

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**BOLETUS ERYTHROPUS MANTARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SENTETİK  
KİMYADA KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Kimyager Arzu ÖZEL**

**NİSAN 2008**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**BOLETUS ERYTHROPUS MANTARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SENTETİK  
KİMYADA KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Kimyager Arzu ÖZEL**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.03.2008  
Tezin Savunma Tarihi : 14.04.2008**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ  
Jüri Üyesi : Doç Dr. Kemal SANCAK  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Oktay ARSLAN  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Enstitü Müdürü V.: Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

Yöremizde yetişen, yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Boletus erythropus*'ta bulunan Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve sentetik kimyada etkinliğinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapıp, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarım boyunca desteğini, hoşgörüsünü ve bilgisini benden esirgemeyen danışman hocam, sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Doktoraya başlama heyecanımı ilk onunla tattığım, bilgeliğini ve hoşgörüsünü her zaman hatırlayacağım değerli hocam, merhum Prof. Dr. Saadettin GÜNER'i saygı ve rahmetle anarım.

Çalışmalarım esnasında kullandığım mantarların toplanmasını ve tanımlanmasını sağlayan hocam, sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye, çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmem için bana laboratuvarlarını kullanma imkanı verip, yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocam, sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a ve öğrencilerine, ayrıca Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi idarecilerine, şükranlarımı sunarım.

Gerek çalışmalarım esnasında gerek özel yaşantımda, desteklerini ve dostluklarını her zaman hissettiren sevgili arkadaşlarım, Arş.Gör. Melek ÇOL ve Arş. Gör. Özlem FAİZ'e ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve birtanem, sevgili eşim Dr. Emre ÖZEL'e sonsuz teşekkür eder, hazırlamış olduğum bu tezi, doğacak olan biricik yavrum, "UĞUR"uma ithaf ederim.

Arzu ÖZEL  
Trabzon 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi .....	3
1.2.1. <i>Boletus erythropus</i> Makromantarının Morfolojik Özellikleri.....	5
1.2.2. Makromantarların Bazı Kullanım Alanları .....	6
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları .....	7
1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları.....	7
1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları.....	8
1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Tabiattaki Dağılımı .....	11
1.5. Polifenol Oksidaz'ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları.....	12
1.6. Polifenol Oksidaz'ın Substratları .....	18
1.7. Polifenol Oksidaz'ın İnhibisyonu.....	21
1.8. Polifenol Oksidaz'ın Aktivitesinin Belirlenmesi .....	23
1.9. Polifenol Oksidaz'ın Bazı Kaynaklardan Saflaştırılması.....	25
1.10. Polifenol Oksidaz'ın Bazı Organizmalarda Bulunuşu .....	28
1.11. Polifenol Oksidaz'ın Doğada, Endüstride, Tıpta ve Sentez Reaksiyonlarındaki Rolü .....	30
1.12. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	32
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	35
2.1. Materyal .....	35
2.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	35
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	35

2.1.3.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	36
2.2.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme.....	40
2.3.	Afinite Jelinin Hazırlanması.....	41
2.3.1.	Sepharose-4B'nin CNBr ile Aktifleştirilmesi ve <i>L</i> -Tirozin Bağlanması .....	41
2.3.2.	<i>L</i> -Tirosinle Modifiye Edilen Sepharose-4B'ye <i>p</i> -aminobenzoik Asidin Bağlanması .....	42
2.4.	Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	43
2.5.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi .....	44
2.6.	Protein Tayini .....	44
2.7.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	45
2.7.1.	Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyaması.....	46
2.8.	SDS Jel Elektrofrezisi .....	46
2.9.	Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar .....	47
2.9.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	48
2.9.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	48
2.9.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	48
2.9.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	48
2.9.5.	Hill Eğrisi .....	49
2.9.6.	Polifenol Oksidaz'ın pH Kararlılığı .....	49
2.9.7.	Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı .....	49
2.9.8.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi .....	51
2.9.9.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	51
2.10.	Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkınlığının İncelenmesi .....	51
3.	BULGULAR .....	53
3.1.	Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	53
3.2.	Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	54
3.2.1.	Polifenol Oksidazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu .....	54
3.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu .....	56
3.2.2.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	56
3.2.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	57
3.2.2.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	58
3.2.2.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	59
3.2.2.5.	Hill Eğrisi .....	61

3.2.2.6. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı .....	61
3.2.2.7. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı .....	62
3.2.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi .....	66
3.2.2.9. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi .....	69
3.3. Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkınlığının İncelenmesi .....	70
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	72
5. ÖNERİLER .....	81
6. KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ	

## ÖZET

Polifenol oksidazlar (PFO), bakır içeren metaloenzimler olup oksijen varlığında, monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu ve *o*-difenollerin de *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler.

Bu çalışmada, yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Boletus erythropus*'tan PFO, Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Saf enzim, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant halinde belirlendi. Optimum PFO aktivitesi, pH'ın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, 4-metil katekol substratı kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı, 4-metil katekol varlığında, 8.0 olarak bulundu. Enzimin optimum sıcaklığı ise, 20 °C olarak belirlendi. pH 3.0-9.0 aralığında, 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra *B. erythropus* PFO'sunun, bu pH aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Enzim, pH 3.0-9.0 aralığında, 4 °C'de 120 saat inkübe edildikten sonra, aktivitesini % 60'ın üzerinde korudu. 4 saatlik inkübasyondan sonra, enzimin 10-30 °C aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. 4-metil katekol varlığında, *B. erythropus* PFO'sunun  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri, Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla, sırasıyla, 2.8 mM ve 1428.6 U/mg protein olarak belirlendi. PFO tarafından katalizlenen 4-metil katekolün oksidasyonu için elde edilen  $I_{50}$  değerlerine göre, özellikle askorbik asit ve sodyum metabisülfid başta olmak üzere, askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum azid ve benzoik asitin tamamı, *B. erythropus* PFO'sunu inhibe etti.

*B. erythropus* PFO'sunun, toluen, diklorometan ve dikloroetan gibi organik çözücülerde, kateşin substratı kullanılması durumunda, etkili bir biyokatalizör olabileceği belirlendi.

Bütün bu veriler, *B. erythropus*'ta mevcut bulunan difenolaz aktivitesinin diğer bitki polifenol oksidazlarıyla benzer özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Boletus erythropus*, Polifenol Oksidaz, Afinite Kromatografisi, Karakterizasyon, İnhibisyon

## SUMMARY

### **Purification, Characterization of Polyphenol Oxidase from *Boletus erythropus* and Investigation of its Catalytic Efficiency on Synthetic Chemistry**

Polyphenol oxidases (PPO) are copper-containing metalloenzymes catalyzing hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinons in the presence of oxygen.

In this study, PPO, was isolated from *Boletus erythropus* using a Sepharose-4-B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity column. The purified enzyme was migrated as a single band on native and SDS-poliacrylamide gel electrophoresis. Optimum PPO activity as a function of pH and temperature was determined using 4-methyl catechol as substrate. The optimum pH of the enzyme was found 8.0 in the presence of 4-methylcatechol. The optimum temperature was determined at 20 °C. The *B. erythropus* PPO was extremely stable at the ranged of pH 3.0-9.0 after 24 h of incubation at 4 °C at that pH. The enzyme retained over 60 % of its original PPO activity at the ranged of pH 3.0-9.0 after 120 h of incubation at 4 °C at that pH. The enzyme was extremely stable at the ranged of 10-30 °C after 4 h incubation. The  $K_m$  and  $V_{maks}$  values of *B. erythropus* PPO were determined 2.8 mM and 1428.6 U/mg protein by Lineweaver-Burk curve, respectively. According to  $I_{50}$  data of the 4-methylcatechol oxidation catalyzed by PPO, sodium metabisulfite, ascorbic acid, sodium azide and benzoic acid, all inhibited *B. erythropus* PPO, especially sodium metabisulfite and ascorbic acid.

It was investigated that *B. erythropus* PPO is an effectively biocatalysis using catechin as substrate in the organic solvents of toluene, dichloromethane and dicholoroethane.

All the data support the presence of a active diphenolase in *B. erythropus* having similar properties to other plant polyphenoloxidases.

**Key Words:** *Boletus erythropus*, Polyphenol Oxidase, Affinity Chromatography, Characterization, Inhibition



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri .....	4
Şekil 2. <i>Boletus erythropus</i> 'un früktofikasyon organları .....	5
Şekil 3. Melanin pigmentlerin oluşum mekanizması (Laurila vd., 1998).....	9
Şekil 4. Kinonların serbest amino asitlerle polimerizasyonu (Labuza vd., 1992).....	10
Şekil 5. Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi) .....	12
Şekil 6. <i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi).....	12
Şekil 7. PFO'nun bakır merkezleri .....	13
Şekil 8. <i>Panulirus interruptus</i> hemosiyaninin <i>deoksi</i> -yapısı. Bakır atomları mavi; histidinler yeşil; Phe351 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000).....	14
Şekil 9. <i>Octopus</i> hemosiyaninin <i>oksi</i> -formunun yapısı. Açık mavi: tirosin substratı; histidin yeşil; sistein sarı; bakır mavi; oksijen kırmızı; Leu2689 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000).....	14
Şekil 10. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003) .....	15
Şekil 11. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Q: <i>o</i> -kinon) (Siegbahn, 2003).....	16
Şekil 12. PFO için önerilen monofenolaz ve difenolaz mekanizmaları .....	17
Şekil 13. Polifenol oksidazın kromojenik nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri .....	24
Şekil 14. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları .....	43
Şekil 15. Afinite kromatografisi ile <i>Boletus erythropus</i> 'tan PFO'nun saflaştırılması.....	53
Şekil 16. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi .....	55
Şekil 17. SDS poliakrilamid jel elektroforezi.....	56
Şekil 18. <i>B. erythropus</i> 'tan saflaştırılan PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	57
Şekil 19. <i>B. erythropus</i> 'tan saflaştırılan PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi .....	58
Şekil 20. PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi .....	59
Şekil 21. 4-metilkatekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi .....	60
Şekil 22. 4-metilkatekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 23. 4-metilkatekol varlığında elde edilen Hill eğrisi .....	61
Şekil 24. <i>B. erythropus</i> PFO'sunun pH kararlılığı .....	62
Şekil 25. PFO'nun 4 saat sonunda ısıl kararlılık eğrisi .....	63

Şekil 26.	<i>B. erythropus</i> 'tan saflaştırılan PFO'nun ısı kararlılığının zamanla değişimi...	64
Şekil 27.	Enzimin farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerinden yararlanarak aktivasyon enerjisinin belirlenmesi .....	65
Şekil 28.	PFO'nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.....	67
Şekil 29.	PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi .....	67
Şekil 30.	PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi .....	68
Şekil 31.	PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi .....	68
Şekil 32.	Toluen varlığında kateşinin (□-□) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin (◆-◆) spektrofotometrik tarama grafiği .....	70
Şekil 33.	Diklorometan varlığında kateşinin (□-□) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin (◆-◆) spektrofotometrik tarama grafiği .....	71
Şekil 34.	Dikloroetan varlığında kateşinin (□-□) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin (◆-◆) spektrofotometrik tarama grafiği .....	71

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar .....	35
Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler .....	35
Tablo 3. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları .....	36
Tablo 4. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri .....	45
Tablo 5. SDS jel elektroforezinin bileşenleri .....	47
Tablo 6. PFO'nun <i>B. erythropus</i> 'tan saflaştırılması .....	54
Tablo 7. PFO'nun katalizlediği reaksiyon için hesaplanan termodinamik değerler .....	66
Tablo 8. <i>B. erythropus</i> 'dan saflaştırılan PFO inhibitörlerine ait $I_{50}$ değerleri .....	69
Tablo 9. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi .....	69

## SEMBOLLER DİZİNİ

BSA	:	Bovin Serum Albumin
DHPPA	:	3-(3,4-dihidroksifenil)propanoik asit
DMF	:	Dimetil foramid
DOPA	:	3,4-dihidroksifenilalanin
EC	:	Enzim kod numarası
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
EU	:	Enzim Ünitesi
$H$	:	Planck sabiti ( $6.6261 \times 10^{-34} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$ )
IUB	:	Uluslararası Biyokimya Derneği
$k$	:	Hız sabiti
$K$	:	Boltzmann sabiti ( $1.3806 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$ )
kDa	:	Kilodalton
MBTH	:	3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PFO	:	Polifenol oksidaz
PMSF	:	Fenilmetilsülfonilflorür
$R$	:	İdeal gaz sabiti
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
$T$	:	Sıcaklık (K)
Tris	:	Tris(hidroksimetil)amino metan
$E_a$	:	Aktivasyon enerjisi
$K_m$	:	Michaelis-Menten sabiti
$V_{maks}$	:	Maksimum hız
$\Delta G^\#$	:	Serbest enerji
$\Delta H^\#$	:	Entalpi değişimi
$\Delta o$	:	Isıtma işleminden önceki aktivite
$\Delta S^\#$	:	Entropi değişimi
$\Delta t$	:	Kalan aktivite

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Besinlerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucunda, sebze veya meyve dokularında, sarıdan kahverengi ve siyaha kadar gelişebilen renk değişimleri meydana gelir. Esmerleşme veya kararma olarak bilinen bu renk değişimleri, bitkilerde ve diğer memelilerde meydana gelen en yaygın oksidasyon reaksiyonlarından biridir. Esmerleşme, genellikle fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonu ve takiben de enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonlarıyla, hızlı ve kolay bir şekilde polimerleşerek, koyu renkli ve suda az çözünen pigmentlerin oluşturulduğu polimerleşme işlemleriyle sonuçlanan bir olaydır (Laurila vd., 1998). Enzimatik esmerleşmeden sorumlu tutulan polifenol oksidaz enzimi (PFO), sebze ve meyvelerde fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonunu katalizler.

Tüketicinin yiyecek seçimi yaparken düşündüğü dört etken, yiyeceğin görünüşü, tadı, sertliği veya yumuşaklığı ve besinsel değeridir. Görünüş, özellikle renk bakımından tüketiciye etki eder ve besin kalitesini değerlendirmede, tüketicinin öncelikli olarak önemsendiği özelliklerden biridir. Besinlerin rengi, klorofiller, karotenoidler ve antosiyaninler gibi doğal olarak oluşan pigmentlerden kaynaklanabileceği gibi, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu oluşan pigmentlerden de kaynaklanabilir (Marshall vd., 2000).

Besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi esnasında, esmerleşme reaksiyonları sonucu ortaya çıkan renk değişimleri, çoğu zaman istenilen seviyede durdurulamamaktadır. Bunun sonucunda, besinlerin fiziksel görünüşlerinde ve besinsel değerlerinde değişimler meydana gelmektedir. Bu da, besinin hem ekonomik ve besinsel değerini kaybetmesine hem de raf ömrünün azalmasına sebep olarak, ciddi problemler ortaya çıkarmaktadır (Whitaker ve Lee, 1995).

Enzimatik esmerleşmenin tümü, bitkinin türüne göre farklılık gösterir. Bitkilerde enzimatik esmerleşme, aktif PFO konsantrasyonuna, pH'ya, sıcaklığa ve dokularda mevcut bulunan oksijene bağlıdır. Bunlardan birinin ortadan kaldırılmasıyla bu reaksiyonlar durdurulabilir veya azaltılabilir.

Besinlerde esmerleşme denildiği zaman, genellikle besinin üretiminden oluşum sürecine kadar, esmerleşmenin zararlı etkileri belirtilir. Oysa ki, bazı enzimatik esmerleşme reaksiyonları, besin için çok faydalıdır. Çay, kahve ve kakao, birçok ülke için oldukça önemli ürünlerdir (Ensminger vd., 1995). Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi, özellikle fermentasyon ve kuruma döneminde enzimatik esmerleşmeye bağlıdır. Ayrıca, üzüm, erik, hurma ve incir gibi meyvelerin kurutulmasıyla, karakteristik sarı veya kahverengini almaları da enzimatik esmerleşmenin bir sonucudur.

Polifenol oksidazların, böcek ve mikroorganizmaların bitkilere saldırmasını ve çürük oluşumunu önlemede anahtar fizyolojik rol oynadığı düşünülür. Meyve ve sebzeler olgunlaştıkları zaman, onların fenolik bileşenlerinde meydana gelen azalmadan dolayı, hastalıklara karşı hassasiyetleri artar. PFO, fenolik bileşiklerden kinonların oluşumunu katalizler ve oluşan kinonlar, polimerizasyon reaksiyonlarıyla polimerleşirler. Bu polimerleşme, antibakteriyal ve antifungal aktivite gösteren melaninlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Oluşan bu melaninler, aynı zamanda sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına yardımcı olur (Marshall vd., 2000).

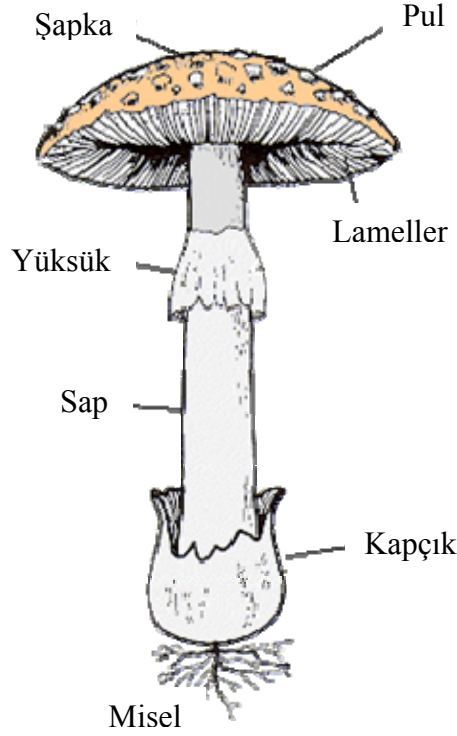
Enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin, antibakteriyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olmaları, araştırmacıların enzimatik esmerleşmeye büyük bir ilgi duymasına neden olmuştur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için, besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılarından tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Besinlerde aynı anda birden fazla esmerleşme işleminin meydana gelmesi mümkündür. Bu nedenle, çeşitli bitkilerdeki esmerleşme olaylarının ortaya konulması, etkilerinin anlaşılması ve çözümler bulunması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından, oldukça önemlidir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en geçerli yöntem, PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren, uygun yeni teknolojilerle birlikte, meyve ve sebzelerin kişi başına düşen tüketimindeki artış, birçok ülke için ekonomik yararlar sağlayacaktır (Labuza, 1992).

## 1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

Mantarlar çok eski zamandan beri bilinmekte olup, çok çeşitli alanlarda insanlığa faydalı olmuşlardır. Fakat mantarların hakiki yapıları ve büyüme şekilleri hakkındaki bilgiler, ancak 17. asırda mikroskopun keşfiyle elde edilmeye başlanmıştır.

Mantarlar, hücre çeperlerine sahip olmaları ve hareketsiz olmaları ile hayvanlardan, daha büyük, çok şekilli ve hakiki çekirdeğe sahip olmaları ile bakterilerden, fotosentetik pigmentlerinin bulunmamasıyla bitki, alg ve mavi-yeşil alglerden (Cyanobacteria) ayrılır. Genellikle mantarların vejetatif yapıları silindir şeklinde tüpsü iplikçiklerden oluşur. Bu tüpsü iplikçiklerin her birine “hif” denir. Hiflerin bir araya gelerek oluşturdukları vejetatif yapıya “tallus” denir. Tallusu oluşturan hif topluluğuna ise “misel” denir (Özkaragöz, 1978). Hifler uç kısımlarından gelişir. Mantarlarda hücre çeperi genellikle kitin, bazı mantarlarda ise selüloz yapıdadır. Birçok mantarda çeper yapısına kitin veya selülozun yanı sıra bazı ara maddelerde katılır. Bu ara maddeler mantarın türüne ve hifin yapısına bağlı olarak değişir. Çeper ara maddeleri ise lignin, kallos ve diğer bazı organik maddelerden oluşur (Baydar, 1989). Hücre çeperinin bileşimi, hücrenin yaşına ve çevre koşullarına, sıcaklığa, ortamın pH’sına göre de farklılık gösterir. Hücrenin içi protoplazma ile doludur. Renksiz ve saydam olan sitoplazma, lipidik granüller ve çubuk şeklinde oluşumlar içerir. Vakuoller hücrenin hem gaz alışverişini düzenler, hem de sitoplazmanın atıklarını barındırır.

Şekil 1’de olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri görülmektedir. Mantarların toprak altı kısmını miseller, toprak üstü kısmını ise şapka ve sap kısmı oluşturur. Toprak altı kısmını oluşturan miseller, bitkilerdeki kökler gibi, ortamdan su ve besin maddelerini alarak başka noktalara gönderilmesini sağlarlar. Şapka, altında bulunan, spor üreten lamelleri özellikle yağmurdan ve diğer etkilerden korur. Şapkanın üzerinde büyüyen hif, önce radyal olarak yukarı doğru, daha sonra aşağı doğru yayılır. Şapkanın genişlemesi sonucunda, şapkanın kenarları sap kısmından ayrılır ve daha sonra şapka yüzeyi, özelleşmiş yapılar ve pigmentler geliştirebilir (URL-1, 2005).



Şekil 1. Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri

Sap, yukarı doğru yükseltmiş olduğu şapkayı topraktan korur ve sapın yükseltmiş olduğu şapkada bulunan sporlar böylece rüzgarla birlikte yayılabilir. Sap kısmı, uzun ve silindirik veya kısa, eğri ve dayanıklı olabilir. Bu özellikler her cins için genelde karakteristiktir (URL-1, 2005).

Lameller, gençken pembe, daha sonra ise üzerinde taşıdığı sporların olgunlaşarak renk değiştirmesi nedeniyle koyu kahverengi olup, ince ve düşey levhalar şeklinde ve sapın şapkayla birleştiği noktadan, sıra sıra çıkarak yayılırlar. Lamellerin yüzeyi, himenyum olarak da bilinen, spor üreten bir tabaka ile kaplanmıştır. Lameller üzerinde bulunan basidiosporlar olgunluğa ulaşınca, doğaya yayılırlar. Bu sporlar, uygun bir ortam bulduğunda, çimlenerek mantarı oluşturmaya başlarlar. Olgunlaşma ile lameller, yoğun bir şekilde sıklaşarak geniş yer tutarlar. Mantarlar, lamellerin sap kısmına bağlanma şekillerine bakılarak daha iyi tanımlanabilir (URL-1, 2005).

Kapçık, olgunlaşmamış meyve veren kısmı sarar. Fakat, genişlemeyle birlikte parçalanır, şapka pulları ve sap kısmının dibinde fincan şeklinde bir kısım oluşur. Yüksük, şapka uçlarını sap kısmına bağlayarak, olgunlaşmamış solungaçları örter. Mantarın büyümesiyle bu örtü bozularak sap halkası şeklini alır (URL-1, 2005).



### 1.2.1. *Boletus erythropus* Makromantarının Morfolojik Özellikleri

Yenilebilir, şapkalı bir mantar olan *Boletus erythropus* Pers., mantarlar aleminin Basidiomycetes sınıfı, Boletales takımının Boletaceae ailesine aittir. Yaz aylarının sonlarında ve sonbahar döneminde yetişir. Kozalaklı ağaçların ve kışın yapraklarını döken ağaçların altlarında, kireçsiz, asidik veya asidik olmayan toprakta oluşur. Gençken ince tüylü ve yarım küresel şeklinde olan şapkası, ilerleyen dönemlerde gittikçe daha konvesks, düz, pürüzsüz ve parlak olur. Olgunlaşma döneminde şapkasının genişliği 5-20 cm aralığında değişebilir ve rengi, kırmızimsı, koyu çikolata kahvesi, soluk kahve veya bakır-bronz renkli olabilir. Şapkanın üst yüzeyi sarı renklidir. Yaralanma veya kesme sonucu rengi hızla kararır. Bu mantarın sap kısmı, küçük, kırmızı beneklerle kaplıdır. Sap uzunluğu 5-15 cm ve genişliği 2-4 cm aralığında değişmekte olup, silindirik şeklinde ve parlak sarı renklidir. Pişmiş hali yenilebilir. Ancak, pişmemiş yenmesi durumunda bazı mide bozuklukları yapabilir ( Breitenbach ve Kranzlin, 1991).



Şekil 2. *Boletus erythropus*'un früktofikasyon organları

### 1.2.2. Makromantarların Bazı Kullanım Alanları

Mantarların önemi gün geçtikçe artmaktadır. Çünkü, gerekli bileşikleri içermesi ve yan etkilerden uzak olması nedeniyle, geleneksel bir ilaç olarak çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilmesi, ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Araştırmalar, fungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici olarak kullanmaları, araştırmacıların ilgisini, mantarların tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymaya yönlendirmiştir. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda, diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak kullanılmışlardır (Blackwell, 1988).

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

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

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

Mantar bileşiklerinin insanın bağışıklık sistemini uyararak kanserlere karşı etkili olduğu günümüzde bilinen bir gerçektir. Antikanser mantarların bir çoğu aynı zamanda kolesterolü azaltan bileşiklere sahip olduğundan kardiyovasküler hastalıkların kontrolünde kullanılırlar (Sesli, 1994; Colak vd., 2007).

Şapkalı mantarların kullanım alanlarından biri de kağıt endüstrisidir. Kağıt hamuru elde etme yöntemlerinin hepsinde ortak amaç, hammadde içinde bulunan lifsel hücreleri bir arada tutan ve kağıtta istenmeyen bir renk oluşumuna neden olan ligninin pratik ve ucuz bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Kompleks bir yapıya sahip olan lignin, yüksek sıcaklık ve basınçla birlikte yeterli miktarda değişik kimyasal maddelerin kullanımı ile ayrıştırılabilir. Bu işlem, aşırı enerji ve kimyasal madde kaybına ve elde edilen kağıt hamurunun renginin bozulmasına neden olur. Kağıt hamurları ancak, ağartma adı verilen diğer bir kimyasal işlemle kaliteli hale getirilebilir. Biyobozunma işlemleri ile, hem enerji ve kimyasal madde tüketiminden tasarruf edilmiş, hem de çevre kirliliği azaltılarak kaliteli kağıt hamuru üretimi sağlanmış olur. Yapılan çalışmalar, *Lentinus edodes* (Leatham, 1985) ve *Pleurotus ostreatus*'un (Bostancı ve Yalınkılınç, 1989) lignini parçalayarak, biyobozunma işlemlerinde başarıyla kullanılabileceklerini göstermiştir.

### 1.3. Esmerleşme Reaksiyonları

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ya da çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeleri sonucunda meydana gelen ve sarıdan kahverengi veya siyaha kadar olan bazı renk değişimleri, esmerleşme olarak bilinir. Esmerleşme reaksiyonları iki farklı şekilde ortaya çıkabilir:

- ✓ Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları
- ✓ Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları

#### 1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Besinlerde gerçekleşen ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları genelde Maillard reaksiyonları olarak bilinir (Hodge, 1953). Maillard reaksiyonları, ilk kez amino asitlerle indirgen şekerler arasında gerçekleşen bir işlem olarak tanımlanmıştır. Fakat günümüzde, diğer birçok türden karbohidrat ve amino grubu içeren bileşikler için de kullanılmaktadır. Şeker kaynakları, dekstroz, fruktoz, sukroz, nişasta ve maltodekstrin olabilmektedir (Lee ve Nagy, 1988; Mauron, 1981).

Maillard reaksiyonlarının ilk aşamasında şeker-amin kondenzasyonu ve amadori düzenlenmesiyle bir Schiff bazı oluşur. İkinci aşamada ise, şeker dehidrasyonu ile

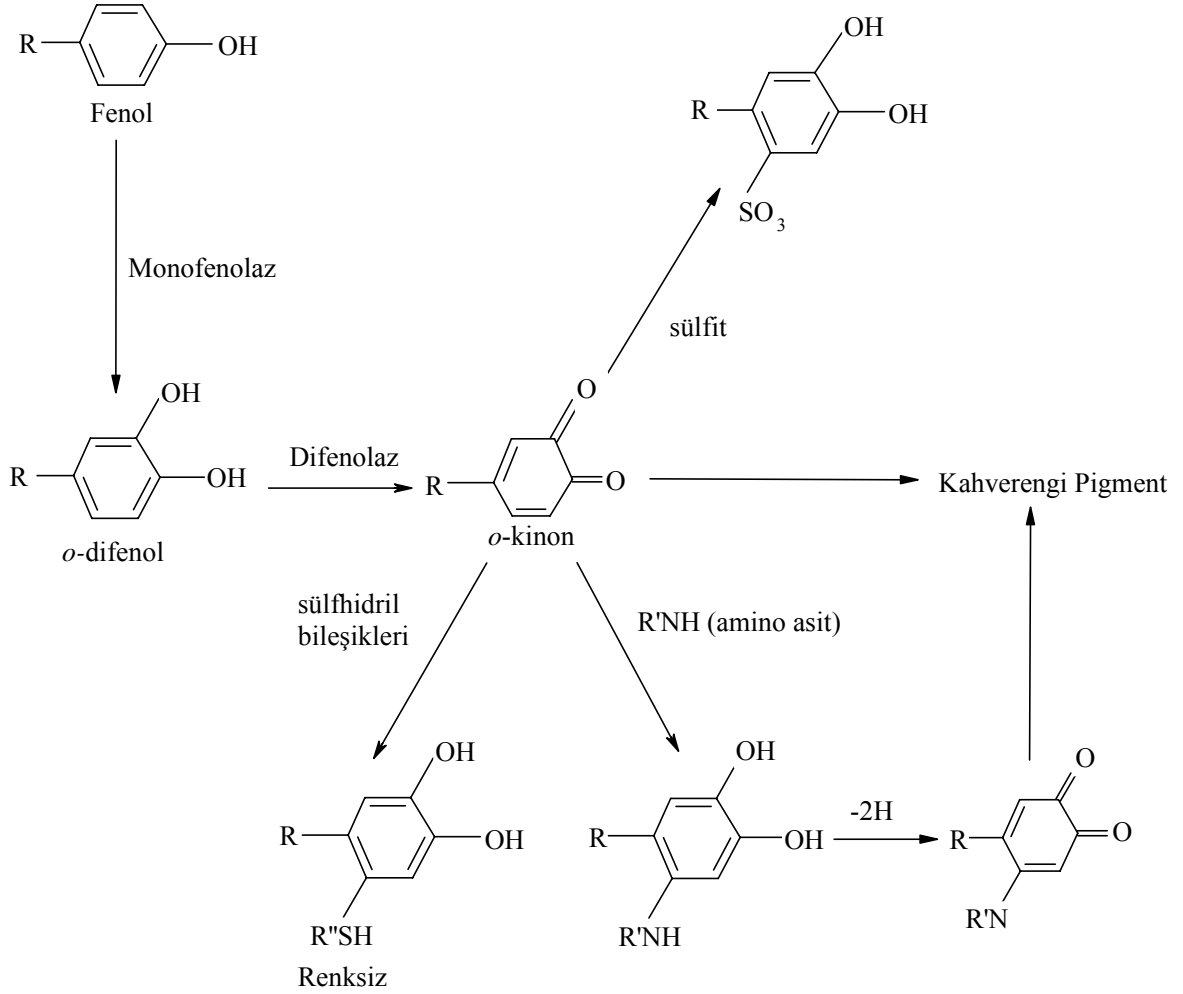
fermentasyonu ve amino asit parçalanması gerçekleşir. Bu aşamada, ketozaminin amino grubunun serbest hidrojeni bir diketozamin oluşturmak üzere ikinci bir aldoz molekülüyle reaksiyona girer. Bu adımda gerçekleşen amino asitlerin Strecker düzenlenmesinde bir schiff bazı oluşur. Oluşan bu schiff bazı kolayca hidrolizlenir ve bir aldehid oluşur. Oluşturulan bu bileşikler daha sonra melanoid üretimine katkıda bulunur. Üçüncü aşamada heterohalkalı azot içeren bileşiklerin üretimi söz konusudur. Gerçekte esmerleşme bu adımda olur. Melanoidlerin oluşumu, ileri Maillard reaksiyonları esnasında oluşan oldukça reaktif ara ürünlerin polimerizasyonu ile sonuçlanır (Mauron, 1981).

### **1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları**

Esmerleşme reaksiyonları içinde en yaygın olarak rastlanılan enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Bitkilerde enzimatik esmerleşme reaksiyonları iki şekilde ortaya çıkabilir (Friedman, 1996; Friedman, 1997). Bunlardan biri, sebze ve meyvelerde bulunan fenol bileşiklerinin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan kinonoid bileşikler, daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlarla kahverengi melanin pigmentlerine polimerleşirler (Şekil 3) (Laurila vd., 1998). Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenle temas halinde değildir. Fakat, meyve veya sebze kesildiği ya da zedelendiği zaman, enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında, bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girer ve renkli bileşikler oluşturur (Lee vd., 1990; Valero ve Garcia-Carmona, 1998; Rocha vd., 1998; Manzocco vd., 1999; Chang vd., 2000; Mathewson 2000).



Diğer enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır (Şekil 4) (Labuza vd., 1992). Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlardır.



Şekil 4. Kinonların serbest amino asitlerle polimerizasyonu (Labuza vd., 1992)

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları, bitkinin çeşidine, türüne, yetiştiği bölgeye ve meyvenin olgunluğuna göre değişim gösterir. Enzimatik esmerleşmenin olabilmesi için, PFO, bitki vakuollerinde bulunan ve PFO'nun etkilediği fenolik substratlar ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca, sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların da uygun olması gerekir. Enzimatik esmerleşme, fenolik substratlar, moleküler oksijen ve PFO'dan birinin ortadan kaldırılması ile azaltılabilir veya durdurulabilir (Pekyardımcı, 1992).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında oluşan ve ilk kilit madde olan *o*-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak, oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve oluşan bu bileşikler daha büyük molekülü bileşiklere polimerize olurlar. İşte renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir (Mcweeny, 1974; O'brein ve Morrissey, 1989).

#### 1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Tabiattaki Dağılımı

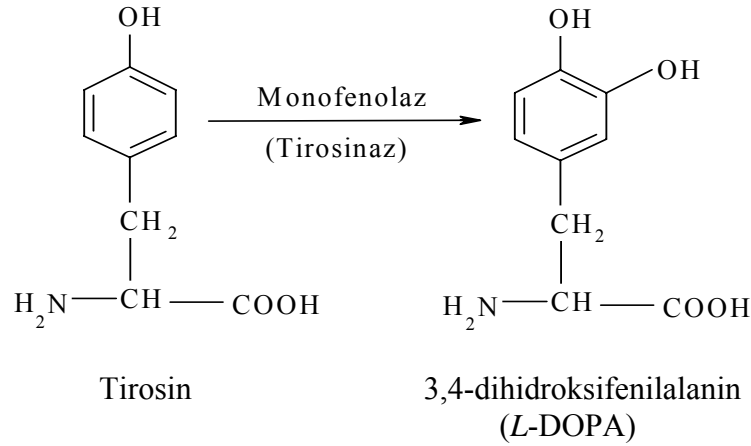
Polifenol oksidazlar, oksidoredüktaz sınıfına ait bifonksiyonel enzim olup, bakır içeren proteinlerin bir grubudur (Robb, 1984; van Gelder vd., 1997). Bu grubun ortak özelliği, moleküler oksijen varlığında polifenollerin oksidasyonunu katalizlemesidir. Uluslararası Biyokimya Derneğinin (IUB) enzim komisyonuna göre, PFO'nun birbiriyle bağlantılı iki çeşit aktivitesi vardır. Bunlar: katekol oksidaz veya *o*-difenol:oksijen-oksidoredüktaz (EC.1.10.3.1) ve kresolaz ya da monofenol monoooksijenaz (EC.1.18.14.1)'dir (Yelena vd., 1996). Enzimin katalizlediği reaksiyona göre kullanılan adları da vardır ve bunlardan bazıları; tirozinaz, kresolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, *o*-difenolaz, katekol oksidaz, dopa oksidaz, monofenol monoooksidaz, *o*-difenol oksido redüktaz şeklindedir (White ve White, 1997).

PFO, ilk olarak 1856 yılında, Schoenbein tarafından yemeklik mantarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Daha sonra, bazı turunçgillerde, pek çok meyve ve sebzelerde PFO belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Laurila, 1998).

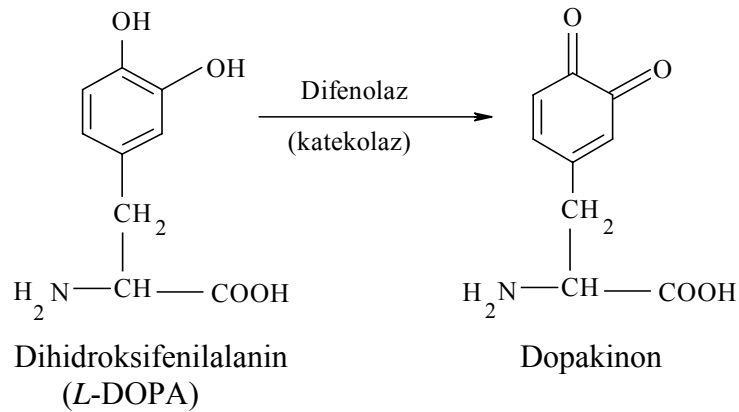
PFO, memeliler, mikroorganizmalar, sebze, meyve, deniz ürünleri ve mantarlara kadar çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunur. Buna ek olarak, bazı toprak türlerinde, glikoz oksidaz gibi oksidoredüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO'nun varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar vd., 1989; Mos'ko vd., 1992; Gul'ko, ve Khaziyev, 1993). Farklı bitkilerin PFO içeriği, türe ve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta, aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi, bitkinin türüne ve yaşına, meyve ve sebzelerde ise olgunluğa bağlıdır (Harel vd., 1964; Tolbert, 1973; Stephens ve Wood, 1974; Padron vd., 1975; Mayer, 1987).

### 1.5. Polifenol Oksidaz'ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları

Uluslararası Biyokimya Derneği'ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün PFO'ların, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için, birinci sınıf enzim oldukları belirlenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre PFO, iki farklı aktivite göstermektedir. Bunlardan biri, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1) ve enzimin bu aktivitesi, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak bilinir. Diğeri ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinir (Cabanés vd., 1994; Rodriguez-Lopez vd., 1994; Espin vd., 1997; Fenoll vd., 2000; Espin vd., 2001; Brooks vd., 2004).



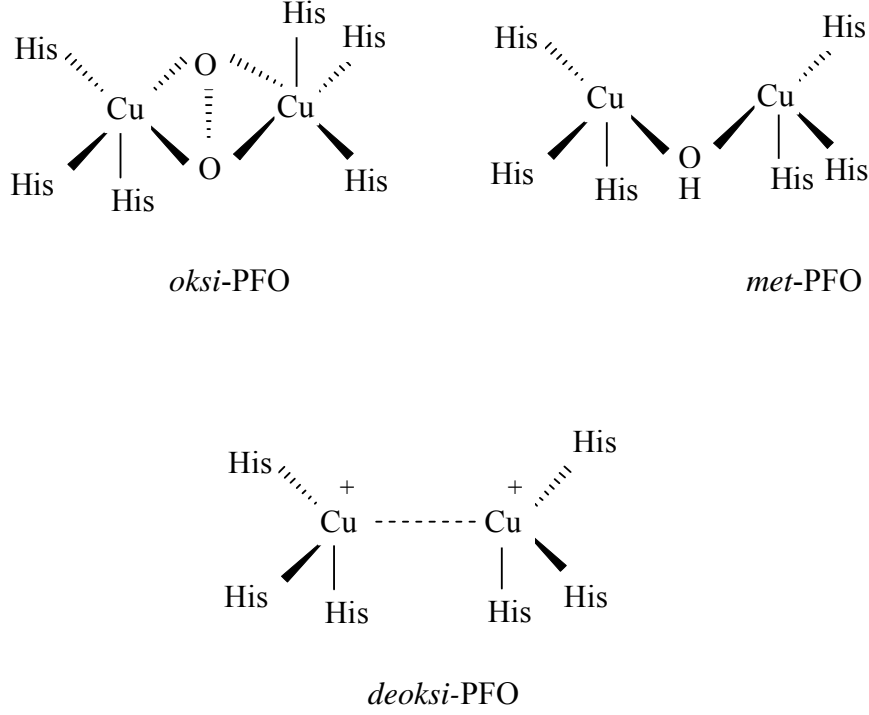
Şekil 5. Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)



Şekil 6. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)



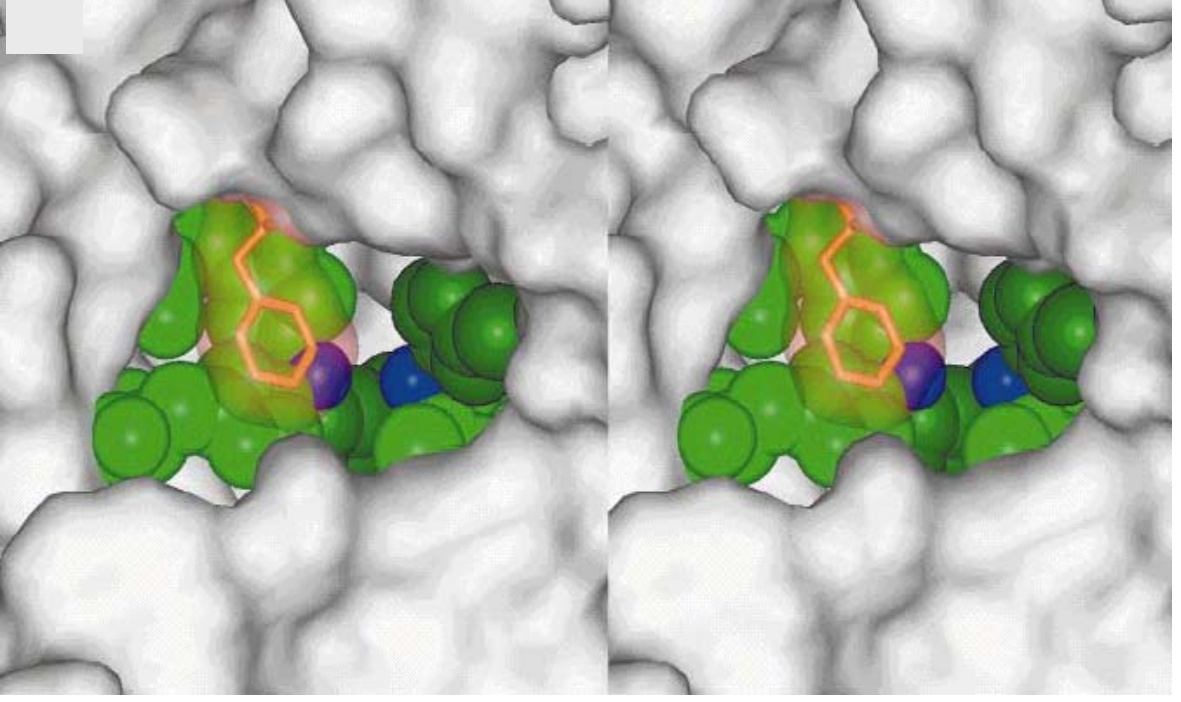
Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar, PFO'nun, binükleer bakır kompleksi içeren bir aktif bölgeye sahip olduğunu göstermiştir. PFO'nun merkezi, Tip3 bakır merkezi olarak bilinir.



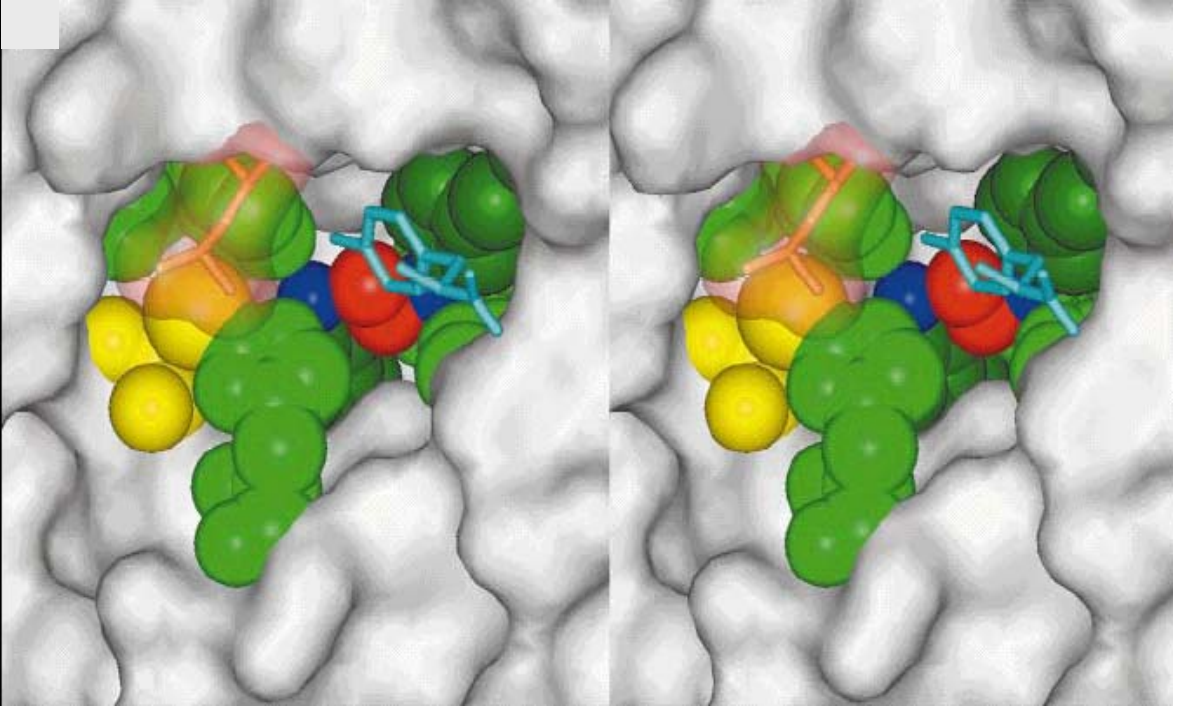
Şekil 7. PFO'nun bakır merkezleri

Oksijenlenmiş form (*oksi-PFO*), her biri iki güçlü ekvatoryal ve bir zayıf aksiyal  $N_{\text{His}}$  ligandlarıyla bağlanmış iki tetragonal Cu(II) atomu içerir. Eksojen oksijen molekülü, peroksit olarak bağlanmıştır ve iki Cu merkeziyle köprü oluşturmuştur. *met-PFO*, oksi- forma benzerdir ve bir endojen köprüyle bağlanmış antiferromagnetik iki tetragonal Cu(II) iyonu içerir. *deoksi-PFO*, bir [Cu(I)-Cu(I)] yapısına sahiptir. PFO'nun aktif bölgesindeki bu bakır durumları, monofenollerin *orto*-hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonunda gereken reaksiyon mekanizmaları için yapısal bir modeli önerir (Sanchez vd., 1995).

PFO'nun aktif bölgesi hemosiyanınin aktif bölgesiyle benzerdir (Şekil 8, 9). Hemosiyaninler, PFO'lardaki substrat-aktif bölge arasındaki ilişkiyi anlamak için bir model sistem olarak kullanılır (Decker ve Tuczec, 2000). Bu model sistemler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, monofenollerin PFO katalizli dönüşümlerinin, substratın enzimin *oksi-* formuna bağlanması ile başladığını ortaya koymuştur.

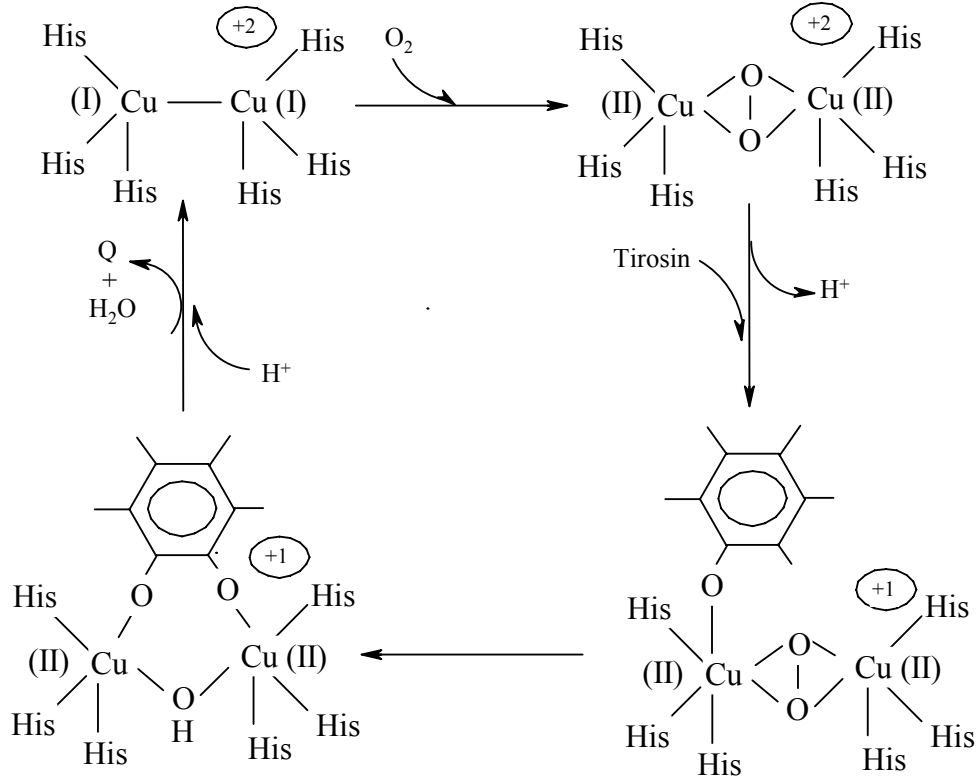


Şekil 8. *Panulirus interruptus* hemosiyaninin *deoksi*-yapısı. Bakır atomları mavi; histidinler yeşil; Phe351 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000).



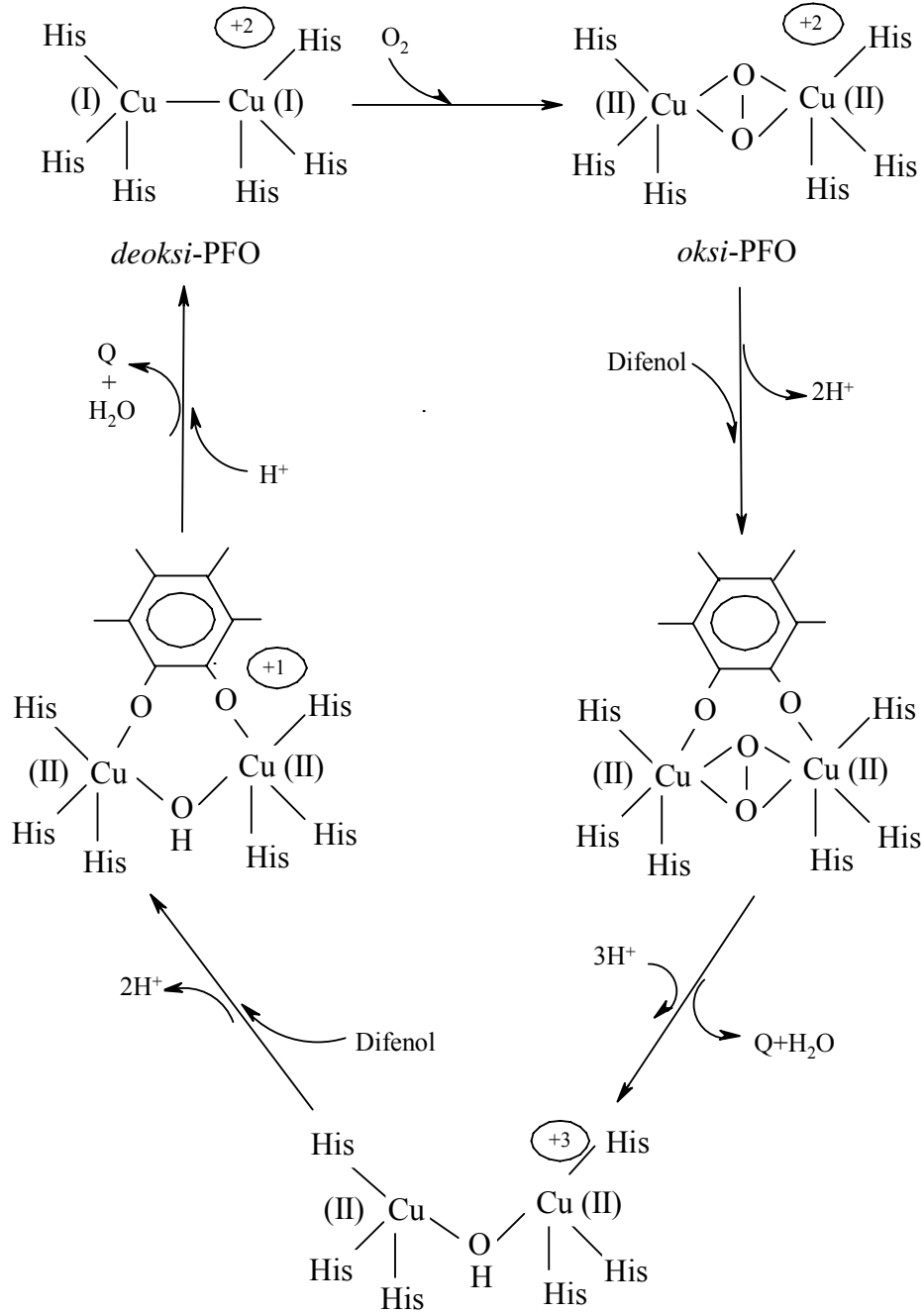
Şekil 9. *Octopus* hemosiyaninin *oksi*-formunun yapısı. Açık mavi: tirozin substratı; histidin yeşil; sistein sarı; bakır mavi; oksijen kırmızı; Leu2689 turuncu renklerle gösterilmiştir (Decker ve Tuczek, 2000)

Polifenol oksidazın monofenolaz ve difenolaz çevrimlerinin, genellikle birbirlerine bağlantılı oldukları ifade edilir. Çünkü, önce monofenolaz çevriminde bir difenol üretilir (kresolaz reaksiyonu) ve bundan sonra difenolaz çevriminde (katekolaz reaksiyonu) kullanılır.



Şekil 10. Polifenol oksidaz için önerilen monofenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003)

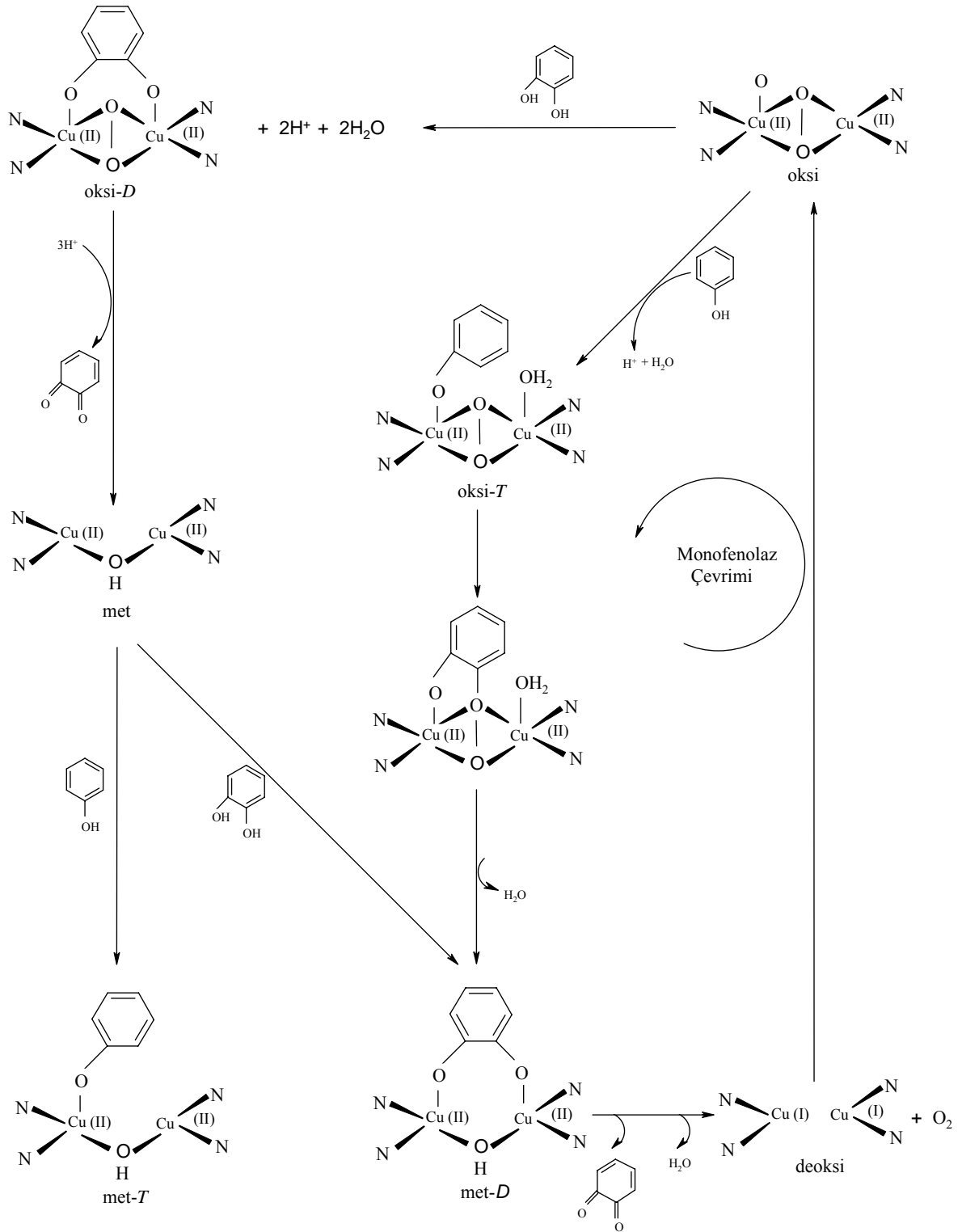
Monofenolaz çevriminde, *deoksi*-formundaki enzim oksijenle *oksi*-forma dönüşür ve fenolün hidroksi grubu, *oksi*-formundaki  $[Cu(I)-O_2-Cu(I)]$  PFO'nun bir bakır atomuna aksiyal konumda bağlanır. Daha sonra *orto*-konumunda bir oksijenlenme meydana gelir. PFO'nun bir monofenolü dönüştürebilecek tek aktif merkez formunun *oksi*-formu olduğuna dikkat edilmelidir. Bu form,  $Cu(I)-O_2-Cu(I)$  şeklinde yazılabilir, fakat daha uygun olarak peroksid  $[Cu(II)-O_2^{2-}-Cu(II)]$  şeklinde ifade edilir. Substratın bağlanmasından sonra oluşan bu beş koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesini takiben, fenolik substratın *orto*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir.



Şekil 11. PFO için önerilen difenolaz çevirimi (Q: *o*-kinon) (Siegbahn, 2003)

Difenolaz çevriminde, *oksi*-formdaki enzime bir difenol bağlanır. Molekül içi elektron transferi sonucu *orto*-benzokinin ürünü oluşur ve bu sırada enzimin *deoksi*-formu, yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelir.

Monofenolaz ve difenolaz katalitik çevrimlerinin birleştirilmesiyle tam bir mekanizma basit olarak Şekil 12'deki gibi gösterilebilir.



Şekil 12. PFO için önerilen monofenolaz ve difenolaz mekanizmaları

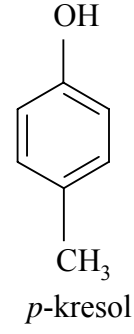
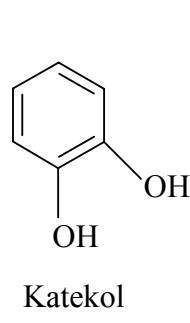
Oluşturulan *o*-kinon bileşikleri, canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı bir şekilde ve kolayca polimerleşerek, koyu kahverengi ve suda az çözünen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşturulur.

Hem monofenolaz ve hem de difenolaz çevrimlerinde görüldüğü gibi, katalitik çevrimlerin ilginç bir tarafı, net reaksiyonda dışarıdan her hangi bir protona ihtiyaç duyulmamasına rağmen, oldukça yoğun bir proton akışının var olmasıdır. Örneğin, difenolaz çevriminde (Reaksiyon 11) O-O bağının parçalandığı sırada üç protona ihtiyaç vardır.

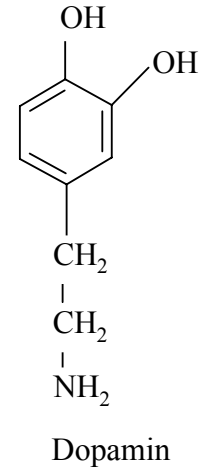
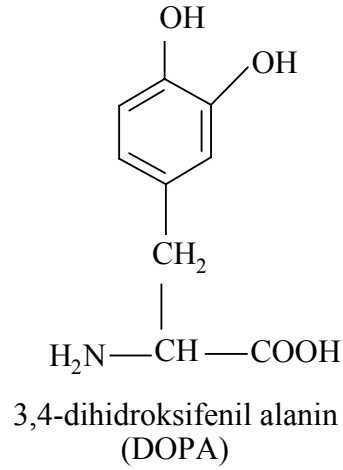
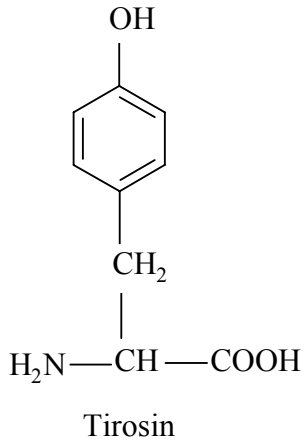
### **1.6. Polifenol Oksidaz'ın Substratları**

Sebze ve meyveler, çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak, bu bileşiklerin çok az bir kısmı PFO'ya substrat olabilmektedir. Fenolik ve polifenolik bileşiklerin birçok bitki türünde ikincil metabolitler oldukları ve bu bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin, bitkilerin bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenlere karşı bir savunma sisteminde rol oynadıkları düşünülür. PFO ile katalizlenmiş polimerizasyon reaksiyonları, hasar gören bitki yüzeylerinin iyileşmesine yardımcı olur. Ayrıca, polifenolik bileşiklerin antimutajenik, antikanserojenik, antigliserik ve antioksidatif özelliklerinin olduğu da bilinmektedir. Bu özellikler, daha sağlıklı olmayı sağlayacak besin maddelerinin geliştirilmesi, küf oluşumunun engellenmesi ve proteinsel besin değerlerinin artırılması amacıyla kullanılabilir (Hughes, ve Swain, 1962; Czerkaskij, 1970; Friedman, 1997). Bitkilerdeki fenolik bileşikler, bitkinin türüne, kültürünün yapılmasına, büyüme ve saklanması sırasında çevresel şartlara ve olgunlaşma derecesine göre çeşitlilik gösterir. Ayrıca fenolik bileşikler, bitkinin rengine ve tadına da katkı da bulunur (Marshall vd., 2000).

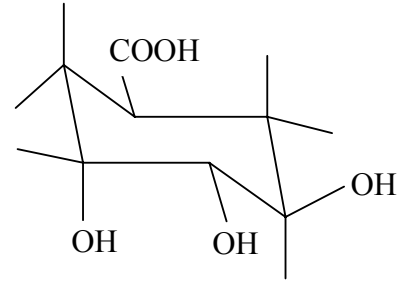
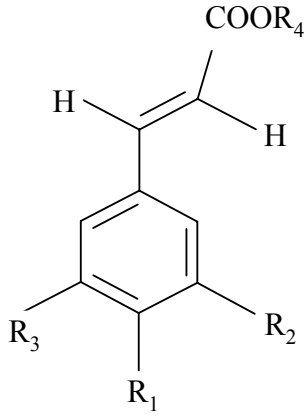
PFO'nun en yaygın substratları basit yapılı fenoller, klorojenik asit ve türevleri ile flavonoid tipi fenollerdir. Basit fenoller genelinde, katekol ve kresol gibi fenolik bileşikler yanında tirozin ve türevleri ile sinnamik asit oluşturur.



Birçok besin maddesinde bulunabilen tirozin, enzimatik oksidasyon sonucu, 3,4-dihidroksifenil alanin (DOPA) üzerinden melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan substratlardandır.



Sinamik asit, daha çok klorojenik asit türevleri ve flavonoidlerin oluşturulmasında rol oynar. Patateste klorojenik asit, patates yumrularının fenolik içeriğinin yaklaşık % 90'ını oluşturur ve bu bileşimin bir çok izomeri çeşitli teknikler yardımıyla tespit edilmiştir. Patates, şeftali ve fasulye yaprağı PFO aktiviteleri, klorojenik asit ve kafeik asit varlığında oldukça farklılık gösteriyorken, *L*-DOPA varlığında benzer aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (Whitaker, 1972).



Kinik asit

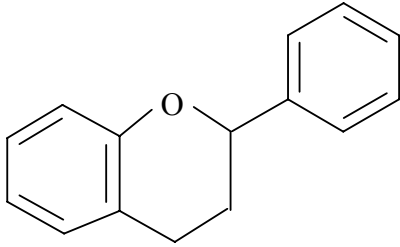
Sinnamik asit:  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$

Kafeik asit:  $R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=R_4=H$

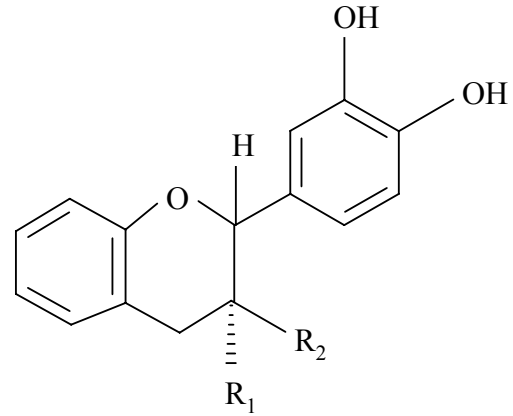
Ferulik asit:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=R_4=H$

Klorojenik asit:  $R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=Kinik\ asit$

Kateşinler, flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir ve doğada (+)-kateşin ve onun stereoizomeri olan (-) epikateşin olarak bulunurlar (Ganguly ve Seshado, 1958).



Flavonoid



Kateşin:  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$

Epikateşin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$

Doğal fenolik substratların her birinin sebze ve meyvelerde sebep oldukları kararmaya katkıları, fenollerin konsantrasyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olduğu kadar, farklı kinonlardan elde edilen makromoleküler pigmentlerin renk şiddetine de bağlıdır.



Bazı meyve ve sebzelerde PFO'nun ana substratı, bitki materyallerinde bulunmayan fenolik bileşiklerdir (Hermann, 1976; Espin vd., 1988).

Substrat spesifikliği yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değildir. Aynı zamanda, belli bir ölçüye kadar enzim özütünün, meyve ve sebzenin hazırlandığı kısma da bağlıdır. Aktivitenin incelendiği pH değeri de substratın kullanılabilirliğini etkiler (Lavollay vd., 1963; Vamos-Vigyazo ve Gejzago, 1978).

### **1.7. Polifenol Oksidaz'ın İnhibisyonu**

Mantarların ve diğer besinlerin olgunlaşması, depolanması ve işlenmesi esnasında, enzimatik esmerleşmeden kaynaklanan ciddi ekonomik kayıplar meydana geldiği için, enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin işleme endüstrisinde oldukça önemli olup araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir. PFO katalizli esmerleşme, sadece enzimin inaktive edilmesiyle değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyon için gerekli olan O<sub>2</sub> veya fenolik substratın ikisinin ya da birinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla da önlenir. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke edilmesiyle ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumunun engellenmesiyle önlenir (FDA, 1996).

PFO'nun bir çok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır (Ferrar ve Walker, 1996).

Sülfidler çok kullanılan bir PFO inhibitörüdür ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda kullanımına izin verilmez (FDA, 1996). Sülfidler, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeleri önler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder, ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici madde olarak rol oynar. Ancak bunların yanında sülfid kullanımının bazı dezavantajları vardır. Sülfidler, besinleri yıkıcı özelliği yanında bitki ve meyvelerde doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir (Langdon, 1987; Anonymous, 1991; McEvily vd., 1991). Yayımlanan bir çok rapora göre, bazı insanların özellikle astım hastalarının sülfid bileşiklerine karşı hassas olabilecekleri belirtilmiş ve bu yüzden dünyada sülfid kullanımına ortak kısıtlama getirilmiş hatta birçok gelişmiş ülkede de yasaklanmıştır (Ding vd.; 2002). Sülfid katılmış besinlerin sağlığa karşı etkileri ve müşterilerin taze ve

doğal besinleri tercih etmelerindeki artış, sülfid ajanlarına alternatif başka etkili ajanların araştırılmasına neden olmuştur. Bir inhibitör olarak üzerinde en çok çalışılan madde askorbik asittir. Ayrıca sitrik asit, sitrik-askorbik asit ve benzoik-sorbik asit karışımlarının uygulanması da minimum düzeyde işlenmiş patateslerde etkili sonuçlar vermiştir. Karides, elma ve patates için 4-hekzilrezorsinol iyi bir enzimatik esmerleşme inhibitörüdür (Monsalve-Gonzalez vd., 1993; Lou ve Barbato-Canovase, 1995; Whitaker 1972; Castaner vd., 1996).

PFO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PFO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan *o*-kinonlarla sisteinin tiyol-konjugatlarını oluşturmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca sistein, oluşan *o*-kinonları ilgili fenollerine indirgeyerek de inhibisyon sağlamış olur (Cilliers ve Singleton, 1990; Marshall vd., 2000).

PFO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir (Laurila vd., 1998).

Polifenoller, doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir ve bir çok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak ta bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kök, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze meyve, sebze ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel PFO inhibitörleri; kompferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir (Kubo ve Yokokava, 1992; Kubo ve Kinst-Hori, 1999; Ha vd., 2001; Chen ve Kubo, 2002). Bu çalışmalara göre flavanoidlerin inhibisyon özelliği, aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir.

2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, kumik asit gibi çok sayıda aldehid ve türevlerinin, PFO için inhibitör madde olabilecekleri belirlenmiştir (Kubo ve Kinst-Hori, 1998; Lee vd., 2000; Lee, 2002). Aldehid grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple inhibisyon etkisinin, enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı oluşturmasından ileri geldiği söylenmektedir.

Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PFO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkaptotiyazol-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid

ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkaptimidazol)'dür (Andrawis ve Kahn, 1996; Espin ve Wichers, 2001).

Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asitler gibi bir çok kimyasalın da inhibitör olarak PFO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Kubo ve Kinst-Hori, 1998).

### **1.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında ve çeşitli manometrik, polarografik, kronometrik ve spektrofotometrik yöntemler yardımıyla, substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilmektedir.

Fenolik substratların oksidasyonu sırasında kullanılan O<sub>2</sub>, bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak ya da bir oksijen elektroduyla polarografik olarak ölçülebilir (Mayer vd., 1966).

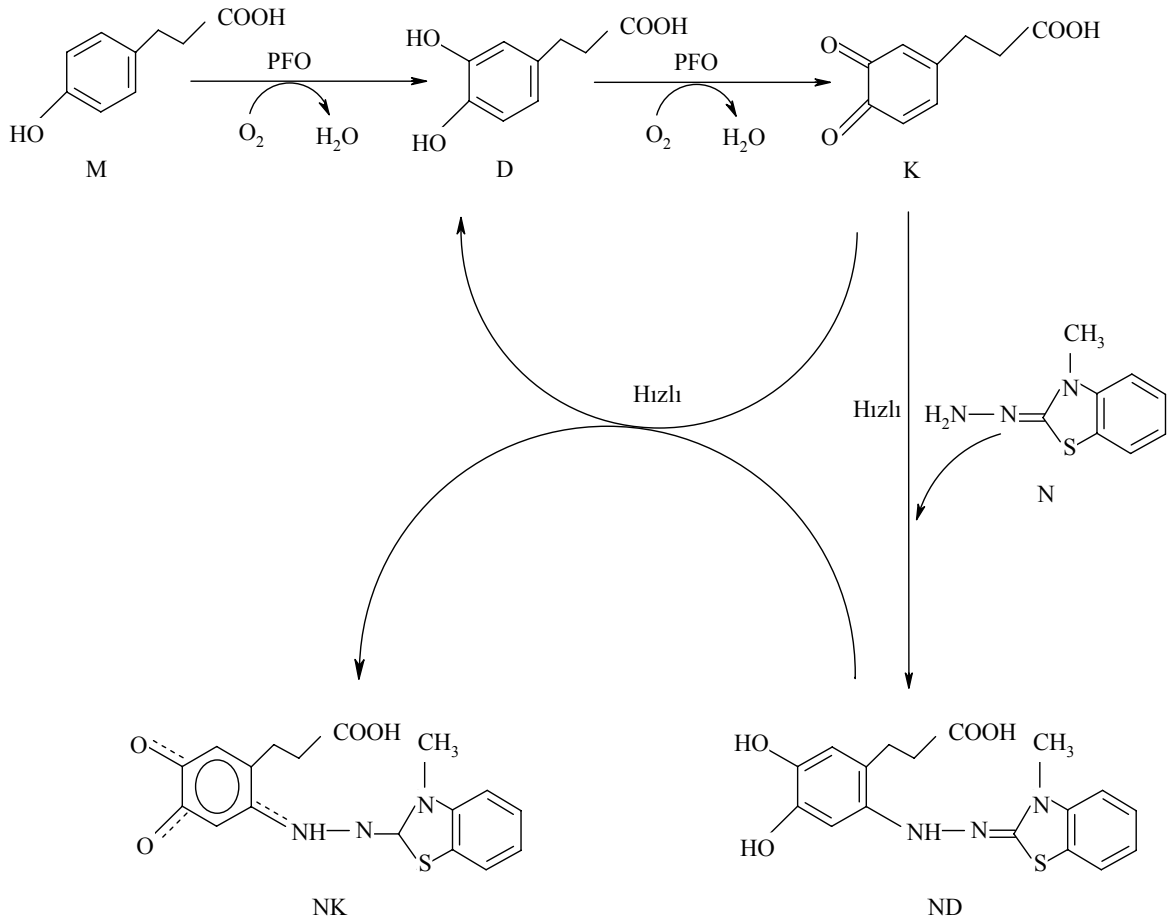
Aktivite ölçümleri esnasında, PFO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden birinde, reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen, hidrokinon veya askorbik asit gibi negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir ve sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bir diğer yöntemde, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorbans verdiği 265 nm'de, konsantrasyonundaki azalma ölçülür. Askorbik asidin tükenme hızı, enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon↔substrat transformasyonudur. Kronometrik metotta ise, askorbik asit varlığında, reaksiyon sırasında oluşan kinonlardan kaynaklanan rengin ilk görüldüğü an tespit edilir.

Askorbik asit yerine, 420 nm'de absorbans veren potasyum hegzasiyanoferrat trihidrat (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].3H<sub>2</sub>O) kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm'de absorbans veren bitki materyalleri sonuca etki etmez. Bu metodun diğer avantajları ise, hegzasiyanoferratin özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre, daha az hassas olması ve çözeltide daha kararlı olmasıdır (Vamos-Vigyazo, 1981).

Spektrofotometrik işlemlerde ise, genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızı ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir

ve bu yöntem daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972).

PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitesi 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) gibi kromojenik bir nükleofil varlığında, oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşturulan *o*-kinon, nükleofil ile renkli katılma ürünleri verir ve bu katılma ürünleri 500 nm ve civarındaki karakteristik absorpsiyonları ile belirlenir (Şekil 13). Bu reaksiyonun mekanizması detaylı bir şekilde ortaya konmuştur (Rodriguez-Lopez vd., 1994).



Şekil 13. Polifenol oksidazın kromojenik nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: Monofenol, D: Difenol, K: *o*-kinon, N: Kromojenik nükleofil, ND: Nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: Nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü)

3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon yerine, her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz kondenzasyon ürünü oluşturan, sarı renkli bir bileşik olan

2-nitro-5-tiyobenzoik asit de kullanılabilir. Enzim aktivitesi, 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin 412 nm'de absorbansındaki azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edilebilir (Esterbauer vd., 1977).

Son yıllarda çok daha etkin spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla, PFO aktivitesinin daha doğrudan belirlenmesine olanak sağlayabilen substratlar tasarlanmış ve sentezlenerek monofenolaz ve difenolaz aktivitesinin doğrudan kantitatif olarak belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmışlardır. Bunlardan biri de, geleneksel substratlar yerine bunlara yapısal olarak benzeyen diazo-türevleri olan substratların kullanılmasıyla sağlanmıştır (Haghbeen ve Tan, 2003).

Bu teknikler dışında nükleer magnetik rezonans ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemleri de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmış olmasına rağmen bu yöntemler oldukça pahalı cihazları ve uzmanlığı gerektirir.

### **1.9. Polifenol Oksidaz'ın Bazı Kaynaklardan Saflaştırılması**

PFO'nun en önemli özelliklerinden biri, bitki dokularında aktif olmayan bir halde bulunabilme yeteneğidir. Ancak, asit-bazlar, üre, poliaminler, anyonik deterjanlar, proteazlar ve yağ asitleri tarafından aktive edilebileceği bildirilmiştir (Kenten, 1957; Swain vd., 1966; Sanchez-Ferrer vd., 1989; Jimenez-Atienzar vd., 1991; Sanchez-Ferrer vd., 1993). Enzimin inaktif formunda izole edilebilmesi için aktivasyonunu veya modifikasyonunu önlemek amacıyla, uygun koşullarda çalışılması gereklidir. Bitkisel örneklerin, soğuk aseton ile toz haline getirilmesi veya amonyum sülfat ile çöktürülmesi, böyle bir işlem için oldukça uygundur. Böyle bir işlemle elde edilen özütlerde, daha sonra Triton X-114, Triton X-100 veya Tween-80 gibi iyonik olmayan bir deterjan yardımıyla ve sıcaklıkla indüklenmiş faza katılma tekniği olarak tanımlanan bir işlemle oluşturulan iki fazdan, sulu fazda enzimin çözünürleştirilip diğer bileşenlerden ayrılması sağlanmış olur (Sanchez-Ferrer vd., 1990). Bazı bitkisel özütlerden PFO içeren dokuların homojenizasyonu sırasında, doku hasarına bağlı olarak oluşan ve fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ortaya çıkan esmerleşme reaksiyonları dolayısıyla oluşan ve suda çözünürlüğü az olan pigmentler, işlem sırasında problem olabilir. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda çalışmak, bu problemi bir miktar azaltabilir ki sıvı azot ortamında böyle bir homojenizasyon işlemi, uygun tampon çözeltiler varlığında gerçekleştirilebilir (Sanchez-Ferrer vd., 1990; Jimenez-Atienzar ve Garcia-Carmona, 1996).

Aseton ile enzimin bitkisel özütlerden çöktürülmesi de oldukça tercih edilen bir yöntemdir ve böyle bir işlemle genellikle oldukça yüksek PFO aktivitesi elde edilmiştir. Homojenizasyon çözeltisinin pH değerinden enzimin aktivitesi etkilenebileceğinden, tampon çözeltinin seçimi de enzimin izolasyonunda önem taşır. Bazı durumlarda, homojenizasyon çözeltisine, çeşitli indirgenme-yükseltgenme olaylarını önlemek ve böylece enzim aktivitesini korumak amacı ile, indirgen reaktifler ya da enzim inhibitörleri katılabilir. Sodyum azid, askorbik asit, glutatyon, ditiyotreitol, sistein, sodyum metabisülfid veya tiyoüre gibi çeşitli bileşikler bu amaçla kullanılmıştır (Friedman, 1997).

PFO'nun bitki dokularından izolasyonu sırasında, fenolik bileşiklerin oksidasyonunun ve dolayısıyla polimerleşmelerinin engellenmesi amacıyla, genellikle ortama, bu fenolik bileşikler bağlayıp ortamdan uzaklaştırabilecek ve genelde polimerik yapıda olan polivinilpirrolidin, poliamit ve polikaprolaktam gibi bir madde ilave edilir. Daha sonra bu polimerik yapı, ortamdan uygun tamponlarla yıkama yoluyla uzaklaştırılarak, fenolik oksidasyon engellenmiş olur. Bazı durumlarda da polietilen glikol bu tür oksidasyon işlemlerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Dinçer, 1999).

Homojenize edilen enzim özütlerinden PFO'nun saflaştırılması, genellikle amonyum sülfat veya aseton ile çöktürmeyi takiben, kromatografik basamakları içerir. Bu kromatografik işlemlerde santrifüjlenip hazırlanan berrak çözelti, dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex veya DEAE-selüloz gibi anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 veya Sephadex G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemlerine tabi tutulur (Mayer, 1987). Kromatografi sonrasında, PFO içeren elüatlar birleştirilir ve bazı durumda asetonla veya amonyum sülfatla çöktürülerek PFO konsantre edilir. Bazı dokulardan PFO'nun saflaştırılması için bu kromatografik tekniklerden biri yeterli olurken, genellikle kombinasyonları şeklinde kullanıldığında, daha yüksek saflıkta enzim saflaştırılması gerçekteştirilebilir. Örneğin, fasulye PFO'su, DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi, onu takiben fenil agaroz matriksi üzerine hidrofobik etkileşim kromatografisi ve son olarak da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile, üç basamaklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır (Paul ve Gowda, 2000). Gawlik-Dziki ve arkadaşları (2007) tarafından, iki kromatografik teknik sırasıyla kullanılarak, bir tür marul PFO'su, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi teknikleriyle saflaştırılmıştır. Bir tür mantar PFO'su ise, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve onu takiben de hidroksiapatit

kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Fan ve Flurkey, 2004). Ayrıca, daha önce fenil Sepharose-CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisiyle PFO, tek basamakta çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır (Wisseman ve Lee, 1980; Janovitz-Klapp vd., 1989; Zhou vd., 1993; Das vd., 1997). Çok kullanılan bir teknik olan jel filtrasyon kromatografisi ile de tek adımda PFO saflaştırma işlemi, Chazarra ve arkadaşları (2001) tarafından bir tür maruldan, Xu ve arkadaşları (2004) tarafından bir tür kestaneden ve Erat ve arkadaşları (2006) tarafından *Ferula sp.*'den gerçekleştirilmiştir.

Afinite kromatografisinin, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve izolasyonunda güçlü bir teknik olduğu ispatlanmıştır. 1953 yılının başlarında Lerman, selüloza bağlanmış mantar PFO'sunun fenolik ve substitue benzoik asit türevi inhibitörlerinin etkili bir afinite absorbanları olabileceğini göstermiştir. Daha sonra, Gutteridge ve Robb (1973), mantar PFO'sunun, yarışmalı bir inhibitör olan 4-amino benzoat'ı Sepharose-4B'ye bağlayarak, bu afinite adsorbantının enzimin saflaştırılmasında kullanışlı olduğunu göstermiştir. Aynı dönemlerde, O'Neill ve arkadaşları (1973), Sepharose-4B'ye, aminofenol taşıyan camlara ve *p*-amino benzil selüloza fenolik, katekolik ve benzoil gruplarını bağlayarak, hangi adsorbantın mantar PFO'suna spesifiklik gösterdiğini araştırmışlardır. Bu adsorbantlardan dopamin afinite kolonları ham enzim özütünden enzimi bağlamayı başarmıştır. Ancak bu kolonlar, kendiliğinden oksidasyona uğradığından dolayı, tekrar tekrar kullanılamamıştır.

Katı desteklere bağlanmış inhibitörler, fenolikler alkil grupları ve antibadiler ile mantar PFO'sunun saflaştırılması, bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Flurkey ve Jen, 1980; Yonekura vd., 1981; Wisseman, ve Montgomery, 1985).

Pathak ve arkadaşları (1992) yaptıkları bir çalışmada, afinite kromatografisi üzerine aktivasyon metotlarının etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, patates PFO'sunun afinite kromatografisinde kullanılmak üzere, CNBr veya divinilsülfon (DVS) ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye değişik uzantı kolları ve uzantı kollarına da ligand olarak *p*-aminobenzoik asit'in bağlanmasıyla çeşitli afinite jelleri hazırlanmıştır. Bu çalışma neticesinde, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye *p*-aminobenzoik asit'in bağlanmasıyla oluşturulan afinite jelinin, PFO adsorbsiyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir.

Arslan ve çalışma ekibi (2004) tarafından yapılan çalışmada, Sepharose-4B, CNBr ile aktiveleştirildikten sonra, uzantı kolu olarak *L*-tirosin ve uzantı koluna da ligand olarak *p*-aminobenzoik asit bağlanmıştır. Böylece, Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit

senteziyle hazırlanan afinite jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisi ile PFO, dut meyvelerinden, tek adımda ve 74 kat saflaştırılmıştır.

### 1.10. Polifenol Oksidaz'ın Bazı Organizmalarda Bulunuşu

Çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunan PFO, sahip olduğu önemli fonksiyonları nedeniyle, bir çok araştırmacı tarafından, farklı organizmalarda çalışılmıştır.

Bir tür İzmir üzümünden, (*Vitis vinifera* L.), PFO, Sephadex G-100 jel flitasyon kromatografisi ile 26.15 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi, 186.44 U/mg protein olarak bulunmuştur. Yapılan substrat spesifikliği çalışmasında, üzüm PFO'sunun en yüksek aktiviteyi katekol varlığında gösterdiği belirlenmiştir. Bu substrat varlığında enzimin optimum pH değeri 7.2, optimum sıcaklığı ise 25 °C olarak belirlenmiştir. Yapılan termal kararlılık çalışmasında ise, enzimin 20-40 °C aralığında 30 dakika inkübasyonundan sonra, aktivitesini % 50'nin üzerinde koruduğu bildirilmiştir (Önez, 2006).

Mineral ve vitaminler açısından oldukça faydalı ve besleyici bir meyve olan dut, zayıflık semptomlarının tedavisinde kullanılmaktadır ve hem kurutulmuş hem de taze olarak tüketilebilmektedir. Dut meyvelerinden hazırlanan enzim özütünden PFO, sentezlenen Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile, afinite kromatografisi yapılarak 74 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin optimum pH'sı, 4-metil katekol varlığında 5.0 ve katekol varlığında 7.0 iken, optimum sıcaklığı ise, 4-metil katekol varlığında 20 °C ve katekol varlığında 45 °C olarak belirlenmiştir. Dut PFO'sunun, difenollerini okside ettiği ancak monofenollere karşı bir aktivite göstermediği, bu nedenle de enzimin aktivitesinin difenolaz aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Saf enzim tatbik edilerek yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde, yaklaşık 65 kDa'a karşılık gelen tek bandın varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan inhibisyon çalışmasında, dut PFO'su için en etkili inhibitörün *p*-aminobenzen sulfonamid ve bunu takiben de, sulfosalisilik asit, *L*-sistein ve glutatyon olduğu bildirilmiştir (Arslan vd., 2004).

Filipinlerde yetiştirilen bir muzda yapılan araştırmada, meyvenin soyulmuş etli kısmında yüksek miktarda dopamine rastlanmış ve bu maddenin ham veya kısmen saf PFO tarafından oksidasyona uğratıldığı bildirilmiştir (Riggin vd., 1976). Saflaştırma ve karakterizasyon esnasında yapılan işlemlerde, oksidasyonun hızlı gerçekleştiği dopaminin en iyi substrat olduğu anlaşılmıştır. Muzdan elde edilen enzimin substrat spesifitesi, Japon armudu (Tono vd.,1986), lahana (Fujita vd.,1991) ve patlıcandan (Fujita ve Tono, 1998)



farklılık göstermektedir. Saflaştırılmış enzimde dopamin için  $K_m$  2,8 mM ve optimum pH 6,5 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, 3.0-11.0 aralığındaki pH değerlerinde, enzimin 48 saatlik inkübasyonundan sonra, pH 5.0-11.0 aralığında, başlangıç aktivitesini % 90 oranında koruduğu gözlenmiştir. Saf enzimin optimum sıcaklığının 30 °C olduğu ve 70 °C üzerinde 10 dakika ısıtıldığında aktivitesinin % 80 oranında kaybolduğu bildirilmiştir.  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  gibi metal iyonlarının zayıf inhibitörler olduğu, *L*-askorbik asid ve sisteinin 1 mM konsantrasyonunun tamamen inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir (Galeazzi ve Sgarbieri, 1981; Sojo vd., 1998). SDS-PAGE elektroforezinde molekül ağırlığı 42 kDa olan saf enzime ait tek bir bant görülmüş ve jel filtrasyon kromatografisiyle de bu proteinin molekül ağırlığı yaklaşık 41 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuç saf enzimin bir monomer olabileceğini göstermektedir (Yang vd., 2000).

PFO'nun etkili olduğu bir diğer organizma mantarlardır. Endüstriyel olarak en az düzeyde işlenmiş mantarın, saklama esnasında enzimatik esmerleşmeden dolayı raf ömrü birkaç gün ile sınırlıdır (Burton ve Twynning, 1989). Mantardaki esmerleşmeye sebep olabilecek enzimler olan PFO, lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri, *Portabella* mantarında çalışılmış ve PFO'nun mantar dokularındaki en bol enzim olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu, mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO'dan kaynaklandığı bildirilmiştir (Zhang ve Flurkey, 1997).

Gönen kaplıcalarından izole edilen ve termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4<sup>T</sup> bakterileri ile hazırlanan hücre içi enzim özütünde yapılan çalışmada, difenolaz aktivitesi için belirlenen en iyi substrat 4-metil katekoldür. Ayrıca, 4-metil katekol varlığında optimum pH'nın 9.5, optimum sıcaklık değerinin ise 70 °C ve 80 °C olduğu bulunmuştur. Optimum sıcaklıkta, *A. kestanbolensis* K4<sup>T</sup> 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<sup>T</sup> suşlarında 0,01 mM sodyummetabisülfid, askorbik asid ve *L*-sistein ilavesiyle tamamen inhibe edildiği; 1mM  $Mn^{2+}$  ortama ilave edildiğinde ise aktivitenin 6.4 ve 5.3 kat arttığı bildirilmiştir (Yildirim vd., 2004).

Son yıllarda, bitkilerden PFO genlerinin izolasyonu konusunda da çeşitli çalışmalar yapılmış ve domates (Newman vd., 1993), patates (Hunt vd., 1993), üzüm (Dry ve Robinson, 1994) ve melez kavak ağacından (Constabel vd., 2000) PFO'yu kodlayan genler izole edilmiştir. Domatesin yedi bireysel genomik klonu izole edilmiş ve elde edilen her bir

genin tam nükleotit dizisi belirlenmiştir. Bu bitkide PFO ekspresyonunun floral organlarda oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Newman, 1993). Patateste ise gelişmekte olan dokularda yüksek düzeyde ekspresyon gözlenirken, tamamen gelişmiş dokularda ise düşük düzeyde ekspresyon belirlenmiştir (Hunt, 1993). Üzüm cDNA'nın bütün olarak 67 kDa'luk bir proteini kodladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, Southern emdirme yöntemi ile de üzümde tek bir PFO geninin varlığı belirlenmiştir (Dry, 1994). Moleküler düzeyde PFO ekspresyonunu belirlemek için yapılan bir diğer çalışmada, melez kavak ağacı cDNA'sı elde edilmiş ve bu cDNA'nın, 563 amino asitten oluşan, uzunluğu 1912 baz çifti ve toplam ağırlığı 64 kDa olan proteini kodladığı belirlenmiştir. Bu PFO proteininin amino ucu, 67 amino asitlik bir bölge içermekte olup, transit bölge olarak kabul edilmiştir. Bu transit bölge PFO'nun, kloroplastlara ve tilakoid lümene taşınmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada PFO'nun varlığı Southern emdirme yöntemiyle de gösterilmiştir. Ayrıca melez kavak ağacının yaralı yapraklarında mRNA miktarının sağlam yapraklara kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, yaralanmayla PFO aktivitesinin uyumlu olduğunu göstermiştir (Constabel vd., 2000).

### **1.11. Polifenol Oksidaz'ın Doğada, Endüstride, Tıpta ve Sentez Reaksiyonlarındaki Rolü**

PFO'nun tabiattaki en önemli görevi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır.

Bitkilerin enfeksiyonlara karşı olan dirençlerinde PFO'nun görevi basitçe şöyle açıklanabilir: Enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek, suda çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular, enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi görürler. Bu olay, bazı araştırmacılar tarafından PFO'nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Membranların lipid içeriğinin azalması bu açıdan önemlidir. Çünkü, bu durum membranların geçirgenliğini etkileyebilir ve enzimin substratıyla temasını kolaylaştırarak bariyerlerin oluşumunu arttırabilir. Diğer bir teoriye göre de, polifenollerin oksidatif polimerizasyonunun ara ürünleri, enzimi inaktif edebilir veya bazı kararsız bitki enzimlerine ve virüslere bağlanabilir (Vamos-Vigyazo, 1981).

PFO'nun *o*-dihidroksifenollerini oksidasyonu ile oluşan kinonlar, triptofan ile reaksiyona girerek, indolpirüvik asit üzerinden, indol asetik asidi oluştururlar. Bundan dolayı PFO, bitki büyüme regülasyonunda rol alabilir (Vamos-Vigyazo, 1981).

PFO etkisiyle oluşan kinonlar, humuslaşma ve enzimatik olmayan kararmaya yol açan benzer reaksiyonlara katılabilir ve bundan dolayı toprağın organik maddelerinin üretimine katkıda bulunabilir (Gul'ko ve Khaziyeu, 1993).

Fermente içeceklerin koku ve tadına PFO etkisi, istenen bir durum olabilir. Elma suyu ve fermente armut suyu üretiminde, doğal olarak bulunan fenollerin polimerizasyon ve kondanse olmuş oksidasyon ürünleri çöker ve filtrasyonla uzaklaştırılır. Üzüm fenollerinden, başlıca kateşinler, enzim ile oluşturulan kinonlar, amino asitlerle reaksiyona girebilir ve son ürün olarak uçucu aldehidleri verirler (Erzengin, 2002).

Bazı un türlerinde bulunan yüksek PFO aktivitesi, ekmek veya makarna ürünlerinde kararmayı meydana getirir. Enzimatik olarak oluşan kinonların, kazein gibi proteinlerle reaksiyonu, makarna ürünlerinin sindirimini ve lizin içeriğini azaltır. Bu durum, besinlerin besleyici değerlerini etkileyebilir. Enzimatik renk değişimi, pancar ve şeker kamışının işlenmesi esnasında son ürünün rengine etki edebileceği gibi oluşan polimerler, şekerin kristalizasyonunu da zorlaştıracığından ve verimi düşüreceğinden dolayı da istenmeyen bir durumdur (Gross ve Coombs, 1975). En istenmeyen durum ise, PFO tarafından oluşturulan kinonların, düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler okside etmesidir ki bu bileşikler dihidroksifenollere indirgenmektedir. Bundan dolayı kinonlar, enzimin oksidatif etkisine yeni substrat sağlamayı, reaksiyon ürünleriyle inaktive oluncaya kadar veya indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler tükeninceye kadar devam ederler. Bu olay, askorbik asidin kinonlar üzerinde nasıl bir etki yaptığını ve bu bileşiğin renk değişimini nasıl önlediğini göstermektedir. Askorbik asidin tamamı tükeninceye kadar, kinonlar sürekli olarak indirgenir ve böylece, kinonlar birbirleriyle veya dönüşümsüz renkli polimerler oluşturabildikleri amino asit veya proteinlerle reaksiyon veremez. Bundan dolayı, enzimatik kararmanın oluşumu dokulardaki vitamin C'nin tamamının bittiğini gösterir. Patlıcan, vişne ve kirazda görüldüğü gibi, antosiyaninler, PFO tarafından oluşturulan kinonlar ile benzer şekilde bozundurulurlar. Askorbik asit, antosiyanin oksidasyonunu düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeli ile engeller (Vamos-Vigyazo, 1981).

Tıp ve endüstri alanlarında kullanılmak üzere, PFO tarafından sentezlenen maddeler bilinmektedir ve özellikle, PFO, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda

dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından, güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç tutuklamada miyopolimer olarak da bu melaninlerden yararlanılmaktadır. Bundan başka, bazı kanser türlerinde, kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde, enzimin melanin sentezleme özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir (Çiçek 2000). Memelilerde tirozinazın aktif biçimi, melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunmaktadır. Dewey ve arkadaşları (1977) tirozinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün, farelerde Harding-Passey melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Cho ve arkadaşları tarafından (2003) yapılan bir çalışmada, PFO'nun biyosentetik bir reaksiyonda, enantiyomer seçici bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, PFO, sadece (+)-larreatrisini (+)-3'-hidroksilarreatrisine hidroksillerken, enantiyomeri olan (-)-3'-hidroksilarreatrisine hidroksilleyememiştir. Bu da PFO'nun yüksek substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermektedir.

PFO'nun kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan *L*-DOPA'nın üretimidir (Whitaker 1995).

### 1.12. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılacak organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim katalizli polimerleşme reaksiyonları ile elde edilen polimerler, özel kimyasal maddelerin üretiminde, enzimlerin ne derece spesifik olduğunu göstermektedir. Bazı fenol türevlerinin, polifenollerin, polianilinlerin, polifenol oksidazlar (Ikeda vd., 1996) kullanılarak ılımlı reaksiyon şartları altında yükseltgenme yoluyla polimerleştirildikleri belirtilmiştir.

Dolayısıyla, PFO'lar veya benzeri reaksiyonları katalizleyen enzimler bu açıdan son yıllarda oldukça ilgi toplamışlardır. Endüstriyel açılardan değerlendirildiğinde sadece birkaç oksidoredüktaz, çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak bu türden yeni enzimlerin saflaştırılıp karakterize edilmesi ile bazı yeni ürünlerin enzimatik sentezi mümkün olabilecektir. Bitkilerde bulunan bu tür enzimler, potansiyel kaynaklar olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Yöremizde yetişen yabani makromantar PFO'larının varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılıp, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceği açısından önem arz etmektedir. Bu kaynaklardan PFO'ların saflaştırılması ile çeşitli ve yeni bazı polimerlerin veya diğer kimyasal maddelerin sentezi işlemlerinde kullanılabilirliklerinin araştırılması hız kazanacaktır.

Bu çalışmada, Trabzon'un yaylalarında yetişen ve Fatih Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ertuğrul SESLİ'nin teşhis ettiği, yabani ve yenilebilir bir makromantar olan *Boletus erythropus*'tan, bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO, bir afinite jeli (Arslan vd., 2004) sentezlenerek, bir tür adsorpsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu kapsamında, optimum pH ve sıcaklığı, pH ve ısıl kararlılığı, protein ve substrat konsantrasyonunun, metal iyonlarının ve bazı genel PFO inhibitörlerinin aktivite üzerine etkisi araştırılarak, bazı kinetik verilere ulaşılmış ve ayrıca, *Boletus erythropus* PFO'sunun, bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkınlığı incelenmiştir.

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir. Buna göre, yöremizde yetişen ve tüketilebilen bu mantar, tüketilmenin yanında bir endüstriyel öneme de sahip olabilecektir. Bu kaynaktan sağlanan özütten PFO enziminin saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bunun sonucunda elde edilen PFO aktivitesinin inhibisyonu verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel PFO kaynaklarına adapte edilmesiyle, hem istenmeyen esmerleşmeden kaynaklanan ekonomik kayıplar azaltılmış veya önlenmiş hem de besin değerini kaybetmeksizin ürünlerin raf ömrü arttırılmış olacaktır.

Buna göre, yukarıda da ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi, yapılan bu çalışmayla, yeni enzim kaynakları denenerek endüstrinin ihtiyaç duyduğu yeni ve potansiyel PFO'ların saflaştırılması ve elde edilen bu enzim için optimum çalışma şartlarının belirlenmesi, bu

bilgiler dahilinde, çeşitli organik reaksiyonlarda enzimin kullanılması amacıyla, organik çözücüler varlığında kararlılığı incelenerek, endüstriyel veya farmakolojik öneme sahip yüksek saflıkta bazı organik bileşiklerin sentezi ve bazı polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için kaynak teşkil edecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrofotometre	UV/2	Unicam
Soğutmalı santrifüj	Z36HK	Hermle
Protein elektroforezi	P8DS	Owl Scientific
pH metre	WTW	Inolab
Jel görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200	Kodak
Soğutmalı İnkübatör	ES110	Nüve
Thermoblok	TS-110	Boeco

#### 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Afinite Jeli Sentezinde Kullanılan Sepharose-4B, CNBr, NaOH, NaHCO <sub>3</sub> , L-tirosin, p-aminobenzoik asit ve NaNO <sub>3</sub>	Sigma, Aldrich

Tablo 2'nin devamı

Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Triton X-114, PMSF, EDTA ve MgCl <sub>2</sub>	MP Biomedicals, Sigma
Protein Elektroforezinde Kullanılan N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin (TEMED), Sodyum dodesilsülfat (SDS), Amonyum persülfat (APS), N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Bromofenol Mavisi, Gliserol, $\beta$ -merkaptoetanol, Glisin, Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, Fluka, Carlo Erbo
Substratlar	Sigma, Aldrich, Alfa Aesar, Merck
Inhibitörler	Sigma
Tampon Çözeltilerde Kullanılan Sodyum Asetat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ve Tris Bazı	Sigma, Merck
Lowry Protein Tayininde Kullanılan Sığır Serum Albumini (BSA), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, Na-K Tartarat ve Folin Belirteci	Sigma, Merck
Metal Klorürleri LiCl, NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , AlCl <sub>3</sub> , MnCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , CdCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CrCl <sub>2</sub> ve NiCl <sub>2</sub>	Merck, Fluka
Çözücüler Diklorometan, Dikloroetan, Toluen, HCl, Asetik Asit, Metanol ve Aseton	Merck

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

Tablo 3. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	İçerik / Hazırlanış
Lowry Protein Tayini	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>



Tablo 3'ün devamı

Lowry B	% 1 (w/v) bakır sülfat ve % 2 (w/v) sodyum potasyum tartarat (1:1)
Lowry C	50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B
Lowry D	1 hacim folin belirteci : 2 hacim saf su

---

SDS / Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

---

Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl)	36.3 g Tris bazı 150 mL saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH 8.8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlandı
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	24.2 g Tris bazı 150 mL saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlandı
% 10 SDS	10 g SDS 50 mL saf suda çözüldü ve hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı
% 10 APS	10 g APS 50 mL saf suda çözüldü, hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı ve 200 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı
TEMED	Orijinal şişesinden kullanıldı
% 30 Akrilamid / Bisakrilamid: % 29.2 (w/v) Akrilamid + % 0.8 (w/v) N,N'-metilen bisakrilamid	29.2 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilen bisakrilamid 50 mL saf suda çözüldü ve hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı
SDS Jel Yükleme Tamponu	50 M Tris-HCl (pH 6.8) % 2 SDS % 0.1 Bromofenol mavisi % 20 Gliserol % 6 β-merkaptotanol (200 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı)
SDS Jel Yürütme Tamponu	500 mL'de 25 mM Tris bazı (1.5 g) 500 mL'de 250 mM Glisin (7.5 g) % 0.1 SDS 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH 8.3'e ayarlandı ve hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı

---

Tablo 3'ün devamı

Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 M Tris-HCl (pH 6.8) % 0.1 Bromofenol mavisi % 20 Gliserol (200 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı)
Doğal Jel Yürütme Tamponu	500 mL'de 25 mM Tris bazı (1.5 g) 500 mL'de 250 mM Glisin (7.5 g) 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH 8.3'e ayarlandı ve hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı
Boyama (Staining) Çözeltisi	1 g Coomassie brilliant blue R-250 100 mL Glasiyal asetik asit 300 mL Metanol 600 mL Saf su
Boya Uzaklaştırma (Destaining) Çözeltisi	100 mL Glasiyal asetik asit 300 mL Metanol 600 mL Saf su
Substrat Boyama Çözeltisi (L-DOPA)	24 mM L-DOPA 100 mL saf suda hazırlandı
<hr/>	
Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar	
<hr/>	
NaHCO <sub>3</sub> Tamponu (0.1 M pH 10.0)	4.200 g NaHCO <sub>3</sub> 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH'sı 10.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
NaHCO <sub>3</sub> Tamponu (0.2 M pH 8.8)	4.200 g NaHCO <sub>3</sub> 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH'sı 8.8'e ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Tamponu (0.01 M pH 6.0)	0.71 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH'sı 6.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Afinite Jelini Yıkama ve Dengeleme Tamponu (50 mM pH 5.0 Asetat Tamponu)	3.40 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı 5.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı

Tablo 3'ün devamı

Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8.0 Fosfat Tamponu içinde 1 M NaCl)	3.10 g $K_2HPO_4$ ve 29.25 g NaCl 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Diğer Tamponlar	
Sitrat-Fosfat Tamponu (50 mM pH 3.0)	2.81 g sitrik asit ve 1.80 g $KH_2PO_4$ 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 3.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Asetat Tamponu (50 mM pH 4.0-5.0)	3.40 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Fosfat Tamponu (50 mM pH 6.0-7.0)	3.10 g $K_2HPO_4$ 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Tris-HCl Tamponu (50 mM pH 8.0-9.0)	3.02 g Tris bazı 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı
Substrat Çözeltileri	
100 mM 4-Metil Katekol	0.124 g 4-metil katekol az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
100 mM Katekol	0.11 g katekol az saf suda çözülüp hacmi saf suyla 10 mL'ye tamamlandı
100 mM DHPPA (3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik asit)	0.182 g DHPPA az saf suda çözülüp hacmi saf suyla 10 mL'ye tamamlandı
100 mM <i>L</i> -DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin)	0.197 g <i>L</i> -DOPA az saf suda biraz ısıtılarak çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
100 mM <i>L</i> -Tirozin	0.181 g <i>L</i> -tirozin az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı

Tablo 3'ün devamı

İnhibitör Çözeltileri	
10 mM Askorbik Asit	0.0177 g askorbik asit az saf suda çözülüp hacmi saf suyla 10 mL'ye tamamlandı
10 mM Sodyummetabisülfid	0.019 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
80 mM Benzoik Asit	0.098 g benzoik asit az saf suda biraz ısıtılarak çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
100 mM Sodyum Azid	0.065 g NaN <sub>3</sub> az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
Diğer Çözeltiler	
10 mM MBTH	0.022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
100 mM Kateşin	0.290 g kateşin az saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı
Ham Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisi	0.84 g sodyum asetat (50 mM), % 6 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ve 1 mM PMSF 80 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı 5.0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı

## 2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme

Trabzon'un Akçaabat ilçesinin Hıdırnebi yaylasından toplanan, yabani ve yenebilir bir mantar olan *Boletus erythropus*, toplandığı anda sıvı azot içerisine konularak laboratuara kadar ulaştırıldıktan sonra, temizlenip -20 °C'de saklandı. Toplanan bu mantarın 50 g' ı Dewar kabındaki sıvı azot içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, 100 mL enzim özütü hazırlama çözeltisi ile porselen havanda iyice öğütüldü ve dört katlı tülbentten süzüldü. Elde edilen süzüntü 4 °C'de 20,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çökelek atıldı ve süpernatanta hacmi kadar soğuk aseton ilave edilip,

bir gece 4 °C'de bekletildikten sonra, 4 °C'de 20,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp elde edilen çökelek, dengeleme tamponu olan 50 mM pH 5.0 asetat tamponunun çözünebildiği en az miktarında çözüldü (Özen vd., 2004).

### 2.3. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibinin (2004) sentezlediği yöntemle sentezlendi. Bu yöntemle göre afinite jeli, çözünmeyen bir kolon maddesi olan Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin serbest -OH gruplarının modifikasyonu için genel olarak CNBr kullanıldığı için bu çalışmada da, Sepharose-4B CNBr ile aktiveleştirildikten sonra, matriksin uzantı kolunu oluşturmak üzere tirosinle kovalent olarak modifiye edildi. *p*-aminobenzoik asit polifenol oksidaz (PFO) enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanıldığı için, ligand olarak seçildi. Bu bağlamda, uzantı kolu olan tirosin, enzimi spesifik olarak bağlayan ligand kısmını oluşturmak üzere, diazolanmış *p*-aminobenzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Böylece elde edilen jel, afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak kullanılarak, *B. erythropus*'tan PFO'nun saflaştırılması işleminde kullanıldı.

#### 2.3.1. Sepharose-4B'nin CNBr ile Aktiveleştirilmesi ve *L*-Tirosin Bağlanması

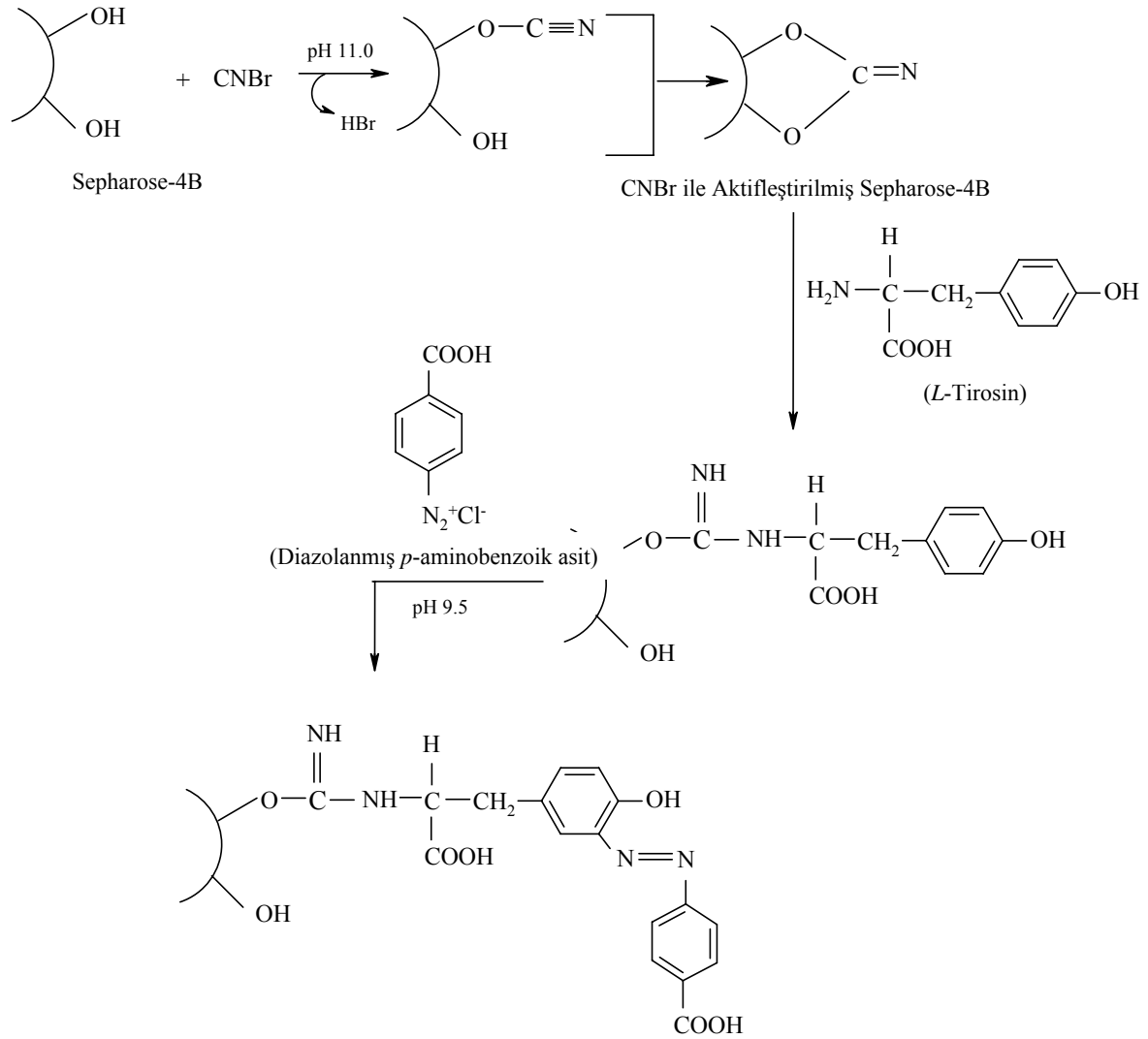
Bir beher içerisinde 10 mL Sepharose-4B'ye saf su ilave edilerek iyice yıkandı ve çökmesi için bekletildi. Çöktükten sonra üstteki sıvı kısım dekante edildi. Sepharose-4B süspansiyonuna eşit hacimde saf su ilave edildi. Bir çeker ocak içinde, karışmakta olan bu süspansiyona, 4 g CNBr katı olarak ilave edildi ve bir pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11.0'a çıkarıldı. CNBr tamamen reaksiyona girene kadar (yaklaşık 30 dakika) pH 11.0'da tutuldu ve reaksiyon tamamlandığında pH'nın 11.0'da sabit kaldığı görüldü. Çok miktarda küçük buz parçaları süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine yerleştirilen mavi banttardan süzüldü. Mavi bant üzerinde kalan kalıntı, 250 mL 0.1 M pH 10.0 olan soğuk NaHCO<sub>3</sub> tamponuyla yıkanarak süzüldükten sonra bir beher içerisine alındı. 20 mL'sinde 10 mg *L*-tirosin içeren 0.1 M konsantrasyonda ve pH'sı 10.0 olan soğuk NaHCO<sub>3</sub> tamponundan ilave edilerek, yavaşça karıştırılan bu

süspansiyondan, bağlanma verimliliğini belirlemek amacıyla, her 15 dakikada bir, içinde jel bulunmayan üstteki sıvı kısımdan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbanı değışimi izlendi. 90. dakikadan sonra absorbanıta önemli bir farklılık olmadığı için, bağlanma reaksiyonu 90 dakika olarak belirlendi. Böylece *L*-tirosinin, CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B matriksine bağlanmış olduğu belirlendi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyon bir buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, süzütüsü 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen *L*-tirosin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Mavi bant üzerinde kalan katı kısım, 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponuyla da yıkanarak aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Böylece, sentezlenen sepharose-4B-*L*-tirosin, ligandın bağlanması için hazır hale getirildi (Arslan vd., 2004).

### **2.3.2. *L*-Tiroşinle Modifiye Edilen Sepharose-4B'ye *p*-aminobenzoik Asidin Bağlanması**

25 mg *p*-aminobenzoik asit, bir buz banyosunda soğutulan 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü ve buz banyosunda bırakıldı. 75 mg NaNO<sub>2</sub>, yine buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözümlenerek *p*-aminobenzoik asit çözeltisi üzerine damla damla ilave edildi. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen reaksiyon sonunda, diazolanmış halde bulunan *p*-aminobenzoik asit, 40 mL sepharose-4B-*L*-tirosin süspansiyonuna ilave edildi. 4 M NaOH ile pH 9.5'e çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, önce 1 L saf su ile ve ardından 200 mL 0.01 M pH 6.0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan vd., 2004).

Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi, *L*-tirosin ile modifiye edilmesi ve *p*-aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyonlar Şekil 14'de verilmiştir:



Şekil 14. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları

#### 2.4. Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli,  $1 \times 15$  cm boyutlarındaki kolona bir mikropipet yardımıyla damla damla ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yüklendi. Jel, yıkama ve dengeleme tamponu olan 50 mM pH 5.0 asetat tamponu ile, kolonun üstünden ilave edilen ve kolonun altından toplanan tamponun, 280 nm'de absorbans değerleri birbirine eşit oluncaya kadar yıkandı ve bu şekilde dengelendi. Asetonla çöktürülen ve dengeleme tamponu olan 50 mM pH 5.0 asetat tamponunda çözülen enzim özütü, dengelenen kolona tatbik edildi ve yine yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Böylece, PFO'nun büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve enzim özütünde var olan diğer proteinlerle diğer maddeler ortamdandır.

uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra, elüsyon tamponu olan ve içerisinde 1 M NaCl içeren 50 mM pH 8.0 fosfat tamponu ile, 4'er mL halinde tüplere enzim elüatı toplandı. Enzim elüatının toplandığı her bir tüpte 280 nm'de protein tayini ve 496 nm'de 4-metil katekol substratı ile aktivite tayini yapıldı.

## 2.5. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Afinite kromatografisi sonrasında elde edilen her bir tüpte PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 496 nm'de 4-metil katekol için ve 500 nm'de diğer bütün substratlar için, absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995). Substratın (stok, 100 mM) hacmine eşit hacimde (stok, 10 mM) MBTH ile 20 µL DMF içeren reaksiyon karışımı, tampon çözelti ile belli bir hacme tamamlandıktan sonra, saf enzim elüatından belli hacimde katılıp reaksiyon karışımının nihai hacmi 1000 µL olacak şekilde hazırlandı. Saf enzim elüatının katılmadığı reaksiyon karışımı ise kör olarak kullanıldı.

Bir ünite PFO aktivitesi; 1 mL reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0.001 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak, PFO'nun spesifik aktivitesi ise; 1 mg protein başına aktivite (ünite) olarak tanımlandı (Galeazzi ve Sgarbieri, 1981).

## 2.6. Protein Tayini

Protein tayini, Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albumin çözeltisi kalibrasyon grafiği için hazırlandı. Protein tayini için aşağıdaki işlemler yapıldı:

- BSA standartları, kör, enzim özü ve saflaştırılan enzim elüatı 5'er mL Lowry C belirteci ile karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 0.5 mL Lowry D belirteci hızla tüplere eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 30 dakika karanlıkta bekletildi.
- 660 nm'de absorbanslar ölçüldü.
- BSA standartları ile kalibrasyon grafiği çizildi.
- Kalibrasyon grafiği yardımıyla enzim özütü ve saf enzim elüatının protein konsantrasyonu belirlendi.



Protein konsantrasyonu belirlenen enzim özütü ve saf enzim elüatının spesifik aktivitesi hesaplanarak, enzimin kaç kat saflaşmış olduğu belirlendi.

## 2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Enzim özütünde ve saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, SDS'siz ve soğuk ortamda gerçekleştirilen doğal jel elektrofrez yapılarak, hem substrat hem de coomassie brilliant blue R-250 boyamayla ortaya konuldu. Doğal elektrofrez işlemi için kullanılan % 12'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli Tablo 4'teki gibi hazırlandı.

Tablo 4. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinin bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1.25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2.5 mL	---
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf Su	3.4 mL	6.97 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

Elektrofrez cam plakaları saf su ve etil alkol ile iyice temizlendikten sonra, plakalar arasına aralık oluşturmak için plastik aparatı yerleştirildi ve cam plakalar bir kısıkaçla tutturuldu. Tablo 4'te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli, plakalar arasına üst yüzeye 2-3 cm kalana kadar bir mikropipet yardımıyla, jel içerisinde hiçbir hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olması ve kurumaması için, jel yüzeyine saf su koyuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, üst yüzeydeki saf su döküldü ve üst yüzey Tablo 4'te belirtildiği gibi hazırlanan yükleme jeli ile tamamen doldurularak, tarak hemen yükleme jeline yerleştirildi. Böylece plakalar arasında

hazırlanan jel, donduktan sonra tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, doğal elektroforez yürütme tamponuyla dolduruldu ve buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Doğal elektroforez yükleme boyası ile karıştırılan ve 15-20 µg protein içeren örnekler, jelin bir tarafında ham enzim özütü ve saf enzim elüatı, diğer tarafında ise sadece enzim elüatı olacak şekilde Hamilton şırıngasıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve boyama işlemine geçildi.

### **2.7.1. Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyaması**

Doğal elektroforez sonucu sistemden çıkartılan ve bir tarafında ham enzim özütü ve saf enzim elüatı, diğer tarafında ise, sadece enzim elüatı bulunan jel, ortadan ikiye bölünerek, jelin bir tarafı Tablo 3'te belirtildiği gibi hazırlanan substrat boyama çözeltisi (L-DOPA), diğer tarafı da coomassie brilliant blue R-250 boyama çözeltisi içerisinde hafifçe çalkalanarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için, substrat boyası ile boyanan jel, 1 mM'lık askorbik asit çözeltisiyle, coomassie brilliant blue R-250 boyama çözeltisiyle boyanan jel ise, Tablo 3'te belirtildiği gibi hazırlanan boya uzaklaştırma çözeltisiyle yaklaşık 2-3 saat muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

### **2.8. SDS Jel Elektroforezi**

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli % 12'lik ve yükleme jeli % 5'lik olacak şekilde Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) yapıldı.

Tablo 5. SDS jel elektroforezinin bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1.25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2.5 mL	---
% 10 SDS	0.1 mL	0.1 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf Su	3.3 mL	6.87 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

Temizlenen cam plakalar arasına dökülen ayırma jeli donduktan sonra yükleme jeli döküldü. Hazırlanan jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tank, Tablo 3'te belirtildiği şekilde hazırlanan SDS yürütme tamponuyla dolduruldu. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde protein miktarı 15-20 µg olacak şekilde SDS yürütme boyası (Tablo 3) ile karıştırıldı. Örnekler, 95 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, Hamilton şırıngasıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve Tablo 3'te belirtildiği gibi hazırlanan boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak yaklaşık 2 saat boyandı. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise, boya uzaklaştırma çözeltisiyle (Tablo 3) yaklaşık 2-3 saat muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jel, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

## 2.9. Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar

PFO'nun kinetik özelliklerini araştırmak için, belirlenen en iyi substratı kullanılarak, optimum pH ve sıcaklık değerleri, ısı ve pH kararlılığı, protein miktarı ve metal

iyonlarının aktivite üzerine etkisi,  $V_{maks}$ ,  $K_m$  değerleri ve bilinen bazı inhibitörleri kullanılarak  $I_{50}$  değerleri tayin edildi.

### **2.9.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

PFO aktivitesi, pH'nın bir fonksiyonu olarak, 50 mM sitrat fosfat tamponunda pH 3.0; 50 mM asetat tamponunda pH 4.0-5.0; 50 mM fosfat tamponunda pH 6.0-7.0 ve 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8.0-9.0 değerleri arasında, difenolik substrat olarak 4-metilkatekol kullanılarak belirlendi. Bu substrat varlığında belirlenen optimum pH, substrat özgünlüğünün, ısıl özelliklerinin ve diğer parametrelerin belirlenmesi için kullanıldı (Colak vd., 2005).

### **2.9.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10 °C'lik artışlarla 0-80 °C aralığında incelendi. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım, 0-10 °C aralığında soğutmalı inkübatörde, 20-80 °C aralığında ise Thermoblok'ta 5 dakika inkübe edildi. PFO aktivitesi, karışıma MBTH, DMF ve saf enzim elüatı ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ölçüldü ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek optimum sıcaklık belirlendi (Dinçer vd., 2003).

### **2.9.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi**

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere, PFO aktivitesi, 4-metilkatekol substratı varlığında, enzimin 0.5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında ölçüldü ve elde edilen verilere göre PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi irdelendi (Kolcuoğlu vd., 2007).

### **2.9.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Optimum pH'sı belirlenen PFO'nun aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, 100 mM stok 4-metilkatekol substratı hazırlandı. Nihai

konsantrasyonu 0.0625-20 mM aralığında değişen substrat çözeltisi, aktivite tayininde kullanılan diğer çözeltiler ve uygun konsantrasyonda PFO içerecek şekilde optimum pH'da reaksiyon karışımı hazırlandı ve 496 nm'de ölçümler yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten grafiği çizilerek optimum substrat konsantrasyonu belirlendi. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ), her biri için doğrusal eğrinin x- ve y- eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineaweaver ve Burk, 1934).

### 2.9.5. Hill Eğrisi

4-metilkatekol substratı varlığında, değişen substrat konsantrasyonlarına (0.0625-20 mM) karşılık bu substrat konsantrasyonlarındaki hız ( $V$ ) ve  $V_{maks}$  değeri kullanılarak  $V/(V_{maks}-V)$  oranının logaritması alınarak çizilen Hill grafiğinden, 4-metilkatekol substratı için substrat bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativite olup olmadığı tespit edildi.

### 2.9.6. Polifenol Oksidaz'ın pH Kararlılığı

pH kararlılığını incelemek için, elde edilen saf enzim elüatı, 50 mM konsantrasyonundaki pH 3.0 sitrat-fosfat tamponu, pH 4.0-5.0 asetat tamponu, pH 6.0-7.0 fosfat tamponu ve pH 8.0-9.0 Tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 4 °C'de 24 saat ve 120 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bu enzim-tampon karışımlarından, uygun miktarda nihai enzim konsantrasyonu içerecek şekilde alınarak, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivitesi ölçüldü. Ayrıca enzim, inkübasyona tabi tutulmadan, aynı tamponlar içerisindeki karışımı hazırlanır hazırlanmaz hemen aktivitesi ölçüldü ve enzimin yüzde kalan aktivitesi belirlendi (Özen vd., 2004).

### 2.9.7. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

PFO'nun ısıl kararlılığının belirlenmesi için, saf enzim elüatından içerisinde uygun miktarda enzim içerecek şekilde ependorf tüplerine alınarak, 10 °C'lik artışlarla, 0-10 °C aralığında soğutmali inkübatörde ve 20-80 °C aralığında da Thermoblokta, saatte bir ölçüm alınmak suretiyle toplam 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında saf enzim

elüatı oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivite ölçüldü. % Kalan aktivite, inkübasyona tabi tutulmayan saf enzim elüatının aynı şartlardaki aktivitesiyle karşılaştırılarak hesaplandı (Colak vd., 2005).

Isıl kararlılık grafiğinden elde edilen sonuçlar, *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO aktivitesinin bazı termodinamik parametrelerle ilişkisini analiz etmek üzere kullanıldı. Bu sıcaklık uygulamalarından yararlanılarak reaksiyon için sıcaklığa bağımlı bazı sabitler hesaplandı (Özen vd., 2004).

*B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun, her bir sıcaklıktaki hız sabitleri ( $k$ ) aşağıdaki eşitlik (1) ile hesaplandı.

$$k = -\frac{1}{\text{zaman (saniye)}} \times \ln(\Delta t / \Delta o) \quad (1)$$

$k$  : Hız sabiti

$\Delta t$ : Kalan aktivite

$\Delta o$ : Isıtma işleminden önceki aktivite

Enzimin aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), her bir sıcaklığın Kelvin cinsinden değerlerinin tersine karşılık her bir sıcaklıktaki  $\ln k$  değerlerinin grafiğe geçirilmesinden elde edilen eğimin,  $-E_a/R$ 'ye ( $R$ , ideal gaz sabiti,  $8.314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ ) eşitlenmesiyle hesaplandı.

Enzimin her bir sıcaklıktaki serbest enerji değişimleri ( $\Delta G^\#$ ) aşağıdaki eşitlik (2) ile hesaplandı.

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

$\Delta G^\#$  : Serbest enerji

$R$  : İdeal gaz sabiti

$T$  : Sıcaklık ( $^\circ\text{K}$ )

$k$  : Hız sabiti

$K$  : Boltzmann sabiti ( $1.3806 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$ )

$h$  : Planck sabiti ( $6.6261 \times 10^{-34} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$ )

Enzimin her bir sıcaklıktaki entalpi değişimi ( $\Delta H^\#$ ) aşağıdaki eşitlik (3) ile hesaplandı.

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

Enzimin her bir sıcaklıktaki entropi değişimi ( $\Delta S^\#$ ) aşağıdaki eşitlik (4) ile hesaplandı.

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

### **2.9.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi**

PFO aktivitesine inhibitör etkisi, substrat olarak 4-metilkatekol, inhibitör olarak PFO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit (0.03-0.25 mM), sodyummetabisülfid (0.02-0.125 mM), benzoik asit (2-16 mM) ve sodyum azid (1-40 mM) kullanılarak belirlendi. Optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda, 4-metilkatekolün oksidasyonunun inhibisyon sonrasında kalan yüzde aktivitesine karşılık, inhibitör konsantrasyonundan çizilen grafikten, % 50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu,  $I_{50}$  değeri olarak belirlendi (Colak vd., 2005).

### **2.9.9. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi**

PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek üzere, reaksiyon ortamına, nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde, bazı 1A, 2A, 3A ve geçiş metalllerinin klorür tuzlarından hazırlanan çözeltilerinden eklendi ve PFO aktivitesi ölçüldü (Kolcuoğlu vd., 2007).

### **2.10. Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkinlığının İncelenmesi**

Polifenol oksidazın bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkinlığını incelemek üzere, toluen, diklorometan ve dikloroetan organik çözücü olarak seçildi. Tüm organik

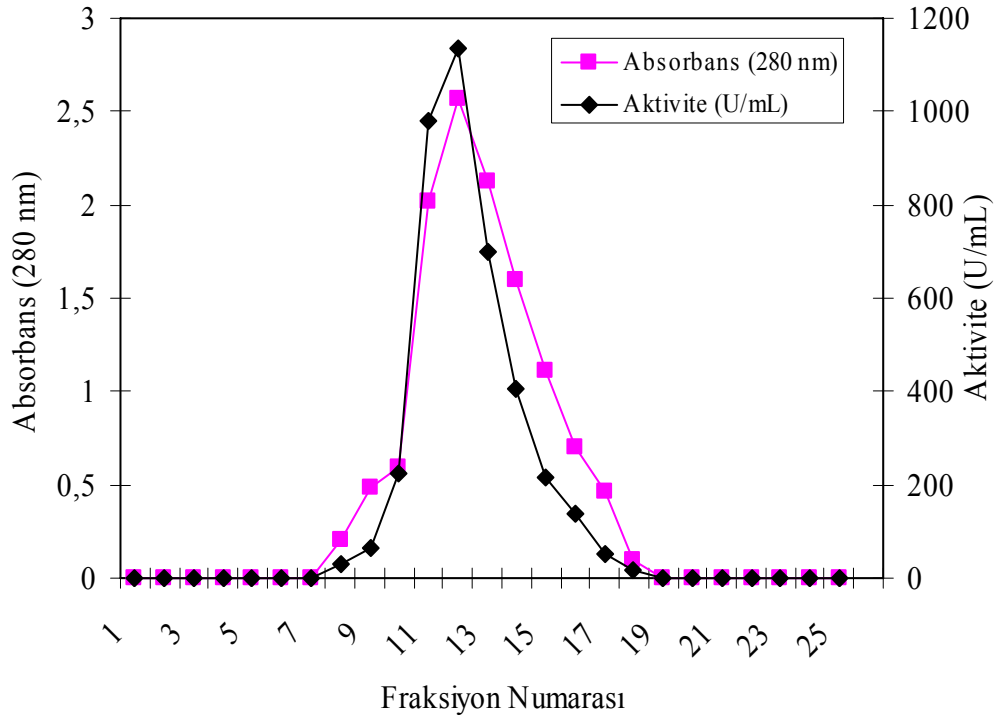
Çözücüler, susuz sodyum sülfatla bir gece kurutuldu. Reaksiyon karışımı, kateşinin metanolde hazırlanan 400 mM stok çözeltilisinden 5 µL ve saf enzim elüatından uygun miktarda içerecek şekilde hazırlanıp, hacmi organik çözücüyle 200 µL'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı 25 °C'de vorteksle 5 dakika karıştırıldı ve enzimatik reaksiyonu durdurmak için, reaksiyon ortamına 200 µL aseton ilave edildi. Saf enzim elüatının haricindeki tüm bileşenleri içeren bir kör hazırlanıp, aynı sürede aynı işlemlere tabi tutuldu. Toluen, diklorometan ve dikloroetan reaksiyon ortamında PFO katalizli son ürünlerin renk şiddeti, spektrofotometrik olarak ölçüldü. 330-700 nm arasındaki absorbans değişimi, enzim katalizli ve enzim bulunmayan reaksiyon karışımları için izlendi (Kermasha vd., 2001).



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sepharose 4-B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit jeli sentezlenerek yapılan afinite kromatografisi sonucu, toplanan elüatlardan oluşturulan fraksiyonlar için, 280 nm’de protein miktarı ve 496 nm’de PFO aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi (Şekil 15). Grafikte enzim aktivitesi tek bir pik göstermektedir ve bu pike karşılık gelen fraksiyonlardan saf PFO toplanmıştır.



Şekil 15. Afinite kromatografisi ile *Boletus erythropus*'tan PFO'nun saflaştırılması

1'den 25'e kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine gelen elüatlar 4'er mL halinde toplandı. Saflaştırılan PFO'yu içeren fraksiyonlar birleştirilerek, elde edilen saf enzim elüatında ve ham enzim özütü çözeltisinde Lowry yöntemiyle toplam protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim elüatında 0.40 mg/mL ve ham enzim özütünde ise

3.8 mg/mL protein miktarı belirlendi. Bu değerler kullanılarak saflaştırılan PFO'nun ve ham enzim özütünde bulunan PFO'nun spesifik aktivitesi hesaplanarak, enzimin kaç kat saflaşmış olduğu belirlendi. Tablo 6'da verildiği gibi ham enzim özütünde PFO'nun spesifik aktivitesi 63.2 U/mg protein iken, saf enzimin spesifik aktivitesi 1800 U/mg protein olarak bulundu. Elde edilen bu sonuçlardan enzimin 28.5 kat saflaşmış olduğu belirlendi.

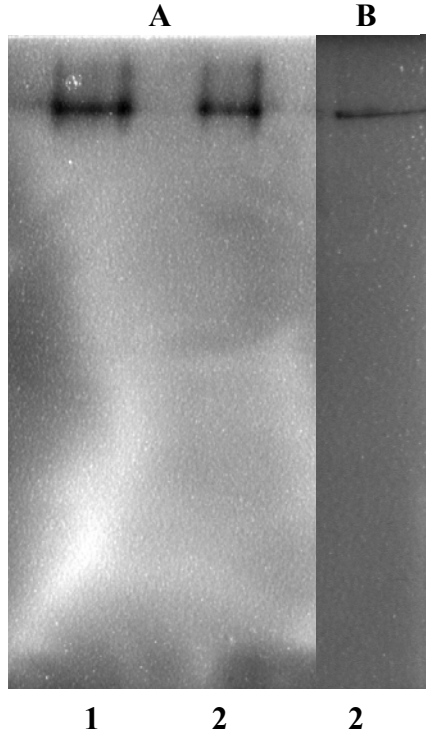
Tablo 6. PFO'nun *B. erythropus*'tan saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Aktivite (U/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Kat Sayısı
Ham Enzim Özütü	240	3.80	63.2	-
Saf Enzim Elüatı	720	0.40	1800	28.5

### 3.2. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.2.1. Polifenol Oksidazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu

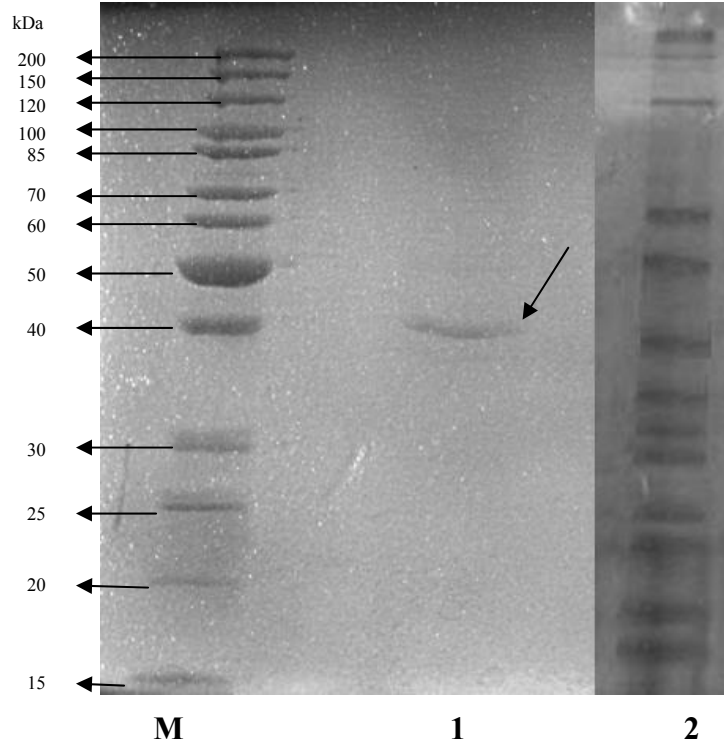
Hazırlanan enzim özütünde ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen saf enzim elüatında, polifenol oksidazın varlığı yapılan doğal elektroforezle ortaya konuldu. SDS'siz ve soğuk ortamda yapılan doğal elektroforezde, jelin bir tarafına enzim özütü ve saf enzim elüatı, diğer tarafına ise sadece saf enzim elüatı yüklendiği için, doğal elektroforez sonrasında jel ortadan ikiye bölündü ve bir tarafı substrat boyama çözeltisi (*L*-DOPA) ve diğer tarafı ise coomassie brillant blue R-250 boyama çözeltisiyle boyandı. Oluşan bantlar jel görüntüleme cihazında kaydedildi (Şekil 16).



Şekil 16. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi  
**A:** Substrat Boyama  
**B:** Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama  
**1:** Ham Enzim Özütü  
**2:** Saf Enzim Elüatı

Doğal elektroforez sonucunda, Şekil 16. A'da substrat boyaması ile hem enzim özütünde hem de yapılan afinite kromatografisi sonucunda elde edilen saf enzim elüatında, bir bandın gözlenmesi, *B. erythropus*'ta polifenol oksidazın varlığını göstermektedir. Şekil 16. B'de yapılan coomassie brilliant blue R-250 boyama ile, saf enzim elüatında tek bir protein olduğu ve bunun da Şekil 16. 2'de substrat boyamasıyla polifenol oksidaza ait olduğu ortaya konmuştur.

Ayrıca doğal elektroforeze ilave olarak, SDS'li ortamda yapılan elektroforezle, hem ham enzim özütünde hem de afinite kromatografisi sonucunda elde edilen elüatta, yaklaşık 40 kDa'lık bir protein bandı gözlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. SDS poliakrilamid jel elektroforezi

**M:** Protein Standartları

**1 :** Saf PFO

**2 :** Ham Enzim Özütü

### 3.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

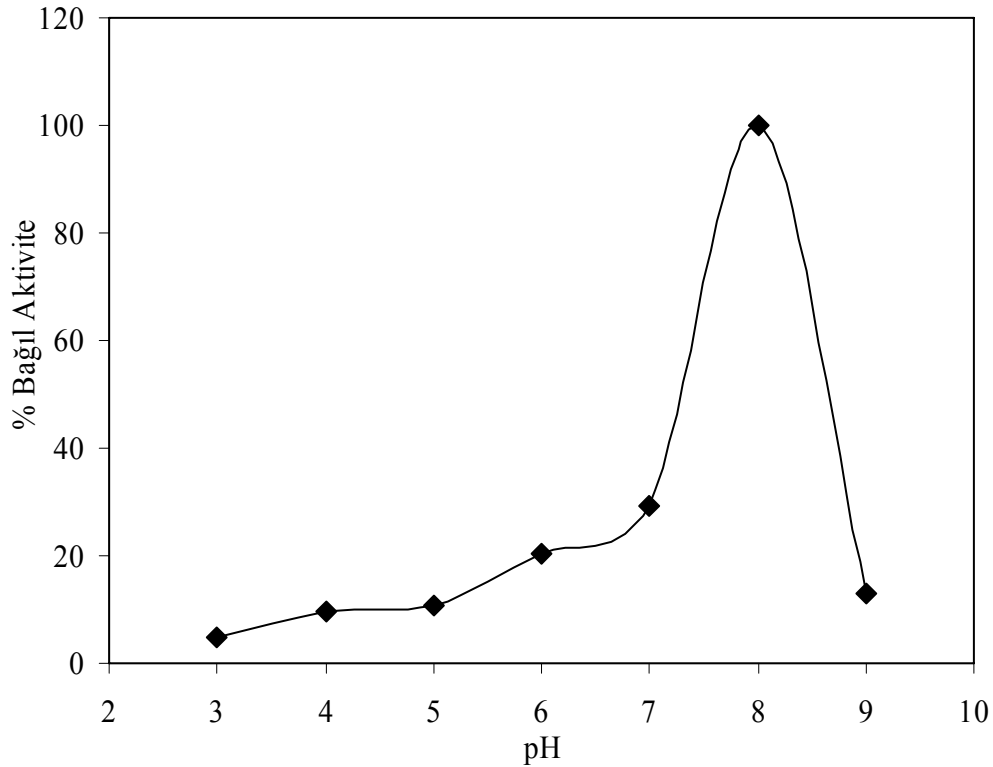
Afinite kromatografisi ile saflaştırılan *B. erythropus* PFO'su için kullanılan 4-metilkatekol, katekol, *L*-DOPA, DHPPA ve *L*-tirosin substratları içerisinde, enzim en iyi aktiviteyi 4-metilkatekol varlığında gösterdi. Yapılan tüm biyokimyasal çalışmalarda da substrat olarak 4-metilkatekol kullanıldı.

*B. erythropus*'tan hazırlanan ham enzim özütünden, sentezlenen bir afinite jeli ile yapılan afinite kromatografisi sonrasında saflaştırılan PFO'nun detaylı bir şekilde karakterizasyonu için, aktivite üzerine pH, sıcaklık, protein konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, metal iyonu ve inhibitörlerin etkisiyle, pH ve ısıl kararlılığı incelendi.

#### 3.2.2.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

*B. erythropus*'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek üzere, pH 3.0-9.0 değerleri arasında hazırlanan

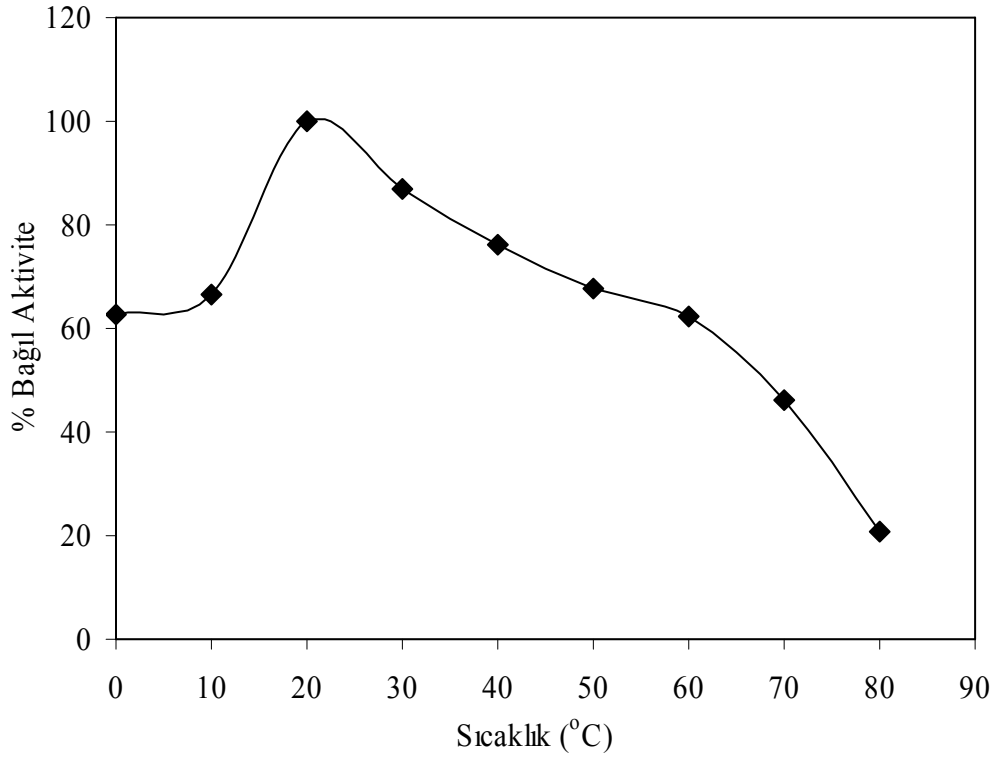
tamponlar kullanılarak, bu her bir pH'da enzimin aktivitesi 4-metilkatekol substratı varlığında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiğinden enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 8.0 olarak belirlendi (Şekil 18). Enzimin asidik pH değerlerinde aktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Elde edilen bu grafikte, tek bir pikin varlığı enzimin kararlı bir şekilde saflaştırıldığını da desteklemektedir.



Şekil 18. *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO aktivitesinin pH ile değişimi

### 3.2.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

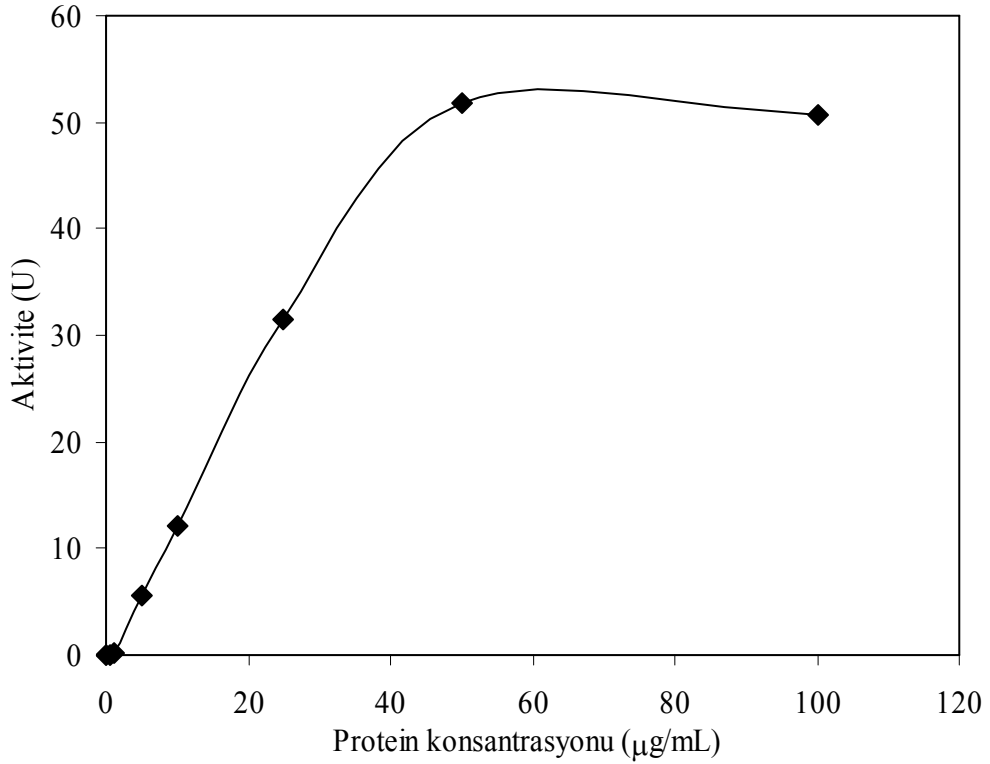
*B. erythropus*'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun, sıcaklık değişiminin aktivite üzerine etkisini incelemek suretiyle, en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek üzere, 0-80 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla enzim aktivitesi ölçülerek, sıcaklık - % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 19). 0-10 °C aralığında enzim aktivitesi % 60 civarında iken, 20-40 °C aralığında enzim aktivitesini % 70'in üzerinde korumuştur. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ise 20 °C'dir. 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesi giderek azalmıştır ve 80 °C'de, enzim, aktivitesinin % 80'ini kaybetmiştir.



Şekil 19. *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

### 3.2.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

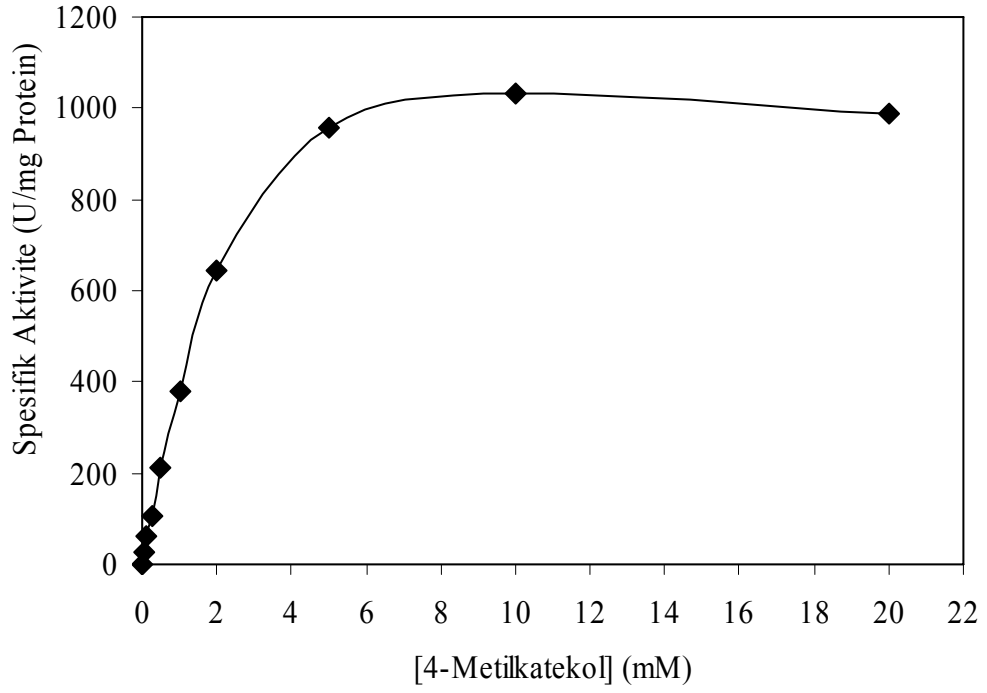
*B. erythropus*'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun aktivitesi, sabit 4-metilkatekol konsantrasyonunda, proteinin 0.5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aralığındaki konsantrasyon değişimine bağlı olarak incelendi. Elde edilen hiperbolik eğriden maksimum PFO aktivitesi için optimum enzim konsantrasyonu 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak belirlendi (Şekil 20).



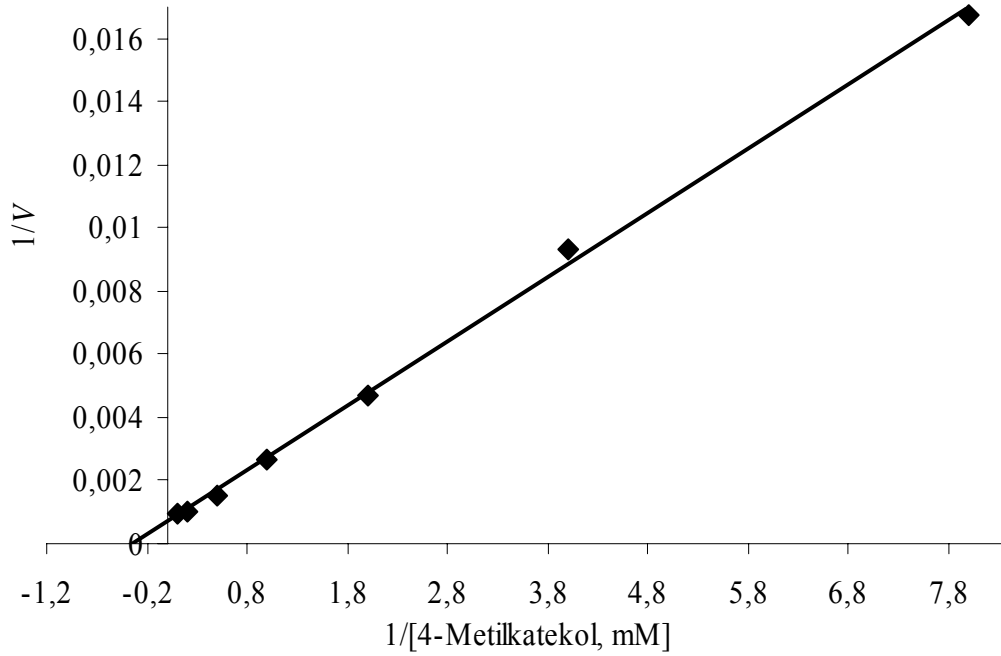
Şekil 20. PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

#### 3.2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

*B. erythropus* PFO'suna ait bazı kinetik verilerinin belirlenmesi amacı ile, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0.0625-20 mM aralığında değişen substrat varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi 496 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrisi çizildi (Şekil 21). Çizilen bu grafikten, saflaştırılan bu enzimin aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve etkin bir enzim aktivitesinin gözlenebilmesi için 4-metilkatekol konsantrasyonunun 10 mM olması gerektiği tespit edildi. Kinetik veriler olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden sırasıyla, 2.8 mM ve 1428.6 U/mg protein olarak belirlendi (Şekil 22).



Şekil 21. 4-metilkatekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi

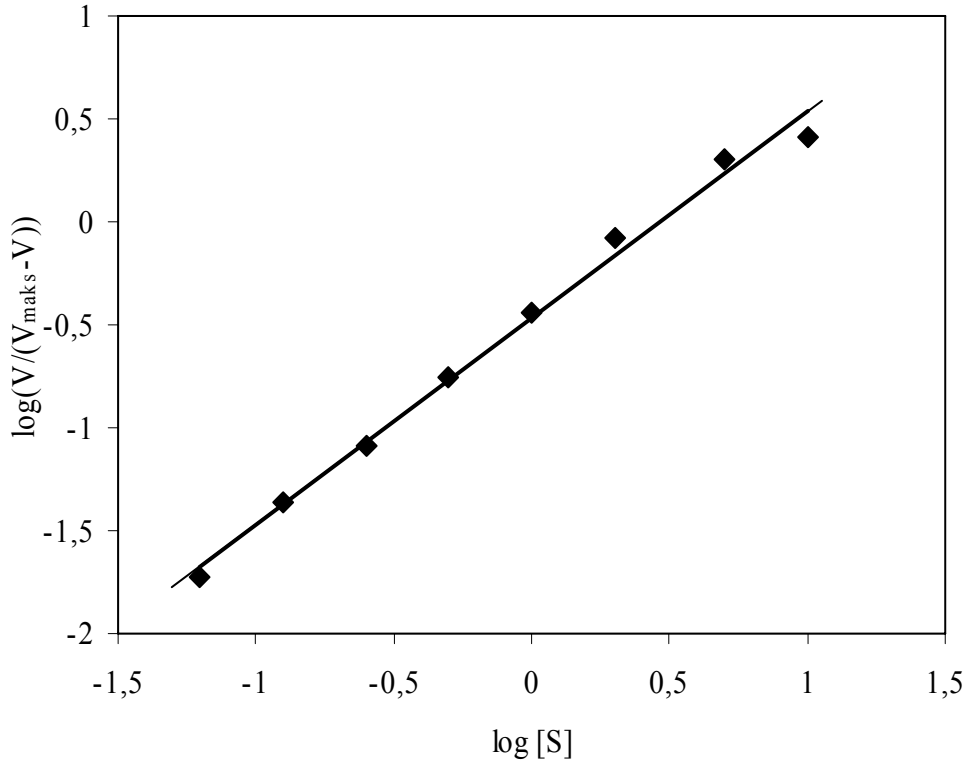


Şekil 22. 4-metilkatekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği



### 3.2.2.5. Hill Eğrisi

Hill eşitliğinden yararlanılarak çizilen ve 4-metilkatekol substratına ait olan Hill eğrisi Şekil 23'te verilmiştir. Bu substrat için, PFO üzerindeki substrat bağlanma bölgesinin sayısı ve bir kooperativitenin olup olmadığı belirlendi. Hill grafiğinde 4-metilkatekole ait doğrunun eğiminden, Hill sabiti ( $h$ ) 1.0 olarak hesaplandı. Bu da enzimin, tek bir substrat bağlanma bölgesinin olduğunu ve bir kooperativite olmadığını göstermektedir.

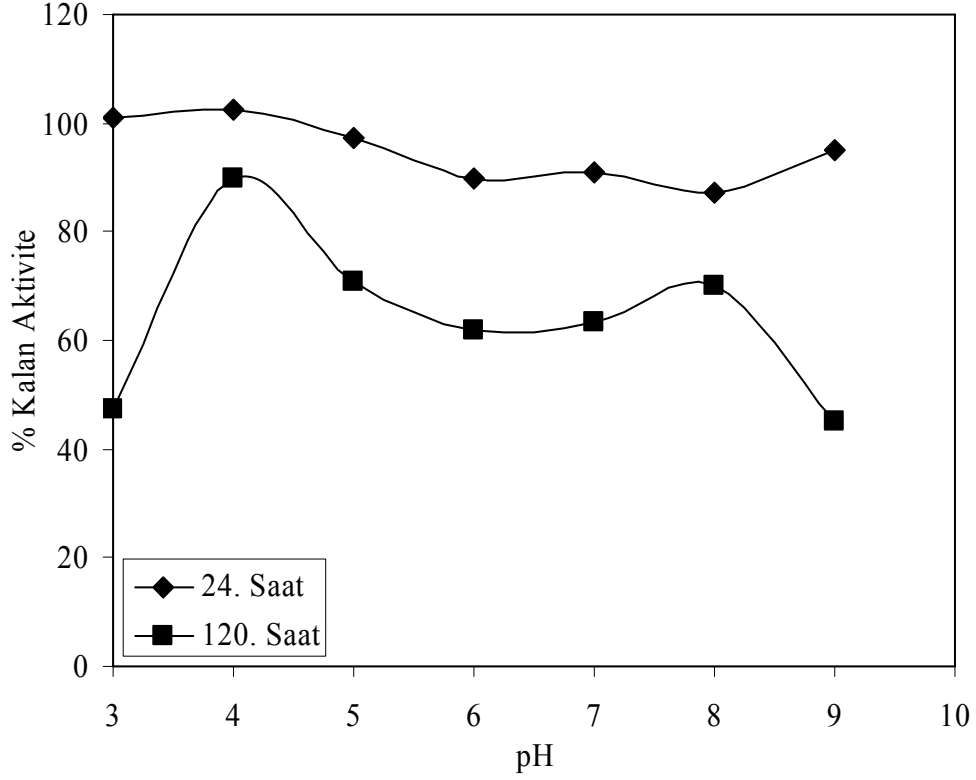


Şekil 23. 4-metilkatekol varlığında elde edilen Hill eğrisi

### 3.2.2.6. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

*B. erythropus*'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun pH kararlılığını incelemek için, enzim pH 3.0-9.0 aralığındaki farklı tamponlar içerisinde, 4 °C'de 24 saat ve 120 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi. Şekil 24'te görüldüğü gibi, enzim belirtilen pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında,

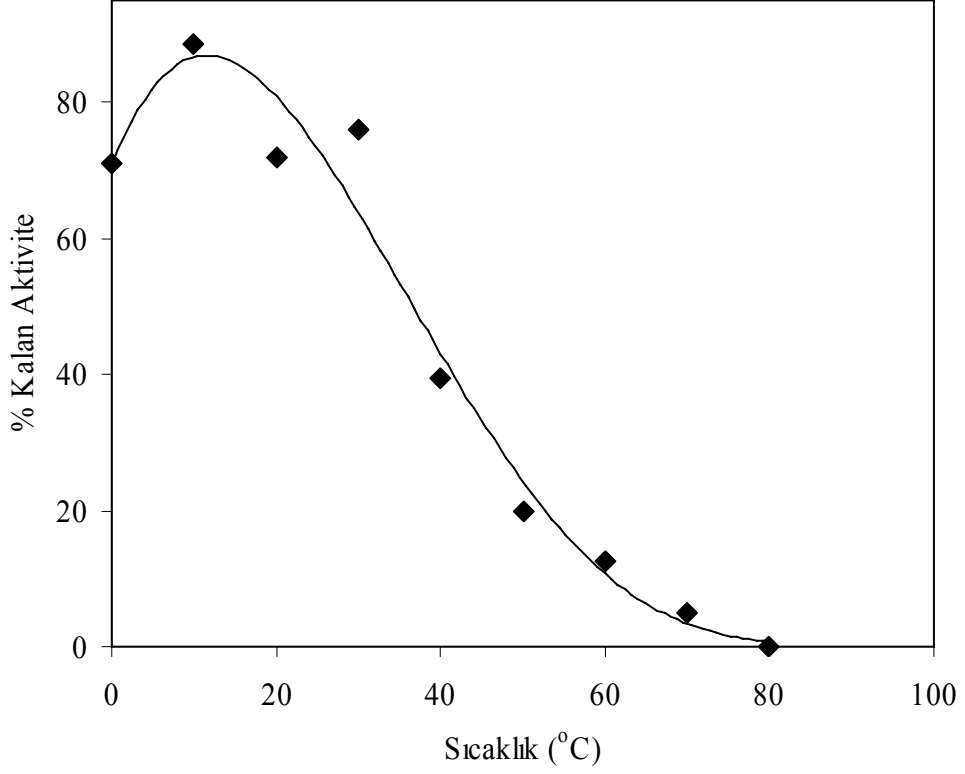
aktivitesini % 85'in üzerinde korumuştur. 120 saatlik inkübasyon sonunda ise, enzimin aktivitesini % 60'ın üzerinde koruduğu, pH 9.0 da ise yaklaşık % 60 aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir.



Şekil 24. *B. erythropus* PFO'sunun pH kararlılığı

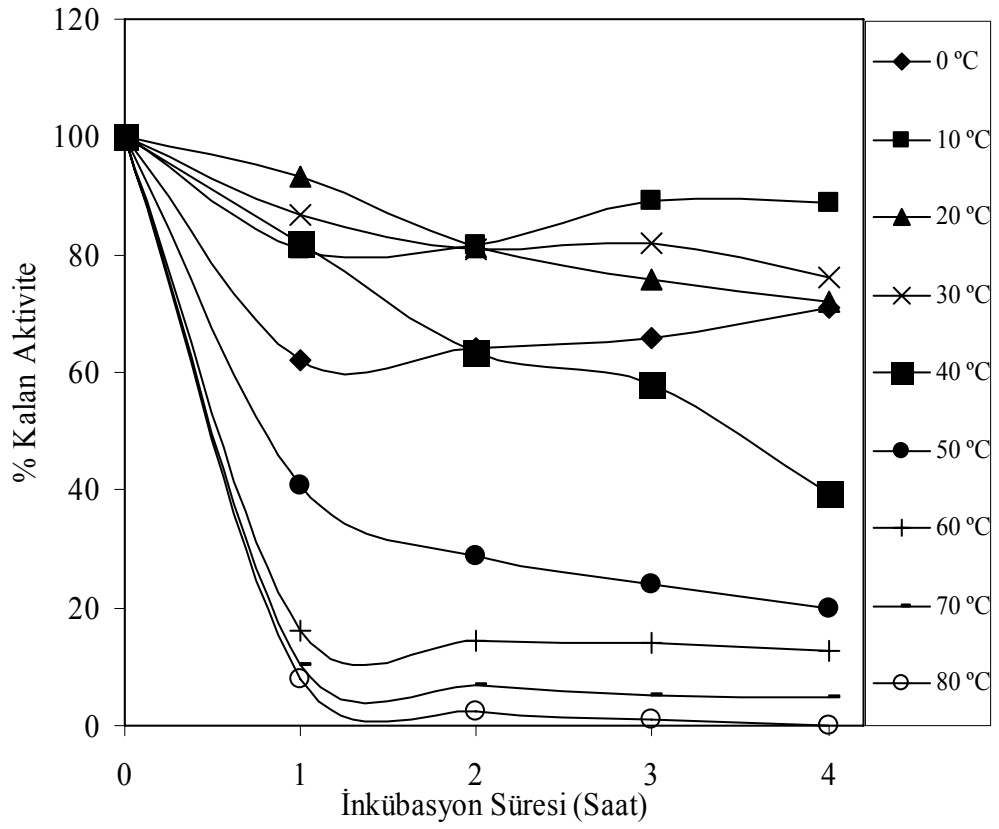
### 3.2.2.7. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

*B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun, 0-80 °C aralığında, 10 °C'lik artışlarla 4 saat inkübasyonundan sonraki, 4-metilkatekol substratı varlığında tipik bir ısıl kararlılık grafiği Şekil 25'te verilmiştir.



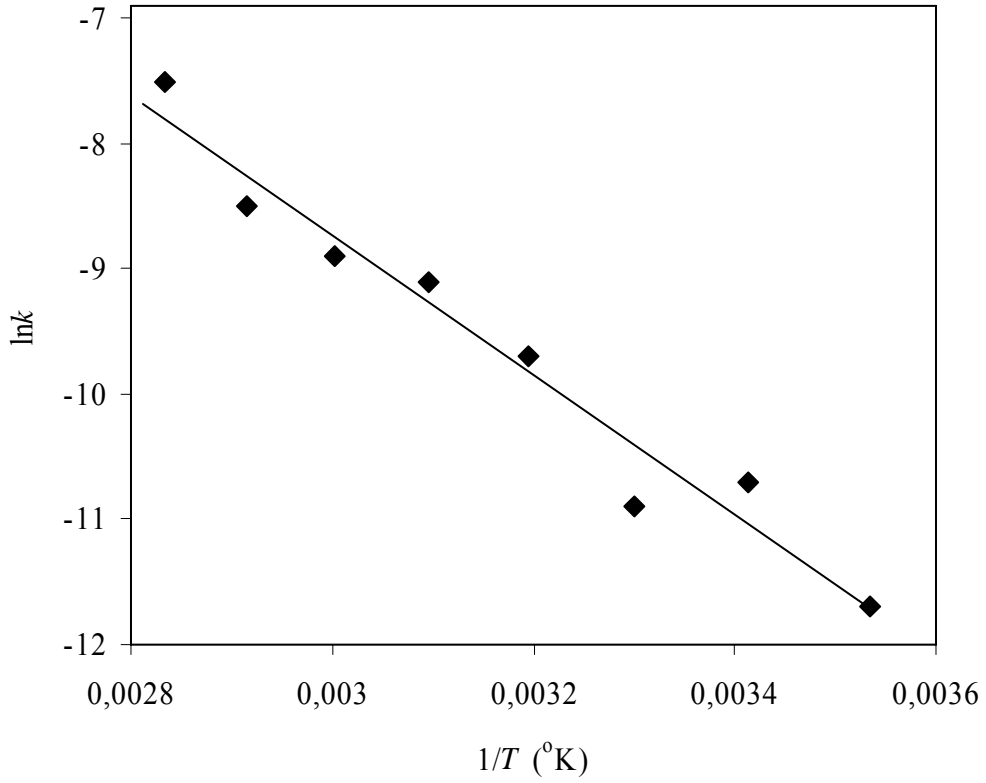
Şekil 25. PFO'nun 4 saat sonunda ısıl kararlılık eğrisi

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla, enzim 0-80 °C aralığında, 10 °C'lik artışlarla 1 saat zaman aralıklarında aktivite ölçmek suretiyle 4 saat inkübe edildi. Elde edilen sonuçlarda, enzimin aktivitesini 10-30 °C aralığında, 4 saat inkübasyon sonunda % 70'in üzerinde koruduğu görülmüştür. 40 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini % 80 civarında korurken, artan inkübasyon süresinde aktivitesini giderek kaybettiği gözlemlenmiştir. 50-70 °C aralığında, enzim aktivitesini 1 saatlik inkübasyonda % 50'nin üzerinde kaybetmiştir. 80 °C'de ise, 1 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesi % 10'un altına düşmüş ve inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun ısı kararlılığının zamanla değişimi

*B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun, 0-80 °C sıcaklık aralığındaki davranışlarından yola çıkılarak, enzimin (1) eşitliği yardımıyla bulunan hız sabiti ( $k$ ) değerlerinin logaritması ile sıcaklık değerlerinin tersi ( $1/T$ ) arasındaki grafikten elde edilen doğrunun eğiminden, 4-metilkatekol oksidasyonunu katalizleme reaksiyonuna ait aktiflenme enerjisi ( $E_a$ )  $46444 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$  olarak bulundu (Şekil 27).



Şekil 27. Enzimin farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerinden yararlanarak aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

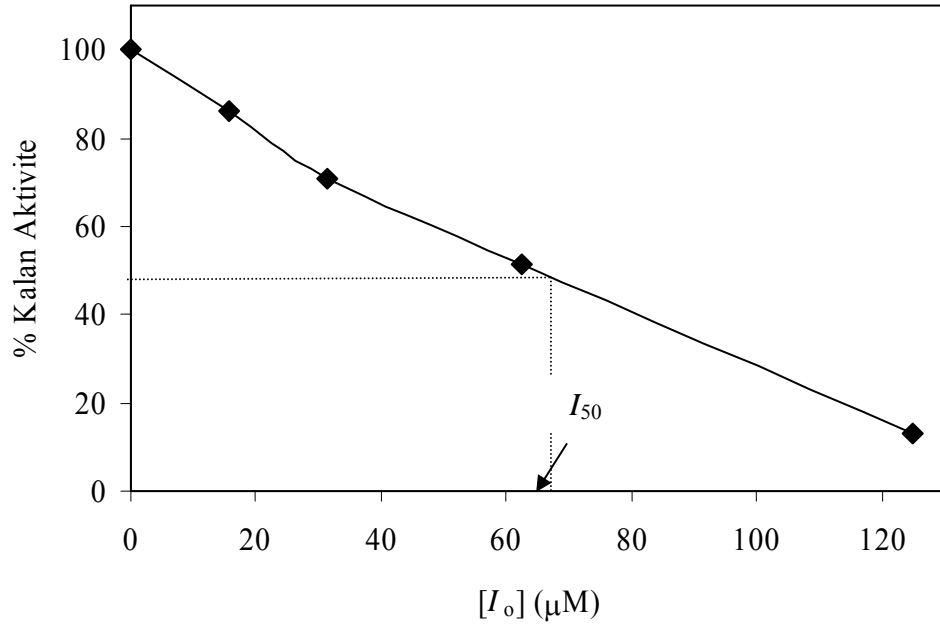
*B. erythropus* PFO aktivitesinin bazı termodinamik parametrelerle ilişkisini analiz etmek üzere, PFO'nun her bir sıcaklıkta hesaplanan hız sabiti ( $k$ ) ile diğer termodinamik parametreler olan  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  ve  $\Delta S^\ddagger$  sırasıyla (2, 3 ve 4) eşitlikleri kullanılarak hesaplandı (Tablo 7). PFO'nun 4-metilkatekol oksidasyonu reaksiyonu için elde edilen termodinamik parametreler, artan sıcaklık değerleri ile beraber küçük miktarlarda değişmesine rağmen ortalama değerler olarak  $\Delta G^\ddagger$  için 12 kJ/mol,  $\Delta H^\ddagger$  için 43 kJ/mol ve  $\Delta S^\ddagger$  için ise  $-277 \text{ J/K}^{-1} \times \text{mol}$  bulundu.

Tablo 7. PFO'nun katalizlediği reaksiyon için hesaplanan termodinamik değerler

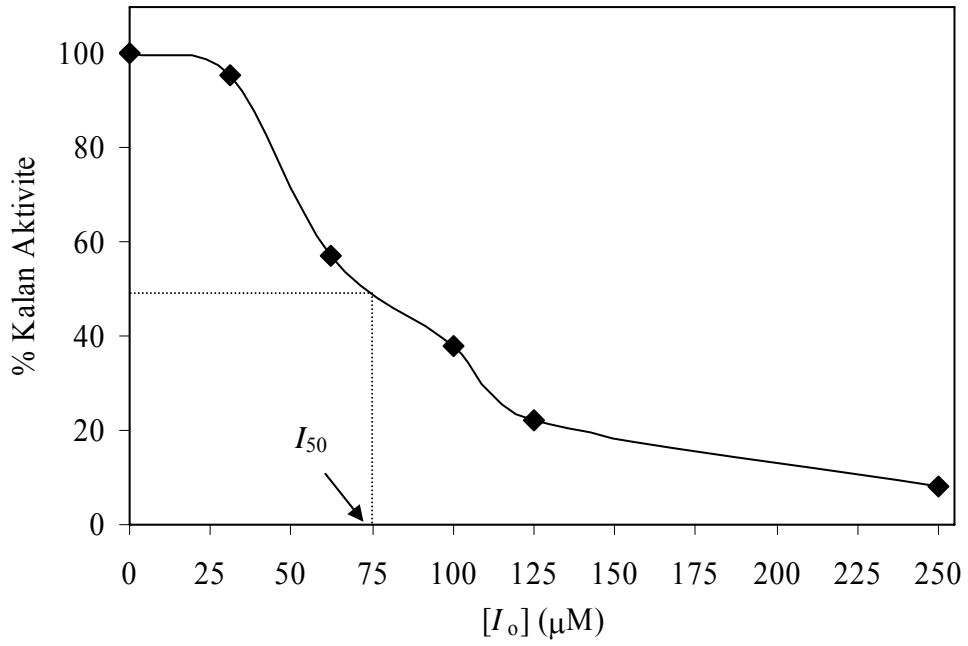
Sıcaklık (°C)	$k$ (s <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\ddagger$ (J×mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\ddagger$ (J×mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (J×K <sup>-1</sup> ×mol <sup>-1</sup> )
0	$2,3 \times 10^{-5}$	103670	44174	-218
10	$8,4 \times 10^{-6}$	105182	44091	-216
20	$2,3 \times 10^{-5}$	111437	44008	-230
30	$1,9 \times 10^{-5}$	114844	43925	-234
40	$6,4 \times 10^{-5}$	121879	43842	-249
50	$1,1 \times 10^{-4}$	127312	43859	-259
60	$1,4 \times 10^{-4}$	132006	43675	-265
70	$2,1 \times 10^{-4}$	137210	43592	-273
80	$5,4 \times 10^{-4}$	144067	43509	-285

### 3.2.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

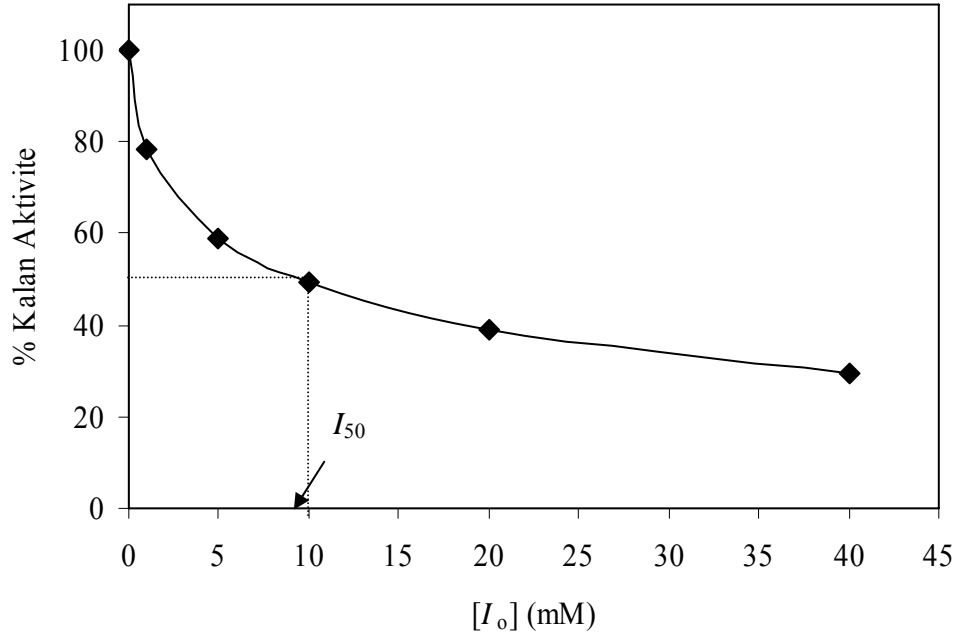
PFO için bilinen dört genel inhibitör kullanılarak, *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO üzerine bu inhibitörlerin etkisi incelenmiştir. Her bir inhibitörün, inhibitör konsantrasyonuna karşılık enzimin inhibisyon sonrasında % kalan aktivitesi grafiğe geçirilerek elde edilen eğriden, enzimin % 50 aktivitesinin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu  $I_{50}$  değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 28, 29, 30, 31).



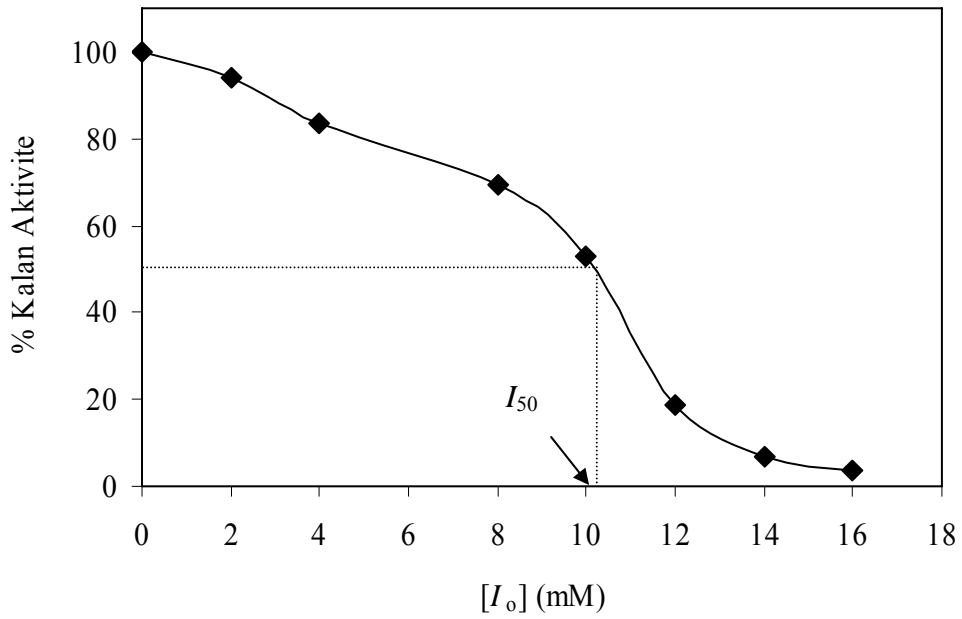
Şekil 28. PFO'nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 29. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 30. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 31. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi

Bulunan  $I_{50}$  değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Her bir inhibitör durumunda gözlenen inhibisyon değerleri, *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun inhibitör yokken elde edilen



aktivite değerleriyle karşılaştırıldığında, test edilen inhibitörlerin *B. erythropus* PFO'suna karşı oldukça etkili olduğu gözlenmiştir.

Tablo 8. *B. erythropus*'dan saflaştırılan PFO inhibitörlerine ait  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$
Sodyum metabisülfid	0.066 mM
Askorbik asit	0.075 mM
Sodyum azid	10 mM
Benzoik asit	10.2 mM

### 3.2.2.9. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

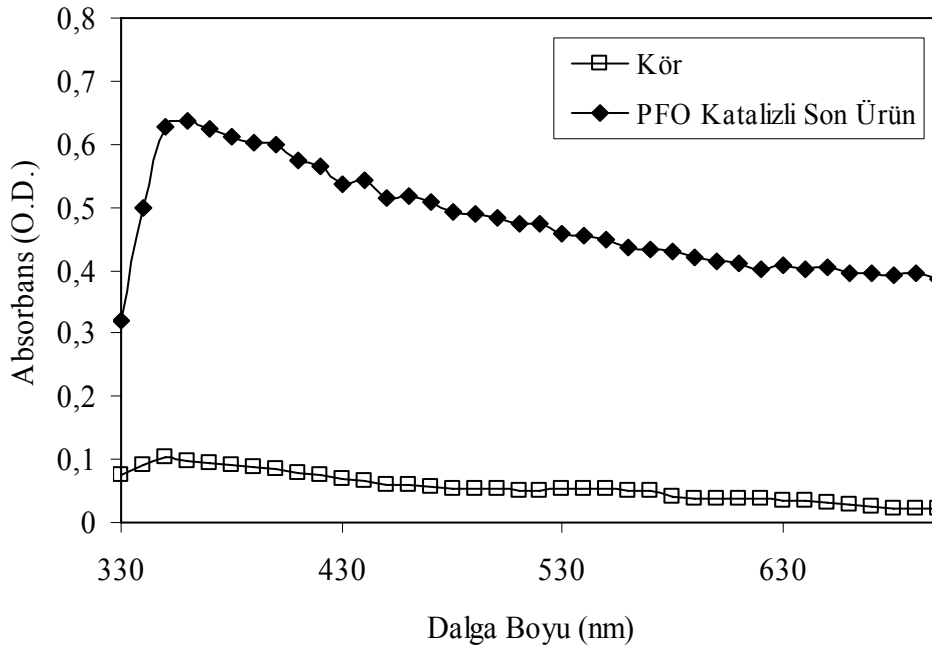
Polifenol oksidaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini ortaya koymak amacı ile, monovalent  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , divalent  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ , ve  $\text{Ni}^{2+}$  ve trivalent olarak da  $\text{Al}^{3+}$  iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. 1 mM'lık nihai konsantrasyondaki metal iyonları varlığında PFO aktivitesindeki değişimler kaydedildi. Kontrol olarak metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışımdaki PFO aktivitesi % 100 kabul edildi (Tablo 9).

Tablo 9. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

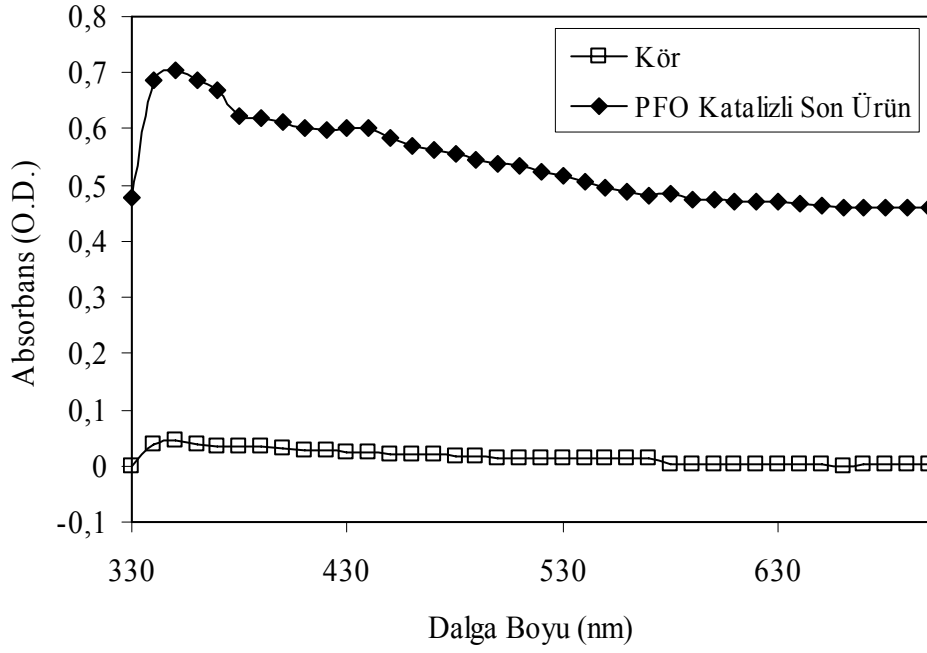
Metal İyonu	% Aktivite	Metal İyonu	% Aktivite
Yok	100	$\text{Mn}^{2+}$	62.9
$\text{Li}^+$	72.5	$\text{Cu}^{2+}$	88.3
$\text{Na}^+$	94.6	$\text{Cd}^{2+}$	103.0
$\text{K}^+$	103.8	$\text{Zn}^{2+}$	93.2
$\text{Mg}^{2+}$	101.8	$\text{Cr}^{2+}$	95.5
$\text{Ca}^{2+}$	74.2	$\text{Ni}^{2+}$	56.6
$\text{Al}^{3+}$	127.3		

### 3.3. Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatknlığının İncelenmesi

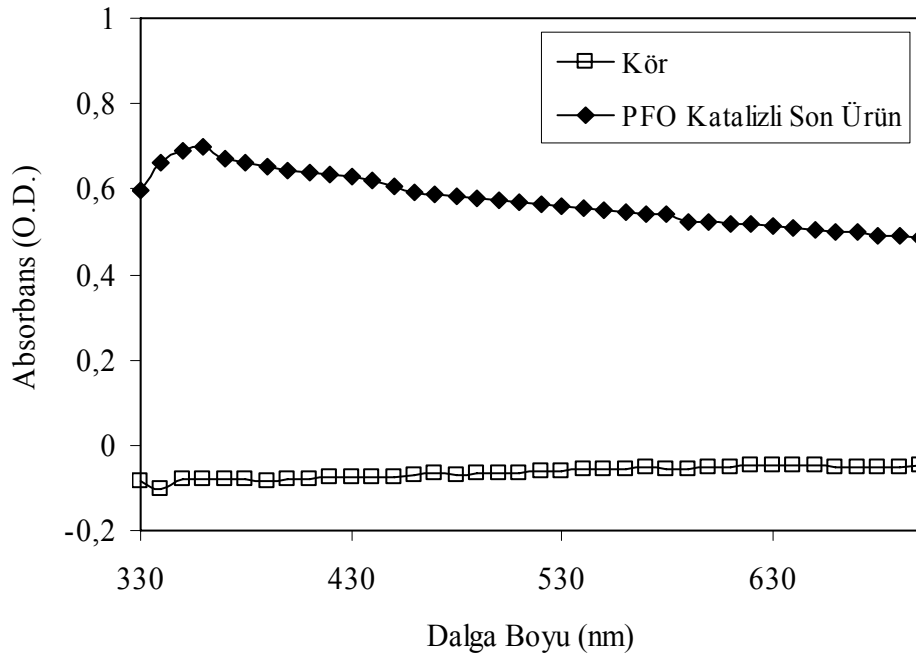
Polifenol oksidazın organik çözücülerdeki reaksiyon yatknlığını incelemek amacıyla, *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun, toluen, diklorometan ve dikloroetan organik çözücülerinin varlığında kateşinin substratıyla ürün oluşturması, spektrofotometrik olarak incelendi. Enzimin bulunmadığı reaksiyon karışımını kör olarak kullanıldı. Her bir organik çözücü varlığında hazırlanan körde, 330-700 nm aralığında absorbansta belirgin bir artış gözlenmemiştir. Oysa ki, enzimin bulunduğu reaksiyon ortamında özellikle 350-400 nm aralığında, absorbansta belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, kateşinin ilgili *o*-kinonlara biyodönüşümü için seçilen çözücüler ortamında, saflaştırılan PFO'nun gerekliliğini desteklemektedir.



Şekil 32. Toluen varlığında kateşinin ( □-□ ) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin ( ◆-◆ ) spektrofotometrik tarama grafiği



Şekil 33. Diklorometan varlığında kateşinin (□-□) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin (◆-◆) spektrofotometrik tarama grafiği



Şekil 34. Dikloroetan varlığında kateşinin (□-□) ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin (◆-◆) spektrofotometrik tarama grafiği

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Doğanın katalizörleri olan ve hayatın var olabilmesi için gerekli olan enzimler, özellikleri ve farklı organizmalardaki davranışları açısından, yaklaşık 200 yıldır incelenmektedir. Yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle, oksidoredüktaz sınıfı enzimler üzerinde, diğer enzimlere göre daha az çalışılmıştır. Ancak, son yıllarda, Polifenol oksidaz enzimi (PFO), araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir (Seo vd., 2003). PFO, hem katalizlediği reaksiyonlar hem de fizyolojik görevleri açısından, içinde bulunduğu organizmaya ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak, aynı organizmanın farklı çeşitlerinde bile farklı oranlarda aktivite gösterebilir.

Yapılan bu çalışmada, *Boletus erythropus* mantarında bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO'nun varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Bu amaçla; *B. erythropus*'tan hazırlanan enzim özütünden PFO, sentezlenen bir afinite jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Enzimin varlığı, saf enzim elüatında ve ham enzim özütünde elektroforetik olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin biyokimyasal, kinetik ve bazı termodinamik özellikleri ile organik reaksiyonları katalizleyebilme yetkinliği araştırılıp, elde edilen veriler diğer organizmalarda çalışılan PFO'lar ile karşılaştırılmıştır.

PFO, *B. erythropus*'tan TX-114 deterjanıyla çözünürleştirilip kısmen saflaştırılmıştır. Bu teknik, membran proteinlerinin hayvanlardan, bakterilerden ve bitki dokularından saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bordier, 1981; Sanchez-Ferrer vd., 1994; Bricker vd., 2001).

Arslan ve çalışma ekibinin (2004) daha önce sentezlediği yöntem kullanılarak, Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli başarı ile sentezlenmiştir. Sentezlenen bu jel kullanılarak yapılan afinite kromatografisi ile, PFO'nun *B. erythropus*'tan saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ham enzim elüatında enzimin spesifik aktivitesi 63.2 U/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 1800 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, enzim *B. erythropus*'tan 28.5 kat saflaştırılmıştır. Aynı afinite jeli sentezlenip, yapılan afinite kromatografisi ile PFO'nun dut meyvelerinden 74 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Arslan vd., 2004). Ayrıca, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel flitasyon kromatografisi, PFO'nun çeşitli organizmalardan

saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler kullanılarak yapılan PFO saflaştırma çalışmalarında, PFO, fasulye tohumlarından 34 kat (Paul ve Gowda, 2000), aysberg marulundan 44.8 kat (Chazarra vd., 2001), *Lactuca sativa* var. *capitata* L.'den 19.4 kat (Gawlik-Dziki vd., 2007), yenedünya meyvesinden 39.9 kat (Selles-Marchart vd., 2006), bir çeşit kestaneden 36.87 kat (Xu vd., 2004), armuttan 10.8 kat (Zhou ve Feng, 1991), bir tür patatesten 6.5 kat (Martin ve Ruberte, 1976) ve *Ferula* sp. saplarından 25.78 kat (Erat vd., 2006) saflaştırılmıştır.

Kromatografik ayırma işleminden sonra, elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edilmiştir. Ham enzim özütünün ve saf enzim elüatının tatbik edildiği % 12'lik doğal poliakrilamid jel elektroforezinde, *L-DOPA* substrat boyaması sonucunda, PFO'nun varlığını gösteren tek bir bant gözlenmiştir. Ayrıca, aynı jel üzerine uygulanan saf enzim elüatında, yapılan coomassie brilliant blue R-250 boyama ile, tek bir protein bandının varlığı ve bu bandın da PFO'ya ait olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 16). Daha önce farklı bitki, sebze ve diğer organizmalarda yapılan çalışmalar sonucunda, birden fazla PFO izoenzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları, kuşburnu (Şakiroğlu vd., 1996), papaya (Cano vd., 1996), döngel (Dincer vd., 2002), Trabzon hurması (Özen vd., 2004), karayemiş (Colak vd., 2005), *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4<sup>T</sup> (Yildirim vd., 2004) ve *Macrolepiota mastoidea* mantarı (Kolcuoglu vd., 2007) şeklindedir.

Ham enzim özütü, saf enzim elüatı ve standartların birlikte yüklendiği % 12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezinde, coomassie brilliant blue R-250 boyama sonucunda, ham enzim özütünde var olan çok sayıdaki protein bantlarının varlığı gözlenmiştir. Ayrıca, standart proteinlerle karşılaştırıldığında, saf enzim elüatında, yaklaşık 40 kDa'a karşılık gelen bir protein bandı belirlenmiştir (Şekil 17). Ancak elde edilen bu bulgular sonucunda, saflaştırılan PFO'nun moleküler ağırlığının 40 kDa olduğunu söyleyemeyiz. Enzimin aynı moleküler ağırlığa sahip birden fazla alt birim içerebileceği mümkündür. Dolayısıyla, enzimin alt birim içerip içermediğine dair denemeler yapılmadığından, toplam alt birim sayısı, dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı hakkında kesin bir şey söylenemez. Nitekim, fasulye tohumlarından saflaştırılan PFO'nun moleküler ağırlığı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile 120 kDa olarak belirlenmiştir. Oysa ki, yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 30 kDa civarında tek bir bant gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak, fasulye tohumu PFO'sunun bir tetramer olduğu ortaya konulmuştur (Paul ve Gowda, 2000). Flurkey (1989), fasulye yaprağı PFO'sunun, moleküler ağırlıkları 61.5 ve 60 kDa ile 44.5 ve 43 kDa olan dublet altbirimlerden oluşan bir protein olduğunu

bildirmiştir. Ayrıca, yenedünya meyvesinden saflaştırılan PFO için yapılan SDS poliakrilamid jelde, 59.2 kDa'luk moleküler ağırlığa karşılık gelen tek bir bant gözlenmiş ve yapılan jel flitrasyon kromatografisiyle, enzimin moleküler ağırlığı 61.2 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, enzimin bir monomer olduğu ortaya konulmuştur (Selles-Marchart vd., 2006). İleriki çalışmalarda, HPLC veya jel flitrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak, *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı belirlenebilir.

Çalışmada denenen ve difenolik substratlar olan 4-metilkatekol, katekol, *L*-3,4-dihidroksifenil alanin (*L*-DOPA) ve 3-(3,4-dihidroksifenil)propionik asit (DHPPA) *B. erythropus* PFO'su tarafından yükseltgenmiş olmasına rağmen, bir monofenol olan tirozin, enzim tarafından yükseltgenmemiştir. Bu denemeler sonunda elde edilen bilgiler, enzimin gözlenen aktivitesinin, diğer bazı bitki kaynaklarında gözlenen PFO aktivitelerinde olduğu gibi (Cash cd., 1976; Siddiq vd., 1992; Ding vd., 1998; Perez-Gilabert ve Carmona, 2000; Beena ve Gowda, 2000; Özen vd., 2004), bir difenolaz aktivitesi olduğunu göstermiştir. *B. erythropus* PFO'sunun, seçilen bu difenolik substratlar arasından, en yüksek aktiviteyi gösterdiği substrat, 4-metil katekol olarak belirlenmiştir. *Macrolepiota mastoidea* mantarı PFO'sunun (Kolcuoğlu vd., 2007), *Portabella* mantarı PFO'sunun (Zhang ve Flurkey, 1997), elma PFO'sunun (Trejo-Gonzalez ve Soto-Valdez, 1991) ve bir tür marul PFO'sunun (Gawlik-Dziki vd., 2007) 4-metil katekol ve katekol substratlarına oldukça büyük ilgi duydukları bildirilmiştir. Katekol ve 4-metil katekol substratlarına PFO ilgisi benzerdir. Ancak, çoğu zaman 4-metil katekolün oksidasyonu biraz daha fazladır. Bu da, 4-metil katekolün *para*- pozisyonunda elektron vericisi olan metil grubunun bulunmasının, katalitik etkinliğini arttırmasından ileri gelmektedir (Paul ve Gowda, 2000).

Enzimlerde, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ham enzim özütü hazırlama yöntemine ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir (Aylward ve Haisman, 1969; Jiang, 1999). Bu yüzden, pH, enzim aktivitesinin ifadesinde önemli bir faktördür. *B. erythropus* PFO'sunun pH'ya bağımlılığı, 3.0-9.0 pH değerleri arasında incelendiğinde, grafiğin tek pik verdiği ve optimum pH'nın 8.0 olduğu gözlenmiştir (Şekil 18). pH - % bağıl aktivite profilinde tek bir optimum pH'nın gözlenmesi, doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile de belirlendiği gibi, *B. erythropus*'ta tek bir PFO izoformunun olabileceğini desteklemektedir. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiğe göre, enzimin asidik pH değerlerinde, 4-metilkatekol oksidasyonunu

katalizleyebilme yeteneği çok dūşüktür. Nötral pH değerlerine doğru gidildikçe, bu difenolik substratın enzim tarafından oksidasyonunun arttığı ve pH 8.0'da maksimuma ulağtığı görölmüştür. Değişik organizmalardaki difenolazların, 4-metilkatekol varlığında karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, PFO için optimum pH, dutta 5.0 (Arslan vd., 2004), fasulye tohumlarında ve yaban mersininde 4.0 (Paul ve Gowda, 2000; Kader vd., 1997)), ahudududa 8.0 (Gonzales vd., 1999) ve kuşburnunda 8.5 (şakiroğlu vd., 1996) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, PFO için birden fazla optimum pH daha önce, bir tür avakadoda 4.5 ve 5.0 (Gomez-Lopez, 2002), bir tür elmada 5.0 ve 7.5 (Rocha ve Morais, 2001), Anamur muzunda 5.5 ve 7.0 (Ünal, 2007) ve kayısıda 7.0 ve 8.5 (Arslan vd., 1998) olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, *B. erythropus* difenolazının, önceden bildirilen difenolazlarla, pH optimumu açısından uygunluk gösterdiği görölmektedir.

*B. erythropus* PFO'sunun aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 0-80 °C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin optimum sıcaklığı 20 °C olarak belirlenmiştir (şekil 19). 0-10 °C aralığında enzim aktivitesinin % 60 civarında olduğu ve 20-40 °C aralığında ise enzimin aktivitesini % 70'in üzerinde koruduğu gözlenmiştir. 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda, enzim aktivitesi giderek azalmış ve 80 °C'de ise enzim, aktivitesinin % 80'ini kaybetmiştir. Farklı kaynaklarda PFO'nun optimum sıcaklıkları *B. erythropus* PFO'su ile benzerlik göstermekle beraber, dutun *Morus nigra* L. türünde 20 °C ve *Morus alba* L. türünde ise 40 °C (Colak vd., 2007), şeftalide 20 °C (Mihalyi vd., 1978), taro ve patatestede 25-30 °C (Duangmal ve Owusu Apenten, 1999), patlıcanda 30 °C (Concellon vd., 2004) ve daha yüksek optimum sıcaklıklar, çilekte 50 °C (Serradell vd., 2000), *Thermomicrobium roseum* bakterisinde 50 °C (Kong vd., 2000) ve *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 ve K4<sup>T</sup> bakterilerinde 80 °C ve 70 °C (Yildirim vd., 2005) olarak bildirilmiştir.

*B. erythropus* PFO'su, farklı pH değerlerinde 4 °C'de 24 saat ve 120 saat inkübasyona maruz bırakıldığında, difenolaz aktivitesinde genel olarak ciddi kayıpların olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, *B. erythropus* PFO'sunun sahip olduğu difenolaz aktivitesi açısından, yüksek pH kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir (şekil 24). Özellikle 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, enzimin aktivitesini çalışılan her pH değerinde % 85'in üzerinde koruması, söz edilen sıcaklık ve süre zarfında enzimin oldukça kararlı olduğunu göstermektedir. Enzim, 4 °C'de 120 saat inkübe edildikten sonra, pH 4.0-8.0 olmak üzere geniş bir pH aralığında, aktivitesini % 60'in üzerinde korumuştur.

pH 3.0 ve pH 9.0'da ise enzimin aktivitesinin yaklaşık % 60'ını kaybettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde, daha önce muzdan saflaştırılan PFO'nun, pH 5.0-11.0 değerleri arasında, 4 °C'de 48 saat inkübasyonu sonunda aktivitesini % 90'ın üzerinde koruduğu gözlenmiştir (Yang vd., 2000). Ayrıca, benzer pH kararlılığının lahana PFO'su için gözlendiği (Fujita vd., 1995; Fujita vd., 1997), fakat elma (Murata vd., 1992), marul (Fujita vd., 1991), Japon armutu (Tono vd., 1986) ve patlıcan (Fujita ve Tono, 1988) PFO'sundan farklı olduğu bildirilmiştir.

*B. erythropus* PFO'sunun, 0-80 °C aralığında, saatte bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam 4 saatlik inkübasyonu sonunda kalan aktiviteleri belirlenerek, ısıl kararlılığı incelenmiştir (Şekil 26). Elde edilen verilere göre, optimum sıcaklık olan 20 °C'de, 1 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesini % 90'ın üzerinde korumuştur. 4 saatlik inkübasyon sonunda ise enzimin hala % 70 civarında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. 10-40 °C aralığında, 1 saatlik inkübasyon sonunda, enzim aktivitesini sadece yaklaşık % 20 civarında kaybederken, 4 saatlik inkübasyon sonunda, özellikle 10-30 °C aralığında aktivitesini % 70'in üzerinde korumuştur. Enzim, 40 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda, aktivitesini % 80 korurken, sonraki inkübasyon sürelerinde aktivitesi giderek azalmıştır. 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda ise enzim, 1 saatlik inkübasyon süresinden itibaren, aktivitesini önemli ölçüde kaybetmiş ve toplam inkübasyon süresi sonunda, neredeyse hiç aktivitesi kalmamıştır. Gawlik-Diziki ve arkadaşları tarafından (2007), bir tür marul PFO'sunun, 30 ve 40 °C'lerde, 1 saatlik inkübasyon sonrasında, oldukça kararlı olduğu ve aktivitesini % 60'ın üzerinde koruduğu belirlenmiştir. *Allium* sp. PFO'sunun 40 °C'de 30 dakika, erik ve muz PFO'sunun 70 °C'de 30 dakika ve yerelması PFO'sunun 60 °C'de 30 dakika kararlı oldukları bildirilmiştir (Aydemir, 2004). Verilen bu bilgiler doğrultusunda, *B. erythropus* PFO'sunun, 0-30 °C aralığında 4 saatlik inkübasyonu sonucunda, ısıl kararlılığının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ise, enzimin aktivitesindeki düşmeler, sıcaklığın etkisi ile, enzimin tersiyer yapısında negatif değişmelerin olmasından kaynaklanabilmektedir (Jiang, 1999; Amiza ve Apenten, 1994; Vamos-Vigyazo, 1981; Arslan vd., 1997; Özen vd., 2004; Dinçer vd., 2002).

$E_a$ ,  $k$ ,  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  ve  $\Delta S^\ddagger$  gibi bazı termodinamik parametreler, enzimin termal kararlılığını belirlemek amacıyla, gerçekleştirilen farklı sıcaklıklardaki 4 saatlik inkübasyon sonunda, kalan aktiviteler kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 7). Elde edilen bu sonuçlar, daha önce Trabzon hurmasında (Özen vd., 2004), iki karayemiş türünde (Colak vd., 2005) ve *Macrolepiota mastoidea* mantarında (Kolcuoğlu vd., 2007) elde edilen



sonuçlarla uyum içindedir. Ayrıca,  $\Delta H^\ddagger$  değeri, transisyon halinin oluşumunda, kovalent olmayan etkileşimlerin kırılması için gerekli olan enerjinin bir ölçüsüdür. Bu çalışmada, 0-80 °C aralığında hesaplanan  $\Delta H^\ddagger$  değerlerinin ortalamasının yüksek olması, literatürde de belirtildiği gibi, difenolaz aktivitesinin sıcaklığa karşı duyarlı olduğunu göstermektedir (Duangmal vd., 1999; Amiza ve Apente, 1994; Galani ve Apenten, 1997; Mazzafera ve Robinson, 2000). Ayrıca, enzimin difenolaz aktivitesi için hesaplanan  $E_a$  değeri, daha önce Trabzon hurması PFO'su (Özen vd., 2004) ve *Macrolepiota mastoidea* mantarı (Kolcuoğlu vd., 2007) için hesaplanan  $E_a$  değerleri ile hemen hemen aynı bulunmuştur. Bunun sonucunda, bu organizmalardaki PFO'nun sahip olduğu difenolaz aktivitesi yönünden katalizlediği reaksiyonların mekanizmalarının oldukça benzer olduğu söylenebilir.

*B. erythropus* PFO'sunun aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, 50 µg/mL'lik protein içeriğine kadar, PFO aktivitesinin arttığı, daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, PFO aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Şekil 20). Sonuç olarak, optimum enzim konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra, difenolün oksidasyon hızının, enzim miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir. Tespit edilen bu enzim konsantrasyonu literatür bilgileri ile uyum içinde olup, genellikle reaksiyon karışımları, 10-100 µg/mL arasında PFO konsantrasyonu içermektedir (Paul ve Gowda, 2000).

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak, değişen substrat konsantrasyonlarında çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, *B. erythropus* PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görülmüştür (Şekil 21). Çizilen bu grafikten yararlanılarak, enzimin optimum substrat konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiştir. 10 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doyunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda, hızının değişmediği saptanmıştır. Enzimin, difenolik substratı 4-metilkatekol varlığındaki kinetik verileri olan Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerleri, çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden sırasıyla, 2.8 mM ve 1428.6 U/mg protein olarak belirlenmiştir. (Şekil 22). 4-metilkatekol substratı varlığında PFO aktivitesi için  $K_m$  değerlerinin, kekikte 9.8 mM, Amasya elmasında 3.1 mM (Dogan ve Dogan, 2004), patlıcanda 3.24 mM (Concellon vd., 2004), *Euterpe edulis*'te 2.0 mM (Lourenço vd., 2006), ayvada 4.54 mM (Yagar ve Sagiroglu, 2002), *Portabella* mantarında 2.1 mM (Xiaodong ve Flurkey, 1997) ve *Ferula* sp. saplarında 6.78 mM (Erat vd., 2006) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bazı farklı kaynaklarda gözlenen difenolazlar için, 4-metilkatekol gibi küçük

moleküler ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar olduklarını gösteren sonuçlarla uyumludur (Palmer, 1995; Walker, 1995; Cano vd., 1996; Perez-Gilabert ve Garcia-Carmona 2000; Özen vd., 2004). Ayrıca, bu enzimin 4-metilkatekol gibi küçük substrata ilgi duyması, enzimin, küçük substrat bağlanma bölgesine sahip olduğunu gösterir.

4-metilkatekol substratı varlığında, Hill eşitliği kullanılarak, Hill eğrisi çizilmiştir (Şekil 23). Çizilen bu grafikten yararlanılarak, Hill sabiti (*h*) 1.0 olarak bulunmuştur. Hill sabitinin 1'e eşit olması, *B. erythropus* PFO'sunun tek bir bağlanma bölgesinin olabileceğini ve bu enzimin bir kooperativiteye sahip olmadığını gösterebilir (Chilaka vd., 1993; Güner, 2007).

Birçok organizmada enzimatik esmerleşme, oksijen veya fenolik reaktantların uzaklaştırılmasıyla veya PFO inhibitörünün kullanılmasıyla azaltılabilir veya durdurulabilir. Organizmadan oksijenin tamamen uzaklaştırılması zordur (Dogan ve Dogan, 2004). Enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından kullanılan birçok inhibitör vardır (Dogan vd., 2004; Şakiroğlu vd., 1996; Yang vd., 2001). Mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında, mantar endüstrisinde de ciddi ekonomik kayıplara yol açan, enzimatik esmerleşmenin önlenmesi için, en sık başvurulmuş yol, inhibitörlerin kullanımudur. Yakın zamana kadar, bu amaçla, en çok kullanılan inhibitör SO<sub>2</sub> olmuştur. Ancak, bu bileşiğin insan sağlığına vermiş olduğu zararlardan dolayı, tiol grubu içeren bileşikler gibi alternatifler denenmeye başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada da, bir çok bitki PFO'su için inhibitör olarak denenmiş, askorbik asit, sodyummetabisülfid, sodyum azid ve benzoik asit denenmiş ve her bir inhibitör için belirlenen *I*<sub>50</sub> değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Elde edilen veriler, kullanılan inhibitörler arasında, enzimi en etkin inhibe eden inhibitörün sodyummetabisülfid ve bunu takiben de askorbik asit olduğunu göstermiştir. Sodyummetabisülfidin 0.125 mM konsantrasyonunda, enzimin hemen hemen tamamen inhibe olduğu görülmüştür (Şekil 28). Sodyummetabisülfidin gözlenen etkili inhibisyonu, daha önce belirtildiği gibi, tiol bileşiklerinin PFO'lar için etkili inhibitörler olduklarını desteklemektedir (Friedman ve Bautista, 1995; Ding vd., 1998; Duangmal ve Owusu-Apenten, 1999; Yang vd., 2000). Sülfhidril grubu içeren bileşiklerin inhibisyon mekanizmasının iki şekilde olabileceği ileri sürülmüştür. Bunlardan birincisi, kinon bileşikleri ve kükürt grupları arasında konjugat meydana gelerek, bu bileşiklerin çökmesi ve dolayısıyla, melanin pigmentlerinin oluşmamasıdır. İkincisi ise, bu bileşiklerin içerdiği kükürdün yüksek bir ilgiyle, enzimin

aktif bölgesinde bulunan bakır atomuna ve histidin birimlerine dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla inhibisyonun gerçekleşmesidir (Ding vd., 2002). Bir diğer inhibitör olan askorbik asidin de etkili bir inhibisyon yaptığı ve 0.25 mM konsantrasyonunda, enzim aktivitesinin neredeyse tamamını inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 29). Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Sapers ve Ziolkowski, 1987; Hsu vd., 1988; Dudley ve Hotchkiss, 1989; Ros vd., 1993; Paul ve Gowda, 2000; Aydemir, 2004). Askorbik asit, ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden, enzim aktivitesini azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Daha çok bir antioksidan olarak etki eden askorbat, esmerleşmeye neden olan pigmentlerin oluşmasına izin vermeden, PFO tarafından difenolden oluşturulan kinonu indirger (Aydemir, 2004). Ayrıca, askorbat, PFO tarafından üretilen kinonoid bileşiklerin üretimini, bu bileşiklerle veya enzimin bakır merkezli aktif bölgesiyle şelat oluşturarak kısıtlayabilmektedir (Martinez ve Whitaker, 1995; Sapers, 1993; Zawistowski vd., 1991).

Enzimlerin çoğu, aktivitelerini yerine getirebilmeleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları, farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı geometriye ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu yüzden, proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). PFO aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından,  $Al^{3+}$ 'ün enzim aktivitesini % 27 arttırdığı,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$ 'un aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$ 'in aktiviteyi inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 9). Bu çalışmada denenen metal iyonlarının, PFO aktivitesi üzerine yapmış oldukları etkiler, daha önce bildirilen bazı metal iyonlarının *Macrolepiota mastoidea* PFO'su (Kolcuoğlu vd., 2007) ve muz PFO'su (Yang vd., 2000) üzerine yapmış oldukları etkiler ile benzerdir. Aktivasyona veya inhibisyona sebep olma gibi durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu, enzimin yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabilir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001).

PFO'nun, reaksiyon ortamında biyokatalizör olarak, farklı oranlarda su-organik çözücü karışımlarındaki davranışı, bazı araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Richard-Forget vd., 1992; Robert vd., 1995; Gauillard ve Richard-Forget, 1997). PFO'nun sulu ortamda kullanımı, oluşan *o*-kinonların polimerizasyonunun, enzimi inaktif etmesi nedeniyle sınırlıdır (Kazandjian ve Klivanov, 1985). Son yıllarda, özellikle sınırlı *o*-kinon polimerizasyonundan dolayı, PFO aktivitesi için, potansiyel bir reaksiyon ortamı olarak, organik çözücülerin kullanıldığı bildirilmektedir (Estrada vd., 1991). Bütün bunlar dikkate

alınarak yapılan çalışmada, toluen, diklorometan ve dikloroetan organik çözücülerini ortamında, kateşinin enzimatik oksidasyonu ile oluşan renkli bileşiklerin, spektrofotometrik tarama grafikleri Şekil 32, Şekil 33 ve Şekil 34'te görülmektedir. Elde edilen bu grafiklere göre, her bir çözücü ortamında, enzimin kullanılmadığı reaksiyon karışımının spektrofotometrik taraması sonucunda, absorbanın hemen hemen sıfır civarında ve neredeyse hiç değişmediği belirlenmiştir. Her bir çözücü ortamında, enzimin bulunduğu reaksiyon karışımlarının spektrofotometrik taramasında ise, özellikle 350-400 nm aralığında, absorbansta belirgin bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, kateşinin ilgili kinonlara biyodönüşümünün, saflaştırılan PFO ile gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Elde edilen bu bulgular, daha önce bu konu ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlarla (Goodenough vd., 1983; Tse vd., 1997; Kermasha vd., 2001) uyum içindedir.

Sonuç olarak, *B. erythropus*'tan saflaştırılan ve difenolaz aktivitesine sahip olan PFO'nun, 4-metilkatekol substratı varlığında, optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısı kararlılığı, çeşitli genel PFO inhibitörlerine karşı gösterdiği inhibisyon profilleri, metal iyon etkisi, kinetik bazı parametreler ve organik çözücülerdeki davranışı açısından, çeşitli organizmalardaki PFO'lara oldukça benzer davranışlar gösterdiği belirlenmiştir.

## 5. ÖNERİLER

Değişik organizmalarda PFO etkinliğine bağlı olarak gelişen pigment oluşumu ve enzim katalizli reaksiyondan bağımsız olan esmerleşme reaksiyonlarıyla meydana gelen renk değişimleri, bir dereceye kadar istenir. Özellikle besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi sırasında, çoğu kez bu reaksiyonlar ve dolayısıyla renk değişimleri, arzu edilen seviyede durdurulamadıklarından, besinlerin fiziksel özellikleri, yani görünüşlerindeki değişimler yanında, duyuşal ve besinsel özelliklerinde değişimlere de yol açar. Bu durum, aynı zamanda ciddi ekonomik kayıplara da neden olur. Esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için besinlerin bileşimindeki değişmelerinin, besinsel ve toksikolojik açılardan tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerinin engellenmesine ihtiyaç vardır. Bu da, ancak esmerleşmeyi sağlayan PFO aktivitelerinin kapsamlı karakterizasyonu ile sağlanabilir.

Özellikle son yıllarda enzimlere olan talebin artmasıyla, oldukça öneme sahip olan PFO enzimi de değişik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır. Ham enzim özütünden PFO'nun saflaştırılması için, istenen saflık derecesine ve enzim kaynağına göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları, farklı doygunlukta amonyum sülfat veya organik bir çözücü ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir. PFO saflaştırma işlemlerinde, genellikle bu üç kromatografik teknik, arka arkaya kullanılır. PFO'nun saflaştırılması için uygulanan metotlardan biri de, afinite kromatografisidir. Bu teknikle, saflaştırma, çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemlerine gerek olmadan, kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir. Bu nedenle, PFO için afinite kromatografisinde kullanılabilen alternatif afinite jelleri, ilgili sentez reaksiyonları göz önünde bulundurularak sentezlenebilir. Ayrıca, ileriki çalışmalarda, *Boletus erythropus*'tan saflaştırılan PFO'nun, altbirim içerip içermediği ve böylece dördüncül yapısı ile toplam moleköl ağırlığının belirlenebilmesi için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri uygulanabilir. Saflaştırılan PFO'nun, çeşitli kimyasal maddeler varlığındaki davranışları incelenerek, yeni inhibitörlerin araştırılması ve bu

inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konulması, özellikle gıda sektörü için önemli yararlar sağlayacaktır.

Enzimlerle ilgili en önemli durum, bu biyolojik katalizörlere endüstrinin duyduğu taleptir. Son yıllarda, sentetik kimya alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlardan yüksek verim, tek bir ürün oluşumu, uygun ortam şartları gibi olumlu yönleri açısından, oldukça avantajlıdır. Enzimlerin diğer üstün özellikleri ile endüstriyel kullanımı hızla gelişmektedir. Özellikle yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen oksidaz türü enzimlere talep oldukça yüksektir. Anorganik ve organik kimya alanlarında gerçekleştirilen bazı sentez reaksiyonlarının, bundan sonraki çalışmalarda daha ılıman koşullar altında, enzim katalizli gerçekleştirilmesiyle, daha yüksek verimde bileşikler elde edilip, bazı spektroskopik cihazlarla, elde edilen ürünlerin yapı aydınlatması yapılabilir. Çeşitli endüstrilerde, ilginç ürünlerin sentezini katalizleyebilecek yeni enzimlerin incelenmesine, sürekli ihtiyaç vardır. Yeni enzimler bulmanın en etkili ve başarılı yollarından biri, çok sayıdaki organizmanın dikkatle incelenmesidir.

Ticari yollarla sentezlenmesi oldukça güç olan ve toksik maddeler kullanılmadan elde edilen fenolik bileşiklerin fonksiyonel polimerlerinin PFO ile sentezi, bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli tehlikeler oluşturan fenolik bileşiklerin, özellikle monofenollerin, atık sularla kirlenen akarsularda ve bunlarla sulanan topraklarda varlığını tespit etmek amacıyla, çevreye ekstra kirlilik vermeyen ve oldukça hassas olan biyosensörlerin, mantar tirozinazının immobilize edilmesiyle kullanımı oldukça ilgi çekicidir. Fenol-formaldehid reçinelerinin oldukça yaygın kullanıldığı endüstriyel alanda, bu reçinelerin çok iyi dayanıklılık göstermesine rağmen, formaldehitin toksik özelliği çeşitli problemlere neden olabilmektedir. Bunun için de, formaldehid kullanılmadan fenol polimerlerinin hazırlanmasında, enzimatik yöntem oldukça ilgi görür. Böylece hem fenollerin polimerizasyonu ılıman şartlar altında, toksik ajanlar kullanılmaksızın gerçekleşirken, hem de polimerin yapısı ve çözünebilirliği, reaksiyon şartlarının değiştirilmesiyle kontrol edilebilir.

*B. erythropus* gibi mantarların yüksek antioksidan özellik göstermesi, bu mantarlara olan talebi gün geçtikçe arttırmaktadır. Ancak, *B. erythropus*, yılın belli zamanlarında bulunabilmesi ve henüz kültürü yapılamaması nedeniyle, kolay ulaşılamayan bir türdür ve saf kimyasalların sentezinde kullanılacak difenolaz enzimlerinin saflaştırılması için yeterli

bir kaynak olmayabilir. Bu nedenle, bu mantarın kültürünün yapılabilirliğinin incelenebileceği gibi, bu organizmada difenolaz enzimini kodlayan genin belirlenip, uygun bir organizmaya klonlanarak ileri derecede ekspres edilmesi sağlanabilir. Böylece, enzimin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi mümkün olacaktır.

Bütün bu bilgiler ışığında, son yıllarda araştırmacılar arasında oldukça ilgi gören, önemi her gün biraz daha artan mantar PFO'su, engin klinik kullanımı ve endüstriyel uygulamaları nedeniyle daha birçok araştırmacıya konu olacak gibi görölmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Amiza, M. A. ve Apenten, R. K. O., 1994. Thermal inactivation parameters alkaline proteinases from North Sea cod (*Gadus Morhua* ) and  $\alpha$ -chymotrypsin bovine, Journal of the Science of Food and Agriculture, 66, 389-391.
- Andrawis, A. ve Kahn, V., 1996. Effect of methimazole in the activity of mushroom tyrosinase, Biochemical Journal, 235, 91-96.
- Anonymous, 1991. Sulphites banned, Food Ingredients Processing International, 11, 11.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, İ., 1997. Polyphenol oxidase from *Allium* sp., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1091-1096.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, I., 1998. Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1239-1241.
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. ve Ozensoy, O., 2004, Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties, Food Chemistry, 88, 479-484.
- Aydemir, T., 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, Food Chemistry, 87, 59-67.
- Aylward, F. ve Haisman, D. R., 1969. Oxidation systems in fruits and vegetables-Their relation to the quality of pressured products, Advances Food and Nutrition Research, 17, 1-76.
- Baydar, S., 1989. Tohumuz Bitkiler Sistematiği, Cilt-2, K.T.Ü. Matbaası, Trabzon.
- Beena, P. ve Gowda, L. R., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Guava (*Pisidium guajava* L.), Journal of the Science of Food and Agriculture, 36, 1259-1265.
- Blackwell, W. H., 1988. Paisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall, New Jersey.
- Bock, W. C., Katz, A. G., Markham, G. D. ve Glusker, J. P., 1999. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparasion of the divalent ions, Journal of the American Chemistry Society, 121, 7360-7372.
- Bordier, C., 1981, Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solition, Journal of Biological Chemistry, 256, 1604-1607.
- Bostancı, Ş. ve Yalınkılınç, M. K., 1989. *Pleurotus ostreatus* Jacg. mantarının bazı selülozluk hammaddelerde yaptığı biyolojik degradasyon, Doğa, 13, 506-514.



- Breitenbach, J. ve Kranzlin, F., 1991. Fungi of Switzerland, 3, Lucerne, Verlag Mykologia, Switzerland.
- Bricker, T. M., Prevost, M., Vu, V., LaBord, S., Womack, J., ve Frankel, I. K., 2001. Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning, Biochimica et Biophysica Acta, 1503, 350-356.
- Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. ve O'Conner, K. E., 2004. Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 486-492.
- Burton, K. S. ve Twynning, R. V., 1989. Extending mushroom storage-life by combining modified atmosphere packaging and cooling, Acta Horticulturae, 258, 565-571.
- Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F., 1994. Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates, Biochimica et Biophysica Acta, 917, 190-197.
- Cano, M. P., Lobo, M. G. ve Galeazzi, M. A. M., 1996. Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3075-3079.
- Cash, J. N., Sistrunk, W.A. ve Stutte, C. A., 1976. Characteristics of Concord grape polyphenol oxidase involved in juice color loss, Journal of Food Science, 41, 1398-1402.
- Castaner, M., Gil, M. I., Artes, F. ve Tomas-Barberan, F. A., 1996. Inhibition of browning of harvested head lettuce, Journal of Food Science, 61, 314-316.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N. ve Barrett, D. M., 2000. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 147.
- Chazarra, S., Garcia-Carmona, F. ve Cabanes, J., 2001. Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: Purification and characterization, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4870-4875.
- Chen, Q. X. ve Kubo, I., 2002. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4108-4112.
- Chilaka, F. C., Anosike, E. O. ve Egbuna, P. C., 1993. Purification and properties of polyphenol oxidase from oil bean seeds, Journal of the Science of Food and Agriculture, 61, 125-127.

- Cho, M. H., Moinuddin, S. G. S., Helms, G. L., Hishiyama, S., Eichinger, D. ve Davin, L. B., 2003. (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantiospecific polyphenol oxidase from creosote bush (*Larrea tridentata*), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 10641-10646.
- Cilliers, J. J. L. ve Singleton, V. L., 1990. Caffeic acid autooxidation and the effects of thiols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 1789-1796.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation, Food Chemistry, 90, 801-807.
- Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A. ve Dincer, B., 2007. Comparative Characterization of Diphenolases from Two Mulberry Fruits (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.), Asian Journal of Chemistry, 19, 2961-2972.
- Colak, A., Kolcuoglu, Y., Sesli, E. ve Dalman, Ö., 2007. biochemical Composition of Some Turkish Fungi, Asian Journal of Chemistry, 19, 2193-2199.
- Concellon, A., Anon, M. C. ve Chaves, A. R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature, Food Chemistry, 88, 17-24.
- Constabel, C. P., Yip, L., Patton, J. J. ve Cristopher, M. E., 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory, Plant Physiology, 124, 285-295.
- Czerkaskij, A., 1970. Pink discoloration in canned Williams Bon Chretien pears, Journal of Food Science, 35, 608.
- Çiçek, H., 2000. Beyaz-çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu (Bilim Uzmanlık Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Das, J. R., Bhat, S. G. ve Gowda, L. R., 1997. Characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2031-2035.
- Decker, H. ve Tuczek, F., 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism, Journal of Biological Chemistry, 275, 392-397.
- Dewey, D. L., Butcher, F. W. ve Galpine, A. R. 1977. Hydroxyanisole-induced regression of the Harding-Passey melanoma in mice, The Journal of Pathology, 122, 117-128.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae), Food Chemistry, 77, 1-7.

- Dinçer, B., 1999. Döngel Bitkisi (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) Meyvelerindeki Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Imahori, Y., 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4144-4149.
- Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Wang, C. Y., 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds, Food Chemistry, 76, 213-218.
- Di Tusa, C. A., Christensen, T., Mc Call, 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.
- Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), Food Chemistry, 88, 69-77.
- Dry, I. B. ve Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase, Plant Molecular Biology, 26, 495-502.
- Duangmal, K. ve Owusu-Apenten, R. K., 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano), Food Chemistry, 64, 351-359.
- Dudley, E. D. ve Hotchkiss, J. H., 1989. Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase, Journal of Food Biochemistry, 13, 65-75.
- Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Kolande, J. E. ve Robson, J. R. K., 1995. The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition, CRC Pres, Boca Raton, LA.
- Erat, M., Sakiroglu, H. ve Kufrevioglu, O. I., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp., Food Chemistry, 95, 503-508.
- Erzengin, M., 2002. Farklı Kaynaklardan Afinite Kromatografisi ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Espin, J. C., Garcia, P. G., Tudela, J. ve Canovas, F. G., 1988. Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2968.
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Analytical Biochemistry, 43, 2807-2812.

- Espin, J. C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1084-1090.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A. ve Wichers, H. J., 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1187-1193.
- Espin, J. C. ve Wichers, H. J., 2001. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro*, Biochimica et Biophysica Acta, 1554, 289-300.
- Esterbauer, H., Schwarzl, E. ve Hayn, M., 1977. A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid, Analytical Biochemistry, 72, 643.
- Estrada, P., Sanchez-Muniz, R., Acebal, C., Arche, R. ve Castillon, M. P., 1991. Characterization and optimization of immobilized polyphenol oxidase in low-water organic solvents, Biotechnology and Applied Biochemistry, 14, 12-20.
- Fan, Y. ve Flurkey, W. H., 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portebella mushrooms, Phytochemistry, 65, 671-678.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration, The Office of Federal Register, Washington DC, USA.
- Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J. N., Varon, R., Garcia-Ruiz, P. A., Garcia-Canovas, F. ve Tudela, J., 2000. Action mechanism of tyrosinase on *meta*- and *para*-hydroxylated monophenols, Biological Chemistry, 381, 313-320.
- Ferrar, P. H. ve Walker, J. R. L., 1996. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study, Journal of Food Biochemistry, 20, 15-30.
- Flurkey, W. H. ve Jen, J. J., 1980. Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors, Journal of Food Biochemistry, 4, 29-41.
- Flurkey, W. H., 1989. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenol oxidase, Plant Physiology, 91, 481-483.
- Friedman, M. ve Bautista, F. F., 1995. Inhibition of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 69-76.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 631-653.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.

- Fujita, S. ve Tono, T., 1988. Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*), Journal of the Science of Food and Agriculture, 46, 115-123.
- Fujita, S., Tono, T. ve Kawahara, H., 1991. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*), Journal of the Science of Food and Agriculture, 55, 643-651.
- Fujita, S., Sari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N. ve Tono, T., 1995. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1138-1142.
- Fujita, S., Sari, N., Maegawa, M., Samura, N., Hayashi, N. ve Tono, T., 1997. Isolation and characterization of two phloroglucinol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 59-63.
- Galani, D. ve Apenten, R. K. O., 1997. The comparative heat stability of bovine  $\beta$ -lactoglobulin in buffer and complex media, Journal of the Science of Food and Agriculture, 74, 89-98.
- Galeazzi, M. A. M. ve Sgarbieri, V. C. J., 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.), Journal of Food Science, 46, 1404-1406.
- Ganguly, K. ve Seshado, T. R., 1958. Isolation of the more commonly occurring leucoanthocyanidins of plants, Journal of Scientific and Industrial Research, 17, 168-173.
- Gauillard, F. ve Richard-Forget, F., 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*pyrus communis* L. cv Williams): activation, purification and some properties, Journal of the Science of Food and Agriculture, 74, 49-56.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U. ve Swieca, M., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), Food Chemistry, 107, 129-135.
- Gomez-Lopez, V. M., 2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado, Food Chemistry, 77, 163-169.
- Gonzales, E. M., Ancos, B. ve Cano, M. P., 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4068.
- Goodenough, P. W., Kessell, S., Lea, A. G. H. ve Loeffler, T., 1983. Mono- and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*, Phytochemistry, 22, 359-363.
- Gross, D. ve Coombs, J., 1975. Enzymatic colour formation in beet and cane juice, 15<sup>th</sup> General Assembly of C.I.T.S., Vienna.

- Gul'ko, A. Y. ve Khaziyev, F. K., 1993. Soil polyphenol oxidase; their production, immobilization and activity, Eurasian Soil Science, 25, 101.
- Gutteridge, S. ve Robb, D., 1973. Purification of Mushroom Tyrosinase by Affinity Chromatography, Biochemical Society Transactions, 1, 519.
- Güner, S., 2007. Biyokimya-1, K.T.Ü. Matbaası, Trabzon.
- Ha, T. J., Yang, M. S., Jang, D. S., Choi, S. U. ve Park, K. H., 2001. Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophora flavescens* for melanogenesis, Bulletin of the Korean Chemical Society, 22, 97-99.
- Haghbeen, K. ve Tan, E. W., 2003. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates, Analytical Biochemistry, 312, 23-32.
- Harel, E., Mayer, A. M. ve Shain, Y., 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition, Plant Physiology, 17, 921.
- Hermann, K., 1976. Flavonols and flavones in food plants: a review, Journal of Food Technology, 11, 433.
- Hodge, J. E., 1953. Dehydrated foods : Chemistry of browning reactions in model systems, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1, 928-943.
- Hsu, A. F., Shieh, J. J., Bills, D. D. ve White, K., 1988. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives, Journal of Food Science, 53, 765-767.
- Hughes, J. C. ve Swain, T., 1962. After-cooking blackening in potatoes. Examination of the interaction of factors by in vitro experiments, Journal of Science of the Food and Agriculture, 13, 358.
- Hunt, M. D., Eanetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. ve Steffens, J. C., 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase, Plant Molecular Biology, 21, 59-68.
- Ikeda, R., Uyama, H. ve Kobayashi, S., 1996. Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide) Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid, Macromolecules, 29, 3053-3054.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F. ve Nicholas, J., 1989. Polyphenol oxidase from apple-purification and some properties, Phytochemistry, 28, 2903-2907.
- Jiang, Y. M., 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit., Food Chemistry, 66, 75-79.
- Jimenez-Atienzar, M., Pedreno, M. A. ve Garcia-Carmona, F., 1991. Activation of polyphenol oxidase by polyamines, Biochemistry International, 25, 861-868.

- Jimenez-Atienzar, M. ve Garcia-Carmona, F., 1996. Kinetics of the slow pH-mediated transition of polyphenol oxidase, Archives of Biochemistry and Biophysics, 331, 15-22.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. ve Metche, M., 1997. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase, Journal of Science of the Food and Agriculture, 73, 513-516.
- Kazandjian, R. Z. ve Klibanov, A. M., 1985. Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform, Journal of American Chemical Society, 107, 5448-5450.
- Kenten, R. H., 1957. Latent phenolase in extracts of broad bean. Activation by acid and alkali, Biochemical Journal, 67, 300-307.
- Kermasha, S., Bao, H. ve Bisakowski, B., 2001. Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media, Journal of Molecular Catalysis, 11, 929-938.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), Food Chemistry, 101, 778-785.
- Kong, K. H., Hong, M. P., Choi, S. S., Kim, Y. T. ve Cho, S. H., 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 113-118.
- Kubo, I. ve Yokokava, Y., 1992. Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from *Buddleria coriacea*, Phytochemistry, 31, 1075-1077.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1998. Tyrosinase inhibitores from cumin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 5338-5341.
- Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1999. Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4121-4125.
- Labuza, T. P., Lillemo, J. H. ve Taoukis, P. S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes, Fruit Processing, 2, 9-13.
- Langdon, T. T., 1987. Prevention of browning in prepared potatoes without the use of sulfiting agents, Food Technology, 41, 64-67.
- Laurila, E., Kervinen, R. ve Ahvenainen, R., 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits, Postharvest News and Information, 9, 53.

- Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre, G. ve Neumann, J., 1963. Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase, in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham J. E. Ed., Pergamon Pres, Oxford.
- Leatham, G. F., 1985. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 859-867.
- Lee, H. S. ve Nagy, S., 1988. Quality changes and nonenzymic browning. intermediates in grapefruit juice during storage, *Journal of Food Science*, 53, 168-172.
- Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W. ve Brown, S. K., 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 99.
- Lee, S. E., Kim, M. K., Lee, S. G., Ahn, Y. J. ve Lee, H. S., 2000. Inhibitory effects of *Linnamomen cassia* bark-derived materials on mushroom tyrosinase, *Food Science and Biotechnology*, 9, 330-333.
- Lee, H. S., 2002. Tyrosinase inhibitors from *Pulsatilla cernua* root-derived materials, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1400-1403.
- Lerman, L. S., 1953. A Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 39, 232-236.
- Lineweaver, H., ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-661.
- Lou, Y. ve Barbaso-Canovase, G. V., 1995. Enzymatic browning and its prevention, Lee, C. Y., Whitaker, J. R., American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Lourenço, E. J., Leao, J. S. ve Neves, V. A., 2006. Heat inactivation and kinetics of polyphenoloxidase from palmito (*Euterpe edulis*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52, 249-259.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manzocco, L., Nicoli, M. C., Anese, M., Pitotti, A. ve Maltini, E., 1999. Polyphenol oxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties, *Food Research International*, 31, 363.



- Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C., 2000. Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods.  
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>,  
03 Mart 2008.
- Martin, W. ve Ruberte, R., 1976. The polyphenol of *Dioscorea alata* (yam) tubers associated with oxidative browning, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 67.
- Martinez, M. ve Whitaker, J. R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning Trends in Food Science and Technology, 6, 195-200.
- Mathewson, P. R., 2000. Enzymes, Eagen Pres, Handbook Series, 37.
- Mauron, J., 1981. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint, Program The Food and Nutrition Science, 5, 5-35.
- Mayer, A. M., Harel, E. ve Ben-Shaul, R., Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods, Phytochemistry, 5, 783.
- Mayer, A. M., 1987. Polyphenol oxidases in plants recent progress, Phytochemistry, 26, 11.
- Mazzafera, P. ve Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee, Phytochemistry, 55, 285-296.
- McEvily, A. J., Iyengar, R. ve Otwell, S., 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis, Food Technology, 45, 80-86.
- Mcweeny, D. J., 1974. The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites, Journal of the Science of Food and Agriculture, 25, 735.
- Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo, L., Kiss-Kutz, N. ve Babos-Szcbenly, E., 1978. The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 7, 57.
- Monsalve-Gonzalez, A., Barbaso-Canovas, G. V., Cavalieri, R. P., McEvily, A. J. ve Iyengar, R., 1993. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods, 4-hexylresorcinol as anti-browning agent, Journal of Food Science, 58, 797-800.
- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A. ve Klenitskaya, I. A., 1992. Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus, Eurasian Soil Science, 5, 60.
- Murata, M., Kurokami, C. ve Homma, S., 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*), Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56, 1705-1710.

- Newman, S. M., Eannetta, N. T., Yu, H., Prince, J. P., de Vincette, M. C., Tanksley, S. D. ve Steffens, J. C., 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family, Plant Molecular Biology, 26, 495-502.
- O'brein, J. ve Morrissey, P. A., 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in food, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28, 211.
- O'Neill, S. P., Graves, D. J. ve Ferguson, J. E., 1973. Affinity chromatography of mushroom tyrosinase, Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry, 7, 1159-1166.
- Önez, Z., 2006. Üzümden (*Vitis Vinifera* L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B. ve Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae, Food Chemistry, 85, 431-437.
- Özkaragöz, K., 1978. Alerji Hastalıkları Kitabı, Emek Matbaası, Ankara.
- Padron, M. P., Lorano, J. A. ve Gonsales, A. G., 1975. Properties of *o*-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*, Phytochemistry, 14, 1959.
- Palmer, T., 1995. Kinetics of single-substrate enzyme catalyzed reactions. In Understanding Enzymes, 4, 107-127.
- Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S. ve Hegade, M. V. J., 1992. Effect of activation methods on affinity chromatography of potato polyphenol oxidase, Phytochemistry, 31, 1481.
- Paul, B. ve Gowda, L. R., 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3839-3846.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları, Gıda, 17, 181.
- Perez-Gilabert, M. ve Garcia-Carmona, F., 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 695-700.
- Richard-Forget, F. C., Rouet-Mayer, M., Goupy, P. M., Philippon, J. ve Nicolas, J., 1992. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Apple Polyphenol Oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2114-2122.
- Riggin, R. M., McCarthy, M. J. ve Kissenger, P. T., 1976. Identification of salsolinol as a major dopamin metabolite in the banana, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 189-191.

- Robb, D. A., 1984. Copper proteins and copper enzymes, Lontie, R., 2, FL: CRC Press, Boca Raton.
- Robert, C. M., Cadet, F. R., Rouch, C. C., Pabion, M. ve Richard-Forget, F., 1995. Kinetic study of the irreversible thermal deactivation of palmito (*Acanthopoenix rubra*) polyphenol oxidase and effect of pH, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1143-1150.
- Rocha, A. M. C. N., Cano, M. P., Galeazzi, M. A. M. ve Morais, A. M. M. B., 1998. Characterization of starring apple polyphenol oxidase, Journal of the Science of Food and Agriculture, 77, 527.
- Rocha, A. M. C. N. ve Morais, A. M. M. B., 2001. Characterization of polyphenol oxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple, Food Control, 12, 85-90.
- Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J. ve Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone, Analytical Biochemistry, 216, 205-212.
- Ros, J. R., Rodriguez-Lopez, J. N. ve Garcia-Canovas, F., 1993. Effect of ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase, Biochemical Journal, 295, 309-312.
- Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J. ve Garcia-Carmona, F., 1989. Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase, Phytochemistry, 91, 1321-1325.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. ve Garcia-Carmona, F., 1990. Partial purification of a thylakoid bound enzyme using temperature-induced phase partitioning, Analytical Biochemistry, 184, 279-282.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. ve Garcia-Carmona, F., 1993. Substrate dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1583-1586.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. ve Garcia-Carmona, F., 1994. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents, Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology, 29, 275-313.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, Biochimica et Biophysica Acta, 1247, 1-11.
- Sapers, G. M. ve Ziolkowski, M. A., 1987. Comparison of erythorbic acid and ascorbic acid as inhibitors of enzymatic browning in apple, Journal of Food Science, 52, 1732-1733.
- Sapers, G. M., 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means, Food Technology, 47, 75-81.

- Sarkar, J. M., Leonowicz, A. ve Bollog, J. M., 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils, Soil Biology and Biochemistry, 21, 223.
- Selles-Marchart, S., Casado-Vela, J. ve Bru-Martinez, R., 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form, Archives of Biochemistry and Biophysics, 446, 175-185.
- Seo, S. Y., Sharma, V. K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2837-2853.
- Serradell, M. A., Rozenfeld, P. A., Martinez, G. A., Civello, P. M., Chaves, A. V. ve Anon, M. C., 2000. Polyphenol oxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1421-1427.
- Sesli, E., 1994. Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Siddiq, M., Sinha, K. ve Cash, J. N., 1992. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums, Journal of Food Science, 57, 1177-1179.
- Siegbahn, P. E. M., 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 8, 567-576.
- Sojo, M. M., Nuez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. ve Sanchez-Ferrer, A., 1988. Partial purification of banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8,000 for removal of polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4924-4930.
- Stephens, G. J. ve Wood, R. K. S., 1974. Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase, Nature, 251, 358.
- Swain, T., Mapson, L. W. ve Robb, D. A., 1966. Activation of *Vicia faba* tyrosinase as effected by denaturing agents, Phytochemistry, 5, 469-482.
- Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Oktay, M. ve Onganer, Y., 1996. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) Polyphenol Oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 2982-2986.
- Tolbert, N. E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts, Plant Pathology, 51, 234.
- Tono, T., Fujita, S., Kawasaki, H. ve Li, Z. F., 1986. Purification and high *L*-epicatechin oxidase activity in polyphenol oxidase of Japanese pear, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 60, 705-712.

- Trejo-Gonzalez, A. ve Soto-Valdez, H., 1991. Partial characterization of polyphenol oxidase extracted from "Anna" apple, Journal of American Society of Horticultural Science, 116, 672-675.
- Tse, M., Kermasha, A. ve Ismail, A., 1997. Biocatalysis by tyrosinase in organic solvent media; a model system using catechin and vanillin as substrates, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2, 199-213.
- URL-1, <http://www.geocities.com/rainforest/andes/8046/structure.html> Structure of a Mushroom, 18 Şubat 2008.
- Ünal, M. Ü., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*), Food Chemistry, 100, 909-913.
- Valero, E. ve Garcia-Carmona, F., 1998. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2447.
- Vamos-Vigyazo, L. ve Gejzago, L., 1978. Substrate specificity of the enzymatic browning of apples, Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae, 7, 79.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase in fruits and vegetables, Critical Reviews in Food Science Nutrition, 9, 49-127.
- van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. ve Wichers, H. J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase, Phytochemistry, 45, 1309-1323.
- Walker, J. R. L., 1995. Enzymatic browning in fruits: Its biochemistry and control, In *Enzymatic Browning and Its Prevention*, Y. L. Chang and J. L. Whitaker, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, DC, 8-22.
- Whitaker, J. R., 1972. Principles of enzymology for the food sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York.
- Whitaker, J. R. ve Lee, C. Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, C. Y. Lee ve J. R. Whitaker, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, DC, 2-7.
- Whitaker, J. R. 1995. Polyphenol oxidase, *Food enzymes: Structure and Mechanism*, Dominic W. S. Wong, Chapman and Hall, New York, 271-307.
- White, J. S. ve White, D. C., 1997. Source Book of Enzymes, CRL Pres LLC, Florida, 33431.
- Wissemann, K. W. ve Lee, C. Y., 1980. Purification of grape polyphenol oxidase with hydrophobic chromatography, Journal of Chromatography, 192, 232-235.
- Wissemann, K. W. ve Montgomery, M. W., 1985. Purification of d'Anjou Pear (*Pyrus communis* L.) Polyphenol Oxidase, Plant Physiology, 78, 256-262.

- Xiaodong, Z. ve Flurkey, W. H., 1997. Phenoloxidasen in *Portabella* Mushrooms, Journal of Food Science, 62, 97-100.
- Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. ve Kawachi, S., 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). The Japan Wood Research Society, 50, 260-265.
- Yagar, H. ve Sagiroglu, A., 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince, Turkish Journal of Chemistry, 26, 97-103.
- Yang, C. P., Shuji, F., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp, Journal of Agricultural Chemistry, 48, 2732-2735.
- Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusaboyashi, A., Ashafuzzaman, M. A. ve Hayashi, N., 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel, Journal of Agricultural Chemistry, 49, 1446-1449.
- Yelena, G., Sheptovitsky ve Brudving, G. V., 1996. Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. Biochemistry, 35, 16255-16263.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. ve Beldüz, A. O., 2005. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* strains K1 and K4<sup>T</sup>, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 501-507.
- Yonekura, M., Shimoda, T. ve Funatsu, M., 1981. Reinvestigation of Purification of Phenoloxidase from Larvae of Housefly, Agricultural and Biological Chemistry, 45, 101-104.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. ve Eskin, N. A. M., 2007. Oxidative Enzymes in Foods, D. S. Robinson ve N. A. M. Eskin, London, 217-273.
- Zhou, H. ve Feng, X., 1991. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*), Journal of the Science Food and Agriculture, 57, 307-313.
- Zhou, P., Smith, N. L. ve Lee, C. Y., 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 532-536.
- Zhang, X. ve Flurkey, W. H., 1997. Phenoloxidasen in *Portabella* Mushrooms, Journal of Food Science, 62, 97-100.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğreniminden sonra, lise öğrenimini Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 1996 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2000 yılında bu bölümden kimyager unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2003'te tamamladı. Eylül 2003'te, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora programına başladı. Aralık 2000'den itibaren Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.