yönünden zengin olduklarından, sağlık açısından değerli gıdalardır (Kovacz vd., 1996). Yabani olarak yetişen yenilebilir mantarların tüketimi gelişmiş ülkelerde dahi, eser elementler ve protein içeriği açısından zengin olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır (Sesli vd., 2008). Mantarların hipertansiyon, yüksek kolesterol ve kanser gibi birçok hastalığın önlenmesinde tedavi edici oldukları rapor edilmiştir. Mantarların bu özelliği onların kimyasal bileşiminden kaynaklanmaktadır (Manzi vd., 2001).

Yukarıda da belirtildiği gibi mantarlar protein içeriği açısından oldukça zengindir ve bütün esansiyel aminoasitleri içerirler. Ayrıca, az miktarda yağ asidi içermelerinden dolayı düşük kalorili gıdalardır. Mantarlar, karbohidrat ve fiber açısından ise kısmen zengindirler. Bunların yanında, mantarlar önemli miktarda vitamin içerirler. Bu vitaminler tiamin, riboflavin, askorbik asit, vitamin D₂ ve minerallerdir (Brenee, 1990).

İnsanlar D vitamini güneş ışığı etkisiyle cilt üzerinde sentezleyebilmelerine rağmen, D vitamini bileşiklerinin günlük diyetle alınımı, özellikle kuzey bölgelerde yaşayanlar için önemlidir. Kemik hastalıklarında ve kemik yumuşamasına karşı etkili olmasının yanında, D vitamini aynı zamanda postmonopozal osteoporosisin önlenmesinde de etkili olabilir. Ancak çok az besin maddesi doğal olarak önemli oranda D vitamini içerir. Mantarlar, hayvansal kaynaklar dışında D vitamini içeren tek doğal kaynağıdır ve vejetaryenler için doğal D vitamini kaynağıdır. Birçok yabani mantar türünün D₂ vitamini açısından zengin olduğu rapor edilmiştir (Mattila vd., 1999).

Ayrıca, 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 de düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler, onların kolesterolü düşürücü özelliklerinden dolayı, kalp ve damar hastalıklarında da diyet olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Boztok, 1990).

A. bisporus, *L. edodes*, *Auricularia auricula*, *Tricholoma matsutake*, *Tremella fuciformis* gibi birçok mantar türünden elde edilen ekstraktların anti tümör etkisi gösterdiği rapor edilmiştir. Terapik aktivitelere sahip olan bileşenler; mantarların meyve kısımlarında veya misellerinde bulunan polisakkaritler, protein bağlı polisakkaritler (glukoprotein), glukanlar ve heterogalaktanlardır (Zhang vd., 2007).

1970'ten günümüze mantarların eser element içerikleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların iki esas amacı; mantarların yenilebilir kısmının çevre kirliliğinde biyolojik gösterge olarak incelenmesi ve yenilebilir mantar türlerinin eser element içerikleri açısından incelenmesidir. Yabani olarak yetişen birçok mantar türünün özellikle kadmiyum, civa, kurşun ve bakır gibi eser elementleri diğer gıda kaynaklarına oranla daha yüksek miktarlarda biriktirdiği gözlemlenmiştir. Mantarlardaki eser element birikimi, mantarın türüne ve yetiştiği ortama bağlıdır. Eser element birikimi açısından yenilebilir kısmın olgunluğunun ya da büyüklüğünün daha az bir etkisi vardır. Yenilebilir kısmın atmosferden eser elementleri absorplayarak biriktirmesi, onun 10–14 gün olan kısa yaşam süresi göz önüne alındığında çokta önemli değildir. Kültür mantarları, taksonomik olarak benzer, yabani yetişen türleri ile kıyaslandığında, eser element birikimi kültür mantarlarında daha azdır (Kalac ve Svoboda, 1999).

1.2.1. *Russula delica* Mantarının Morfolojik Özellikleri

R. delica makro mantarı *Russulaceae* sınıfına ait bir mantar türüdür. Genellikle gruplar halinde meşeliklerde, karışık ormanlarda ya da açık arazilerde bulunur. Nötral veya hafif bazik, kısmen kuru ve nemli topraklarda yetişir. Meşeliklerde ve başlıca kayın ağaçlarının yanında, nadir olarak da kozalaklı ağaçların yanında yaz sonu ve sonbahar başlangıcında bulunur. Etlı kısmı beyazdır ve tadı pek hoş değildir.

Şapka 80–130 mm, gençken yuvarlak (küresel) daha sonraki dönemlerde genişlemiş, genellikle içe doğru kıvrılmış huni şeklinde yüzeyi radyal olarak damarlı, nemli iken kısmen kaygan, gençken beyaz, daha sonra kirli krem ve benekli açık kahverengi rengine kısmen soyulabilir ve kenarları kavislidir (Şekil 1).

Sap 20–50 x 20–30 mm ebatlarında, silindirik, gençlerde içi dolu, olgunlarda boş, önce beyaz, sonra açık kahverengindedir. Lameller sap üzerinde bir miktar ilerleyerek sonlanır. Önce beyaz renkte daha sonra açık kahverengi alır. Spor tozları beyaz, sporları ovaldır (Kränzlin, 2005).

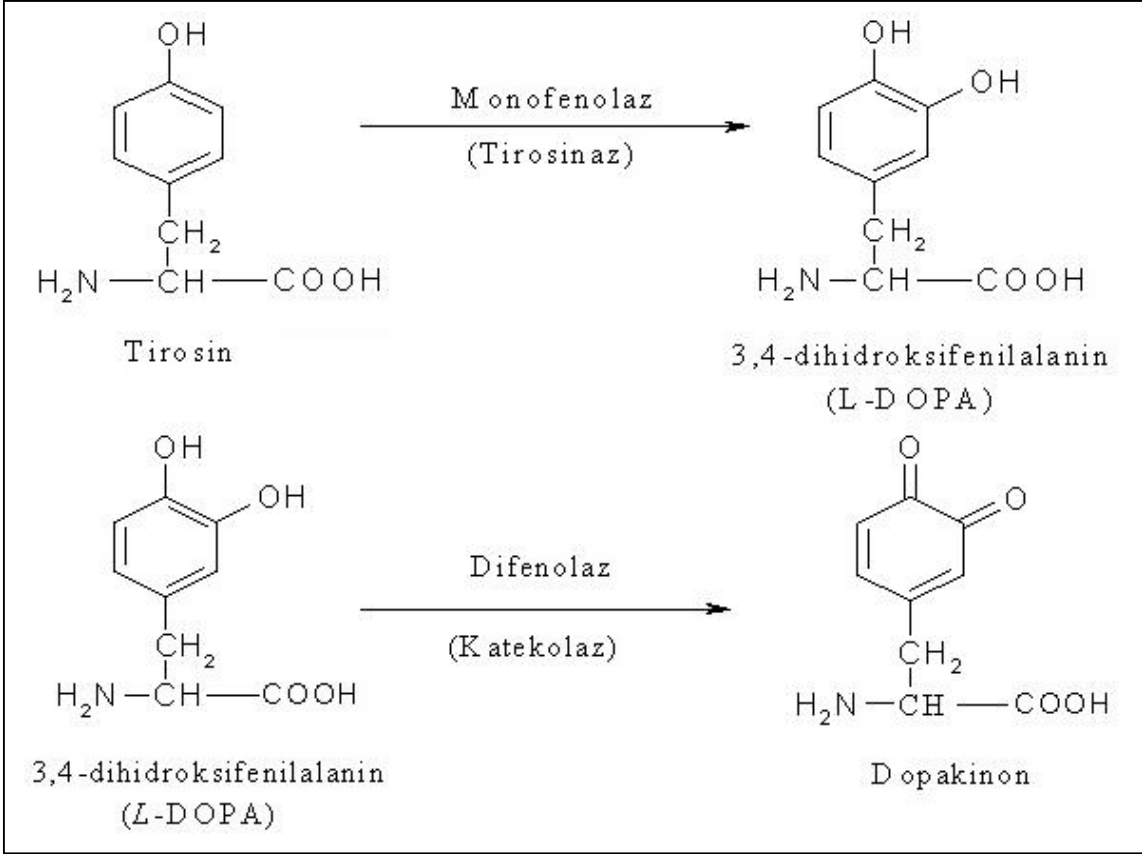


Şekil 1. *R. delica*'nın fruktifikasyon organları (URL-1, 2009).

1.3. Polifenol Oksidazların (PFO) Genel Özellikleri

PFO'lar, fenolik bileşikleri moleküler oksijen mevcudiyetinde yükseltgeyen ve prostetik grup olarak bakır içeren enzimlerdir. PFO'lar birbiriyle bağlantılı üç farklı aktiviteye sahiptirler. Bunlar; Kresolaz (monofenol monooksijenaz, E.C.1.14.18.1), Katekol Oksidaz (*o*-difenol: oksijen oksidoreduktaz, E.C.1.10.3.1) ve Lakkaz (*p*-difenol: oksijen oksidoreduktaz, E.C.1.10.3.2) aktiviteleridir (Sheptovitsky ve Brudwig, 1996).

Lakkazlar, çok değişik türde aromatik bileşiklerin, özellikle fenolik olanların oksidasyonunu katalizler ve bu esnada moleküler oksijeni H₂O'ya indirgerler. Tipik bir lakkaz reaksiyonunda, bir fenolik substrat ariloksi radikali vermek üzere bir elektron oksidasyonuna tabi tutulur. Bu aktif radikaller, oksidasyonun ikinci basamağında kinonlara dönüştürülebilirler (Duran vd., 2002). Tirosinazların hem monofenolleri *o*-dihidroksifenollere hidroksilledikeri, hem de *o*-dihidroksifenolleri kinonlara yükseltgediği bilinir. Katekol oksidaz sadece dihidroksifenollerin *o*-kinonlara yükseltgenme reaksiyonlarını katalizler (Martinez ve Whitaker, 1995). PFO'nun katalizlediği reaksiyonlar Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. PFO'nun katalizlediği reaksiyonlar

Şimdiye kadar farklı kaynaklardan oldukça fazla PFO klonlanmış ve amino asit sırası belirlenmiştir (Haruta vd., 1998; Kim vd., 2001). Yapılan çalışmalar sonucu, enzimin aktif bölgesinde oldukça korunmuş altı histidin biriminin olduğu tespit edilmiştir. Aktif bölge oldukça korunmuş olsa da, amino asit sıraları türler arasında değişkenlik göstermektedir. Hatta bazı yapısal çalışmalar sonucu, enzimin aktif bölgesindeki korunmuş amino asitlerin de değişebildiği tespit edilmiştir. PFO'ların molekül ağırlıkları buldukları organizmaya göre değişkenlik göstermektedir. Bitkilerde PFO kloroplastlarda, mantarlarda ise genellikle sitoplazmada, bazı durumlarda da hücre duvarında lokalize olmuştur (Mayer, 2006).

PFO'nun katalitik aktivitesi birçok sebze ve meyvenin kalitesini etkileyebilir. Bu etki sonucunda, genellikle bu ürünlerin renk, koku, doku ve besinsel değerlerinde değişimler meydana gelir. PFO, birçok ürünün soymak, bölmek/parçalamak, ezmek gibi teknolojik olarak işlenmesinde sınırlayıcı bir faktördür. Bununla birlikte enzimatik esmerleşme çay, kahve, kakao gibi bazı gıdaların işlenmesinde önemlidir çünkü bu esmerleşme reaksiyonları sonucu ürünlerin kalitesinden sorumlu türler oluşmaktadır (Yoruk ve Marshall, 2003).

1.4. Esmerleşme Reaksiyonları

Gıdalar, bir bakıma farklı kimyasal bileşiklerin farklı derişimlerde bir arada buldukları karmaşık sistemlerdir. Gıdanın beslenme değeri gibi duyusal özellikleri (renk, koku, tat vb.) de bu bileşikler tarafından belirlenmektedir. Gıdaların kimyasal bileşimi zaman ve şartlara bağılı olarak değışebilir. Muhafaza ve ambalajlama uygulamaları ile bu değışme yavaşlatılsa bile mutlak anlamda durdurulamamaktadır. Değışme; gıdadaki birincil bileşiklerden, ikincil ve üçüncül bileşiklerin oluşmasıdır (URL-2, 2008). Gıdalardaki kimyasal değışmeler kalite kaybı olarak da yorumlanmakta ve bunlar başlıca; kimyasal esmerleşme ve enzimatik esmerleşme olarak tanımlanmaktadır.

1.4.1. Kimyasal Esmerleşme Reaksiyonları

Gıdalarda enzimatik olmayan yolla renk esmerleşmesi; askorbik asit oksidasyonu, karamelizasyon ve Maillard tepkimesi olmak üzere başlıca üç farklı şekilde ortaya çıkmaktadır (Friedman, 1996).

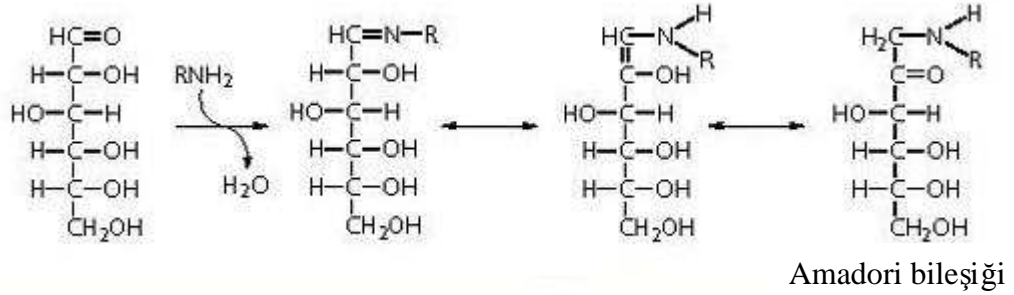
Askorbik asit oksidasyonu, bu asidi içeren meyve ve sebzelerin değışik gıdalara işlenmesi sırasında renk esmerleşmesine yol açan bir tepkimedir. Bu tepkimede askorbik asit dehidro-askorbik asit ve diketo-gulonik asit üzerinden furfural ve karbon dioksit parçalanmaktadır (URL-2, 2008).

Karamelizasyon, karbohidratların yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldıklarında oluşan reaksiyonların genel ismidir. Bu reaksiyonların Maillard reaksiyonlarından farkı, amino grubu içermemeleridir. Bu reaksiyonlar genellikle şekerlemecilikte ve hamur tatlılarında kullanılan karamellerin ve geleneksel sukroz şuruplarının hazırlanması esnasında oluşur. Karamelizasyon reaksiyonları yüksek sıcaklıklarda asit, baz, tuz ve diğersafsızlıklar gibi katalizörlerin varlığında da yokluğunda da oluşur. Karamelizasyon reaksiyonlarında çok farklı yollarla çok farklı türde ürünler oluşur. Karamelizasyon reaksiyonlarında ilk adım sukroz hidrolizidir. Bu işlem, glikozidik bağı protonlanması ile oluşur ve kullanılan proton yüksek sıcaklıklarda suyun ayrışmasından elde edilebileceği gibi asidik reaksiyon ürünlerinden de elde edilebilir. Nötral şartlar altında, sukroz hidrolizinin ürünleri D-glukoz ve fruktoz okso karbonyum iyonudur. Bu fruktoz karbonyumu;

I) Ortamdaki su molekülü ile reaksiyon vererek fruktoz ve H⁺ ya dönüşebilir,

- II) Ortamdaki bir başka karbohidrat molekülü ile birleşerek oligosakkaritlere dönüşebilir,
- III) Bu fruktoz karbokasyonu oluşum mekanizmaları kesin olarak bilinmeyen reaksiyonlarla 5-hidroksi metil furfural (HMF) ve organik asitleri içeren çok farklı türde ürüne dönüşebilir (Quintas vd., 2007).

Maillard reaksiyonu ise amino grubu ve indirgen şekerler arasında genellikle yüksek sıcaklıklarda meydana gelen karmaşık reaksiyonlar serisidir. Maillard reaksiyonlarının ilk basamağı, glukoz gibi bir indirgen şekerin bir amino grubu ile reaksiyonudur. Bu reaksiyon sonucu Amadori bileşiği oluşur. Amadori bileşiğinin oluşumu Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Maillard reaksiyonu ve Amadori bileşiğinin oluşumu (Hodge vd., 1976).

Şekil 3'de görüldüğü gibi, Amadori bileşikler, kolaylıkla üç farklı yapıda izomerize olur ve bunu takip eden basamaklarda farklı reaksiyon gösterirler. Gıdalarda genellikle beşin üzerinde farklı reaktif şeker ve 20 aktif amino asit bulunduğundan, sadece ilk basamakta, teorik olarak 100'ün üzerinde farklı reaksiyon ürünü oluşur. Daha büyük şekerlerin amino asitlerle reaksiyonu daha yavaştır. Pentoz şekerler, heksoz şekerlerden ve disakkaritlerden daha hızlı reaksiyona girerler. Amino asitlerden lizin, iki amino grubuyla, daha hızlı reaksiyona girer ve koyu rengin oluşmasına neden olur. Sistein, sülfür grubu ile çok özel lezzet bileşiklerinin oluşmasına neden olur, fakat daha az renk oluşturur. Şeker alkollerini ya da polioller (sorbitol, ksilitol) Maillard reaksiyonlarına katılmazlar. Amadori bileşiğinin oluşumundan sonraki reaksiyon basamakları, bu bileşiğin izomerine bağlı olarak farklılık gösterir. Herbirinde amino asit yer değiştirir ve en sonunda önemli lezzet bileşikler olan furfural ve hidroksimetil furfurala (HMF) indirgenen reaktif bileşikler oluşur. Diğer reaksiyon, Amadori-yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılan, temel

esmerleşme reaksiyonlarının başlangıç noktasıdır. Amadori-yeniden düzenlenmesinden sonra üç farklı yol izlenebilir;

- I) Dehidrasyon reaksiyonları,
- II) Diasetil ve pürivaldehid gibi kısa zincirli hidrolitik ürünlere parçalanma,
- III) Strecker parçalanması ya da aldollere kondenzasyon

Bu üç yol sonucunda, kahverengi, yüksek molekül ağırlıklı, melanoidin pigmentlerini ve lezzet bileşenlerini içeren çoklu kompleks karışımlar oluşur.

Maillard reaksiyonlarının bazı son ürünleri toksik ve karsinojenik olabilir. Akrilamid sadece 180°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda oluşan potansiyel toksik bileşiktir. Özellikle fırınlanmış ya da kızartılmış ürünlerde oluşur. Kızartma 180 °C aşığı olduğu zaman akrilamid oluşmaz (URL-3, 2008).

1.4.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

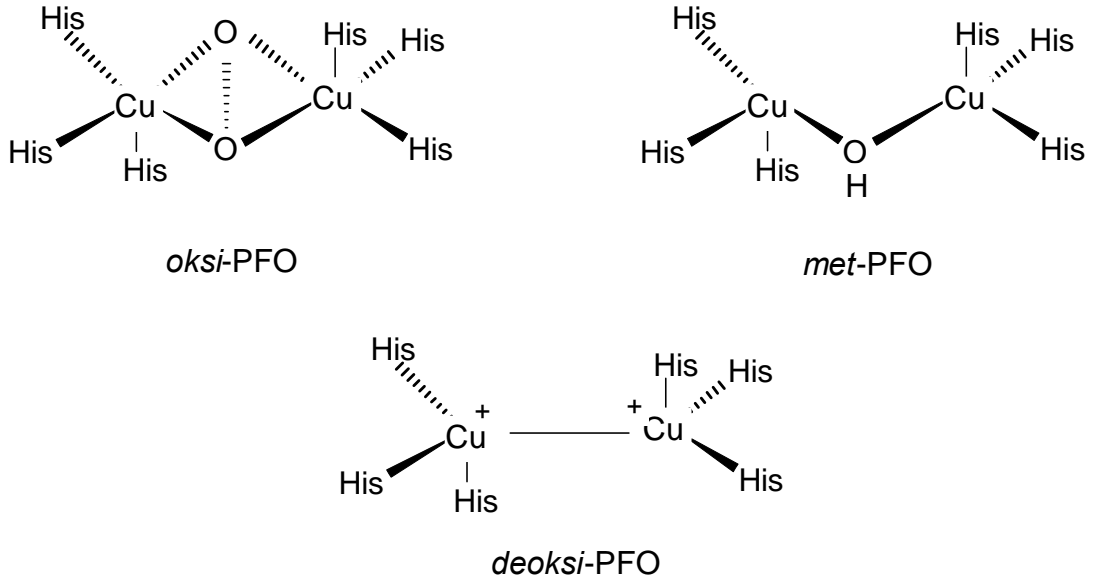
Enzimatik kararım reaksiyonları iki adımda oluşur. Birinci adım, polifenol oksidazın (PFO) katalizlediği reaksiyon ile monofenollerin ya da difenollerin *o*-kinonlara enzimatik oksidasyonu, ikinci adım ise enzimatik oksidasyon sonucu oluşan *o*-kinonların, enzimatik olmayan kondenzasyon ya da polimerizasyon reaksiyonları sonucu melanin bileşiklerini oluşturmasıdır. Bu esmerleşme reaksiyonları stres koşulları altında oluşur. Çünkü bu koşullar altında hücre içi parçalanma meydana gelir ve PFO substratları (fenolikler ve oksijen) ile temas kurar. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları oldukça karmaşıktır. Birçok monofenolik ya da difenolik bileşik, PFO ile etkileşerek çok farklı türde kinonik ürünlere ya da kondenzasyon ürünlerine dönüştürülürler. Fenolik substratlardan, PFO aktivitesi sonucu üretilen *o*-kinonlar renkli türler olmasına rağmen, enzimatik esmerleşmenin tipik kırmızı kahverengimsi rengi, *o*-kinonların enzimatik olmayan ikinci adım reaksiyonları sonucu oluşan melaninlerden kaynaklanır (Yoruk ve Marshall, 2003).

Fenolik bileşiklerin oksidasyon ürünleri, besinlerdeki proteinlerle etkileşim potansiyeline sahiptir ve bu etkileşimler sonucunda kovalent bağlanma reaksiyonları oluşur. Bu bağlanma reaksiyonları sonucu, proteinlerinin yapılarında, fonksiyonlarında ve besinsel değerlerinde değişimler meydana gelir. Proteinlerinin besinsel değerindeki azalma, esansiyel aminoasitlerinin kinonlarla etkileşmesinden kaynaklanır. Yapılan bir çalışmada, fenolik türler ve PFO varlığında, kazeinin mevcut lisin içeriğinde bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Matheis ve Whitaker, 1984).

1.5. Polifenol Oksidazların Reaksiyon Mekanizması

PFO, moleküler oksijen mevcudiyetinde monofenollerin *o*-hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) ve *o*-dihidroksifenollerin *o*-kinonlara (difenolaz aktivitesi), yükselttiği reaksiyonları katalizler. PFO prostetik grup olarak bakır iyonu ihtiva eder ve bu bakır iyonu katalitik aktivite için gereklidir (Kolcuoglu vd., 2007).

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 (Inlow vd., 2006). Enzimin aktif bölgesinde bakırın bağlanabileceği altı histidin birimi vardır ve bu birimler oldukça korunmuştur. Enzimin aktif bölgesi her biri üç histidin rezidüsü ile ligand halinde bulunan iki bakır atomu içerir ve bu aktif bölge reaksiyon esnasında üç farklı forma dönüşür. Bunlar; *met*-PFO (Cu^{2+}), *deoksi*-PFO (Cu^{1+}), *oksi*-PFO (Cu^{2+}) formlarıdır. Enzimin dingin formunun *met*-PFO olduğu düşünülmektedir. Monofenolik substratlar yalnızca enzimin *oksi* formuyla reaksiyon verirler. Difenolik substratların oksidasyonunda substrat sadece *oksi*-PFO ile değil, aynı zamanda *met*-PFO ile de etkileşir. Enzimin dingin hali olan *met*-PFO *deoksi* forma indirgenirken, bir molekül *o*-difenol *o*-kinona yükseltgenir. Enzimin *deoksi* formu bir mol O_2 bağlayarak *oksi* forma dönüşür. Enzimin *oksi* formu bir mol *o*-difenolü *o*-kinona yükseltirken kendisi *met* formuna indirgenir (Şekil 4) (Penalver vd., 2005).

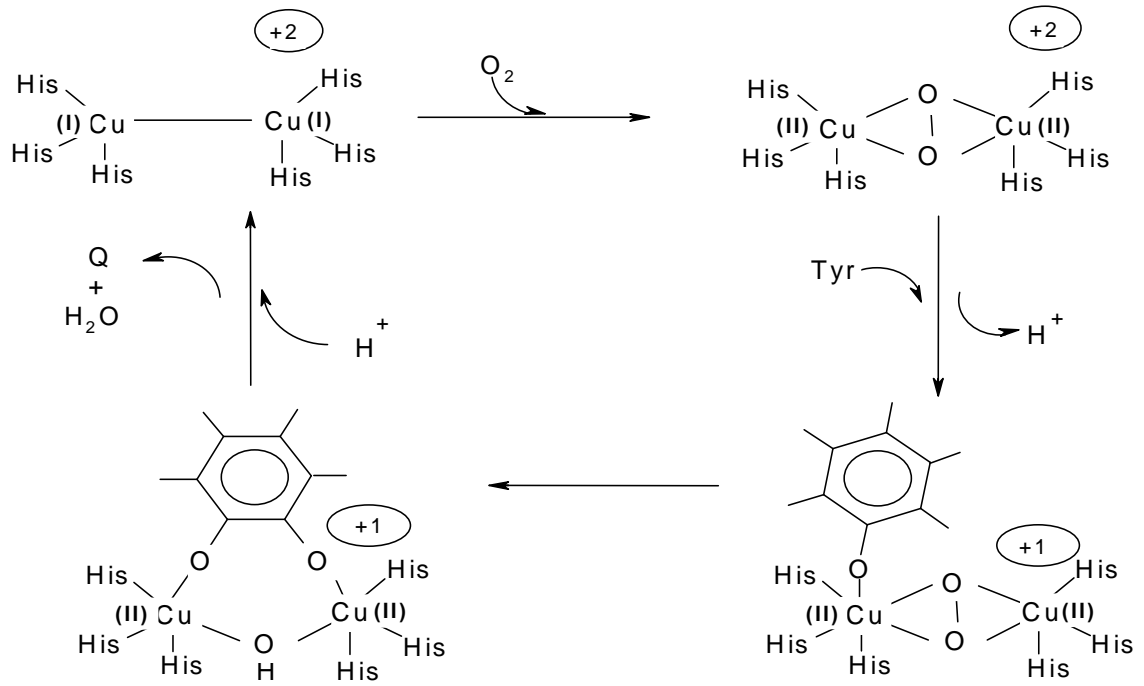


Şekil 4. PFO'nun bakır merkezleri (Penalver vd., 2005).

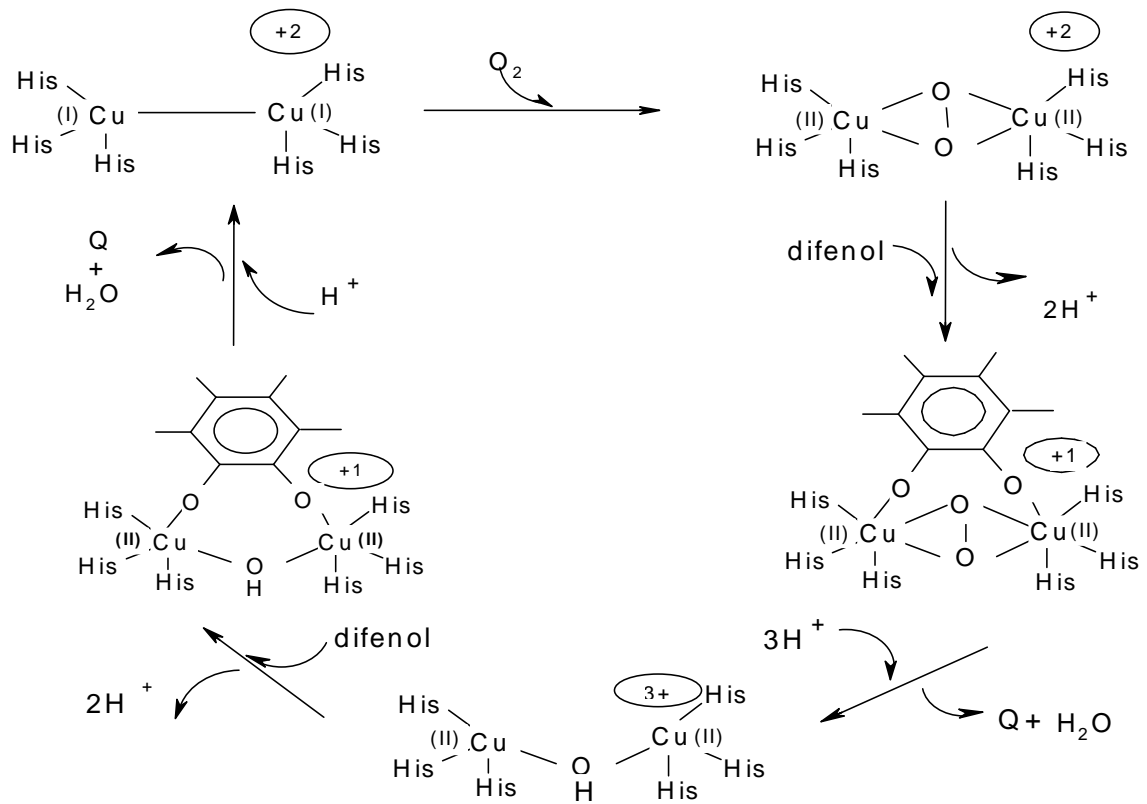
Elektron vericisi olarak etki eden bir *o*-difenolik bileşiğin yokluğunda, monofenolaz aktivitesinde karakteristik bir lag periyodu vardır (Sanchez-Ferrer vd., 1993). Karakteristik lag periyodu, enzimin *met* formundan *oksi* formunun oluşması için gerekli *o*-difenolün üretilmesi için geçen zaman olarak tanımlanmıştır. Monofenol konsantrasyonunun artması ile lag periyodu uzar. Çünkü enzimle etkileşebilecek monofenol miktarındaki artış *met*-PFO-monofenol kompleksi oluşumunu artırır (ölü kompleks). Bu da kararlı hale ulaşmak için daha fazla zaman gerektirir. Karakteristik lag periyodu; enzimin yapısı (doğası) ve miktarı, substratları, ortamdaki oksijen miktarı, safsızlıklar, sıcaklık ve pH gibi birçok değişkene bağlıdır. Katalitik miktarda *o*-difenol bu lag periyodunu azaltmaya ya da elimine etmeye yardımcı olur. Hatta aktivitenin tamamen inaktif olduğu durumlarda SDS gibi denatüre edici kimyasalların ilavesi de lag periyodunu kısaltmaya yardımcı olur (Jolivet vd., 1998). Deneysel şartlar altında, lag periyodunu elimine etmedeki hatalar ya da kullanılan aktivite tayin yönteminin zayıf hassasiyeti, literatürde rapor edilen birçok PFO'nun monofenolaz aktivitesi içermemesini açıklayabilir. Aynı zamanda lag periyodunu azaltan ya da elimine eden doğal difenollerin saflaştırma sırasında ortamdan uzaklaştırılması, monofenolaz aktivitesini maskeleyebilir (Yoruk ve Marshall, 2003).

Bütün hidroksilasyon reaksiyonlarında bir oksijen atomu monofenolün hidroksilasyonunda kullanılırken, diğer oksijen atomu H₂O'ya indirgenir. ¹⁸O₂ ve H₂¹⁶O kullanılarak yapılan izotop çalışmalarında, monofenollerin hidroksilasyonunda kullanılan oksijenin moleküler oksijen olduğu gösterilmiştir (Mason, 1956; Yoruk ve Marshall, 2003)

Fenolik bileşiklerin PFO katalizli hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonları farklı yollarla gerçekleşir ancak bu iki reaksiyon *deoksi*-PFO geçiş kompleksi üzerinden birbirine bağlanır. Hidroksilasyon reaksiyonlarında karakteristik lag periyodunu elimine etmek amacıyla başlangıçta *met*-PFO'nun BH₂ gibi bir indirgen ile *deoksi*-PFO'ya dönüşümü sağlanmalıdır. Monofenollerin hidroksil grubu, *oksi*-PFO'ya enzimin aktif merkezindeki Cu²⁺ üzerinden bağlanır. Sonuç olarak monofenolün *orto* pozisyonu, enzimin *oksi* formunda aktif merkeze bağlı bir oksijen atomu tarafından hidroksillenirken enzim *deoksi* formuna indirgenir. Difenollerin oksidasyon reaksiyonlarında, önce enzimin *deoksi* formu 1 mol O₂ bağlayarak *oksi* forma dönüşür. *Oksi* formun aktif merkezindeki Cu²⁺ iyonları *o*-difenolün hidroksil grupları ile etkileşir ve sonuçta 1 mol *o*-difenol *o*-kinona yükseltgenirken enzim *met* formuna indirgenir. *Met*-PFO ile etkileşen bir başka *o*-difenol *o*-kinona yükseltgenirken enzim *deoksi* formuna indirgenir. PFO için önerilen monofenolaz ve difenolaz çevirimleri Şekil 5 ve Şekil 6'da gösterilmiştir (Lerch, 1995; Fenol vd., 2002).



Şekil 5. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi (Fenol vd., 2002).



Şekil 6. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Q: *o*-kinon) (Fenol vd., 2002).

1.6. PFO Aktivitesinin Belirlenmesi

PFO aktivitesi, palografik, manometrik, kronometrik ve spektrofotometrik gibi çeşitli teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir. Oksidasyon reaksiyonunda kullanılan O₂, bir oksijen elektroduyla palografik olarak ya da bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik 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 hızı ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Yoruk ve Marshall, 2003).

Son zamanlarda 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH) gibi kuvvetli bir nükleofil varlığında PFO aktivitesi tayini oldukça yaygın kullanılan spektrofotometrik bir metottur. Bu metod, enzim katalizli üretilen *o*-kinonların nükleofille verdiği renkli katılma ürününün 500 nm civarındaki absorbanasının ölçülmesi esasına dayanır (Espin vd., 1995).

1.7. PFO İnhibitörleri

Gıdaların depolanması ve işlenmesi esnasında oluşan esmerleşme reaksiyonları, gıdaların kararlılığı ve besinsel değerine olan direkt etkisi nedeniyle geniş bir çalışma alanına sahiptir (Lee ve Park, 2005). Gıda endüstrisinde PFO tarafından sebep olunan esmerleşme reaksiyonlarının önemiyetinden dolayı birçok bileşik potansiyel PFO inhibitörü olabilmeleri açısından değerlendirilmiştir (Seo vd., 2003).

Esmerleşme reaksiyonlarını inhibe ettiği bilinen bileşikler sülfidler, askorbik asit ve türevleri, okzalik asit, sitrik asit ve tiyol bileşikleri olarak sıralanabilir (Altunkaya ve Gökmen, 2008). Askorbik asidin inhibitör olarak kullanıldığı PFO aktivite tayinlerinde, reaksiyonun başlangıcında absorbanstaki değişim belli bir süre izlenememektedir. Bu lag periyodu olarak bilinir. Bu süre sonunda hemen hemen bütün askorbik asit dehidroaskorbik aside dönüşür. Bu periyoda ulaşıldıktan sonra PFO tarafından üretilen *o*-kinon miktarı artar (Colak vd., 2007).

Kojik asit sıklıkla kullanılan referans bir inhibitördür ve 10–50 µM konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Gıdalarda kullanılmasına izin verilen ve geleceği daha parlak olan bir başka bileşik ise yaklaşık 100 µM civarında etkili olan 4-

hekzilresorsinoldur (meta-hidroksi-para-hekzil-fenol) ve bu bileşimin PFO ve Lakkazın ayırt edilmesinde kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Dawley ve Flurkey, 2003).

Enzimin doğal inhibitörleri üzerinde yapılan araştırmalar birçok aktif bileşimin keşfedilmesine neden olmuştur. Bu bileşikler arasında ilgi çekici olanlar kalkonlar ve türevleridir (Nerya vd., 2003). En etkin bileşikler ise 1 μ M civarında etkin olan glabridin ve 8 μ M konsantrasyonda etkin olan izolikuritigenindir (Nerya vd., 2004). Kalkon türevleri üzerine yapılan çalışmalar bu bileşiklerin A ve B zincirlerinde bulunan hidroksil gruplarının sayıları ve pozisyonlarının onların inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesinde önemli olduğunu göstermiştir. Bu kalkon türevlerinin inhibisyon mekanizmaları tam olarak belli değildir (Nerya vd., 2006).

Esmerleşmeyi engelleyen önemli bir inhibitör grubu ise fenolik substratlarla yapısal olarak benzerlik gösteren bazı bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle yarışmalı inhibisyon gösterirler ancak bu tür inhibisyonlar kullanılan substrata ve enzimin elde edildiği kaynağa göre çeşitlilik gösterir. Bu bileşik grubundan *L*-mimosin, tropolon, kojik asit ve 4-resorsinoller yavaş bağlanan yarışmalı inhibitörler olarak tanımlanmışlardır. Fenolik bileşikler metal şelatlayıcı ya da serbest radikal sonlandırıcıları olarak davranan etkili antioksidanlardır. Bunlar arasında, benzopiron türevleri olan flavonoidler gıda ve kozmetik endüstrisi için önemli doğal antioksidanlardır. Yapılan bir çalışmada bazı flavonoidlerin mantarın difenolaz aktivitesini inhibe ettiği ve hemen hemen hepsinin dönüşümlü reaksiyon verdiği ve *L*-DOPA substratına karşı yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (Wang vd., 2007).

Bazı aromatik aldehytlar, gıda işletmeciliğinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlar tatlandırıcı (aroma verici) ya da koruyucu olarak kullanılabilirler. Son zamanlarda gıda karışımlarında katkı maddesi olarak doğal ürünlere tüketiciler tarafından artan bir talep vardır. Yapılan çalışmalar sonucu kuminaldehid ve salinaldehidin mantar PFO'sunu inhibe ettiği, 4-izopropil salisilaldehidin PFO üzerine daha güçlü inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. 4-izopropil salisilaldehid, kuminaldehid ve salinaldehid inhibitör olarak kıyaslandığında, benzen zincirindeki grupların polaritesi ve pozisyonunun, enzim inhibisyonunda önemli rol oynadığı görülmüştür. Bu kıyas, yeni ve potansiyel tirozinaz inhibitörlerinin sentezi için bir ipucu da sağlamaktadır (Song vd., 2005).

Gıda sanayinde PFO'nun sebep olduğu kararmanın öneminden dolayı, potansiyel inhibitörler ve yeni PFO inhibitörleri üzerine çalışmalar halen devam etmektedir (Mayer, 2006).

1.8. PFO'nun Bulunduğu Organizmalar

Çalışmaların büyük bir kısmı PFO'ların doğada yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. PFO'lar bitkiler, hayvanlar, deniz ürünleri, mikroorganizmalar ve mantarlar gibi yaşamın hemen bütün formlarında bulunurlar ve farklı fizyolojik fonksiyonlarda rol alırlar (Van-Gelder vd., 1997).

PFO bitki dokularının büyük bir kısmında bulunur ve bitki ürünlerinin istenmeyen esmerleşmesinde (kararmasında) rol aldığı için, bitki fizyolojisi ve gıda bilimi sahasındaki araştırmacıların özel ilgisini çekmiştir. Bitkilerdeki yaygın bulunuşunun yanında, PFO deniz ürünlerinin birçoğunda, kabuklu deniz canlılarında, memelilerde ve böceklerde çok farklı fizyolojik rollere de sahiptir. Örneğin; PFO, kabuklu deniz ürünlerinde kabuk sertleşmesinden, böceklerde savunma mekanizmalarından ve memelilerde ise esas olarak memelileri zararlı güneş ışınlarına karşı koruyucu ajanlar olarak görev yapan melaninlerin biyosentezinden sorumludur (Yoruk ve Marshall, 2003).

PFO'nun bitkilerde yaygın olarak bulunuşuna, hatta birçok farklı doku ve organdaki mevcudiyetine rağmen, fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak belirlenememiştir (Sherman vd., 1991). Bununla beraber PFO'nun patojenlere ve haşerelere karşı bitkilerde savunma rolü olduğu düşünülmektedir. PFO aktivitesi sonucu üretilen kinonların nükleofilik amino asitlere kovalent olarak bağlanmaları, bitki proteinlerinin besleyici değerini azalttığı ve bunun da bitkilerin otçul böceklere karşı olan direncini artırabileceği düşünülmektedir (Felton, 1996). Kinonların patojenlere karşı direkt toksisitesi de düşünülmektedir. Bununla birlikte, PFO aktivitesinin mekanik yaralanmalara, fungal ve bakteriyel bulaşmalara ve metiljasmonate (MeJa) gibi bazı işaret moleküllerle muamele etmeye karşı artış gösterdiği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Buna rağmen PFO'nun bitki savunmasındaki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır (Maki ve Morohashi, 2006).

Lakkazlar, lignin gibi karmaşık doğal polimerlerin bozundurulmasında kullanılırlar. Reaksiyonda üretilen aktif radikaller, kovalent bağların koparılmasına ve böylece monomerlerin ortaya çıkmasına neden olurlar (Thurston, 1994). Lakkazlar ve tirozinazlar, monofenolaz aktivitesine sahip olup olmamalarına (McMahon vd., 2007) ve bazı inhibitörlerle etkileşimlerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Tirozinazların aksine lakkazlar monofenolaz aktivitesi içermezler. Tirozinazlara spesifik bir inhibitör olan 4-heksilresorsinolun bu enzimin lakkazlardan ayrıştırılmasında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Dawley ve Flurkey, 1993).

Bütün PFO'ların monofenolaz aktivitesine sahip olup olmadıkları devam eden bir tartışma konusudur. Ispanak ve çilek PFO'ları ile yapılan ilk çalışmalarda, bu kaynaklardan elde edilen enzimlerin sadece difenolaz aktivitesine sahip oldukları rapor edilirken (Goldbeck ve Cammarata, 1981; Wesche-Ebeling vd., 1990), daha sonraki çalışmalarda ise, aynı iki kaynaktan elde edilen PFO'ların her iki aktiviteye de sahip olduğu gösterilmiştir (Sanchez-Ferrer vd., 1989; Espin vd., 1997). Her iki durumda da, PFO'nun reaksiyon özelliklerindeki bu çelişkinin ekstraksiyon ya da saflaştırma süreçlerindeki ve/veya aktivite tayin metodunun hassasiyetindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Yoruk ve Marshall, 2003).

Muz (*Musa sapientum L.*) meyvesinden iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan PFO enzimi için yapılan elektroforetik çalışmalarda hem doğal PAGE'de hem de SDS-PAGE'de tek bant görüldüğü bildirilmiştir. Enzimin yaklaşık molekül ağırlığı jel filtrasyonu ile 41 kDa olarak belirlenmiştir. Muz meyvesinden elde edilen PFO'nun, bu meyvenin etli kısmında yüksek oranda bulunan dopamin substratına karşı oldukça ilgisinin olduğu belirtilmiştir. Bu substrat için K_m değeri 2,8 mM olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH'sının 6,5 olduğu ve pH 5–11 aralığında 5 °C'de 48 saat inkubasyon sonunda enzimin aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 30 °C olduğu ve 70 °C sıcaklıkta 30 dak muamele edildiğinde dahi aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Askorbik asit, sistein, sodyum dietilditiokarbomat ve potasyum siyanit kullanılarak yapılan inhibisyon çalışmalarında bütün inhibitörlerin enzimi tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir (Yang vd., 2000).

Malatya kayısısından $(NH_4)SO_4$ çöktürmesi ve diyalizle kısmi saflaştırılan PFO enziminin katekol, L-dopa ve gallik asit gibi difenoliklere karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin en iyi aktiviteyi katekol substratına karşı gösterdiği, bu substrat için K_m değerinin 6,6 mM ve enzimin optimum pH'sının ise 8,5 olduğu belirlenmiştir. Askorbik asit, 2-Merkapto etanol, sodyum meta bisülfid ve tiyoürenin enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Enzimin L- Tirozin ve resorsinol gibi monofenoliklere karşı aktivite göstermediği rapor edilmiştir (Arslan vd., 1998)

Enginardan (*Cynara scolymus L.*) elde edilen ekstraktta oldukça yüksek PFO aktivitesi bulunduğu rapor edilmiştir. Enginardan elde edilen enzimin pH 5–7 aralığında en yüksek aktivite gösterdiği ve pH 6–7 aralığında 25 °C'de 60 dak inkubasyon sonunda aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. Enzim katekol, pirogallol, 4-Metil katekol, L-Dopa ve gallik asit substratlarına karşı aktivite gösterirken L-tirozini okside etmediği gösterilmiştir. Enzim için

en etkin inhibitörün dithioeritol olduğu sodyum metabisüfit ve askorbik asidin daha düşük inhibisyon gösterdikleri belirtilmiştir (Aydemir, 2004).

Döngel (*Mespilus germanica* L.) meyvelerinden elde edilen PFO enzimi için denenen mono ve difenolik substratlar içerisinde 4-MK'un en iyi substrat olduğu belirlenmiştir. Döngel meyvelerinden elde edilen enzimin monofenolliklere karşı zayıf aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Döngel meyvelerinden elde edilen PFO enzimi için optimum pH'nın 7 ve optimum sıcaklığın 30 °C olduğu belirlenmiştir. 4-MK substratı için Km değeri 26 mM olarak belirlenmiştir. Sodyum metabisüfitin en iyi inhibitör olduğu Cu^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} iyonlarının difenolaz aktivitesini kuvvetlice inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ayaz vd., 2008)

Mantarlar PFO enzimi açısından oldukça yüksek aktiviteye sahiptirler. 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, kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO'dan kaynaklandığı da gösterilmiştir (Zhang ve Flurkey, 1997; Ratcliffe vd., 1994).

Gillabert ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *Terfezia clavary*'den elde edilen tirozinaz enziminin monofenolaz aktivitesi ilk defa tanımlanmıştır. Enzimin tamamen inaktif formda olduğu ve ancak reaksiyon ortamında SDS varlığı ile aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Karakteristik lag periyodunun pH, enzim ve substrat konsantrasyonlarından etkilendiği rapor edilmiştir. Enzimin pH 3,5–7 aralığında aktivite gösterdiği ve aktivitenin pH 5,5 de maksimuma ulaştığı belirtilmiştir. Tirozin substratı için K_m değerinin 69 μM olduğu belirtilmiştir (Gillabert vd., 2001).

Macrolepiota mastoidea yabani ve yenilebilir bir mantar türüdür. Bu mantar türünden elde edilen ham enzim özütünün *L*-Dopa ile boyanan doğal poliakrilamid jel elektrofolizinde iki bandın varlığı gözlenmiştir. Ham enzim özütü 3-(4-Hidroksifenil) propionik asit substratına karşı monofenolaz ve 4-Metil katekol substratına karşı difenolaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Her iki aktivite için optimum pH değeri sırasıyla 6,0 ve 4,0 olduğu ve bu pH'larda 24 saat inkübasyon sonunda enzimin başlangıç aktivitesini % 100 ve % 60 oranlarda koruduğu belirtilmiştir. Enzimin optimum sıcaklık değeri monofenolaz aktivitesi için 30 °C difenolaz için 20 °C olarak belirlenmiştir. Tiyüre ve askorbik asidin monofenolaz aktivitesi için sodyum metabisüfit ve askorbik asidin difenolaz aktivitesi için potansiyel inhibitörler olduğu gösterilmiştir (Kolcuoglu vd., 2007).

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-MK 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'nın 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 gözlenmiştir. 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 (Yildirim vd., 2005).

1.9. PFO Enziminin Endüstriyel Uygulamaları

Gıda endüstrisinde siyah çay, kahve ve kakao üretiminde PFO önemli bir rol oynar. Taze çay yaprakları kuru madde ağırlığı oranlarına göre yaklaşık olarak % 36 polifenolik bileşik içerir. Polifenoller içerisinde en yaygın olanlar kateşinlerdir. Çay yapraklarındaki kateşinlerin içeriği bitki yapraklarının olgunluğuna bağlıdır. Çay yapraklarının toplanmasıyla başlayan siyah çay üretimi süreci yaprakların soldurulması, maserasyon işlemi ve son olarak kurutma işlemi ile sonuçlanır. Yaprakların soldurulması boyunca yapraklar maserasyon işlemini kolaylaştıran bir forma dönüşürler. Bu prosesler yaprakların hücre yapılarının bozulması ile sonuçlanır ve fermantasyon prosesi başlamış olur. Siyah çay üretiminde yapraklardaki kateşinlerin yaklaşık % 75'i oksidasyon ve kısmi polimerizasyona bağlı olarak enzimatik dönüşüme uğrarlar. Kateşinlerin PFO bağımlı oksidasyonları sonucu elde edilen kinonlar birbirleri ile teafavinleri vermek üzere bir dizi reaksiyon verirler. Teafavinler dimerik kateşinler olarak bilinirler (Łuczaj vd., 2004).

Ayçiçeği yemi (Sunflower meal, SFM) ayçiçeği yağı üretiminden elde edilen bir yan üründür. SFM çiftlik hayvanlarının beslenmesinde soya fasülyesi, pamuk ve kanoladan sonra dördüncü en geniş ilave protein kaynağıdır. Ne var ki, SFM'nin kullanımını indirgen şekerler fenolik bileşikler gibi besinsel değeri olmayan bazı bileşikler içermesinden dolayı sınırlıdır. SFM'nin bu fenolik bileşiklerden arındırılması onun kullanımını ve diğer pahalı protein kaynaklarının yerini almasına sebep olabilir. Bu işlem için *Trametes versicolor* türünden elde

edilen PFO kullanıldığında, pH 4,3, sıcaklık 45 °C ve etkileşim süresi olan 4 saat sonunda bu fenoliklerin % 98 oranında uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (Duvnjak ve Martinez, 2006).

Tekstil ve diğer endüstri kolları gözle görülür birçok kirlilik üretmekte ve herhangi bir muameleye tabi tutmadan çevreye deşarz etmektedir. Bu kirleticiler deşarz edildikleri sularda sadece renk değişimine neden olmamakta aynı zamanda sucul yaşamın birçok formu için zehirlilik oluşturmaktadır. Buyüzden, aromatik bileşikleri de içeren endüstriyel atıkların arıtımı gereklilik arz etmektedir. Fenoller, aromatik aminler ve kumaş boyaları artık geleneksel arıtma metodları ile arıtılamamaktadır. Bu aşamada oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin, bu kirleticilerle kirlenmiş atık suların arıtılmasında kullanımı yeni bir yaklaşım olabilir. Ancak atık suların arıtımında serbest enzimlerin termal kararsızlık, tekrar kullanılabilirliklerinin olmayışı, aktivite kaybı gibi birçok olumsuz nedenden dolayı büyük hacimlerdeki endüstriyel atıkların arıtılmasında kullanımı henüz mümkün olmamıştır. Yapılan bir çalışmada, patatesten elde edilen PFO'nun selit immobilizasyonu ile birçok endüstriyel kirleticinin atık sulardan arıtımında etkin olduğu ve böyle suların arıtımında kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (Husain ve Ali Khan, 2007).

Fenol türevlerinin belirlenmesinde (analizinde) gelecek vadeden polifenol oksidaz temelli biyosensörler oldukça dikkat çekmektedir. Biyosensörler analitik çalışmalarda bilginin tekrar tekrar elde edilmesini sağlayabilen aletlerdir. Biyosensörlerin yapılarındaki ana faktör enzim immobilizasyonudur. İmmobilize enzimlerin analizlerde kullanılmasının bazı avantajları; karmaşık karışımlardaki analitin kolayca belirlenmesi ve küçük hacimlerde analiz örneği kullanımı olarak sıralanabilir. Polietilenoksit/polipirol matriksine immobilize edilen PFO enziminin bazı Türk şaraplarında polifenolik içeriğin belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Çil vd., 2005).

Nano titanyum dioksit, fotovoltaiik etkisi nedeni ile tirozinazların katalitik aktivitesini artırır. Bu durum, nano titanyum diokside immobilize edilmiş tirozinaz kullanılarak, fenolik bileşiklerin analizinde daha hassas biyosensörler geliştirilebileceğini göstermektedir (Zhou vd., 2006).

L-Dopa (3,4-dihidroksifenil *L*-alanin) birçok bitki kaynağından elde edilebilen fakat hayvanlarda bulunmayan bir aminoasittir. *L*-Dopa Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan bir ilaçtır ve tirozinin PFO katalizli yükseltgenme reaksiyonları sonucu üretilir (İkram-ul-Haq ve Sikander Ali, 2002).

1.10. Çalışmanın Amacı

Gelişen teknoloji ile birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. Gıda, tekstil, temizlik ve sağlık gibi alanlarda artan talebi karşılamak için daha hızlı, az enerji maliyetli ve çevreye daha az zarar verebilecek yöntemler tercih edilmektedir. Klasik kimyasal yöntemler, spesifik olmaması, verimin düşük olması, yan ürünlerin fazla olması ve çevreye daha çok zararlı atık verilmesinden dolayı tercih sebebi olmaktan çıkmaktadır. Bu yüzden endüstriyel uygulamalar ve tıp alanında kimyasal yöntemlerin yerini artık enzim katalizli reaksiyonlar almaktadır. Canlı sistemler tarafından üretilen biyolojik katalizörler olan enzimler, oldukça spesifik reaksiyonları 10^8 - 10^{20} kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünleri oluştururlar. Bu şekilde elde edilen ürünler hem oldukça saf olur, hem de klasik yöntemlere nazaran çok daha kısa sürede sentezlenir. Ayrıca enzim katalizli yöntemlerde reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb.) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerjiden de tasarruf sağlanmış olur. Yani ekonomik açıdan da değerlendirildiğinde enzim kullanımının önemli avantajları olduğu açıktır.

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.

Bu çalışmanın amacı, Trabzon'un Maçka İlçesi, Lişer yaylasından toplanan *R. delica* mantarından PFO enziminin karakterizasyonudur. Karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda, optimum pH, optimum sıcaklık, substrat özgünlüğü, ısı ve pH kararlılığı, metal iyonların ve çeşitli kimyasal maddelerin etkisi, I_{50} değerleri, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşılmıştır. Böylece, PFO aktivitesi gösteren *R. delica*'nın enzim kaynağı olarak endüstriyel ya da diğer uygulamalar için kullanılıp kullanılmayacağı tespit edilebilecektir.

Gerçekleştirilen bu çalışma, yöremizde yetişen bu mantarın biyolojik potansiyelinin incelenmesine de olanak sağladığından önem arz etmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1.Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

2.1.1. Cihazlar

Kullanılan cihazlar, modelleri ve firma isimleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Otomatik Pipet (1–10µL /100–1000µL /1000–5000µL)	Acura 825	Socorex
Isıtıcı /Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Vorteks Karıştırıcı	RX	Velp
pH Metre	720	WTW Inolab
Spektrofotometre	UV/2	Unicam
Santrifüj	Rotina 35 R	Hettich
Protein Elektroforezi	P8DS	Owl Speration Systems
Çalkalayıcı Su Banyosu	SV–1422	Memmert

2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 2’de verilmiştir. Bütün çözeltiler çift destile saf su (dd H₂O) ile hazırlanmıştır.

Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı

Tamponlar	Hazırlanışı
Glisin-HCl Tamponu (50mM, pH 3,0)	3,75 g glisin suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (50mM, pH 4,0-5,0)	4,1 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Fosfat Tamponu (50mM, pH 6,0-7,0-8,0)	8,7 g K_2HPO_4 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti 6,8 g KH_2PO_4 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti ile titre edilerek pH'ı istenilen değere ayarlanarak hazırlandı.
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 9,0)	6,05 g tris bazı suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Substratlar	
Tirosin (100 mM stok çözelti)	112,6 mg tirosin sodyum tuzu ($M_A= 225,2$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
3-(4-hidroksifenil)-Propionik Asit (PHPPA) (100 mM stok çözelti)	83,09 mg PHPPA ($M_A= 166,18$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
4-Metil Katekol (100 mM stok çözelti)	62,07 mg 4-metil katekol ($M_A= 124,14$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
Katekol (100 mM stok çözelti)	55,05 mg katekol ($M_A= 110,11$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (100 mM stok çözelti)	98,59 mg L-DOPA ($M_A= 197,19$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
3,4-dihidroksi Sinamik Asit DHPPA (100 mM stok çözelti)	91,09 mg DHPPA ($M_A= 182,18$ g/mol) suda çözülerek 5 mL'ye tamamlandı.
Lowry Protein Tayini	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3 çözeltisi
Lowry B	% 1 bakır sülfat çözeltisi
Lowry C	% 2 sodyum – potasyum tartarat çözeltisi
Lowry D	1 kısım Lowry B + 1 kısım Lowry C
Lowry E	0,25 mL Lowry D + 12,5 mL Lowry A
Lowry F	1 hacim Folin belirteci + 1 hacim su
Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	36,3 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 mL'ye tamamlandı
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl)	24,2 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, pH 6,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 mL'ye tamamlandı
% 10 Amonyum Persülfat (APS)	% 10 (w/v) APS çözeltisi su ile hazırlandı ve -20 °C'de saklandı
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	% 29,2 (w/v) akrilamid ve % 0,8 (w/v) N, N'-metilen bisakrilamidin suda çözülmesiyle hazırlandı
Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) % 0,1 Bromofenol mavisi % 20 gliserol (100 μ L'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı)
Doğal Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris bazı ve 250 mM glisin içeren çözeltinin pH'ı 8,3'e ayarlanarak hazırlandı
Substrat Boyama Çözeltisi 24 mM L-DOPA	94,7 mg L-DOPA ($M_A= 197,19$ g/mol) suda çözülerek 20 mL'ye tamamlandı.
Diğer Çözeltiler	
3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH)	107,9 mg MBTH ($M_A= 107,9$ g/mol) suda çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.
Dimetilformamid (DMF)	Orijinal şişesinden kullanıldı.

2.1.3. Kimyasallar

Dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum asetat, asetik asit, etilendiamintetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), magnezyum klorür, tris(hidroksimetil)amino metan (TRİS), dimetilformamid (DMF), askorbik asit, sodyum metabisülfid, benzoik asit, hidrojen klorür, glisin, divalent Ni^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} ve trivalent Al^{+3} iyonlarının klorür tuzları Merck A.G. (Darmstadt, Germany)'den temin edildi.

TritonX-114 (TX-114) deterjanı, fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), 4-metil katekol, katekol, *L*-3,4-dihidroksifenilalanin (*L*-DOPA), tirozin, 3-(4-hidroksifenil)-propionikasit (PHPPA), 3-metil-2-benzotiazolinon (MBTH), sığır serum albumin (BSA), sodyumdodesil sülfat (SDS), folin kimyasalları Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edildi.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

- *R. delica*'dan 30 g alınarak sıvı azot içerisinde hücre membranlarının parçalanması için 15 dak bekletildi.
- Bu örneğe 2 mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 1mM PMSF içeren 50 mM fosfat tamponundan (pH 7,0) 30 mL ilave edilerek havanda dövüldü.
- Daha sonra bu karışım süzüldü ve elde edilen süzüntüler 4 °C'de, 20 dak 15.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant 1:1 soğuk aseton: su karışımında çöktürüldü. 4 °C'de 5 dak 9000 rpm'de santrifüjlendi.
- Elde edilen çökelek asetonu uçurmak amacıyla 4 °C'de 24 saat bekletildi.
- Asetonu uçurulan çökelek 50 mM fosfat (pH 7,0) tamponunda çözüldü. 4 °C'de 5 dak 8000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant ham özüt olarak kullanıldı.
- Çalışma süresince kullanılan ham enzim özütleri 1 mL'lik ependorf tüplerinde -30 °C'de saklandı.

2.2.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Doğal PAGE Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA USA) elektroforez cihazı kullanılarak yapıldı. % 5'lik yığıma ve % 10'luk ayırma jeli kullanıldı. Doğal elektroforez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan örnekler Hamilton şırıngası ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA'lık ve ayırma jeli boyunca da 25 mA'lık akım uygulandı. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi. Elektroforezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 3'te verilmiştir.

Doğal jel elektroforezi sonucu elde edilen jel, substrat boyama çözeltisi (24mM L-DOPA) içinde 30 dak bekletilerek PFO aktivitesinden sorumlu bantların varlığı tespit edildi.

Tablo 3. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 10, pH 8,8)
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63 mL	---
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,5 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,83 mL	3,3 mL
dd H ₂ O	3,4 mL	4,0 mL
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,05 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	0,005 mL	0,004 mL

2.2.3. Protein Tayini

Özütteki protein miktarı Lowry (Lowry vd., 1951) metoduyla belirlendi. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için BSA'dan 10, 20, 30, 40 ve 50 µL alınarak üzerlerine % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH çözeltisinden son hacim 500 µL olacak şekilde ilave edildi. Özütten 25 µL alındı ve hacmi % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH ile 500µL'ye tamamlandı. Bundan sonraki aşamada;

- Hem BSA standartlarına hem de örneğe sırasıyla 1'er mL Lowry E karışımı ilave edildi ve hemen vortekslendi.
- Tüpler 10 dak oda sıcaklığında bekletildi.
- Standartlara ve örneğe 100 µL Lowry F ilave edildi ve hemen vortekslendi.
- Tüpler 30 dak karanlıkta bekletildi.

- 650 nm’de absorbansları okundu.
- Kalibrasyon grafiği hazırlanarak örnek için elde edilen konsantrasyon değeri bu işlemdeki seyrelme faktörü ile çarpılarak orijinal özütteki protein içeriği mg/mL olarak belirlendi.

2.2.4. Enzim Aktivitesinin Tayini

Enzim özütündeki monofenolaz (tirozinaz) ve difenolaz (katekolaz) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (Espin vd., 1995). Aktivite tayinleri 4-MK substratı için 494 nm’de, L-DOPA ve tirozin substratları için 507 nm’de, katekol, DHPPA ve PHPPA substratları için ise 500 nm’de gerçekleştirildi.

Aktivite tayini için 100 µL substrat çözeltisi (100 mM stok) üzerine eşit hacimde MBTH (stok 10 mM) ve nihai konsantrasyonu % 2 (v/v) olacak şekilde DMF ilave edilen reaksiyon karışımının hacmi tampon çözelti ile 950 µL ye tamamlandı. Bu karışım üzerine 50 µL enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve absorbanstaki değişim ilgili dalga boylarında 1 dakika boyunca izlenerek aktivite hesabı yapıldı. Referans tüpü ise aynı şekilde hazırlanan çözeltiliye enzim özütü yerine eşit miktarda tampon çözelti ilave edilmesiyle hazırlandı.

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 (Kolcuoglu vd., 2007).

2.2.4.1. Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Enzim özütündeki difenolaz aktivitesi için katekol, 4-MK, L-DOPA, DHPPA substratları, monofenolaz aktivitesi için ise tirozin ve PHPPA substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Yapılan aktivite tayinleri neticesinde monofenolaz aktivitesinin PHPPA substratı, difenolaz aktivitesinin ise 4-MK substratı varlığında en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bundan sonraki aşamalarda monofenolik substrat olarak PHPPA ve difenolik substrat olarak ise 4-MK kullanılmıştır.

2.2.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla, Glisin-HCl (pH 3,0), asetik asit-sodyum asetat (pH 4,0–5,0), $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,0–8,0) ve Tris-HCl (pH 9,0) tampon sistemleri kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Difenolaz ve monofenolaz aktiviteleri için elde edilen hız değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri optimum pH olarak tespit edildi ve bundan sonraki çalışmalarda aktivite tayinleri optimum pH değerlerinde gerçekleştirildi.

2.2.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 10–80 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık değeri 10 °C artırılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları su banyosunda istenilen sıcaklıklarda 5'er dak bekletilerek ön ısıtımları yapıldı. Ham enzim özütü ısıtılan reaksiyon karışımları üzerine ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi.

2.2.4.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

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 5,7–101,7 µg/mL; 4-MK için 0,04–9 µg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirilerek enzimin doygunluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu

2.2.4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile optimum şartlarda (protein miktarı, pH ve sıcaklık) özütün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için her bir substratın değişen konsantrasyonlarına (0,01–20 mM monofenolaz ve 0,01–10 mM difenolaz için) karşı

ölçülen hız değerleri grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan substrat doygunluk eğrilerinden her bir enzim aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi. Ayrıca, Lineweaver-Burk grafikleri de çizilerek enzimin her bir aktivitesi için V_{maks} ve K_m değerleri belirlendi.

2.2.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelenmek amacıyla; K^{1+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

2.2.4.7. pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzim özütünün içerdiği PFO enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitesine ait pH kararlılığının incelenmesi amacıyla;

- 50 mM glisin (pH 3,0), 50 mM asetat (pH 4,0, 5,0), 50 mM fosfat (pH 6,0, 7,0 ve 8,0) ve 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) tamponları kullanıldı.
- Uygun hacimlerdeki enzim özütleri yine uygun hacimlerdeki tampon çözeltilerle karıştırıldı.
- Hazırlanan bu reaksiyon karışımlarının bir kısmı ile aktiviteler tayin edildi.
- Tamponlarla karıştırılan özütlerin geri kalan kısımları 4 °C'de, 24 saat inkübe edildi ve 24 saat sonunda aktivite tayin yöntemine göre aktiviteler tayin edildi.
- % Kalan aktivite 24 saat sonunda elde edilen aktivitelerin sıfırıncı (başlangıç) saatteki aktiviteleriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

2.2.4.8. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzim özütünün içerdiği PFO enziminin monofenolaz ve difenolaz aktivitesine ait ısı kararlılık değerlerini belirlemek amacıyla; özütler 20 dak, 40 dak ve 60 dak zaman

aralıklarında 10–70 °C (10 °C'lik artışlarla) sıcaklıklarda su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Bu özütler bir buz banyosu yardımıyla soğutuldu, son sıcaklık oda sıcaklığına ulaşıktan sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. % Kalan aktivite, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

2.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisinin İncelenmesi ve I_{50} Değerlerinin Bulunması

Enzim özütünün içerdiği PFO enzimine bazı genel PFO inhibitörlerinin etkisini incelemek amacı ile sodyum metabisülfid, sistein, askorbik asit ve benzoik asit kimyasallarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Bu inhibitörlerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. % Kalan aktivite inhibitörsüz olarak tayin edilen aktivite değeri ile kıyaslanarak hesaplandı. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek I_{50} değerleri tayin edildi.

3. BULGULAR

3.1. Substrat Özgünlüğü

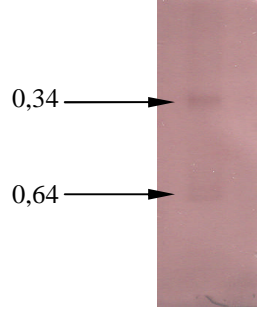
R. delica'dan hazırlanan enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz aktivitesinin tayini için tirozin ve 3-(4-hidroksifenil)-propionikasit (PHPPA) substratları, difenolaz aktivitesinin tayini için ise katekol, 4-metil katekol (4-MK), *L*-3,4-dihidroksifenilalanin (*L*-DOPA), 3-(3,4-hidroksifenil)-propionikasit (DHPPA) substratları kullanıldı. Yapılan aktivite tayinleri sonucunda difenolaz aktivitesinin 4-MK substratı varlığında, monofenolaz aktivitesinin ise PHPPA substratı varlığında en yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4). Monofenolik ve difenolik substratlar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve en yüksek aktivite % 100 olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4. *R. delica* Polifenol oksidazı için substrat özgünlüğü

Substrat	% Bağlı Aktivite
PHPPA	100
Tirosin	76
4-MK	100
DHPPA	76
Katekol	75
<i>L</i> -DOPA	21

3.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

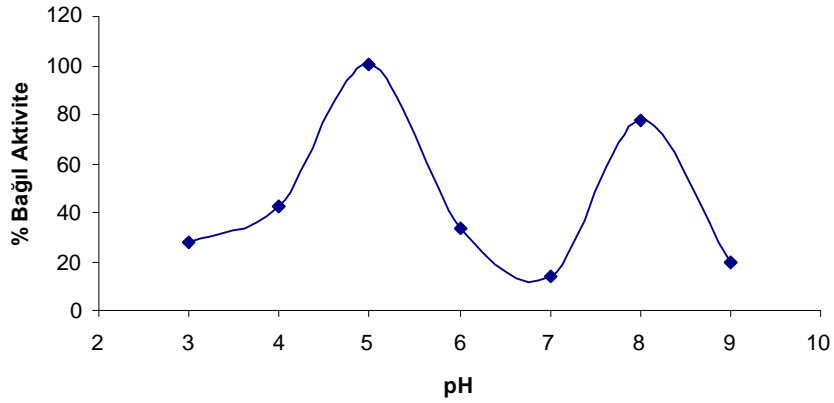
Enzim özütündeki PFO aktivitesinin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrez ve substrat boyaması ile de ortaya konuldu. Elektrofrez sonunda jel 24 mM'lık *L*-DOPA çözeltisi ile boyandı. Boyama sonunda jelde iki bandın varlığı gözlemlendi. Bu bantların R_f değerleri sırası ile 0,34 (koyu) ve 0,64 (soluk) olarak hesaplandı (Şekil 7).



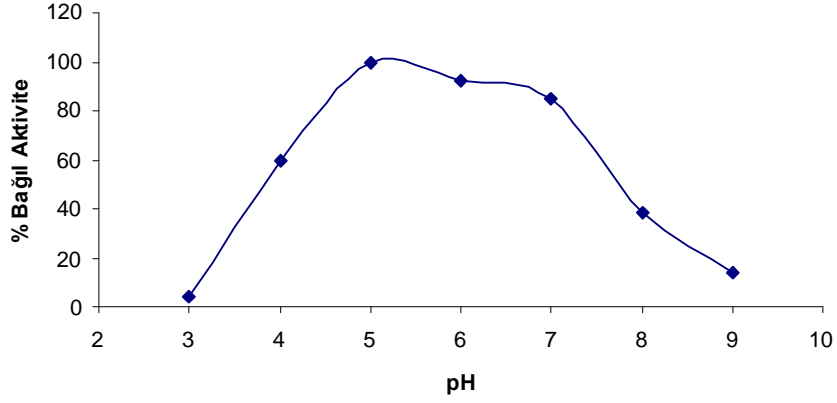
Şekil 7. *R. delica*'dan elde edilen ham özütün doğal poliakrilamid jel elektroforezi

3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin optimum pH değerlerini belirlemek için farklı pH değerlerinde (3,0–9,0) tamponların kullanılmasıyla aktivite tayinleri yapıldı ve % bağıl aktivite- pH grafikleri çizildi. Buna göre, ham enzim özütündeki monofenolaz ve difenolaz aktivitesi için optimum pH değeri 5,0 olarak bulundu (Şekil 8 ve Şekil 9).



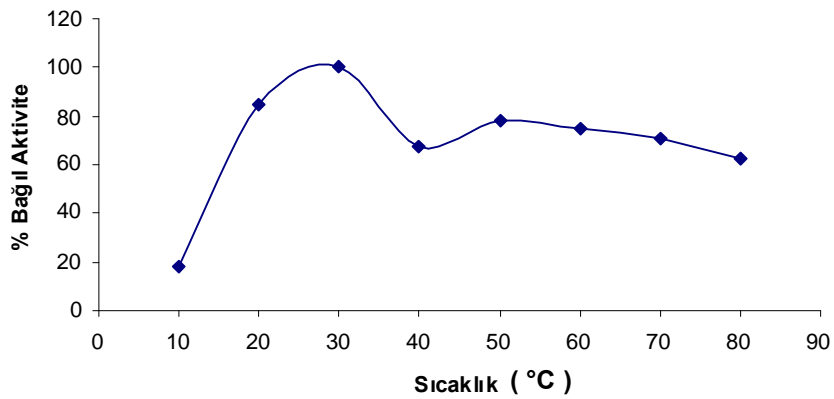
Şekil 8. *R. delica* monofenolazının pH bağımlılık eğrisi



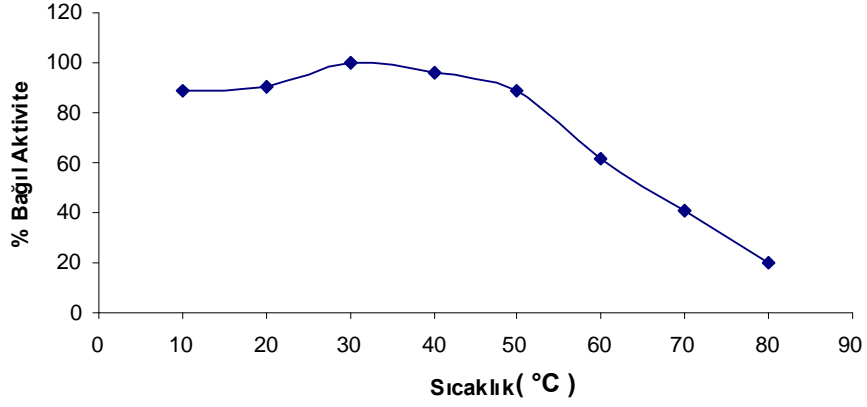
Şekil 9. *R. delica* difenolazınımın pH bağımlılık eğrisi

3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitelere ait optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacı ile 10–80 °C sıcaklık aralığında 10'ar °C aralıkla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre % bağıl aktiviteye karşı sıcaklık değerleri grafiğe geçirildi. Buna göre, monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin her ikisi için optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlendi. Difenolaz aktivitesinin 50 °C'den sonraki sıcaklıklarda hızla azaldığı, buna karşın monofenolaz aktivitesinin ise 50 °C'den sonraki sıcaklıklarda aktivitesini önemli miktarda kaybetmediği, hatta 80 °C'de bile % 60 koruduğu gözlemlendi (Şekil 10 ve 11).



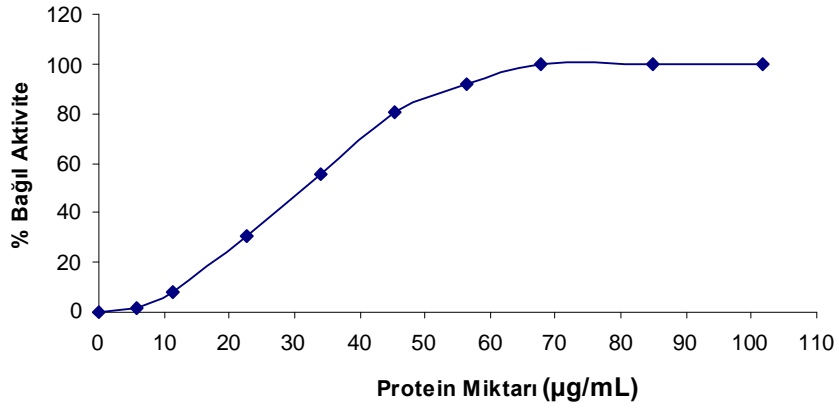
Şekil 10. *R. delica* monofenolazınımın sıcaklık bağımlılık eğri



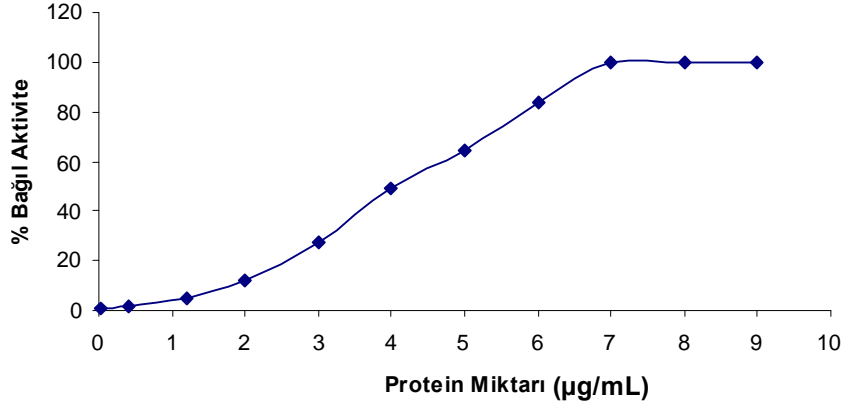
Şekil 11. *R. delica* difenolazın sıcaklık bağımlılık eğrisi

3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

R. delica'dan elde edilen enzim özütündeki monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin optimum protein miktarını belirlemek amacıyla sabit substrat konsantrasyonlarında, farklı protein konsantrasyonlarına sahip özütler kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen hiperbolik eğrilerden monofenolaz aktivitesi için optimum protein konsantrasyonu 57 $\mu\text{g/mL}$, difenolaz aktivitesi için ise 6 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu (Şekil 12 ve 13).



Şekil 12. *R. delica* monofenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

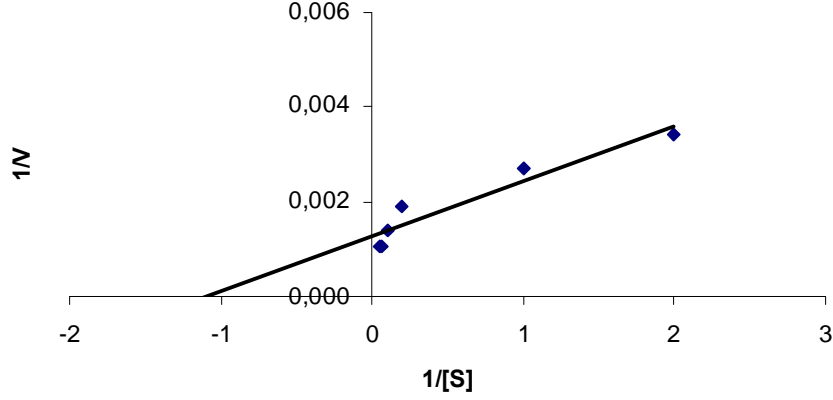


Şekil 13. *R. delica* difenolaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

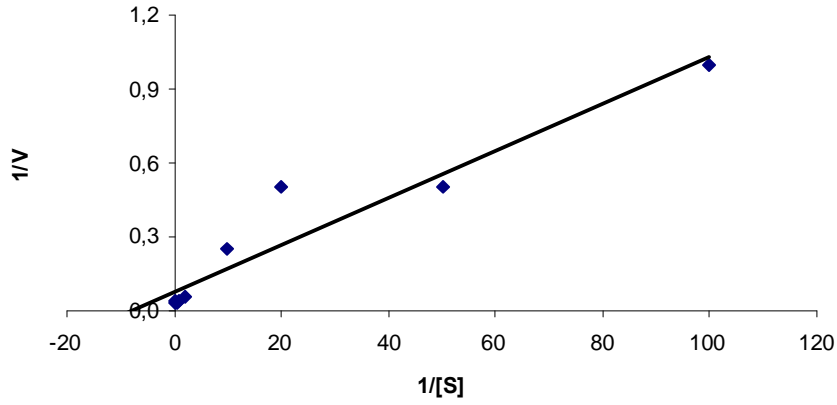
3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Monofenolaz aktivitesi için 0,01-20 mM aralığında PHPPA substratı, difenolaz aktivitesi için ise 0,01-10 mM aralığında 4-MK substratları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak, monofenolaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu 15 mM ve difenolaz aktivitesi için ise 2 mM olarak bulundu.

Kinetik verilerin belirlenmesi içinse Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil14 ve 15). Bu grafiklerden, monofenolaz aktivitesi için PHPPA substratı varlığında V_{maks} değeri 769,23 U/mg protein ve K_m değeri 0,92 mM olarak, difenolaz aktivitesi için ise 4-MK substratı varlığında V_{maks} değeri 90 U/mg protein ve K_m değeri 0,34 mM olarak tespit edildi. Katalitik etkinliğin bir göstergesi olan V_{maks}/K_m değeri PHPPA substratı için 836,12 dak^{-1} olarak, 4-MK substratı için ise 264,70 dak^{-1} olarak hesaplandı.



Şekil 14. *R. delica* monofenolazı için Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 15. *R. delica* difenolazı Lineweaver-Burk eğrisi

3.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi

Enzim özütündeki PFO aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla K^{1+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM lık stok çözeltileri kullanıldı. Her iki substrat varlığında da optimum şartlarda nihai konsantrasyonları 1 mM olan metal iyonlarının aktivite üzerine etkileri incelendi (Tablo 5 ve 6). Kontrol olarak metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve bu karışım için gözlenen aktivite değeri % 100 olarak kabul edildi. PHPPA substratı varlığında Ca^{2+} iyonunun aktiviteyi etkilemediği, K^{1+} iyonunun zayıf, Hg^{2+} iyonunun ise güçlü bir inhibisyona neden olduğu gözlemlendi. Bunların dışındaki metal iyonlarının ise değişik oranlarda aktivasyona neden oldukları gözlemlendi. 4-MK substratı

varlığında ise K^{1+} , Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının aktiviteyi etkilemediği, diğer metal iyonlarının ise değişik oranlarda inhibisyona neden olduğu gözlemlendi.

Tablo 5. *R. delica* monofenolazı üzerine metal iyonlarının etkisi

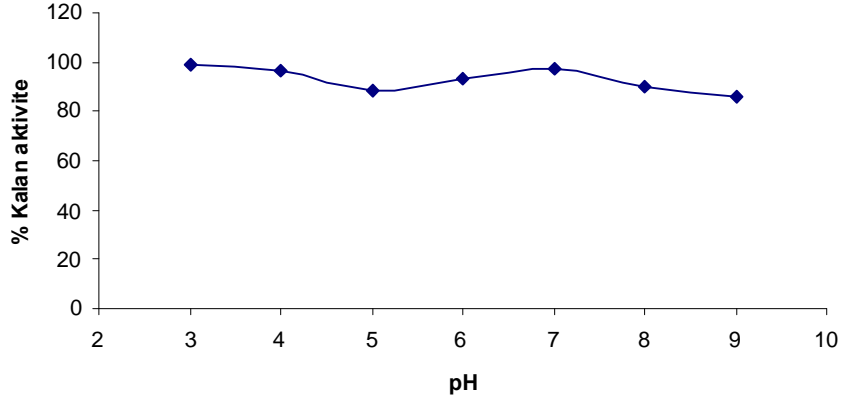
Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite	Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite
K^{1+}	92	Cd^{2+}	180
Ca^{2+}	99	Hg^{2+}	26
Ni^{2+}	150	Zn^{2+}	152
Mn^{2+}	118	Cu^{2+}	104
Co^{2+}	231	Al^{3+}	124

Tablo 6. *R. delica* difenolazı üzerine metal iyonlarının etkisi

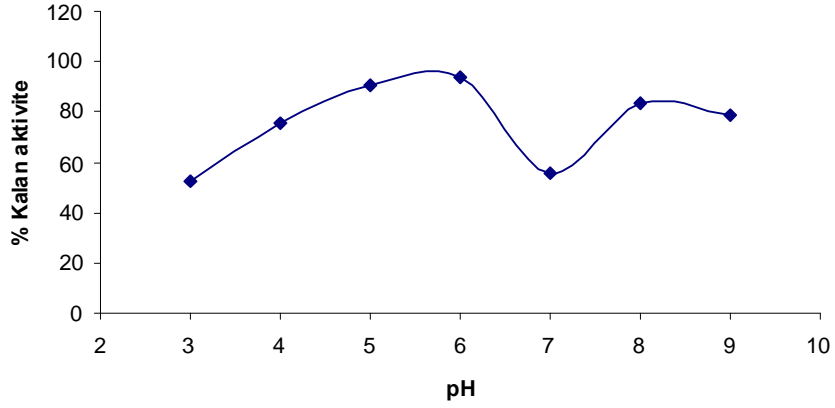
Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite	Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite
K^{1+}	103	Cd^{2+}	85
Ca^{2+}	107	Hg^{2+}	74
Ni^{2+}	74	Zn^{2+}	88
Mn^{2+}	90	Cu^{2+}	103
Co^{2+}	79	Al^{3+}	76

3.8. pH Kararlılığı

Enzim özütü farklı pH'lardaki tamponlarla 1:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen özüt-tampon karışımlarından uygun miktarlarda alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. 4 °C'de 24 saat inkübe edilen özüt-tampon karışımlarından da uygun miktarlarda alınarak aktivite tayinleri yapıldı. Başlangıç ve 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen aktivite değerleri karşılaştırılarak % kalan aktivite-pH grafikleri çizildi (Şekil 16 ve 17). Elde edilen grafiklerden, 24 saat sonunda PHPPA substratı varlığında enzim özütünün denenen bütün pH'larda aktivitesini büyük oranda koruduğu tespit edildi. 4-MK substratı varlığında ise enzim özütünün 24 saat sonunda optimum pH (pH 5,0) civarında başlangıç aktivitesini büyük oranda koruduğu tespit edildi.



Şekil 16. *R. delica* monofenolazı için pH kararlılık eğrisi

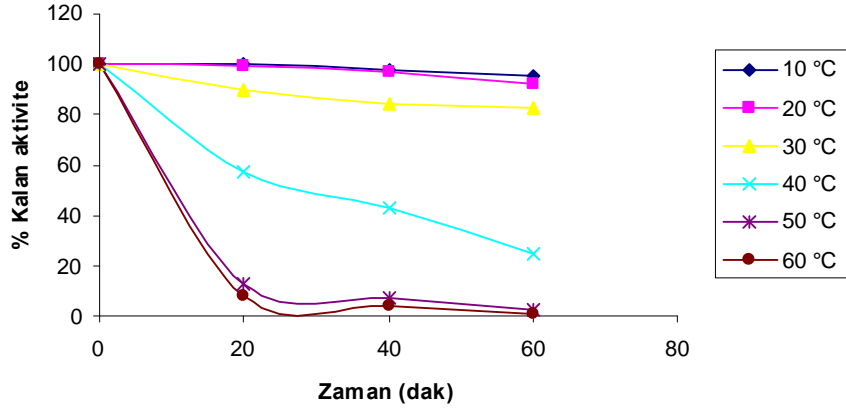


Şekil 17. *R. delica* difenolazı için pH kararlılık eğrisi

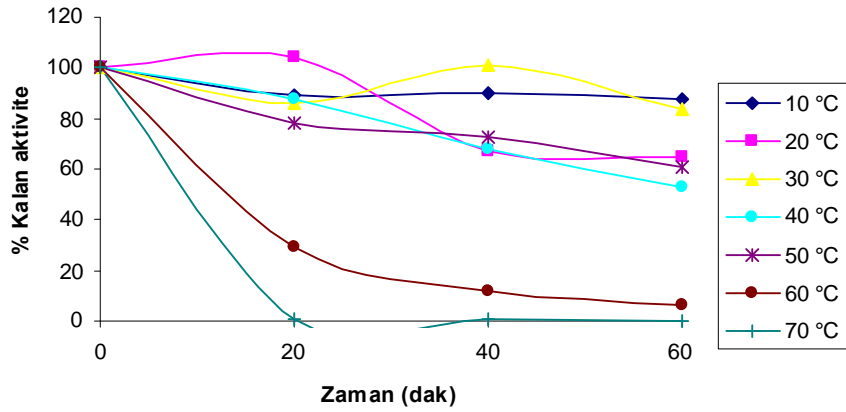
3.9. Isıl Kararlılık

Enzim özütündeki monofenolaz ve difenolaz aktivitelerine ait ısıl kararlılık değerlerini belirlemek amacıyla; özütler 20 dak, 40 dak ve 1 saat zaman ve 10–70 °C'lik (10 °C'lik artışlarla) sıcaklık aralıklarında su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Bu özütler bir buz banyosu yardımıyla soğutuldu ve sıcaklıkları oda sıcaklığına ulaştıktan sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. % Kalan aktiviteler herhangi bir ön işlem uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeriyle karşılaştırılarak hesaplandı ve grafikleri çizildi (Şekil 18 ve 19). Bu grafiklerden enzim özütünün PHPPA substratı valığında ve 1 saat sonunda 10–20–30 °C sıcaklıklarda başlangıç aktivitesini % 90 oranında koruduğu, 40 °C sıcaklıkta 1 saat sonunda başlangıç aktivitesini

% 75 oranda kaybettiği ve ileri sıcaklıklarda ise başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edildi. 4-MK substratı varlığında ve 60 dak sonunda enzim özütünün 10–20–30 °C sıcaklıklarda başlangıç aktivitesini % 90 oranında koruduğu, 40–50 °C sıcaklıklarda % 50 oranında kaybettiği, 60–70 °C sıcaklıklarda ise başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edildi.



Şekil 18. *R. delica* monofenolazı için ısıl kararlılık eğrisi



Şekil 19. *R. delica* difenolazı için ısıl kararlılık eğrisi

3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Enzim özütünün içerdiği PFO enzimine bazı genel PFO inhibitörlerinin etkisini incelemek amacı ile sodyum metabisüfit, sistein, askorbik asit ve benzoik asit kimyasallarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Bu inhibitörlerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. % Kalan aktiviteler optimum şartlarda inhibitörsüz olarak tayin edilen aktivite değeri ile kıyaslanarak hesaplandı. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek I_{50} değerleri tayin edildi (Tablo 7).

Tablo 7. *R. delica* monofenolazı ve difenolazı I_{50} değerleri

Kimyasallar	Monofenolaz I_{50} (mM)	Difenolaz I_{50} (mM)
Sodyummetabisüfit	1,87	6,5
Askorbik asit	1,24	0,11
Benzoik asit	1,16	0,1
Sistein	1,78	0,5

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzimler biyolojik katalizörler olup canlılığın vazgeçilemez biyomolekülleridirler. Enzim terimi bin sekizyüzlü yılların sonlarında ortaya atılmış ve günümüze kadar birçok farklı organizmadan yüzlerce farklı enzim karakterize edilmiştir. Gelişen teknolojiyle birlikte enzimler, tıptan birçok sanayi dalına kadar farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde hala değişik organizmalarda mevcut olan enzimleri inceleyen araştırmalar devam etmektedir. Bu tür yeni enzimlerin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar, farklı özelliklere sahip enzimlerin keşfi için önem arz etmektedir.

PFO birçok hayvan, bitki, mantar ve bakteride bulunmaktadır. Bu enzimin aktivitesi, bulunduğu organizmaya ve ortam şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bitkilerde meyvenin ham veya olgun olması bu enzimin katalizlediği reaksiyonu etkileyen bir unsurdur (Duangmal, 1999).

Bu çalışmada Trabzon İli Maçka İlçesi Lişer yaylasından toplanan *Russula delica* mantar örneklerine ait numunelerden hazırlanan ham özütte PFO enziminin varlığı karakterize edilmiş ve kinetik veriler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bilinen diğer organizmalardaki PFO'lar ile mukayese edilmiştir.

R. delica'dan hazırlanan ham özütteki PFO aktivitesini tespit etmek için yapılan doğal protein poliakrilamid jel elektroforezinde R_f değerleri sırası ile 0,34 (koyu) ve 0,64 (soluk) olan iki bandın varlığı gözlenmiştir (Şekil 7). Bu durum ham enzim özütünde PFO aktivitesi gösteren iki farklı izoenzimin veya substratın yükseltgenmesini sağlayacak farklı enzim aktivitelerinin varlığını ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda değişik organizmalardan elde edilen PFO'lar için iki ile dört arasında farklı izoenzimin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları; elma (Harel vd.,1965), muz (Oba vd.,1992), marul (Heimdal vd., 1994), kuşburnu (Sakiroglu vd., 1996), karayemiş (Colak vd., 2005), döngel (Dincer vd., 2002) (*Macrolepiota mastoidea*) mantarı (Kolcuoğlu vd., 2007) ve (*A. kestanbolensis* K1 ve K4^T) bakterileridir (Yildirim vd., 2004).

Hayvansal kaynaklardan elde edilen PFO'lar diğer fenolik bileşiklere nazaran tirozin ve *L*-3,4-dihidroksifenil alanine (*L*-DOPA) karşı daha spesifik olmalarına rağmen, mantarlar ve yüksek bitkilerden elde edilen enzimler çok farklı türde monofenolik ve *o*-difonelik bileşiği okside ederler (Lerch vd., 1995). Bu çalışmada denenen bütün difenolik ve monofenolik substratlar olan katekol, 4-metil katekol (4-MK), *L*-DOPA, 3-(3,4

dihidroksifenil)-propionik asit (DHPPA), trozin ve 3-(4-hidroksifenil)-propionik asidin (PHPPA) *R. delica*'dan elde edilen ham özütteki PFO enzimi tarafından yükseltildiği tespit edilmiştir. En yüksek aktiviteler, monofenolik substrat olarak PHPPA ve difenolik substrat olarak 4-MK varlığında gözlenmiştir (Tablo 4). Bazı kaynaklardan elde edilen PFO enziminin farklı substratlara karşı % bağıl aktiviteleri Tablo 8'de verilmiştir. Bu bilgiler değerlendirildiğinde *R. delica*'dan elde edilen PFO enziminin, bitkiler, mikroorganizmalar ve makromantarlar gibi birçok farklı kaynaktan elde edilen PFO'lara benzer olarak hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Jolivet vd., 1995; McMahon vd., 2007; Kolcuoglu vd., 2007).

Tablo 8. Farklı kaynaklardan elde edilen PFO'ların bazı substratlara karşı % bağıl aktiviteleri

Substratlar	% Bağıl Aktivite				
	Elma ¹	Şeftali ²	Üzüm ³	(<i>M. mastoidea</i>) ⁴	<i>Trametes sp.</i> ⁵
Tirozin	3	0	0	1,8	0
<i>p</i> -kresol	-	0	0	-	11,7
PHPPA	-	-	-	100	-
4-MK	181	103	74	100	128
Katekol	100	100	5,9	66,8	119
<i>L</i> -Dopa	-	23	5,4	13,5	29,8
Kateşin	54	539	21	-	100
Kafeik asit	-	7	100	-	150

(¹Zhou vd.,1993; ²Flurkey ve Jen,1980; ³Lee vd.,1983; ⁴Kolcuoglu vd., 2007; ⁵Matoda, 1999).

Enzimlerin optimum pH değerleri; ekstraksiyon metodu, sıcaklık, substratın yapısı, kullanılan tampon sistemi gibi birçok deneysel değişkenden etkilenir (Whitaker vd., 1994). *R. delica*'dan hazırlanan ham enzim özütündeki monofenolaz (PHPPA substratı varlığında) ve difenolaz (4-MK substratı varlığında) aktiviteleri için optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur (Şekil 8 ve 9). Ayrıca ham enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz aktivitesinin pH 8,0 civarında ikinci bir pik göstermesi özütte bulunabilecek izoenzimlerin varlığına atfedilebilir. Farklı organizmalardan elde edilen bazı PFO'lar için optimum pH

değerleri Tablo 9’da verilmiştir. Buna göre, *R. delica* monofenolaz ve difenolazı önceden bildirilen monofenolaz ve difenolazlarla pH optimumu açısından uygunluk göstermektedir.

Tablo 9. Farklı organizmalardan elde edilen PFO’lar için optimum pH değerleri

Enzim Kaynağı	Substrat	Optimum pH
Elma ¹	4-MK	3,5–4,5
Şeftali ²	4-MK	5
Üzüm ³	4-MK	3,5–4,5
Badem ⁴	4-MK	5
Avokado ⁵	4-Hidroksi anisol	5
Kuşburnu ⁶	Katekol	8,5
	<i>p</i> -kresol	5
Döngel ⁷	4-MK	5.5-7.5
	Epikatekin	5.5
<i>Terfezia claveryi</i> ⁸	Tirozin	5
<i>M. mastoidea</i> ⁹	4-MK	4
	PHPPA	6
<i>Trametes sp.</i> ¹⁰	Kateşin	5

(¹Marques vd., 1995; ²Fraignier vd., 1995; ³Valero vd., 1988; ⁴Fraignier vd., 1995; ⁵Espin vd., 1997; ⁶Sakiroglu vd., 1996; ⁷Dincer vd., 2002; ⁸Carmona-Garcia F. vd., 2001; ⁹Kolcuoglu vd., 2007; ¹⁰Matoda S., 1999)

R. delica mantar numunelerinden elde edilen ham enzim özütü farklı pH’larda 4 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldığında, PHPPA substratı varlığında enzim özütünün denenen bütün pH’larda aktivitesini büyük oranda koruduğu ve dolayısıyla enzim özütünün içerdiği monofenolaz aktivitesi açısından yüksek pH kararlılığına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 16). 4-MK substratı varlığında ise, enzim özütünün 24 saat sonunda optimum pH civarında (pH 5,0 ile 6,0) ve hafif bazik pH’larda (pH 8,0 ile 9,0) başlangıç aktivitesini büyük oranda koruduğu, pH 7,0 ve pH 3,0’de ise bu aktiviteyi yaklaşık % 50 oranında kaybettiği tespit edilmiştir. Genel olarak difenolaz aktivitesinin de 4 °C’de 24 saat inkübasyon sonunda çok ciddi oranlarda kaybolmadığı tespit edilmiştir (Şekil 17).

Sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen önemli bir başka faktördür. Düşük sıcaklıklarda reaksiyonlar, reaktantların kinetik enerjileri düşük olduğundan düşük hızlarla gerçekleşir (Lehninger vd., 1993). Ancak yüksek sıcaklıklarda enzimlerin üç boyutlu yapıları

bozulabilir ve enzimler denatüre olabilirler. Sıcaklıktaki değişim aynı zamanda reaksiyon ortamındaki çözülmüş oksijen miktarında da değişime neden olarak PFO aktivitesini etkiler (Whitaker, 1994). Yapılan çalışmalar sonucunda *R. delica*'dan elde edilen enzim özütünün sahip olduğu monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin her ikisi için optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 10 ve 11). Tespit edilen bu sıcaklık aralığı, makromantarlar veya bitki dokularından elde edilen enzimler için uygun değerlerdir. Ayrıca difenolaz aktivitesinin 40-50 °C arasında da yüksek değerde çıktığı gözlemlenmiştir. *R. delica* PFO'su literatürde rapor edilen bir çok sebze, meyve ve mantar PFO'su ile optimum sıcaklık açısından benzerlik göstermektedir (Heimdal vd., 1994; Yang vd., 2000; Colak vd., 2006; Kolcuoglu vd., 2007).

Enzim özütünün PHPPA substratı varlığında ve 60 dak sonunda 10–30 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktivitesini % 90 oranında koruduğu, 40 °C sıcaklıkta 60 dak sonunda başlangıç aktivitesini % 75 oranda kaybettiği ve ileri sıcaklıklarda ise başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir. 4-MK substratı varlığında ve 60 dak sonunda enzim özütünün 10–30 °C sıcaklık aralığında başlangıç aktivitesini % 90 oranında koruduğu, 40 - 50 °C sıcaklıklarda % 50 oranında kaybettiği, 60–70 °C sıcaklıklarda ise başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 18 ve 19). İnkübasyon sıcaklığı ve süresinin artması ile enzimin aktivitesini kademeli olarak kaybetmesi, sıcaklığın etkisi ile enzimin üç boyutlu yapısında negatif değişimlerin olmasıyla ilişkilendirilebilir (Duangmal vd., 1999; Jiang vd., 1999; Arslan vd., 1998).

Her bir substrat varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinden hesaplanan enzimin substrata ilgisinin bir göstergesi olan K_m (Şekil 14 ve 15) ve hesaplanan (V_{maks}/K_m) değerleri dikkate alındığında veya literatürle karşılaştırıldığında seçilen substratların monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için son derece uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, 4-MK gibi küçük moleköl ağırlıklı *o*-difenollerin difenolazlar için etkili substratlar oldukları da belirtilmektedir (Duangmal vd., 1999; Perez-Gilabert vd., 2000; Dincer vd., 2002; Yildirim vd., 2004; Kolcuoglu vd., 2007).

Mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında meydana gelen enzimatik esmerleşme, mantar endüstrisinde de ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bunu önlemek amacıyla en sık başvuru olan yol inhibitörlerin kullanımınıdır. Yakın zamana kadar bu amaçla inhibitör olarak SO_2 kullanılmış ancak insan sağlığına verdiği zararlardan dolayı tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar

alınmıştır (Eskin vd., 1971; Kim vd., 2000). Bu çalışmada birçok bitki PFO'su için inhibitör olarak denenilen sodyummetabisülfid, benzoik asid, sistein ve askorbik asid *R. delica*'dan hazırlanan ham özütteki PFO enzimi için de denenmiş ve her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 7). PHPPA substratı varlığında en iyi bağlanma ilgisi benzoik asit ve askorbik asitte gözlenmiştir. 4-MK substratı varlığında ise benzoik asit, askorbik asit ve sisteinin en iyi bağlanma ilgisine sahip oldukları gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada daha önceden PFO aktivitesi üzerine etkileri olduğu rapor edilen bazı metal iyonlarının (Yildirim vd., 2004; Kolcuoglu vd., 2007) *R. delica*'dan hazırlanan ham özütteki PFO enziminin monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir (Tablo 5 ve 6). Hg^{2+} iyonu monofenolaz aktivitesini inhibe ederken, diğer iyonların farklı oranlarda aktivasyona neden oldukları, Ca^{+2} iyonunun ise aktiviteyi etkilemediği gözlenmiştir. K^+ , Ca^{+2} ve Cu^{+2} iyonları difenolaz aktivitesi üzerinde bir etki göstermezken, diğer iyonlar değişik oranlarda inhibisyona neden olmuştur. 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 de kaynaklanabilir (Di Tusa vd., 2001).

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, bu mantarda PFO enziminin mevcudiyeti hem elektroforetik hem de spektrofotometrik olarak ortaya konulmuştur. Genel olarak elde edilen sonuçlar literatürlerdeki PFO'larla benzer değerlerde olup endüstriyel açıdan özellikle monofenolaz aktivitesinin pH kararlılığının 24 saat boyunca korunması ve difenolaz aktivitesinin ısıl kararlılığının 60 dak inkübasyon sonucu 50 °C'ye kadar % 60 oranında korunması dikkat çekici özelliklerdir.

5. ÖNERİLER

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. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir.

PFO enziminin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları gıdalarda görüntü, lezzet ve besinsel değerlerinin kaybına sebep olmakta ve ciddi anlamda ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Enzimatik esmerleşmenin derecesi aktif tirozinaz konsantrasyonuna, fenolik bileşiklere, oksijen varlığına, pH'ya ve dokuların sıcaklığı gibi şartlara bağlıdır. Günümüzde PFO enzimini inaktive etmek amacıyla güncel olarak kullanılan ticari yöntemler mevcuttur, ancak bu yöntemler de gıdalarda bazı istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Bu yüzden gıdalarda istenmeyen kararım reaksiyonlarının önlenmesi noktasında PFO enzimlerinin incelenmesi, yapı ve mekanizmalarının aydınlatılması günümüzde bir ihtiyaç olmuştur. Ayrıca PFO, sentez reaksiyonlarında, tıpta, atık suların temizlenmesi ve biyosensör tasarımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada *Russula delica*'dan hazırlanan ham özütte PFO enzimi hem monofenolaz hem de difenolaz aktivitesi açısından incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki değerlerle paralellik göstermekle beraber monofenolaz aktivitesinin pH kararlılığı ve difenolaz aktivitesinin ısıl kararlılığı dikkat çeken noktalar olarak ortaya çıkmıştır.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, ham özütte karakterize edilmiş olan PFO enziminin saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması şeklinde sıralanabilir. Bunun yanında, organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği de ayrıntılı bir şekilde ele alınabilir.

6. KAYNAKLAR

- Altunkaya, A. ve Gökmen, V., 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*), Food Chem., 107, 1173–1179.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, İ., 1998. Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.), J.Agr. Food Chem., 46,1239–1241.
- Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. ve Colak, A., 2008. Charecterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening, Food Chem., 106, 291–298.
- Aydemir, T., 2004. Partial purification and charecterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, Food Chem., 87, 59–67.
- Boztok, K., 1990. Mantar üretimi tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları, İzmir.
- Breene, W., M., 1990. Nutritional and medicinal value of specialty of mushrooms, J. Food Protect., 53
- Cil, M., Büyükbayram, A., E., Kıralp, S., Toppare, L. ve Yağcı, Y., 2007. Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix, Int. J. Biol. Macromol., 41, 49–55.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, F.A., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at an early stage of maturation, Food Chem., 90, 801–807.
- Colak, A., Sahin, E., Yildirim, M. ve Sesli, E., 2007. Polyphenol oxidase potentials of three wild edible mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon, Food Chem., 103, 1426–1433.
- Dawley, R., M. ve Flurkey, W., H., 1993. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexylresorcinol, a tyrosinase inhibitor, Phytochemistry, 33, 281–284.
- Dawley, R., M. ve Flurkey, W., H., 2003. Differentiation of tyrosinase and laccase using hexylresorcinol, a tyrosinase inhibitor, Phytochemistry, 33:281–284.
- Dincer, B., Colak, A., Aydın, N., Kadioğlu, A. ve Guner, S., 2002. Charecterizatiom of polyphenol oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L.Roseceae), Food Chem., 77, 1-7.

- 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.
- Duangmal, K. ve Owusu-Apenten, R., K., 1999. A Comparative study of polyphenol oxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*), Food Chem., 64, 351-359.
- Duran, N., Rosa, M., A., Annibale, A. ve Gianfreda, L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, Enzyme Microb. Tech., 31, 907-931.
- Erkel, İ., 1992. Dünyada ve Türkiye'de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, Bildiriler Kitabı, İstanbul, Cilt 1, 2-8
- Espin, J., C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Ca'novas, F., 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Anal. Biochem., 231, 237-246.
- Espin, J., C., Ochoa, M., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1997. Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase, Phytochemistry, 45, 667-670.
- Felton, G., W., 1996. Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses, Arch. Insect Biochem., 32, 107-130.
- Fenoll, L., G., Rodr'iguez-López, J., N., Varón, R., Garc'ia-Ruiz, P., A., Garc'ia-Cánovas, F. ve Tudela, J., 2002. Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and *L*-tyrosine methyl ester/*L*-dopa methyl ester, Int. J. Biochem. Cell B., 34, 1594-1607.
- Flurkey, W., H. ve Inlow, J., K., 2008. Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi, J. Inorg. Biochem., Yayında.
- Flurkey, W., H. ve Jen, J., J., 1980. Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors, J. Food Biochem., 4, 29-41.
- Fraignier, M., Marques, L., Fleuriet, A. ve Macheix, J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*, J. Agr. Food Chem., 43, 2375-2380.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview, J. Agr. Food Chem., 44, 631-653.
- Gillibert, P., M., Morte, A., Honrubia, M. ve Carmona-Garcia, F., 2001. Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: characterization and histochemical localization, Physiol. Plantarum, 113, 203-209.
- Goldbeck, J., H. ve Cammarata, K., V., 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme, Plant Physiol., 67, 977-984.

- Harel, E., Mayer, A., M. ve Shain, Y., 1965. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts, Phytochemistry, 4, 783-790.
- Haruta, M., Murata, M., Hiraide, A., Kadokura, H., Yamasaki, M. ve Sakuta, M., 1998. Cloning genomic DNA encoding for apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and apple, Biosci. Biotech. Bioch., 62, 358-362.
- Heimdal, H., Larsen, L., M. ve Poll, L., 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca saliva*), J. Agr. Food Chem., 42, 1428-1433.
- Hodge, J., E., Mills, F., D. ve Fisher, B., E., 1976. Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reactions, Cereal Chem., 17, 34-40.
- Jiang, Y., M., 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit, Food Chem., 66, 75-79.
- Jolivet, S., Voiland, A., Pellon, G. ve Arpin, N., 1995. Main factors involved in the browning of *Agaricus bisporus*, Mushroom Science, 14, 695-702.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H., J. ve Pellon, G., 1998. *Agaricus bisporus* browning : a review, Mycol. Res., 102.
- Kalac, P. ve Svoboda, L., 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms, Food Chem., 69, 273-281.
- Khan, A., A. ve Husain, Q., 2007. Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenol oxidase, Bioresource Technol., 98, 1012-1019.
- Kim, J., Marshall, M., R. ve Wei, C., 2000. Polyphenoloxidase. In *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, 271-315, Marcel Dekker, New York.
- Kim, J., Y., Sea, Y., S., Kim, J., E., Sung, S-K. ve Song, K., J., 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the fuji apple, Plant Sci., 161, 1145-1152.
- Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative charecterizaation of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), Food Chem., 101, 778-785.
- Kovacz, Z., Racz, L., Papp, L. ve Prokai, B., 1996. Trace element determination in cultivated mushrooms: an investigation of manganese, nickel and cadmium intake in cultivated mushrooms using ICP atomic emission, Microchem. J., 54, 444-451.

- Kränzlin, F., 2005. Fungi of Switzerland : a contribution to the knowledge of the fungal flora of Switzerland, Verlag Mykologia, Lucerne, Switzerland.
- Lee, C., Y., Smith, M., L. ve Pennesi, A., P., 1983. Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes, J. Sci. Food Agr., 34, 987-991.
- Lee, K., M. ve Park, I., 2005. Inhibition of potato polyphenol oxidase by Millard reaction products, Food Chem., 91, 57-61.
- Lee, P., M., Lee, K. ve Karim, M., I., A., 1991. Biochemical Studies of Cocoa Bean Polyphenol Oxidase, J.Sci.Food Agr., 55, 251-260.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, J. Am. Chem. Soc., 56, 658-661.
- Lehninger, A., L., Nelson, D., L. ve Cox, M., M., 1993. Principles of Biochemistry, Second Ed., Worth Publishers, New York,.
- Lerch, K., 1995. "Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure,"in C.Y. Lee ve J.R. Whitaker, eds., *Enzymatic Browning and Its Prevention*, ACS Symposium Series 600, Washington, D.C., 64-80.
- Lowry, O., H., Rosebrough, N., J., Farr, A., L. ve Randall, R., J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Luczaj, W. ve Skrzydlewska, E., 2005. Antioxidative properties of black tea, Prev. Med., 40, 910-918.
- Maki, H. ve Morohashi, Y., 2006. Development of polyphenol oxidase activity in the microplayer endosperm of tomato seeds, J. Plant Physiol., 163, 1-10.
- Manzi, P., Aguzzi, A. ve Pizzoferrato, L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy, Food Chem., 73, 321-325.
- Marques, L., Fleuriet, A. ve Macheix, J., 1995. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit, Plant Physiol. Bioch., 33, 193-200.
- Martinez, E. ve Duvnjak, Z., 2006. Enzymatic degradation of clorogenic acid using a polyphenol oxidase preparation from the white-rot fungus *Trametes versicolor* ATCC 42530, Process Biochem., 41, 1835-1841.
- Martinez, M. ve Whitaker, J., R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning, Trends Food Sci. Thec., 6, 195-200.
- Mason, H., S., 1956. Structures and functions of the phenolase complex, Nature, 177, 79-81.
- Matheis, G. ve Whitaker, J.,R., 1984. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products, J. Food Biochem., 8, 137-162.

- Matoda, S., 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Trametes* sp. MS39401, J. Biosci. Bioeng., 87, 137-143.
- Mattila, P., Outila, T., Piironen, V. ve Lamberg-Allardt, C., 1999. Bioavailability of vitamin D from edible mushrooms (*Chanterellus tubaeformis*) as measured with human bioassay, Am.J.Clin.Nutr., 69, 94-98.
- Mattila, P., Könkö, K., Euroola, M., Pihlava, J., M., Astola, J. ve Vahteristo, L., 2001. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms, J. Agr. Food Chem., 49, 2343-2348.
- Mayer, A., M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, Phytochemistry, 67, 2318-2331.
- Mcmahon, M., A., Doyle, E., M., Brooks, S. ve O'Connor, K., E., 2007. Biochemical characterization of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6, Enzyme Microb. Tech., 40, 1435-1441.
- Miles, P. ve Chang, S., T., 1997. Mushroom Biology, Concise Basics and Current Developments, World Scientific,.
- Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R. ve Tamir, S., 2003. Glabrene and soliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots, J. Agr. Food Chem., 51, 1201-1207.
- Nerya, O., Musa, R., Khatic, S., Tamir, S. ve Vaya, J., 2004. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers, Phytochemistry, 65, 1389-1395.
- Nerya, O., Ben-Arie, R., Luzzatto, T., Musa, R., Khativ, S. ve Vaya, J., 2006. Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors, Postharvest Biol. Tec., 39, 272-277.
- Oba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, A., M. ve Garcia, V., V., 1992. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isozymes in banana bud, Biosci. Biotech. Bioch., 56, 1027-1030.
- Penalver, M., J., Fenoll, L., G., Rodrigues, L., N., J., Garcia, R., P., A., Garcia, M., F., Varon, R., Garcia, C., F. ve Tudela, J., 2005. Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. J. Mol. Catal.B-Enzym., 33, 35-42.
- Quintas, M., Guimarães, C., Baylina, J., Brandão, T., R., S. ve Silva, C., L., M., 2007. Multiresponse modelling of the caramelisation reaction, Innov. Food Sci. Emerg., 8, 306-315.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W., H., Kuglin, J. ve Dawley, R., 1994. Tyrosinase, Laccase and Peroxidase in mushroom, J. Food Sci., 59, 824-827.
- Riley, P., A., 1997. Molecules in focus melanin, Int. J. Biochem. Cell B., 29, 1235-1239.

- Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J. ve Garcia-Carmona, F., 1989. Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase, Phytochemistry, 28, 1321-1325.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. ve Garcia-Carmona, F., 1993. Cresolase activity of potato tuber partially purified in a two-phase partition system, J. Agr. Food Chem., 41, 1225-1228.
- Seo, S., Y., Sharma, V., K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects, J. Agr. Food Chem., 51, 2837-2853.
- Sesli, E., Tuzen, M. ve Soylak, M., 2008. Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from black sea region, Turkey, J. Hazard. Mater., 160, 462-467.
- Sheptovitsky, Y., K. ve Brudwig, G., W., 1996. Isolation and charecterization of spinach photosystem II membran associated catalase and polyphenol oxidase, Biochemistry, 35, 16255-16263.
- Sherman, T., D., Vaughn, K., C. ve Duke, S., O., 1991. A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase, Phytochemistry, 30, 2499–2506.
- Song, K., K., Lin, J., F. ve Chen, X., İ., 2005. Inhibitory effects of 4-isopropylsalicylaldehyde on mushroom tyrosinase. Food Chem., Basımda.
- Sakiroglu, H., Küfrevioğlu, O., İ., Kocaçaliskan, İ., Oktay, M. ve Onganer, Y., 1996. Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumlis* Rechst.) polyphenol oxidase, J. Agr. Food Chem., 44, 2982-2986.
- Thurston, C., F., 1994. The structure and function of fungal laccases, Microbiology, 140, 19-26.
- Toth, B., 1995. Mushroom toxins and cancer (review), Int. J. Oncol., 6-137.
- Ul-Haq, İ. ve Ali, S., 2002. Microbiological transformation of L-Tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl L-Alanine(L-Dopa) by a mutant strains of *Aspegillus oryzae* UV-7, Curr. Microbiol., 45, 88-93.
- URL-1 http://www.ipet.gr/mushroom/Russula_delica.html, 14.01.2009.
- URL-2 <http://www.gidabilimi.com/makaleler/34-makaleler/556-gidalarda-kimyasal-kalite-degisimleri>, 16.12.2008.
- URL-3 <http://www.food-info.net/tr/colour/maillard.htm>, 16.12.2008.
- Valero, E., Varon, R. ve Garcia-Carmona, F., 1988. Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes, J. Food Sci., 53, 1482-1485.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, Crit.Rev.Food sci., 15, 49-127.

- van Gelder, C., W., G., Flurkey, W., H. ve Wichers, H., J., 1997. Sequence structural features of plant and fungal tyrosinase, Phytochemistry, 53, 285-292.
- Wang, Q., Qui, L., Chen, X., Song, K., Shi, Y. ve Chen, Q-X., 2007. Inhibitory effects of phloridzin dihydrate on the activity of Mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase, Bioorgan. Med. Chem., 15, 1568-1571.
- Wesche-Ebeling, P. ve Montgomery, M., W., 1990. Strawberry polyphenoloxidase: Extraction and partial characterization, J. Food Sci., 55, 1320-1324.
- Whitaker, J., R., 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second Ed. Marcel Dekker, New York.
- Yang, C-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M., D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp, J. Agr. Food Chem., 48, 2732-2735.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. ve Beldüz, A., O., 2005. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* strains K1 and K4^T, World J. Microb. Biot., 21, 501-507.
- Yoruk, R. ve Marshall, R., M., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review, J. Food Biochem., 27, 361-422.
- Zhang, X. ve Flurkey, W.H., 1997. Phenoloxidase in portabella mushroom, J. Food Sci., 62, 97-100.
- Zhou, H., Liu, L., Yin, K., Liu, S. ve Li, G., 2006. Electrochemical investigation on the catalytic ability of tyrosinase with the effect of nano titanium dioxide, Electrochem. Commun., 8, 1168-1172.
- Zhou, P., Smith, N., L. ve Lee, C., Y., 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase, J. Agr. Food Chem., 41, 532-536.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Maçka'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Maçka'da tamamladı. 1998–2002 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2003 yılı temmuz ayında vatani görevini tamamlayarak terhis oldu. 2005 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. İyi derecede İngilizce bilmektedir.