

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YABANİ VE YENİLEBİLİR BİR MANTAR OLAN *LACTARIUS EUCALYPTI* O. K.
MILL & R. N. HILTON' DAN POLİFENOL OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager İlksen KUYUMCU

ŞUBAT 2014

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YABANI VE YENİLEBİLİR BİR MANTAR OLAN *LACTARIUS EUCALYPTI*
O. K. MILL & R. N. HILTON' DAN POLİFENOL OKSİDAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İlksen KUYUMCU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31. 12. 2013
Tezin Savunma Tarihi : 03. 02. 2014**

Tez Danışmanı: Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

İlksen KUYUMCU Tarafından Hazırlanan

**YABANI VE YENİLEBİLİR BİR MANTAR OLAN *LACTARIUS EUCALYPTI*
O. K. MILL & R. N. HILTON' DAN POLİFENOL OKSİDAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 14/ 01 / 2014 gün ve 1537 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Faik Ahmet AYZAZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Lactarius eucalypti* O. K. Mill & R. N. Hilton’ dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı 1’de yapılmış olup, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Eğitim hayatımın önemli bir kilometre taşı olan bu Yüksek Lisans tez çalışmalarım sırasında bana kılavuzluk eden, her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Öğr.Gör.Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sevgili hocam Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a ve çalışmam esnasında kullanılan mantarların tanımlanmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ’ye teşekkürü bir borç bilirim. Biyokimya Laboratuvarı 1 çalışanları, Arş. Gör. Şaban KESKİN’e, Uzm. Çiğdem AYNA’ya, Uzm. Ümmühan ÇAKMAK’a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Maddi, manevi her zaman yanımda olan yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen dostlarım, Gökhan ÖZKARA, Burçin İPEK, Mehmet Ali TEKİNCANLI ve Mahmut ÖZKAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatın bana en büyük armağanı olarak gördüğüm, her zaman, her konuda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, sevgili aileme gönül dolusu minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İlksen KUYUMCU
Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Lactarius eucalypti* O. K. Mill & R. N. Hilton’ dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

İlksen KUYUMCU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi	2
1.2.1. Mantarlar ve İnsan Sağlığı.....	3
1.2.2. <i>Lactarius eucalypti</i> O. K. Mill & R. N. Hilton'un Morfolojik Özellikleri.....	5
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları	6
1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları	6
1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları	8
1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri	10
1.4.1. Polifenol Oksidazın Adlandırılması	10
1.4.2. Polifenol Oksidazın Tabiattaki Dağılımı.....	10
1.4.3. Polifenol Oksidazın Reaksiyon Mekanizması.....	11
1.4.4. Polifenol Oksidazın Substratları.....	17
1.4.5. Polifenol Oksidazın Tıpta, Endüstride ve Doğadaki Rolü	22
1.4.6. Polifenol Oksidaz Enzimi ile Yapılan Bazı Çalışmalar.....	23
1.4.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	25
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1. Materyal.....	27
2.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	27
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	28
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	29

2.1.3.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.1.3.2.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	29
2.1.3.3.	Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar	30
2.1.3.4.	Substrat Çözeltileri	31
2.1.3.5.	Tampon Çözeltiler	31
2.1.3.6.	Diğer Çözeltiler	32
2.2.	DeneySEL Çalışmalar	33
2.2.1.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme.....	33
2.2.2.	Afinite Jelinin Sentezi	33
2.2.3.	Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	35
2.2.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	35
2.2.5.	Protein Tayini	35
2.2.6.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal-PAGE).....	36
2.2.7.	Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 ile Boyama.....	37
2.2.8.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	37
2.3.	Saf Enzimin Karakterizasyonu	38
2.3.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	38
2.3.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	38
2.3.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	38
2.3.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	39
2.3.5.	Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı	39
2.3.6.	Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı.....	39
2.3.7.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	39
2.3.8.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.....	40
3.	BULGULAR	41
3.1.	Enzim Saflaştırma Çalışmaları	41
3.1.1.	Çalışılan Mantar Türünün ve Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	41
3.1.2.	Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	42
3.2.	Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu	43
3.2.1.	Polifenol Oksidazın Saflığının Elektrofretik Olarak Karakterizasyonu	43
3.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu	44
3.2.2.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	44
3.2.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	45

3.2.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	46
3.2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	47
3.2.2.5. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı	49
3.2.2.6. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı.....	51
3.2.2.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	54
3.2.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.....	56
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	57
5. ÖNERİLER	63
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

YABANI VE YENİLEBİLİR BİR MANTAR OLAN *LACTARIUS EUCALYPTI* O. K. MILL & R. N. HILTON' DAN POLİFENOL OKSİDAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

İlksen KUYUMCU

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

2014, 72 sayfa

Bu çalışmada, polifenol oksidaz (PFO), yabancı ve yenilebilir bir mantar olan *Lactarius eucalypti*'den, Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak, afinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve biyokimyasal olarak karakterize edildi. Saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant halinde ortaya konuldu. 4-metilkatekol (4-MK) substratı varlığında enzimin optimum pH'sı 5,0, *L*-3,4-dihidroksifenilalanin (*L*-DOPA) ve 3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik asit (DHPPA) substratı varlığında 7,0 olarak belirlendi. Optimum sıcaklığı, 4-MK ve *L*-DOPA substratları varlığında 20°C, DHPPA substratı varlığında 30°C olarak belirlendi. Enzimin ısı kararlılık profili incelendiğinde substratları için optimum sıcaklıklarında bir saatlik inkübasyon sonucu aktivitesini %60 koruduğu gözlemlendi. *L. eucalypti* PFO'sunun 4-MK ile pH 5,0, DHPPA ve *L*-DOPA ile pH 7,0'de 24 saat inkübasyon sonucu oldukça kararlı bir profile sahip olduğu gözlemlendi. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda, V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla, 4-MK, DHPPA, *L*-DOPA substratları varlığında 2500, 2000, 1666 U/mg protein ve 0,25, 0,4, 0,83 mM olarak belirlendi. PFO için elde edilen I_{50} değerlerine göre, askorbik asitin *L. eucalypti* PFO'su üzerinde en etkili inhibitör olduğu gözlemlendi. Ayrıca bazı metal iyonlarının PFO aktivitesine farklı şekillerde etkilediği tespit edildi. Çalışmalar sonucu elde edilen veriler, bu enzimin bir çok endüstri alanı için faydalı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lactarius eucalypti*, Polifenol Oksidaz, Afinite Kromatografisi, Karakterizasyon, Saflaştırma

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM
A WILD EDIBLE MUSHROOM *LACTARIUS EUCALYPTI* O. K. MILL & R. N.
HILTON

İlksen KUYUMCU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Yakup KOLCUOĞLU, PhD.
2014, 72 pages

In this study, a polyphenol oxidase (PPO) was purified from wild edible mushroom, *Lactarius eucalypti* O. K. Mill & R. N. Hilton, by using a Sepharose-4-B-*L*-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity column and characterized biochemically. The purified enzyme was appeared as a single band on native- and SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum pH and temperature the purified enzyme were found to be 5,0, and 20°C for 4-methylcatechol (4-MC), 7,0 and 20°C for *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine (*L*-DOPA) and 7,0 and 30°C for 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propionic acid (DHPPA), respectively. Having studied the thermal stability of the purified enzyme, it was conserved the activity approximately 60% in their optimum temperature in presence of the all substrate after an hour incubation. It was observed that *L. eucalypti* PPO very stabile at pH 5,0 with 4-MC, at pH 7,0 with DHPPA and *L*-DOPA after 24 hour incubation. In the presence of, 4-methylcatechol, *L*-DOPA and DHPPA as a substrate, V_{max} and K_m values were calculated as 2500, 2000, 1666 U/mg and 0,25, 0,4, 0,83 mM, respectively. According to I_{50} data, ascorbic acid was found most effective inhibitor on the *L. eucalypti* PPO activity. In addition, some metal ions affect the enzyme activity at different concentrations. The findings from the present study showed that this enzyme can be used for some industrial purposes.

Key Words: *Lactarius eucalypti*, Polyphenol Oxidase, Affinity Chromatography, Characterization, Purification

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Bir mantarın ana Bölümleri.....	3
Şekil 2. <i>Lactarius eucalypti</i> O. K. Mill & R. N. Hilton'un fruktifikasyon organları.....	5
Şekil 3. Serbest amino grubu ve karbonil grubu arasındaki kondenzasyon reaksiyonu.....	6
Şekil 4. Amadori yeniden düzenlemesi	7
Şekil 5. Strecker bozulması	7
Şekil 6. Maillard reaksiyonlarının üçüncü basamağı.....	8
Şekil 7. Kinonların serbest amino asitlere polimerizasyonu.....	9
Şekil 8. PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri	11
Şekil 9. PFO'nun bakır merkezleri	12
Şekil 10. PFO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	13
Şekil 11. PFO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	14
Şekil 12. PFO'nun Ribbon resmi.....	15
Şekil 13. PFO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu	16
Şekil 14. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	17
Şekil 15. (+) - Katekin (R1= H, R2= Oh), (-) - Epikatekin (R1= Oh, R2= H).....	18
Şekil 16. Klorojenik asit (5-O-Kafeilkinik Asit).....	18
Şekil 17. Bazı flavanollerin kimyasal yapısı	19
Şekil 18. Yaygın olarak kullanılan bazı basit fenollerin kimyasal yapısı	19
Şekil 19. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.....	34
Şekil 20. Afinite Kromatografisi İle <i>Lactarius Eucalypti</i> 'den PFO'nun Saflaştırılması	42
Şekil 21.A) SDS-PAGE (Coomassie Boyama)B) Doğal-PAGE(Substrat Boyama) C) Doğal-PAGE Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama.....	44
Şekil 22. Polifenol oksidaz aktivitesinin farklı substratlar varlığında pH ile değişimi	45
Şekil 23. Polifenol oksidaz aktivitesinin farklı substratlar varlığında sıcaklık ile değişimi	46
Şekil 24. Polifenol oksidaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	46
Şekil 25. 4-MK varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği	47
Şekil 26. DHPPA varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği	48
Şekil 27. L-DOPA varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48

Şekil 28. 4-MK substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi.....	49
Şekil 29. DHPPA substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi.....	50
Şekil 30. <i>L-DOPA</i> substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi	50
Şekil 31. +4°C’de enzimin 4-MK substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi...	51
Şekil 32. 20°C’de enzimin 4-MK substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi...	52
Şekil 33. +4°C’de enzimin DHPPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi	52
Şekil 34. 30°C’de enzimin DHPPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi	53
Şekil 35. +4°C’de enzimin <i>L-DOPA</i> substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi	53
Şekil 36. 20°C’enzimin <i>L-DOPA</i> substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi ...	54
Şekil 37. 4-MK substratı varlığında metal iyonları etkisi	55
Şekil 38. DHPPA substratı varlığında metal iyonları etkisi	55
Şekil 39. <i>L-DOPA</i> substratı varlığında metal iyonları etkisi.....	56

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Bazı meyve ve sebzelerdeki PFO'nun fenolik substratları	21
Tablo 2. Kullanılan cihazlar	27
Tablo 3. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	28
Tablo 4. Doğal PAGE Bileşenleri	36
Tablo 5. SDS-PAGE Bileşenleri	37
Tablo 6. Mantarlarda elde edilen özütlerdeki PFO aktivitesinin uygun substratlar varlığında % Bağlı Aktivite Değerleri.....	41
Tablo 7. <i>Lactarius eucalypti</i> PFO 'su İçin Saflaştırma Tablosu	43
Tablo 8. PFO inhibitörlerine ait I ₅₀ Değerleri	56

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
DHPPA	: 3-(3,4-dihidroksifenil)propiyonik asit
DMF	: Dimetilformamid
DOPA	: 3,4-dihidroksifenilalanin
EC	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EU	: Enzim Ünitesi
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
mA	: Miliamper
MBTH	: 3-metil-2-benzotiyozolinon
mM	: Milimolar
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PFO	: Polifenol Oksidaz
PHPPA	: 3-(4-hidroksifenil)propiyonik asit
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
V_{maks}	: Maksimum hız
μg	: Mikrogram

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son yıllarda gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimlerin çeşitli endüstri kollarında kullanımı, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel enzimler ülkemizde en çok tekstil ve deterjan sanayinde kullanılmakta olup, bunu gıda ve deri endüstrisi izlemektedir.

Gıda endüstrisinde de enzimler özellikle son yıllarda tüketiciye cazip gelecek ve yüksek besleyicilik değerine sahip gıdaların geliştirilmesi ve üretiminde gittikçe artan bir öneme sahip olmaya başlamışlardır. Gıdaların korunmasına ilişkin olarak yapılması gereken temel uygulamalardan birisi dokulardaki kimyasal olayların kontrol altına alınmasıdır. Çünkü özellikle sebze ve meyvelerde meydana gelen kimyasal değişimler ürünün renginin bozulmasına ve daha da önemlisi besin değerinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu renk bozunmaları enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır.

Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine esmerleşme ya da kararına denir. Esmerleşmeyi etkileyen başlıca faktörler; pH, sıcaklık, dokularda bulunan oksijen miktarı ve aktif Polifenol oksidaz (PFO) (E.C. 1.14.18.1) konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir.

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).

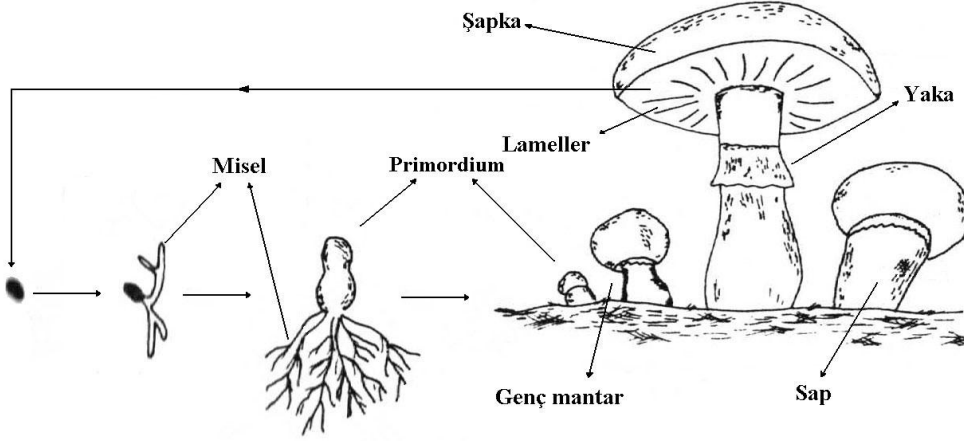
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

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

Yabani olarak yetişen mantarlar dünya çapında yaygındır. Dünya üzerinde var olan mantar türlerinin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte on binler civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bilinen türlerin yüzde ondan daha az bir kısmının yenilebilir olduğu, buna yakın bir oranda türün ise zehirli olduğu düşünülmektedir (Toth, 1995). Yabani olarak yetişen yenilebilir mantarların tüketimi gelişmiş ülkelerde dahi, eser elementler ve protein içeriği açısından zengin olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır (Sesli vd., 1994)

Mantarlar klorofil taşımayan organizmalar olup, canlı bitkilerin üzerinde parazit olarak, ölü bitkilerin üzerinde çürükçül veya başka canlılar ile simbiyotik bir yaşam sürdürürler. Mantarların üremesi sporlar ve/veya miseller yoluyla gerçekleşir. Toprağa dökülen sporlar rüzgârla ya da böceklerle çevreye dağılır ve toprakta yıllarca yaşayabilir. Mantarlar nemli ortamlarda gelişirler. Bu nedenle, yağmurlardan sonra topraktaki sporlar çimlenerek mantarları oluştururlar. Ortalama bir mantarın yaklaşık %90'ısudan oluşur. Bu sebepten dolayı yaşam süresi kısadır ve hemen çürür.

Fruktifikasyon organı veya mantar meyvesi olarak da bilinen şapka, *Basidiomycetes* sınıfında basidiokarp, *Ascomycetes* sınıfında askokarp adını alır. *Basidiomycetes* sınıfında mantarların en gelişmiş türleri bulunur (Boztok, 1990).



Şekil 1. Bir mantarın ana bölümleri (URL-1, 2013)

Sekil 1’de bir mantarın ana bölümleri gösterilmektedir. Mantarların toprak altı kısmını miseller, toprak üstü kısmını ise şapka oluşturur. Toprak altı kısmını oluşturan miseller bitkilerdeki kökler gibi ortamdan su ve besin maddelerini alarak başka noktalara nakledeleler. Ancak, yüksek bitkilerde toprak üstü kısmını oluşturan plumula ve toprak altı kısmını oluşturan radikula tohumda hemen hemen aynı anda oluşurken mantarda üretim birimi olan spor çimlenmesi ile önce miseller ve daha sonra misellerden şapka oluşmaktadır. Mantarlarda sap veya şapka yeterince besin maddesi toplayarak belli bir noktada yoğunlaşan sekonder misellerden meydana gelir. Yoğunlaşan sekonder misellere tersiyer misel adı verilir. Basidokarp’ın oluşumu sırasında sap kısmındaki hücrelerin içerdiği nucleus sayısı yirmiye kadar çıkarmaktadır. Basidokarp’ın yapıtaşı hif adı verilen tüp şeklinde iplikçiklerdir. Hücre çeperinin yapısında başlıca kitin, selüloz, lignin ve diğer organik bileşikler bulunur. Hücre çeperinin bileşimi, hücrenin yaşına, çevre koşullarına, sıcaklığa, ortamın pH’sına göre farklılık göstermektedir. Hücrenin içi protoplazma ile doludur. Renksiz ve saydam olan stoplazma lipidik granüller ve çubuk şeklinde oluşumlar içerir. Vakuoller hücrenin gaz alış verişini düzenler, hem de stoplazmanın artıklarını barındırır (Boztok, 1990).

1.2.1. Mantarlar ve İnsan Sağlığı

Mantarlar protein içeriği açısından oldukça zengindir ve bütün esansiyel aminoasitleri içerirler. Ayrıca, az miktarda yağ asidi içermelerinden dolayı düşük kalorili

gıdalardır. Mantarlar, karbohidrat ve fiber açısından ise kısmen zengindirler. Bunların yanında, mantarlar önemli miktarda vitamin içerirler. Bu vitaminler tiamin, riboflavin, askorbik asit, vitamin D2 ve minerallerdir (Breene, 1990). Mantarlar düşük kalorili, protein, vitaminler ve mineraller yönünden zengin olduklarından, sağlık açısından değerli gıdalardır (Kovacz, 1996).

Mantarlarda bulunan protein miktarı tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g'dır. Bu proteinlerin ortalama % 70'i sindirilebilir niteliktedir. Böylece yenilen 100 g mantarın yaklaşık 2-5 g'ı protein olarak vücuda alınır. Mantarlardan alınan proteinler vücutta depolanmaz, günlük harcanırlar (Erkel, 1992; Gücin ve Dülger, 1997).

Hayvansal gıdalarda ise ortalama % 8-15 arasında protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin ortalama % 30-40'ı sindirilir; yani yenilen 100 g hayvansal gıdadan alınan protein miktarı yaklaşık 3-8 g kadardır. Ancak bu proteinlerin fazlası vücutta depolanmaya başlayarak aminoasitler biçiminde damar çeperinde birikir. Bu özellikle erkeklerde görülen kalp-damar hastalıklarının nedenlerinden biridir. Kalp damar hastalıklarına sahip kişiler için hayvansal gıdaların alınması sakıncalıdır. Mantarlardaki protein miktarı hayvansal yiyeceklerdeki protein miktarından biraz az da olsa, vücutta birikme riski olmamasından dolayı tercih nedeni olmalıdır. Bunların yanında, mantarlardaki proteinlerde insanların beslenmesi için gerekli tüm aminoasitler de bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı mantarlar sağlığımız açısından önemli besinlerdir (Erkel, 1992; Gücin ve Dülger, 1997).

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

Mantarlar geleneksel bir ilaç olarak yan etkilerden uzak olması nedeniyle çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilebilmesi ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için

kullanılmaktadır. Araştırmalar antifungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici olarak kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaştırmalarına sebep olmuştur. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak da kullanılmışlardır (Sesli, 1994; Blackwell, 1998).

1.2.2. *Lactarius eucalipti* O. K. Mill & R. N. Hilton'un Morfolojik Özellikleri



Şekil 2. *Lactarius eucalipti* O. K. Mill & R. N. Hilton'un früktofikasyon organları

Yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Lactarius eucalipti* kum içeren çeşitli topraklarda, küçük gruplar halinde ökaliptus ağacının altında ıslak ve kuru şartlarda yaşayabilen bir mantar türüdür. Şapka kısmı basık dış bükey, 25-30 mm çapında, tüysüz, kırmızımsı kahve renktedir. Sap silindirik, 20-50 mm bazen beyaz ve tüysüz bazen şapka ile uyumlu ya da viyole kırmızı renktedir. Gil dokusu orta yoğunlukta, krem renginde ve ikili seriler halindedir. Etli kısmı yumuşak, renkli, esnek ve havayla temas ettiğinde renk değiştirmez. Sporları beyaz küresel, 7,5-8,5 x 7,5-8,5 µm'dir (URL-2, 2013).

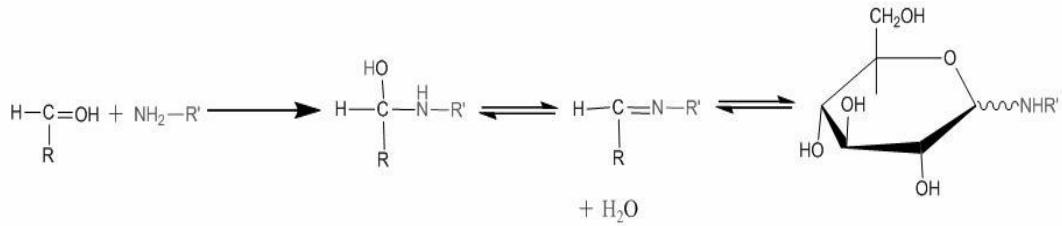
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları

1.3.1. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Meyve ve sebzelerden üretilen birçok ürünün enzimlerin rolü olmadan, başka faktörlerin etkisiyle özellikle ısı etkisiyle hızlanan bir renk esmerleşmesine uğradıkları gözlenmektedir. Meyve suları, kurutulmuş meyve ve sebzeler bazı açık renkli meyve ve sebze konserveleri gibi ürünlerde bu tip renk değişimleri belirgin bir şekilde görülmektedir. Esmerleşme, üretim sırasında uygulanan ısıl işlem sonucu olduğu gibi, depolama sırasında da yavaş bir hızla devam eder. Olayda enzimlerin rolü olmadığından, bu tip renk esmerleşmelerine "enzimatik olmayan renk esmerleşmeleri" denir.

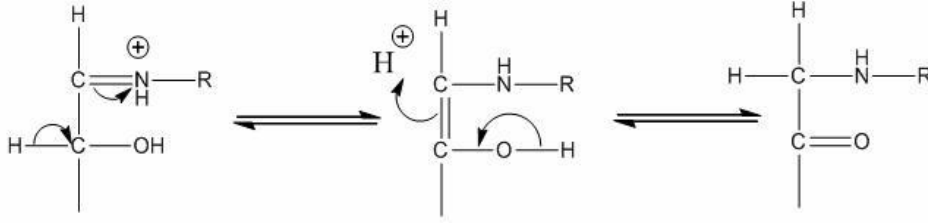
Karmaşık polikondensasyon olayları sonucunda, esmer renkli, "*Melanoidin*" denen bileşikler oluşmaktadır. "*Maillard reaksiyonu*" da denilen enzimatik olmayan renk esmerleşmesi olaylarında birçok ara ürünler oluşmaktadır.

Maillard Reaksiyonlarının oldukça karmaşık olmasına rağmen genel olarak üç basamakta meydana geldiği bilinmektedir. İlk basamakta şeker ve aminoasitlerin kondenzasyon reaksiyonu (Şekil 3) sonucu yapıdan suyun uzaklaşmasıyla Schiff bazı oluşur.



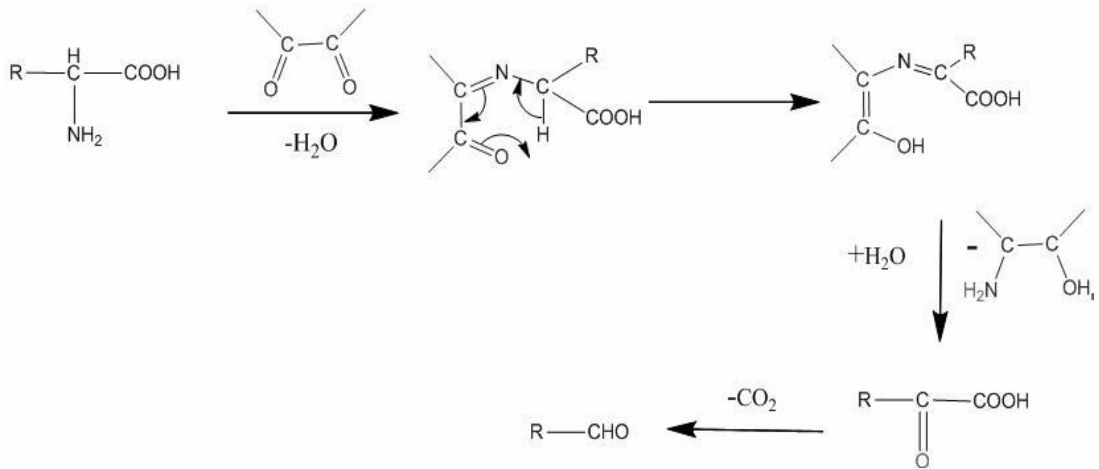
Şekil 3. Serbest amino grubu ve karbonil grubu arasındaki kondenzasyon reaksiyonu (Yıldız vd., 2010).

Asit-baz katalizli ve dönüşümlü olan bu reaksiyondan sonra Schiff bazı aldozilamine döner. Aldozilamin bu aşamada, aldozlar için Amadori düzenleme reaksiyonları ile ketozamine (1-amino-1-dezoksiketoz) izomerize olur (Şekil 4).



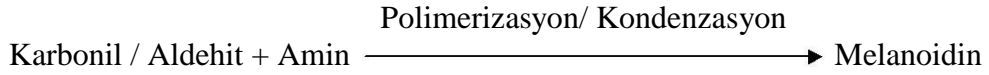
Şekil 4. Amadori yeniden düzenlemesi (Yıldız vd., 2010).

İkinci basamak renk değişiminin de başladığı basamaktır. Bu basamakta birbirinden farklı başlıca 3 yol bulunmaktadır. En önemli Maillard ara ürünlerinin olduğu birinci yolda 1 -amino-1-dezoksiketoza başka bir aldoz molekülü ile reaksiyona girerek daha az stabil olan diketozamine dönüşür. Diketozamin monofruktozamine ve 3-deoksiosüloz gibi birçok bileşiğe parçalanır. İkinci basamağın ikinci yolu Amadori ürünlerinin enolizasyonu (bir karbon atomundan komşu karbonil grubunun oksijenine bir protonun göç etmesi ile doymamış bir alkol yani enol oluşması olayı) ile gerçekleşir. Bu yol pH'nın 7'den düşük olduğu durumlarda pentoz sekerlerin furfurala; heksoz sekerlerin de hidroksimetilfurfurala dönüşmesi ile devam ederken pH'nın 7'den yüksek olduğu durumlarda oldukça reaktif ürünlere enolize olur. İkinci basamağın üçüncü yolu Strecker bozulması (Şekil 5) olarak adlandırılmaktadır. Karbonil gruplarının amino grupları ile kondanse olduğu ve CO₂ oluşumu ile karakterize edilebilen bu basamak, aynı zamanda aroma oluşumunun da başlangıcıdır. Aromanın kaynağı aldehit ve aldehit türevi bileşiklerdir.



Şekil 5. Strecker bozulması (Yıldız vd., 2010).

Üçüncü basamak önceki basamakta oluşan bileşiklerin aminlerle birleşmesi, aldollerin kondanse olması, aldehit ve aminlerin polimerize olması ve böylece melanoidin denilen heterosiklik yapıdaki koyu renkli bileşiklerin oluşmasıdır. Aromatik moleküllerin üretimi reaksiyon dizileri sonucunda oluşur. Bu diziler oldukça karmaşık olup hidroksimetilfurfural, dihidrofuranlar, furanlar, piruvaldehit veya dimetilpirazin gibi kimyasal türlere benzerler (Edwards, 2000; Çelebi, 2006; Coca, 2004).



Şekil 6. Maillard reaksiyonlarının üçüncü basamağı

1.3.2. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan polifenol oksidaz enziminin neden olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenden temassız bir halde bulunmaktadır. Ancak, meyve veya sebze kesildiği ya da zedelendiği zaman enzim hücre dışına çıkar ve moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikleri oluşturur (Mathewson, 2000; Mcweeny, 1974).

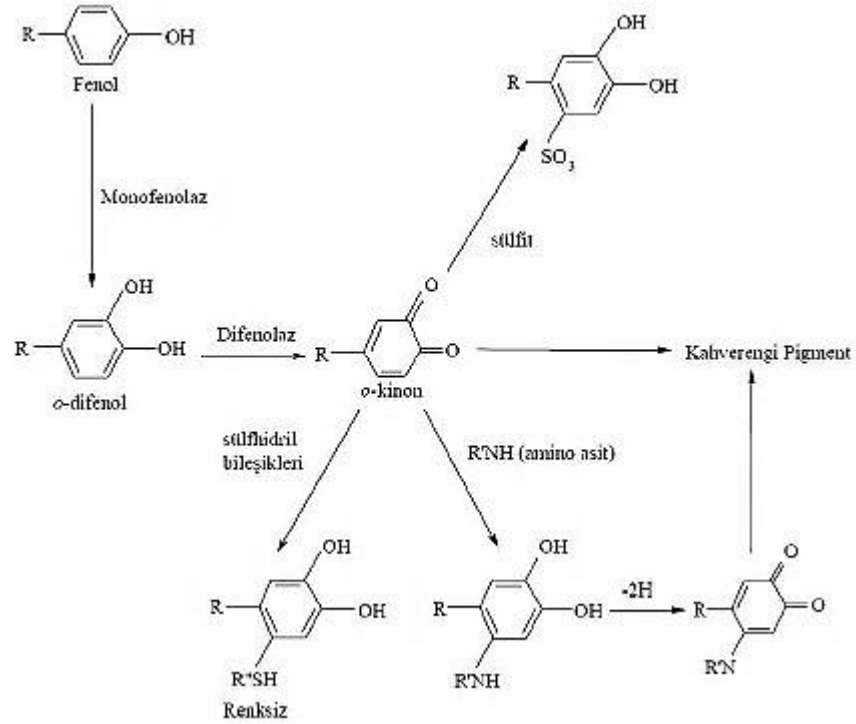
Enzimatik karamanın olabilmesi için polifenol oksidaz enzimi, etkilediği polifenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların uygun bir seviyede olması gerekir. Enzimatik esmerleşme fenolik madde, moleküler oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenebilir (Yang vd., 2001).

Enzimatik karamanın ilk aşaması *o*-kinonların oluşmasıdır. *o*-kinonlar ise *o*-dihidroksifenol ünitesi içeren her çeşit fenolik maddelerden oluşmaktadır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının substratı esas olarak *o*-dihidroksifenol grubu içeren bileşiklerdir. Ancak bu her zaman zorunlu değildir. Nitekim bazı fenolik maddeler, iki aşamada *o*-kinona okside olabilmektedirler. Birinci aşamada, monohidroksi fenollere

hidroksil grupları bağlanarak *o*-dihidroksifenoller oluşmakta, ikinci aşamada ise bunlar *o*-kinonlara dönüşmektedirler.

Enzimatik kararım reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan *o*-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak oluşan *o*-kinon ve türevlerinden sonra dimerler oluşur ve son olarak bunlar daha büyük molekülü bileşiklere polimerize olurlar. Renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir (Labuza vd.,1992; White vd.,1997).

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



Şekil 7. Kinonların serbest amino asitlere polimerizasyonu (Labuza, 1992).

1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri

1.4.1. PFO'nun Adlandırılması

Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir (E.C. 1.14.18.1). Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi), diğeri ise *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi). Kresolaz ve katekolaz aktiviteleri sonucu oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler oluşturur (Whitaker, 1972).

Son yıllarda enzim isimlerindeki karışıklığını giderebilmek amacı ile uluslararası terminolojide bitki polifenol oksidazlarının adlandırılmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Tirosinaz (monofenol monooksijenaz) (E.C.1.14.18.1) enzim kodu ile katekol oksidaz (difenoloksidaz, difenol oksijen oksidoredüktaz) (E.C.1.10.3.2) enzim kodu ile lakkaz ise (E.C.1.10.3.1) enzim kodu ile belirtilmiştir. Ancak bu yeni sınıflandırma aynı enzimin önceleri kresolaz ve katekolaz aktiviteleri olarak bilinen iki reaksiyon arasında ayrımı getirdiği için pek tercih edilmemektedir.

1.4.2. PFO'nun Tabiattaki Dağılımı

PFO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Daha sonra, bazı turunçgiller hariç, pek çok meyve ve sebze PFO enzimi belirlenmiş ve karakterize edilmiştir.

PFO doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı toprak türlerinde glukoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PFO enziminin de varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (Sarkar vd.,1989). Farklı bitkilerin PFO içeriği türe ve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Birçok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PFO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Ragazzi ve Veronese, 1967).

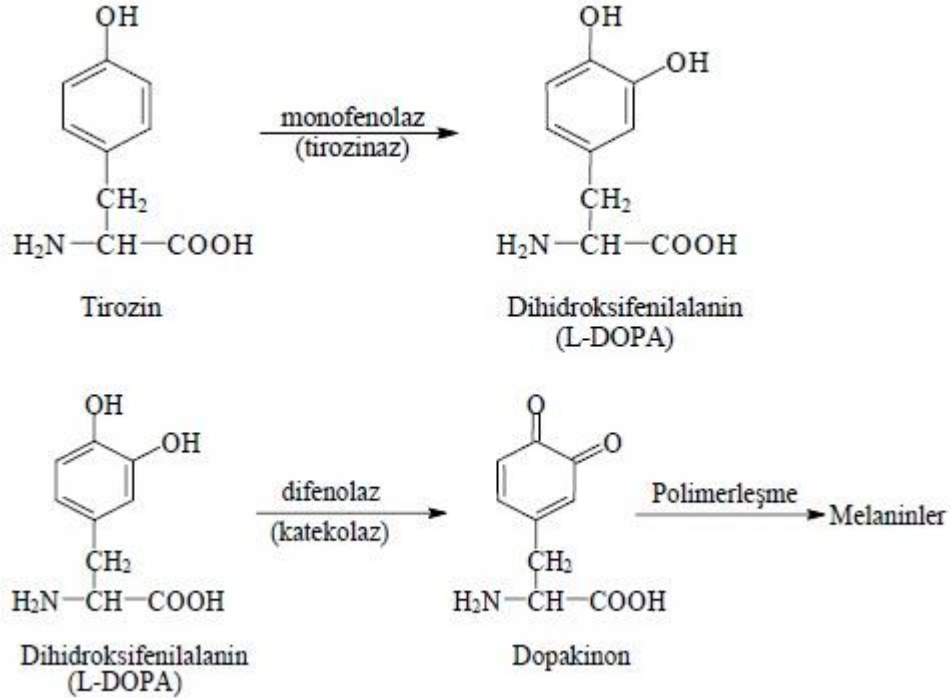
1.4.3. PFO'nun Reaksiyon Mekanizması

Birçok meyve ve sebzenin toplanması ve depolanması süresince kararmasının başlıca sebebi polifenol oksidaz enzimidir (Doğan vd., 2003). Bu enzim, monofenollerin hidroksilasyonu ve polifenollerin oksidasyonunu katalizleyen Cu^{2+} içeren bir monooksigenazdır. PFO, oksijen vasıtasıyla hidrojen yakalayıcısı olduğu için oksidoredüktaz olarak da sınıflandırılmaktadır (Turan, 2005).

Bu sınıflandırmaya göre yapısında bakır içeren PFO enzimi moleküler oksijen varlığında;

- *o*-difenollerin olduğu monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (kresolaz/monofenolaz aktivitesi),
- *o*-difenollerin *o*-kinonlara (katekolaz/difenolaz aktivitesi) oksidasyonu,

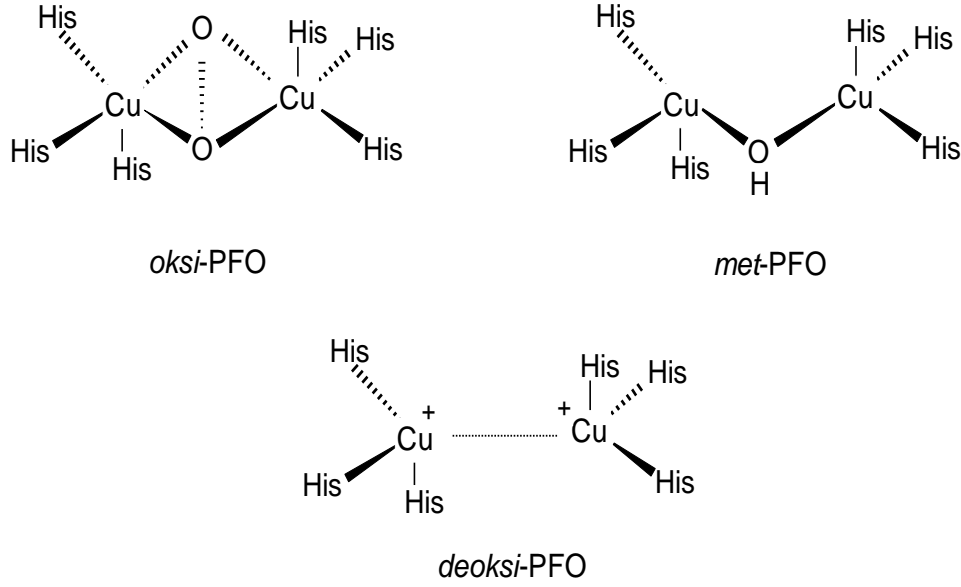
olmak üzere iki farklı reaksiyonu katalizlemektedir (Şekil 8).



Şekil 8. PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (Kolcuoğlu, 2005)

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

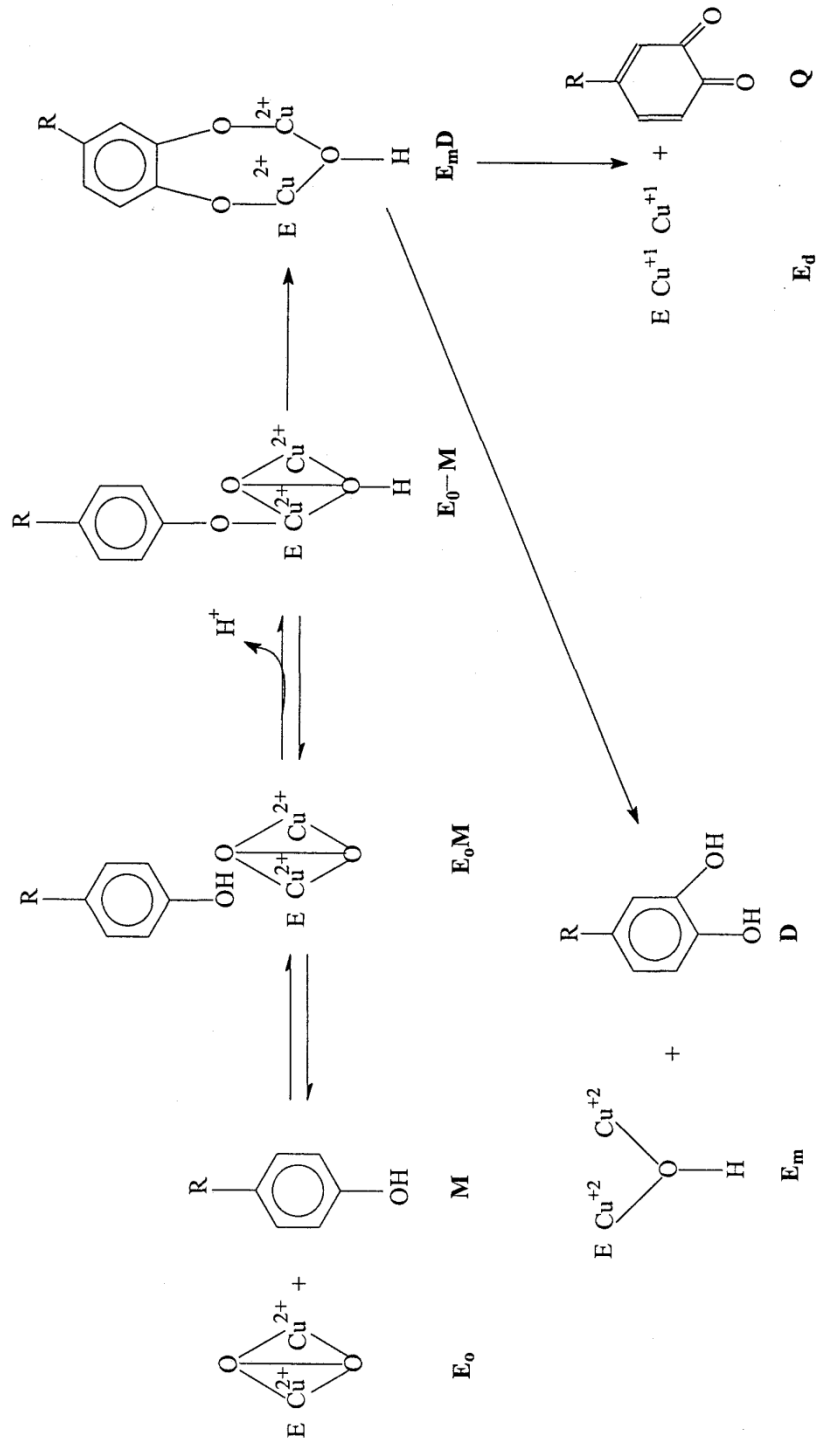
bilinmektedir. Bakır atomunu merkezde bulunuşları sırasıyla ‘‘met’’ (Em), ‘‘deoksi’’ (Ed), ‘‘oksi’’ (Eo) halleridir(Cabanes vd.,1994; Espin vd.,2001). Em; Cu^{2+} - Cu^{2+} aktif bölgesi *met*polifenol oksidazdır. Ed; Cu^{+1} - Cu^{+1} aktif bölgesi PFO'nun indirgenmiş halidir. Eo; Cu^{2+} - O_2^{2-} - Cu^{2+} aktif bölgesi *oksi*polifenol oksidazdır.



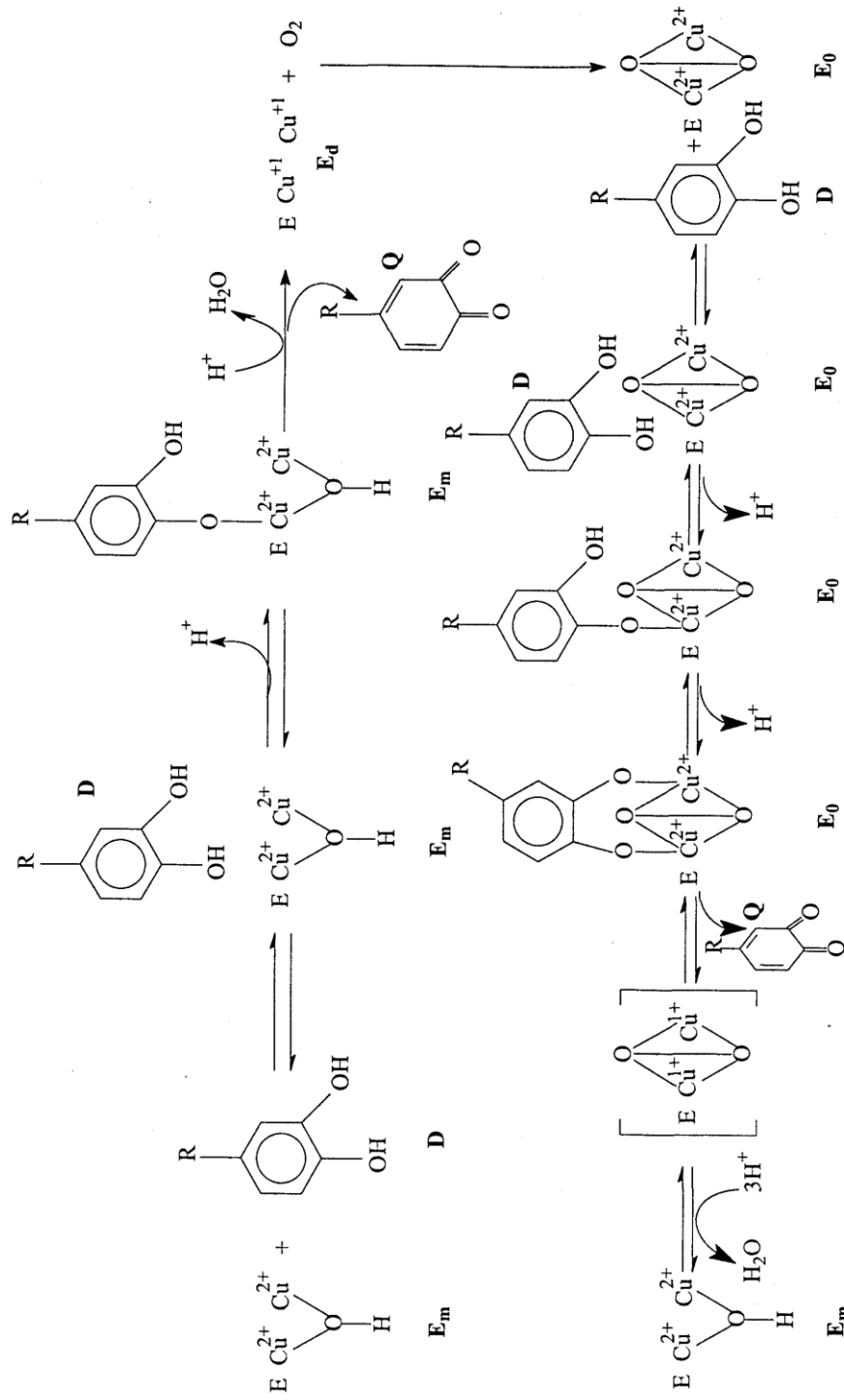
Şekil 9. PFO'nun bakır merkezleri (Öz, 2010)

İlk olarak, monofenolik substrat, E_o'ın aksiyal pozisyonundaki iki bakır atomundan birine koordine olur (Wilcox vd., 1985). Üçgen bipiramit ara bileşiğindeki yeniden düzenleme; peroksit vasıtasıyla monofenolun hidroksilasyonuna su çıkışına ve E_mD kompleksinin oluşumuna yol açar (Solomon ve Lowery,1996) . Oluşan E_mD kompleksi ya $\text{E}_{mD} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{E}_m + \text{D}$ dengesini yerine getirerek katekolaz döngüsündeki ilk adım olan serbest difenolu verebilir ya da aktif bölgeye bağlı difenolat ara bileşiği oksidasyona uğrayarak bir kinon ve bir indirgenmiş binükleer bakır enzim bölgesi (E_d) verir. E_d'ye moleküler oksijen bağlandıktan sonra, oksi PFO(E_o) tekrar rejenere edilir.

PPO tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 10 ve 11'de verilmektedir (Espin, 1998).

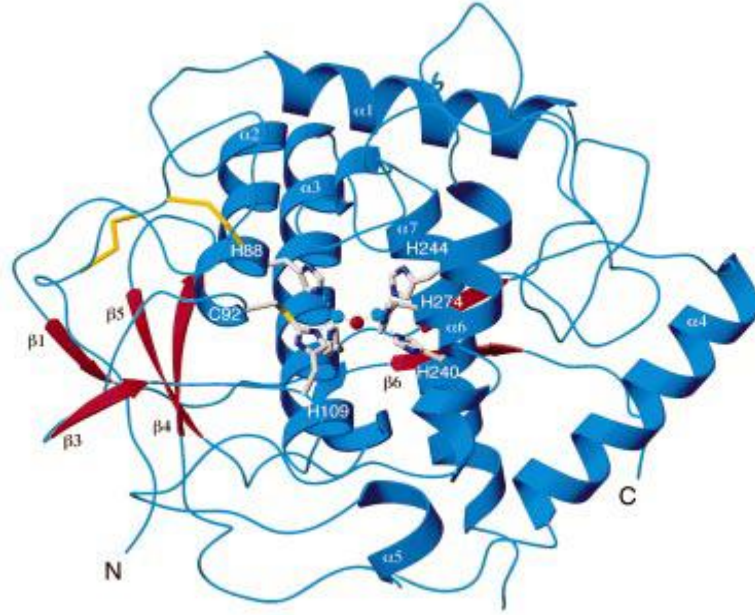


Şekil 10. PFO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması (Espin vd., 1998)



Şekil 11. PFO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması (Espin vd., 1998)

Thomas Klabunde ve arkadaşları (1998) Tip 3 bakır merkezli polifenol oksidaz enziminin katalitik mekanizmasını anlamak amacıyla Cu(II)-Cu(II) yükseltgenme bölgesinde Cu(I)-Cu(I) indirgenmiş form ile feniltiyöre (PTU) inhibitör kompleksiyle patates PFO enziminin üç boyutlu kristal yapısını belirlemek için yaptıkları çalışmada enzimin difenolaz aktivitesini de göstermişlerdir. PFO'nun (katekol oksidaz, tirozinaz) iki çekirdekli bakır merkezi moleküler oksijenin dört elektronunu suya indirgemesiyle katekolün oksidasyonunu katalizler (Şekil 12 ve 13).

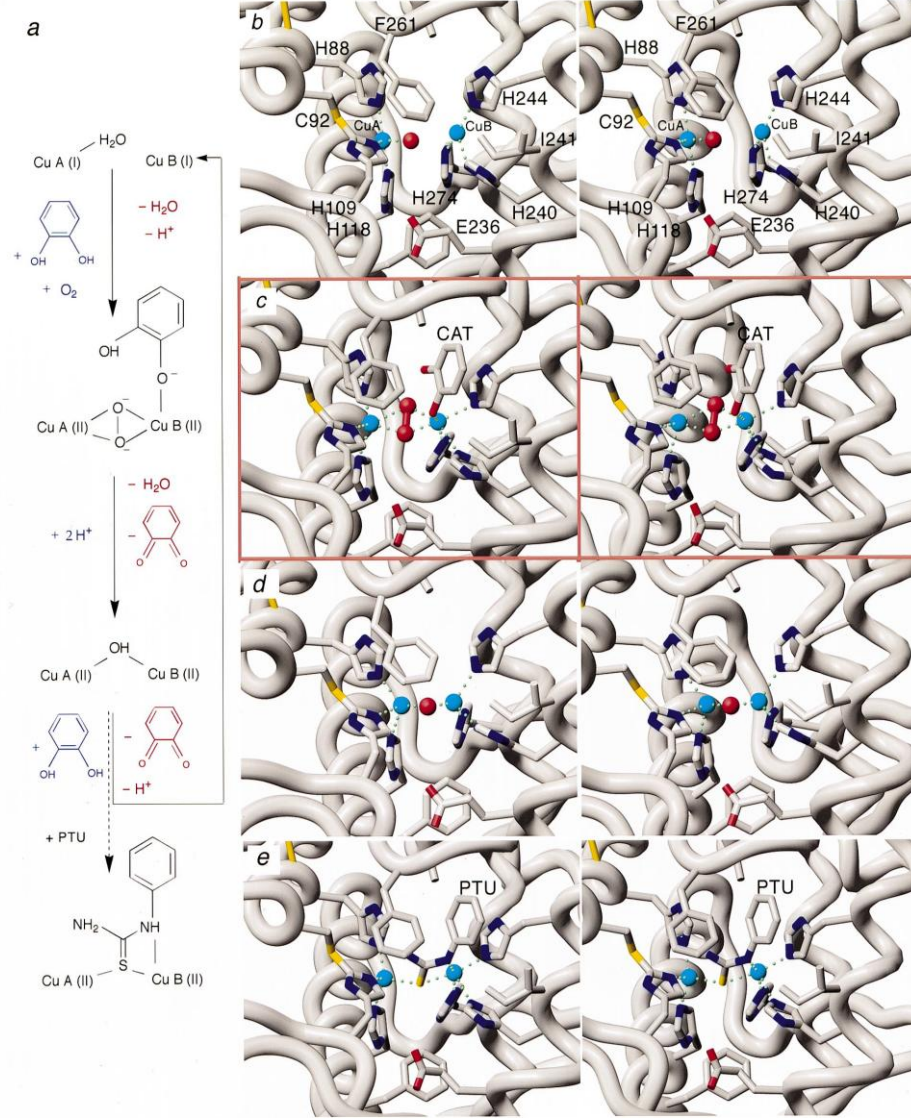


Şekil 12. PFO'nun Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı renkle gösterilmiştir) (Klabunde vd., 1998).

Buna göre iki oksijen iki bakır içeren metal merkeze bağlanmak için indirgenmiş formdaki enzimde CuA'ya bağlı çözücü molekülüyle yer değiştirir (Şekil 13b, Sekil13a'nın en üstü). PFO'da Phe261 yan zincirinin rotasyonu iki bakır merkezini açar ve katekol substratının bağlanmasına izin verir.

PFO ve feniltiyörenin (PTU) inhibitor kompleksi için bağlanma modu incelendiğinde (Sekil 13e, Sekil13 a'nın en alt kısmı) katekol ve oksijenin aynı anda bağlanmasının mümkün olduğu söylenebilir. PFO-PTU inhibitor kompleksine dayanarak, tek-dişli bağlanma modeline göre (Sekil 13c, Sekil 13a'da üstten ikinci) katekol iki hidroksil grubundan birinin protonunu CuB'ya vererek bağlandığı söylenebilir. Dimetal merkeze yakın bir çözücü molekülüne hidrojen bağıyla bağlı Glu236 substratın

deprotonasyonuna yardımcı olmaktadır. Glu236 ve substratın ikinci koordine olmaması hidroksil grubu bir proton vererek su çıkışına ve *o*-kinon çıkışına sebep olur (Sekil 13d, Sekil 13a'nın alttan ikincisi).

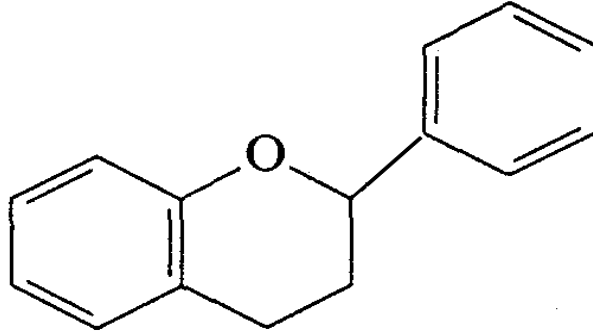


Şekil 13. PFO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu. **a**, üç basamakta şematik olarak gösterilen PFO tarafından katalizlenen reaksiyon yolu: yükseltgenmiş iki katekol molekülü suya indirgenmiş iki oksijen molekülüyle çiftleşir. PTU'nun bağlanması en altta gösterilmiştir. **b-d**, kristalografik analizlerden alınan üç reaksiyon basamağının üç boyutlu yapısı. PFO-O₂²⁻ katekol kompleksi **c**'de **e** (inhibitör PTU'nun bağlanması) rehber alınarak gösterilmiştir (Klabunde vd.,1998).

1.4.4. PFO'nun Substratları

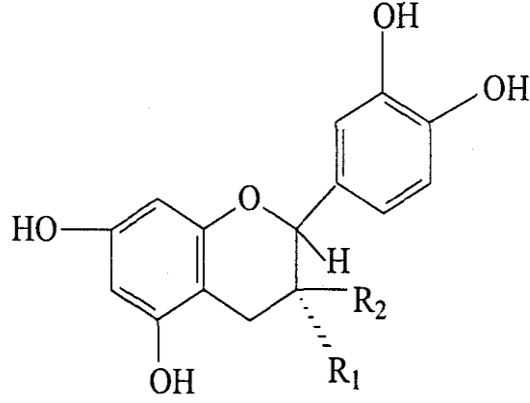
Meyve ve sebzeler oldukça çeşitli fenolik bileşik ihtiva ederler. PFO'nun meyve ve sebzelerdeki en yaygın substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir (Swain, 1962; Hermann, 1974). Substrat özgünlüğü ise yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değildir. Aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiği kısma ve yetiştirilişine bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler (Erzengin, 2002).

Flavonoidler; bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunurlar. Basit fenoller; tabii olarak oluşan flavonoidlerin birçoğu, katekole benzer β halkası hidroksilasyon örneğine sahiptir. Katekol bu yüzden en basit *o*-dihidroksi fenol olarak düşünülebilir.



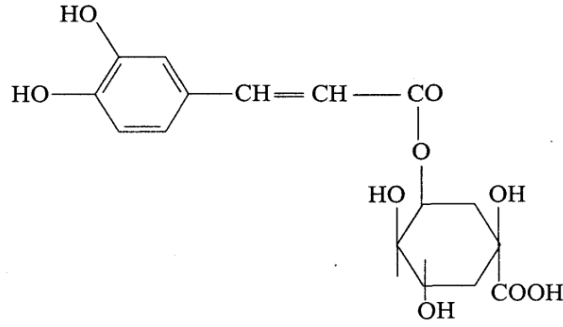
Şekil 14. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Katekinler flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir. Katekinler doğada (+)- katekin ve onun stereoisomeri olan (-) -epikatekin olarak bulunurlar. (+) -katekin ve (-)-epikatekinin seyreltik sodyum karbonat çözeltisinde ısıtılması ile katekin ve epikatekinlerin diastereoizomerlerinin rasemiği elde edilebilir (Ganguly ve Seshado, 1958).



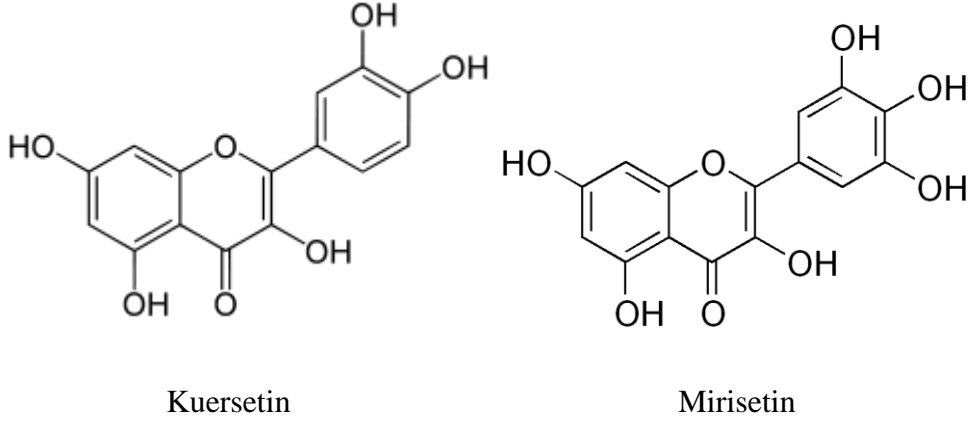
Şekil 15. (+) - Katekin (R1= H, R2= OH)
 (-) - Epikatekin (R1= OH, R2= H)

PFO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden biri olan klorojenik asittir. Klorojenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının *p*-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PFO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir (Sato, 1962).



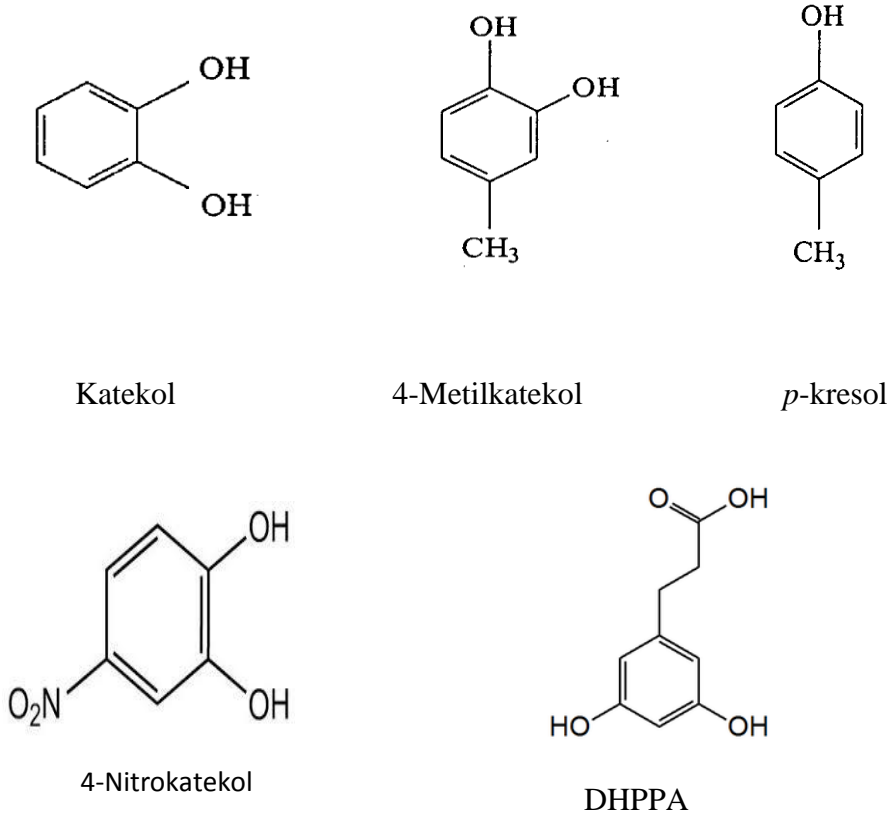
Şekil 16. Klorojenik asit (5-O-kafeilklinik asit)

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



Şekil 17. Bazı flavanollerin kimyasal yapısı

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino grup asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil etilamin) ve tirozinin PFO ile hidroksilasyon sonucu oluşan *L*-DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin) bitki dokularında mevcuttur.



Şekil 18. Yaygın olarak kullanılan bazı basit fenollerin kimyasal yapısı

Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PFO, *L*-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat *p*-kresolu hidroksiller (Stelzig vd., 1972).

Şeker pancarı PFO enzimi, tirozine karşı aktivite göstermezken *L*-DOPA'yı dehidrojenasyona uğratmaktadır. Fakat ilginç olan sudur ki şeker pancarı dokularında kayda değer miktarda *L*-DOPA bulunmazken, oldukça fazla miktarda tirozin bulunmaktadır (Wilcox vd, 1985). Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen "PFO enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman en iyi PFO substratları bulunmaz" tezini desteklemektedir (Harel vd., 1967; Jen vd., 1974).

L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) 1967 yılından beri Parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak tercih edilen bir ilaçtır. Bu hastalık nörotransmitter dopamin eksikliği nedeniyle olur. *L*-DOPA dopaminin öncülüdür ve kan beyin bariyerinden geçebilir. Günümüzde *L*-DOPA üretimi ticari skalada Knowles yöntemiyle kimyasal olarak gerçekleştirilmektedir. Yüksek üretim maliyeti ve yüksek ticari değeri nedeniyle çoğu araştırmacı bu ilacın alternatif üretimini araştırmaktadır. Alternatif yöntemlerden biri; immobilize polifenol oksidaz (PFO, tirozinaz) ile *L*-Tirozin'den *L*-DOPA'nın üretimidir. Polifenol oksidazın pahalı bir enzim olması nedeniyle; enzimin olası yeniden kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla immobilizasyon çalışmaları yürütülmektedir (Ateş vd., 2006).

Bunların yanında meyve ve sebzelerdeki PFO'nun önemli doğal substratlarının birkaçı Tablo 1'de verilmiştir (URL-3, 2013).

Tablo 1. Bazı meyve ve sebzelerdeki PFO'nun fenolik substratları (URL-3,2013).

Kaynak	Fenolik Bileşikler
Elma	klorojenik asit (et), katekol, katekin (kabuk), kafeik asit, (<i>L</i> -DOPA), 3,4-dihidroksi benzoik asit, <i>p</i> - kresol, 4-metil katekol, leukosianidin, <i>p</i> - kumarik asit, flavonol glikozitler
Avokado	4-metil katekol, dopamin, pirogallol, katekol, klorojenik asit, kafeik asit
Kakao	katekinler, leukoantosiyandinler, antosiyantinler, kompleks taninler
Kayısı	izoklorojenik asit, kafeik asit, 4-metil katekol, klorojenik asit, katekin, epikatekin, pirogallol, katekol, flavanol, <i>p</i> - kumarik asit türevleri
Patlıcan	klorojenik asit, kafeik asit, kumarik asit, sinamik asit türevleri
Üzüm	katekin, klorojenik asit, katekol, kafeik asit, <i>L</i> -DOPA, taninler, flavonoller, protokatekül asit, resorsinol, hidrokinon, fenol
Şeftali	klorojenik asit, pirogallol, 4MK, katekol, kafeik asit, gallik asit, katekin, dopamin
Armut	klorojenik asit, katekol, katekin, kafeik asit, <i>L</i> -DOPA, 3,4-dihidroksibenzoik asit, <i>p</i> -kresol
Patates	klorojenik asit, kafeik asit, katekol, <i>L</i> -DOPA, <i>p</i> -kresol, <i>p</i> -hidroksifenil propionik asit, <i>p</i> -hidroksifenil pirüvik asit, <i>m</i> -kresol
Mantar	tirozin, katekol, <i>L</i> -DOPA, dopamin, adrenalin, noradrenalin
Erik	klorojenik asit, katekin, kafeik asit, katekol, <i>L</i> -DOPA
Karides, Istakoz	Tirozin
Çay	flavanoller, katekinler, taninler, sinamik asit türevleri

1.4.5. PFO'nun Tıpta, Endüstride ve Doğadaki Rolü

Polifenol oksidaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalarda, özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir. Bazı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karides, küçük karides) bu enzimin varlığına rastlanmıştır. Polifenol oksidaz bitkisel gıdalarda enzimatik kararmaya neden olurken, hayvansal gıdalarda enzimatik kararma söz konusu değildir (Doğan, 2002).

Doğada geniş ölçüde yayılım gösteren ve doku yaralanmalarından sonra istenmeyen enzimatik kararmaya sebep olan bu enzim, bitkilerde kloroplast tilekoidlerinin membranlarında lokalize olmuş durumdadır. Patojen bakterilerin örneğin, *Pseudomonas syringe*'nin yol açtığı enfeksiyon durumunda savunma amacıyla PFO gereğinden fazla kullanılır. Ayrıca yine benzer bir savunma durumu böcek istilaları sırasında da görülür. Pancar kurdu, domates meyve kurdu, yeşil şeftali aphidi gibi küçük zararlı böceklerin yol açtığı yaralanmalardan sonra PFO böceklere karşı bir savunma oluşturmaktadır (Thipyapong vd., 2004).

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, güneş 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).

Polifenol oksidazın (tirozinaz) kullanımı ile ilgili çeşitli immobilizasyon çalışmaları da yapılmaktadır. Bu araştırmalardan bazıları; *L*- DOPA üretimi, endüstriyel atık suların fenol ve aromatik amin gibi zehirli kimyasallarca zehirsizleştirilmesi (defenolizasyon), fenol ve türevlerinin tayini için biosensörlerde bir bileşen olarak kullanımı, kirlenmiş toprakların biyoyileştirilmesi, meyve sularının berraklaştırılmasıdır. Bu nedenle polifenol oksidaz endüstriyel olarak önemli bir biyomoleküldür (Kocatürk, 2008).

Polifenol oksidazların doğada çok yaygın bir biçimde bulunuşları onların canlı hücrelerde hayati işlemler için ne kadar önemli olduklarını kanıtlamaktadır (Ziyan 1998).

1.4.6. PFO Enzimi ile Yapılan Bazı Çalışmalar

Şener ve Ünal (2011), akko XIII yenedünyasından PFO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlar ve A ve B harfler ile isimlendirdikleri iki adet PFO izoenzimi elde etmişlerdir. Bunlardan izoenzim A'nın optimum pH değerinin 7,4, izoenzim B'nin optimum pH değerinin ise 4,98 olduğu, enzimlerin K_m değerlerinin sırası ile 152,3 mM ve 5,4 mM olduğu, her iki izoenziminde 30°C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiği, izoenzimlerin ısıya dirençlerinin ve inhibitörlere hassasiyetlerinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir.

Ünal vd., (2010), iki farklı ayva çeşidinden amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırdıkları PFO enzimini karakterize etmişlerdir. Eşme ayva çeşidinin PFO'sunun optimum pH ve sıcaklık değeri 4,5 ve 25 °C, Kalecik ayva çeşidinin PFO'sunun optimum pH ve sıcaklık değeri 4,0 ve 30 °C olarak bulunmuştur. V_m/K_m değerlerinden Eşme ayva çeşidinin PFO'sunun substrat özgünlüğünün 4- metil katekol > katekol > progallol şeklinde, Kalecik ayva çeşidinin PFO'sunun substrat spesifikliğinin ise katekol > 4-metil katekol > progallol şeklinde olduğu ve enzimlerin sıcaklık stabilitelelerinin ve inhibitörlere duyarlılıklarının farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Şener vd., (2011), goldnugget yeni dünyasından PFO'nun saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmışlardır. Araştırmacılar A ve B harfleri ile isimlendirdikleri iki aktivite piki elde etmişler ve izoenzim A'nın 5,7 kat ve izoenzim B'nin 61,1 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında izoenzim A'nın optimum pH değerinin 4.5, izoenzim B'nin optimum pH değerinin ise 6,8 olduğu, her iki izoenziminde optimum sıcaklık değerinin 30 °C olarak belirlendiği, izoenzim A'nın izoenzim B'den ısıya daha fazla direnç gösterdiği ve inhibitörlerin izoenzimlere etkilerinin önemli düzeyde değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

Şakiroğlu vd., (2008), dereotundan polifenol oksidaz enzimini izole ederek çeşitli kinetik özelliklerini incelemiştir. Katekol, klorogenik asit ve dopamin substratları için K_m ve V_{maks} değerleri belirlenmiştir. İnhibitör çalışmalarında substrat olarak katekol kullanılarak L-sistein klorür, askorbik asit ve glutatyon ile çalışılmıştır. I_{50} ve K_i değerleri tespit edilmiştir. En etkili inhibitörün L-sistein klorür olduğu belirlenmiştir.

Önez tarafından (2006), Polifenol oksidaz (PFO) enzimi İzmir üzümü (*Vitis vinifera* L.)'nden ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfat çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon

kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla, optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı substratlar kullanılarak belirlenmiştir. PFO enziminin en iyi substratının katekol olduğu bulunmuştur. Bu substrat için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,2 ve 25°C olarak belirlenmiştir. Katekol ile K_m ve V_{maks} değerleri bulunmuştur. Bu çalışmada altı adet inhibitör ile çalışılmış ve en etkili olanların sodyum azid, sodyum dietilditiyokarbamat ve tiyoüre oldukları bulunmuştur. Enzimin poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) çalışmaları da yapılmıştır.

Güngör tarafından (2008), Polifenol oksidaz (PFO) enzimi badem çağlıdan (*Prunus dulcis*) ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemlerinden elde edilen örnek, PFO enziminin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla, optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı substrat kullanılarak belirlenmiştir. PFO enziminin en iyi substratının 4-metil katekol olduğu bulunmuştur. Bu substrat için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,5 ve 35°C olarak belirlenmiştir. K_m ve V_{maks} değerleri bulunmuştur. Bu çalışmada yedi adet inhibitör ile çalışılmış ve etkili olanların yarışmalı inhibitör olarak sodyum azid, benzoik asit, sitrik asit, *L*-askorbik asit ve tiyoüre olduğu bulunmuştur. Metallerin PFO enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} , Pb^{2+} metallerinin enzim aktivitesini artırırken Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{3+} , Sn^{2+} , K^+ metallerinin enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur.

Güray tarafından (2009), polifenol oksidazın jeotermal bir bölgeden izole edilmiş olan termofilik *Bacillus* suşundan bulunması, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre içi ekstraktan ve bakterinin büyüme ortamından alınan örneklerin spektrofotometrik aktivite ölçüm ve poliakrilamid jelde aktivite boyama sonuçları, enzimin hücre içi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Enzimin kısmi saflaştırılması, aseton çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonrası verim ve saflık katsayısı sırasıyla %35 ve 1,24' tür. Katekol substratı kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları enzimin pH 7,0 ve 60°C' de en yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Enzim, 30 ve 60°C arası sıcaklıklarda stabildir ve pH 5,0-8,0 aralığında aktivitesinin %80' inden fazlasını korumuştur. Enzim aktivitesi üzerine bazı etmenlerin ve metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; sodyum dietilditiyokarbamat ve DTT'nin varlığında aktivite tamamen inhibe olmuş ve bakır iyonları ile yüksek derecede stimüle olmuşken diğer iyonların ve etmenlerin aktivite

üzerinde önemli bir etkisi görülmemiştir. Enzimin kinetik parametreleri olan K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 91mM ve 2,25 U/ml olarak bulunmuştur.

Liu vd., (2012) *Lonicera japonica* (LjPFO) polifenol oksidazını saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Ham enzim özütü ön işlemlerden sonra, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve DEAE- selüloz, iyon değişim kromatografisi ile sırayla saflaştırılmıştır. Saflaştırma 31 kat zenginleştirme ile sonuçlanmış ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS -PAGE) ile molükül ağırlığı 49 kDa olduğu söylenmiştir. LjPFO için optimal koşulların pH 7,5, ve sıcaklık 25°C olduğu ortaya konmuş buna ek olarak, inhibitörlerinin engelleyici etkileri konsantrasyonunun artması ile pozitif arttırılmıştır. Ayrıca, en yüksek V_{maks}/K_m değerinin katekol substratı ile olduğu söylenmiştir.

Jian Gao vd., (2011) Örümcek çiçeği olarak yaygın olan *Cleome gynandra* L. yapraklarından polifenol oksidaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Amonyum sülfat, diyaliz, DEAE- Sepharose iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma, 37,8 katlık bir zenginleştirme ile sonuçlanmıştır. Molekül ağırlığı 52,6 kDa olan enzim için optimum şartlar pH 8,0 60°C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, % 0,1 SDS ile artarken Hg^{2+} ve Pb^{2+} metalleri tarafından aktivite tarafından inhibe olmuştur.

Beşel (2003), Mantardan (*Agaricus bisporus*) elde edilen polifenoloksidaz (PFO) (EC 1.14.18.1) enzimini araştırmıştır. %8'lik TX-114 kullanıldığı zaman yaklaşık 5 kat saflaştırma elde edilmiştir. pH 7,0'de polivinilpolipirrolidon (PVPP) kullanılarak saflaştırma 10 kat artmış ve %72 enzim geri kazanımı elde edilmiştir. Bununla beraber, pH 6,0'da çalışıldığı zaman saflaştırma 15,5 kata ve geri kazanım %100'e yükselmiştir. Sodyum veya potasyum tuzlarını eklemek, PFO moleküllerinin deterjanca zengin alt faza ayrılmasına yol açmıştır.

1.4.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Meyve ve sebzelerin hasat edilmesi, taşınması, depolanması veya işlenmesi sırasında meydana gelen doku zedelenmeleri, bir takım kimyasal reaksiyonlara maruz kalarak kahverengi veya esmerleşme olarak bilinen kararmalara neden olduğu bilinmektedir. Esmerleşme duyuşal özellikler ve görünümde istenmeyen bozulmalara sebep olmakta, raf ömrünü kısaltmakta ve ürün albenisini azaltmaktadır (Creumiere, 2000). Besinlerdeki

enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem beslenme hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO' nun varlığı, biyokimyasal ve kinetik özellikleri *Lactarius eucalipti* mantarında incelenmiştir. Kolay elde edilebilirliği ve yüksek besin değerleriyle mantarlar yıllardan beri önemli bir besin olarak tüketilmektedir. Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanında kaliteli ve ucuz olması nedeniyle potansiyel polifenol oksidaz kaynağı olarak endüstrinin birçok alanında kullanıldığı bilinmektedir (Marusek, 2006).

Bu çalışmanın amacı Karadeniz Teknik Üniversitesi Merkez Kampüsü ormanlık alanından toplanan *Lactarius eucalipti* O. K. Mill & R. N. Hilton' dan PFO enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılarak ayrıntılı bir biçimde karakterizasyonunun yapılmasıdır. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve ısı kararlılığı, protein ve substrat konsantrasyonunun, metal iyonlarının ve bazı genel PFO inhibitörlerinin aktivite üzerine etkisi araştırılarak, bazı kinetik verilere ulaşılabilirlik hedeflenmiştir. Yapılacak bu çalışmalar sonucunda elde edilecek verilerin, yenilebilir ve yabani bir mantar olan *Lactarius eucalipti* PFO sunun endüstride kullanılabilirliğini ve bu mantarın gıda olarak tüketilmesi ve hatta kültürünün yapılması durumunda saklama ve depolama koşullarının ortaya konması noktasında önemli katkılar sağlayacak bir çalışma amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2. de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Bio Rad	Mini-protean Tetra System
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikro Santrifüj	Sigma	1-14
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 2000
Termal Mikrotüp Çalkalayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
pH Metre	Inolab	WTW pH 720
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Isıtıcı/Manyetik Karıştırıcı	IKA	RCT basic safety control
Güç Kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Degaz Pompası	Vacuubrand	2C
Kollektör	Retriever	500
UV-Dedektör	Retriever	UA-6
Peristaltik Pompa	Teledyne Isco	Tris

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.verilmiştir.

Tablo3. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Afinite Jeli Sentezinde Kullanılan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, NaOH,NaHCO ₃ ,L-Tirosin, <i>p</i> - aminobenzoik asit ve NaNO ₃	Sigma, Aldrich
Protein Elektroforezinde Kullanılan TEMED, SDS, Amonyum persülfat (APS), N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, BromofenolMavisi, Gliserol, β -merkaptoetanol, Glisin, Coomassie Brillant Blue R-250	Sigma, Fluka
Tampon Çözeltilerde Kullanılan Sodyum Asetat, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ve Tris Bazı	Sigma, Merck
Enzim Özütü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Triton X-114, PMSF, EDTA ve MgCl ₂	Sigma, Aldrich, Fluka
Çözücüler HCl, Asetik Asit, metanol ve aseton	Merck

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.3.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- ❖ Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 Na₂CO₃): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na₂CO₃ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO₄.5H₂O çözeltisi): 1,0 g CuSO₄.5H₂O saf su ile çözülüp hacmi 100 mL 'ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- ❖ Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- ❖ Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL' ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ 1 N NaOH içinde %0,1 SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.

2.1.3.2. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- ❖ Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 36,3 g Tris 150 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 200 mL' ye tamamlandı.
- ❖ Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 6,8'e ayarlanarak, hacmi 250 mL' ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1,0 g APS'nin saf suda çözülüp hacminin 10 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C' de saklandı.
- ❖ SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL 'ye tamamlandı.
- ❖ N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- ❖ Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL 'ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- ❖ Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL' ye tamamlandı.

- ❖ Doğal-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 μ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 μ L %0,1 bromofenol mavisi, 250 μ L %80 gliserol ve 460 μ L saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C’de saklandı.
- ❖ Doğal-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3’e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL’ ye tamamlandı.
- ❖ SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 μ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 μ L %10 SDS, 100 μ L %0,1 bromofenol mavisi, 250 μ L %80 gliserol ve 60 μ L β -merkaptolanolün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C’ de saklandı.
- ❖ SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3’e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL’ ye tamamlandı.
- ❖ Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250’nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- ❖ Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 600 mL saf su, 100 mL glasiyal asetik asit ve 400 mL metanolün karıştırılmasıyla hazırlandı.
- ❖ Substrat Boyama Çözeltisi (*L*-DOPA): 24 mM *L*-DOPA 100 ml saf suda hazırlandı.

2.1.3.3. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar

- ❖ NaHCO₃ Tamponu (0,1 M pH 10,0): 4,2 g NaHCO₃ 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH’sı10,0’a ayarlanıp hacmi 500 mL’ ye tamamlandı.
- ❖ NaHCO₃ Tamponu (0,2 M pH 8,8): 8,4 g NaHCO₃ 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH’sı8,8’e ayarlanıp hacmi 500 mL’ ye tamamlandı.
- ❖ Na₂HPO₄ Tamponu (0,01 M pH 6,0): 0,71 g Na₂HPO₄ 450 mL saf suda çözülüp 1 M NaOH ile pH’sı6,0’a ayarlanıp hacmi 500 ml’ ye tamamlandı.
- ❖ Afinite Jelini Yıkama ve Dengeleme Tamponu (50 mM pH 5,0 Asetat Tamponu): 3,4 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH’sı5,0’a ayarlanıp hacmi 500 mL’ ye tamamlandı.

- ❖ Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8,0 Fosfat Tamponu içinde 1M NaCl): 3,10 g K_2HPO_4 ve 29,25 g NaCl 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı8,0'a ayarlanıp hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.4. Substrat Çözeltileri

- ❖ 100 mM 4-metil katekol (4-MK) : 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 su ile 10mL'ye tamamlandı.
- ❖ 100 mM DHPPA (3-(3,4-dihidrosifenil) propiyonik asit): 0,182 g DHPPA az saf suda çözülüp saf su ile hacmi 10mL'ye tamamlandı.
- ❖ 100 mM PHPPA: 0,116 g PHPPA az saf suda çözülüp saf su ile hacmi 10mL'ye tamamlandı.
- ❖ 100 mM *L*-DOPA (*L*-3,4-dihidrosifenilalanin):0,197 g *L*-DOPA az saf suda çözülüp saf su ile hacmi 10mL'ye tamamlandı.
- ❖ 100 mM Tirosin: 0,225 g tirosin az saf suda çözülüp saf su ile hacmi 10 mL' ye tamamlandı.
- ❖ 100 mM Kateşin: 0,290 g kateşin az saf suda çözülüp saf su ile hacmi 10 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.5. Tampon Çözeltiler

- ❖ A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL 'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- ❖ Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL 'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- ❖ Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- ❖ Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.6. Diğer Çözeltiler

- ❖ 10 mM MBTH (3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon): 0,022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- ❖ Ham Enzim Özütle Hazırlama Çözeltisi: 0,84 g sodyum asetat (50 mM), %1,5 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM PMSF 80 mL saf suda çözülüp, 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0'a ayarlanıp, hacmi saf su ile 500 mL 'ye tamamlandı.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme

Karadeniz Teknik Üniversitesi Merkez Kampüsü ormanlık alanlarından toplanan 4 tür yabancı mantar *Suillus luteus* (L.) Raussel, *Lactarius eucalypti* O. K. Mill & R. N. Hilton, *Agaricus xanthodermus* Genev, *Agaricus silvicola* (Vittad.) Peck, laboratuara ulaştırıldıktan sonra temizlenip saf su ile yıkandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere -30°C'de saklandı. Toplanan mantarlardan enzim özütü hazırlamak için ilk olarak, her birinin 10 gramı 15 dakika sıvı azot içerisinde bekletildikten sonra porselen havan içinde iyice öğütüldü ve üzerlerine 10'ar mL ham enzim özütü hazırlama çözeltisi ilave edildi. Dört katlı tülbenkten süzülen ham enzim özütleri, +4°C'de 20,000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanalardan bir miktar örnek ayrıldıktan sonra kalan kısımlara hacimleri kadar soğuk aseton, buz banyosunda, yavaş yavaş ilave edildi. 2 saat +4°C'de bekletilen ham enzim özütleri, +4°C 'de 20,000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım atılıp, elde edilen çökelekler asetonun uzaklaşması için bir gece +4°C'de bekletildi. Ardından çözünmediği en az hacimde 50 mM pH 7,0 fosfat tamponuyla çözüldü. Elde edilen özütlerle ön aktivite çalışmaları yapıldı ve PFO aktivitesinin yüksek olduğu mantar ve substratlar seçilerek saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri yapıldı.

2.2.2. Afinite Jelinin Sentezi

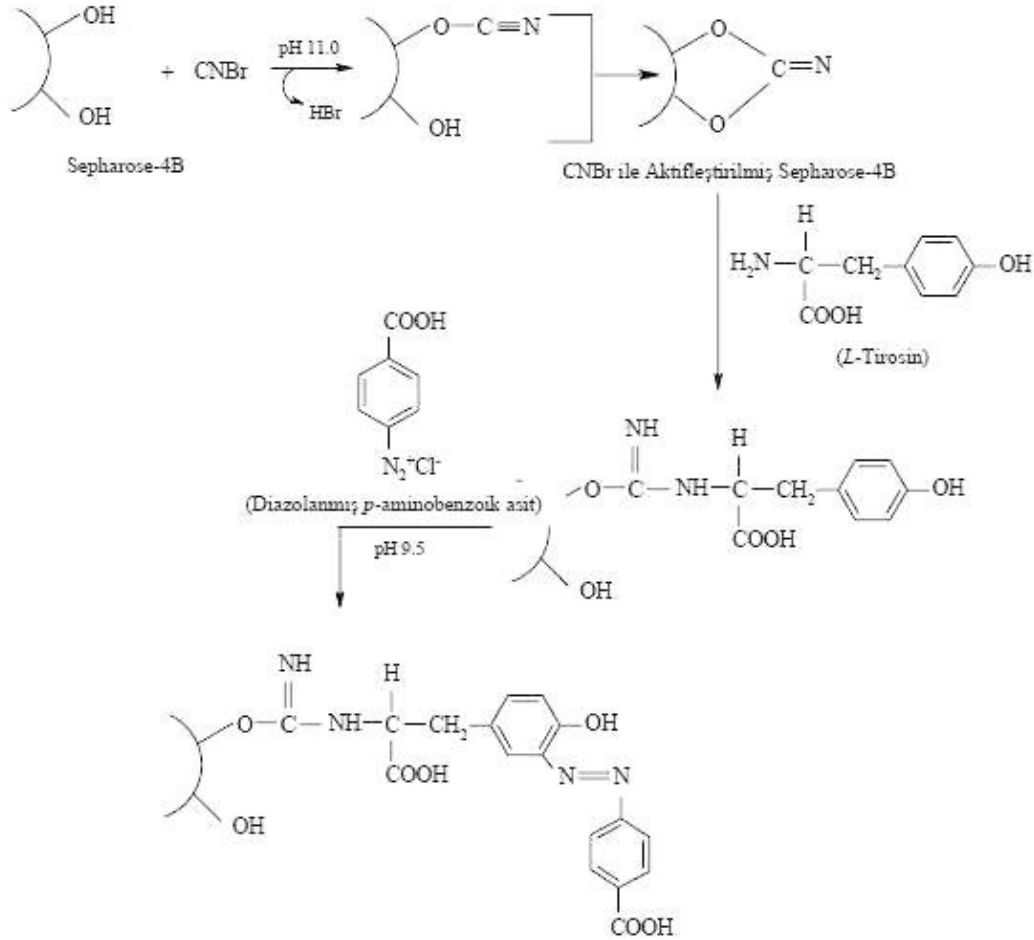
Bu çalışmada kullanılan afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibinin (2004) sentezlediği yöntemle göre sentezlendi. Bu yöntemle göre CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi, uzantı kolunu oluşturmak üzere tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. Ligand olarak polifenol oksidaz (PFO) enziminin spesifik bir inhibitörü olan *p*-aminobenzoik asit seçildi. Bu şekilde elde edilen jel, afinite kromatografisi ile *Lactarius eucalypti*'den PFO'nun saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı.

5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bir beher içerisinde 10 mL saf su ilave edildi. Süspansiyonun pH'sı 2 M NaOH ile hemen 11,0'a çıkarıldı ve pH sabit kalana kadar takip edildi. İçine küçük buz parçaları atılan karışım, su trombu yardımıyla mavi banttardan süzülür. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan kısım, 0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ tamponunun

250 mL' si ile yıkandı ve süzülerek bir beher içerisine alındı. Süspansiyonun üzerine 20 mL'inde 10 mg *L*-tirosin içeren 0,1 M pH'sı 10,0 olan soğuk NaHCO₃ tamponundan ilave edildi ve 90 dakika boyunca karıştırıldı. Bu işlemden sonra süspansiyon, 4°C'de 16 saat bekletildi. Süre sonunda tekrar mavi banttı süzülen süspansiyon bol saf su ile yıkandı. Mavi bant üzerinde kalan kısım, 0,2 M NaHCO₃ tamponunun 100 mL' si ile yıkanarak aynı tamponun 40 mL' si içine alındı.

Buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözölen 75 mg NaNO₂, 10 mL 1 M soğuk HCl içerisinde çözölen 25 mg *p*-aminibenzoik asit üzerine damla damla ilave edildi.

Buz banyosunda 10 dakika bekletilen karışım, 40 mL sepharose-4B-*L*-tirosin süspansiyonuna ilave edildi ve 2 M NaOH ile pH'sı 9,5'e çıkarılarak 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Mavi bant üzerine alınan süspansiyon önce 1 L saf suyla, ardından 200 mL 0,01 M pH 6,0 Na₂HPO₄ tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Arslan vd., 2004).



Şekil 19. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları (Öz, 2013)

2.2.3. Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Sentezlenen afinite jeli, 1×15 cm boyutlarındaki kolona, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde paketlenmiş ve 50 mM pH 5,0 asetat tamponu ile kolonun üstünden ilave edilen ve kolonun altından toplanan tamponun 280 nm’de absorbanans değerleri eşit oluncaya kadar yıkandı. Bu şekilde dengelenen kolona, enzim özütü tatbik edildi ve jel tekrar 50 mM pH 5,0 asetat tamponu ile yıkandı. Böylece afinite jeline tutunmayan diğer tüm proteinler ve maddeler ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Jele tutunan enzimler ise, 1 M NaCl içeren 50 mM pH 8,0 fosfat tamponuyla tüplere 5 mL halinde elüe edildi. Enzim elüatlarının toplandığı her bir tüpte 280 nm’de protein tayini yapıldı..

2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Afinite kromatografisi sonrası toplanan her bir tüpte PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 4-MK için 494 nm’de ve diğer tüm substratlar (DHPPA, tirozin, L-DOPA, katekol, PHPPA, kateşin) için 500 nm’de, absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995).

100 mM substrat çözeltisi ile eşit hacimde 10 mM MBTH çözeltisi ve % 2’lik 20 µL DMF içeren reaksiyon karışımı tampon çözelti ile 950 µL’ye tamamlandıktan sonra karışıma 50 µL enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Absorbansdaki artış 1 dakika boyunca belirtilen dalga boyunda izlendi ve aktivite hesabı yapıldı.

Bir enzim ünitesi, 1 mL enzim çözeltisi için bir dakikada absorbandsda meydana gelen 0.001’lik değişim olarak tanımlanmıştır (Doğan vd., 2004).

2.2.5. Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarı Lowry metoduyla belirlendi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için bir seri serum albümin çözeltisi hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- ❖ Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL ilave edildi. Bu şekilde BSA’nın son konsantrasyonun 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olması sağlandı.

- ❖ Başka bir deney tüpüne saf enzim elüatından 5 µL ilave edildi.
- ❖ Standartlara ve örneğe son hacimler 500 µL olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- ❖ 1 mL Lowry E çözeltisi her bir tüpe ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- ❖ Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi hemen vortekslendi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- ❖ 650 nm' de absorbanslar okundu.
- ❖ Çıkan sonuçlara göre kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerin protein içeriği tayin edildi.

2.2.6. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal-PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak yapıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Doğal PAGE Bileşenleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (%5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (%10, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	-
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	-	2,5 mL
%30 Akrlamid/Bisakrlamid	0,67 mL	3,3 mL
dd H ₂ O	2,74 mL	4,1 mL
%10 (APS)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal elektrofrez yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 30 µg protein, doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp Hamilton şırınga ile kuyucuklara yüklendi. Tank, buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA' de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA' de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi.

2.2.7. Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 ile Boyama

Saf enzim elüatında PFO'nun varlığının ortaya konulabilmesi için SDS'siz ve soğuk ortamda yapılan doğal elektroforez sonrası jel Coomassie Brilliant Blue R-250 boyandı. Aynı yöntemle, aynı şartlarda ve aynı tankta, eş zamanlı olarak yürütülen diğer jel ise substrat çözeltisi (*L*-DOPA) ile boyandı.

Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için jel Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi içerisinde yaklaşık olarak 10-15 dakika çalkalanarak bekletildi. Daha sonra boyanan jel, boya uzaklaştırma çözeltisiyle 2-3 saat çalkalandı.

Substrat boyaması için ise jel substrat boyama çözeltisi (24 Mm *L*-DOPA) içerisinde yaklaşık olarak yarım saat çalkalanarak bekletildi ve bantların varlığı gözlemlendi.

2.2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Maniatis ve arkadaşlarına (1989) göre gerçekleştirildi. %5'lik yükleme ve %12'lük ayırma jeli kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 5. SDS-PAGE Bileşenleri

Bileşenler	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri	%12'lik Ayırma Jeli Bileşenleri
Saf su	2,7 mL	3,3 mL
%30'lük akrilamid/bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5 mL	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5 mL
%10'lük SDS	0,04 mL	0,1 mL
%10'lük APS	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank, SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg saf protein SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Bu şekilde denatüre olan proteinler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat

25 mA'de yürütüldü. Jel, jel boyama çözeltisi içine alındı ve yavaş bir şekilde sallanarak 10 dakika bekletildi. Boyanan jel, fazla boya uzaklaşır protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edildi.

2.3. Saf Enzimin Karakterizasyonu

2.3.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Polifenol oksidaz enzimi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla McIlvaine (pH 3,0, 7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0, 9,0) tampon sistemleri difenolik substratlar 4-MK, DHPPA ve L-DOPA kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Bundan sonraki çalışmalar her substrat için belirlenen optimum pH değerinde yapıldı.

2.3.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Substratların optimum pH değerlerinde PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PFO aktivitesi 10°C'lik artışlarla 0-60 °C aralığında incelendi. İşlemler, 10-20°C için soğutmalı inkübatör, 30-60°C için ise Termoblok kullanılarak yapıldı. Tampon ve substrat karışımları belirtilen sıcaklıklarda 5 dakika inkübe edildi. Karışımlara enzim özütü ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir biçimde aktivite ölçümleri yapıldı ve ölçümler sonucunda optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

2.3.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere her bir substrat için, substrat konsantrasyonları sabit tutularak optimum pH ve sıcaklık değerlerinde ve enzim konsantrasyonu (0,05-10 µg/mL) aralığında olacak şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Belirlenen substratlar varlığında enzim aktivitesinin maksimuma ulaştığı protein konsantrasyonları tespit edildi.

2.3.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunu Etkisi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonlarının belirlenmesi için daha önce belirlenen optimum şartlarda her bir substratın 0,25-14 mM aralığında değişen konsantrasyonlarına (4-MK, DHPPA, L-DOPA) karşı ölçülen hız değerleri grafiğe geçildi. Elde edilen substrat doygunluk eğrilerinden her bir substrat için optimum konsantrasyon tayin edildi. Ele geçen veriler yardımıyla Lineweaver-Burk eğrileri hazırlandı ve her bir substrat için K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

2.3.5. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

Enzimin ısı kararlılığını belirlemek amacıyla enzim elüatları ependorf tüpler içerisinde +4°C'de, 60°C'de ve her bir substrat için belirlenen optimum sıcaklıkta 20 dakikalık aralıklarla toplam bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığına getirilen enzim elüatlarında her bir substrat için daha önceden optimize edilmiş olan şartlarda aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar aynı şartlarda inkübasyona tabi tutulmayan enzim elüatı aktivitesi ile kıyaslanarak kalan yüzde PFO aktiviteleri hesaplandı.

2.3.6. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

PFO'nun pH kararlılığını incelemek amacıyla, her bir substrat için üç farklı pH değerinde tayin yapıldı. 50 mM Mcilvaine (pH 3,0, 5,0, 7,0, 8,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırılan enzim elüatları +4°C ve yine her bir substratın optimum sıcaklık değerlerinde 72 saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aktivite tayinleri yapıldı, aynı şartlarda fakat inkübasyona tabi tutulmayan enzim-tampon karışımlarının da hazırlanır hazırlanmaz optimum şartlarda aktivite değerleri belirlendi. Bu değerlerden faydalanılarak kalan yüzde PFO aktiviteleri hesaplandı.

2.3.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Na^+ , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok

çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen enzim aktivitelerinden faydalanarak kalan yüzde PFO aktiviteleri hesaplandı.

2.3.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisini incelemek amacıyla PFO için yaygın olarak bilinen dört genel inhibitör kullanılmıştır. Her bir substrat için, askorbik asit (0,005-0,03mM), sodyummetabisülfid (0,01-0,05 mM), sodyumazid (50-400mM), tiyoüre (50-400 mM) inhibitörleri ile optimum şartlarda aktivite tayinleri yapıldı. İnhibitör konsantrasyonu % kalan aktiviteye karşı grafiğe geçildi ve aktivitenin %50 korunduğu inhibitör konsantrasyonu I_{50} değeri olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Enzim Safılaştırma Çalışmaları

3.1.1. Çalışılan Mantar Türünün ve Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

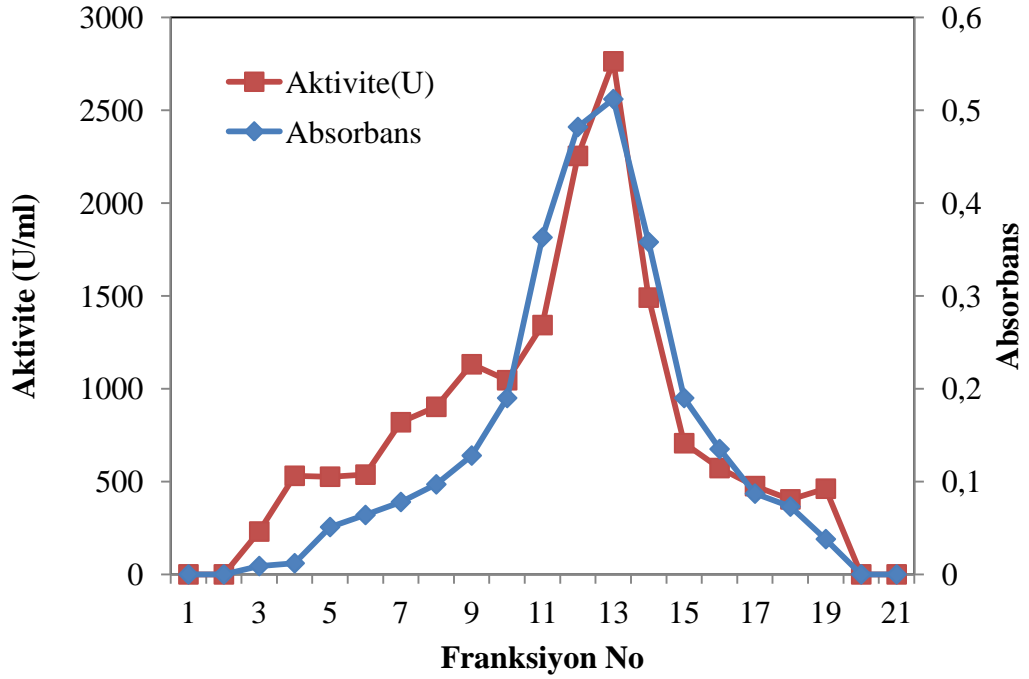
Çalışma için belirlenen *Suillus tuteus*, *Lactarius eucalypti*, *Agaricus xanthodermus*, *Agaricus silvicola* mantarlarından hazırlanan ham enzim özütlerinde ve aseton çöktürmesi sonrası elde edilen özütlerde bulunan PFO aktivitesi için difenolik substrat olarak katekol, 4-MK, DHPPA, L-DOPA, katekin monofenolik substrat olarak da tirosin ve PHPPA kullanılmıştır. Elde edilen değerler tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Mantarlardan elde edilen özütlerdeki PFO aktivitesinin uygun substratlar varlığında % Bağlı Aktivite Değerleri (H:Ham özüt, A: Aseton Çöktürmesi)

Mantar ismi Substrat	Katekol	4-MK	Katekin	DHPPA	L-DOPA	Tirosin	PHPPA	
<i>S. tuteus</i>	H	2,8	4,4	1,1	2,3	1,1	1,1	0,6
	A	8,4	1,9	51,0	8,0	1,0	0,4	1,0
<i>L. eucalypti</i>	H	24,7	69,9	1,8	29,2	45,4	1,2	0,6
	A	9,2	100,0	12,4	98,0	83,3	1,4	6,6
<i>A. xanthodermus</i>	H	4,0	2,4	8,6	15,6	11,5	0,3	6,3
	A	4,9	10,8	15,9	2,9	10,5	6,4	18,6
<i>A. silvicola</i>	H	6,0	4,5	11,8	23,2	6,5	20,5	0,9
	A	0,2	7,3	16,7	3,8	10,8	9,4	16,0

3.1.2. Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sepharose-4B-*L*-tirosin-*p*-aminobenzoik asit jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisi sonrası toplanan elüatlardan oluşan fraksiyonlar için, spektrofotometrik olarak, 280 nm’de protein tayini ve 494 nm’de PFO aktivitesi tayin edildi. Ele geçen sonuçlardan oluşturulan grafikte 280 nm’de belirlenen protein absorbansı ve aktivite absorbansının çakışması enzimin etkili bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir (Şekil 20).



Şekil 20. Afinite Kromatografisi ile *Lactarius eucalypti*'den PFO'nun saflaştırılması

Elüatlar, 1'den 21'e kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine 5'er mL halinde toplandı ve aktivite tayini yapıldı. Substrat özgünlüğü için yapılan aktivite tayinlerinde en yüksek aktivite değerlerinin 4-MK substratı varlığında elde edildi göz önüne alınarak elüatlar ile 494 nm’de 4-MK substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. En yüksek PFO aktivitesi gösteren (9-15 numaralı tüpler) fraksiyonlar birleştirildi. Daha sonra, saf enzim elüatında ham enzim özütünde ve aseton çöktürmesi ile elde edilen çözeltilde Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim elüatında

0,11 mg/mL ve ham enzim özütünde 6,25 mg/mL ve aseton çöktürmesi sonrası elde edilen çözeltide 1,47 mg/mL protein miktarları belirlendi.

Bu değerler kullanılarak saf enzim elüatının, ham enzim özütünün ve aseton çöktürmesi sonrası elde edilen çözeltinin spesifik aktiviteleri hesaplandı, böylece enzimin kaç kat saflaştırıldığı tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. *Lactarius eucalypti* PFO'su için saflaştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Aktivite (U)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg Protein)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	26	6,25	83	-
Aseton Çöktürme	18	1,47	250	3,01
Saf Enzim Elüatı	12	0,11	2187	26,3

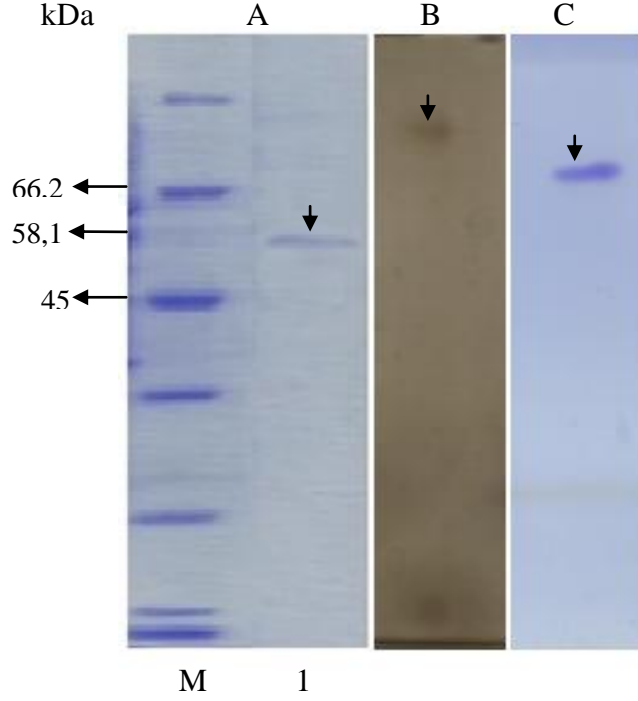
Tablo7. de görüldüğü gibi ham enzim özütünde PFO aktivitesi 83 U/mg protein, iken, saf enzimdeki spesifik aktivite 2187 U/mg protein olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlara göre PFO'nun 26,3 kat saflaşmış olduğu belirlendi.

3.2. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.2.1. Polifenol Oksidazın Saflığının Elektroforetik Olarak Belirlenmesi

Saf enzim elüatında PFO enziminin varlığını ortaya koymak için soğuk ortamda doğal elektroforez yapıldı. Doğal-PAGE'de saf enzimin yürütülüp Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucunda (Şekil 21C) tek bir bant gözlemlendi. Aynı yöntemle, aynı şartlarda ve aynı tankta, eş zamanlı olarak yürütülen diğer jel ise substrat çözeltisi (*L*-DOPA) ile boyandı (Şekil 21B). Comassie Brilliant Blue R-250 boyama ile gözlenen proteinin substrat boyaması ile de PFO'ya ait olduğu ortaya konulmuştur. Tek bandın gözlenmesi enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını desteklemektedir.

SDS jel elektroforeziyle, saf enzim elüatında PFO'ya ait yaklaşık 58,1 kDa'lık bir protein bandı gözlenmiştir (Şekil 21A)



Şekil 21. A) SDS-PAGE (Coomassie boyama); M. Moleküler ağırlık standartları 1. Saf enzim elüatı, B) Doğal-PAGE (Substrat Boyama); Saf enzim elüatı C) Doğal-PAGE Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama; Saf enzim elüatı,

3.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

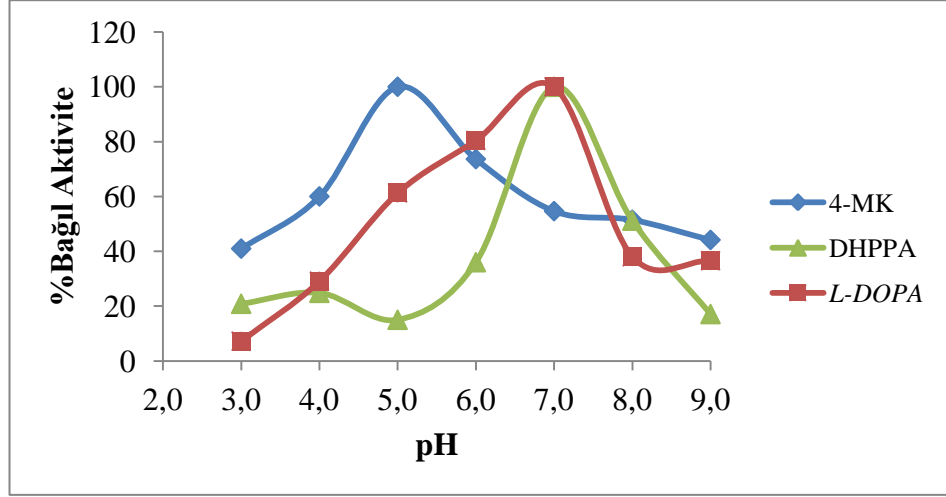
L. eucalypti'den afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO enziminin biyokimyasal karakterizasyonu özgünlüğü en yüksek üç farklı substrat kullanılarak yapıldı (4-MK, *L*-DOPA ve DHPPA).

PFO enziminin biyokimyasal olarak karakterizasyonu aşağıda başlıklar halinde verilen parametrelerin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Polifenol oksidaz enzimi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla Mcilvaine (pH 3,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tampon sistemleri difenolik substratlar 4-MK,

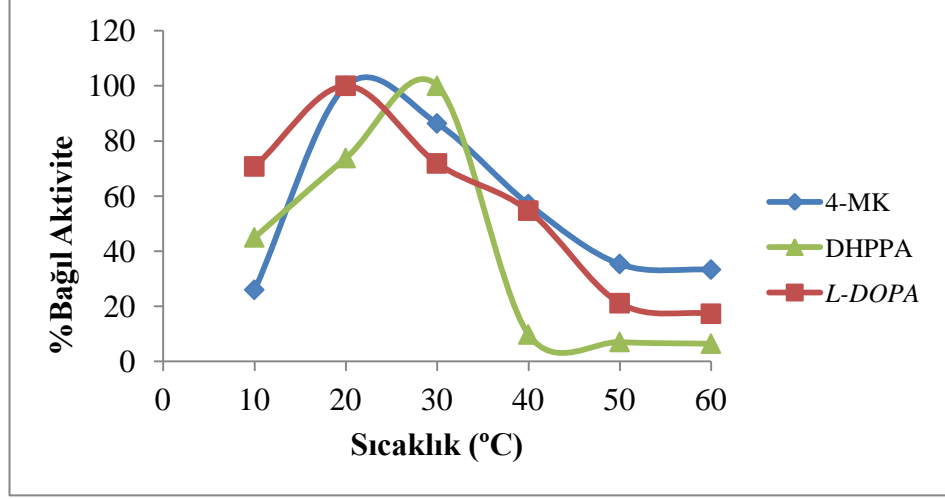
DHPPA ve *L*-DOPA kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı ve bu aktivite değerleri kullanılarak pH-% Bağıl aktivite grafikleri çizildi. Enzimin 4-MK substratı varlığında en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 5,0 olarak belirlenirken DHPPA ve *L*-DOPA substratları varlığında en iyi aktiviteyi pH 7,0' da gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Polifenol oksidaz aktivitesinin farklı substratlar varlığında pH ile değişimi

3.2.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

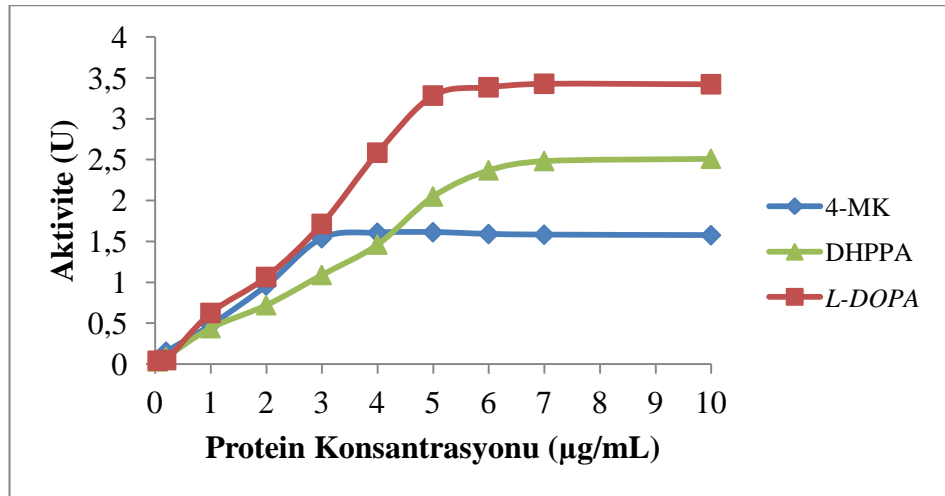
Polifenol oksidaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 0-60°C aralığında 10'ar derece aralıklarla her bir substrat için ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak her bir substrat için sıcaklık % bağıl aktivite grafikleri çizildi(Şekil 23). Enzimin 4-MK, DHPPA ve *L*-DOPA substratları varlığında sırasıyla 20°C, 30°C ve 20°C de en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlendi.



Şekil 23. Polifenol oksidaz aktivitesinin farklı substratlar varlığında sıcaklık ile değişimi

3.2.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

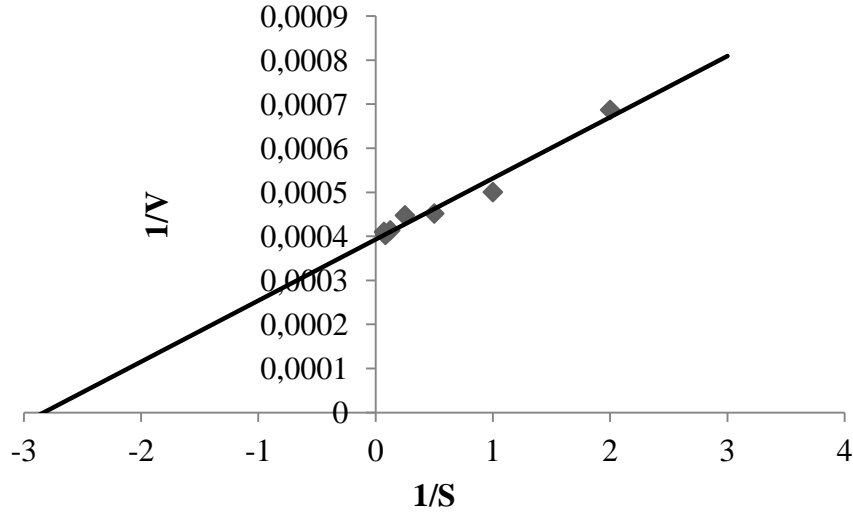
Enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere her bir substrat için substrat konsantrasyonları sabit tutularak optimum pH değerlerinde ve enzim konsantrasyonu (0,05-10 $\mu\text{g/mL}$) aralığında olacak şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen hiperbolik eğrilerden(Şekil 24) maksimum PFO aktivitesi için optimum enzim konsantrasyonu 4-MK, DHPPA, L-DOPA substratları için sırasıyla 3 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$ ve 5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.



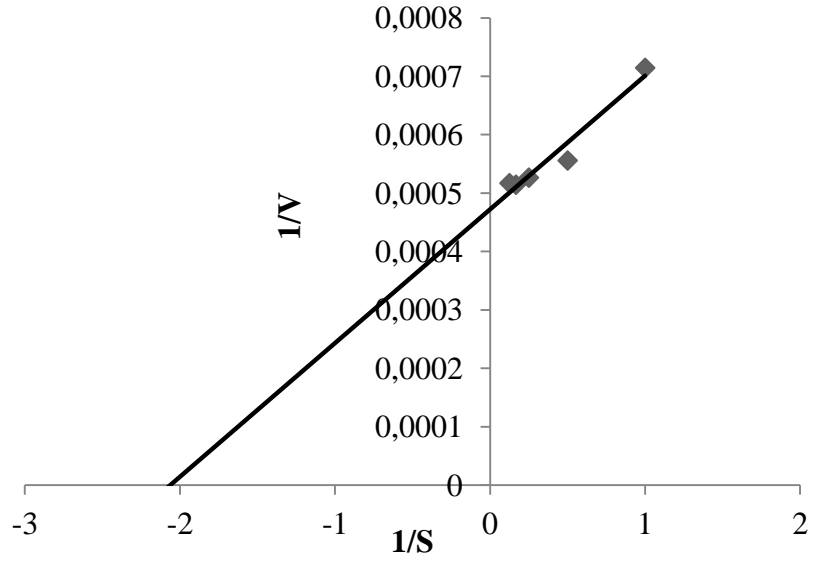
Şekil 24. Polifenol oksidaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

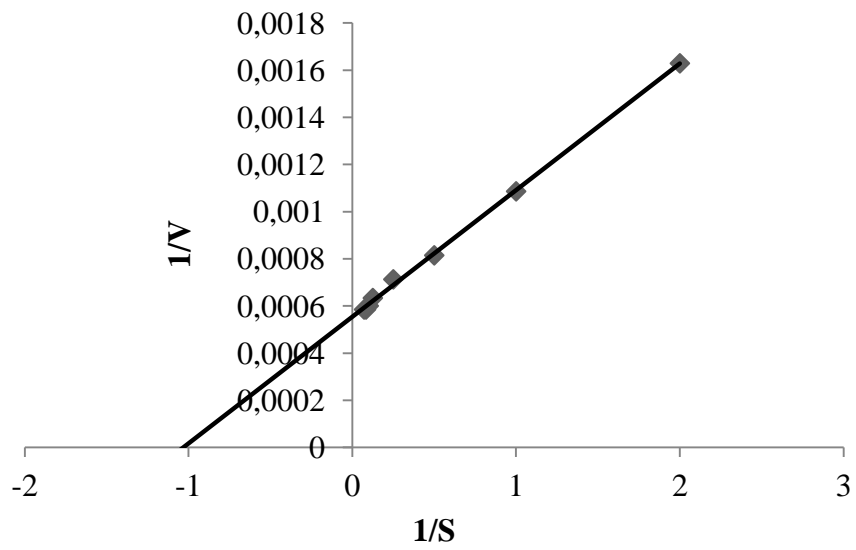
L. eucalypti'den afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'ya ait bazı kinetik verileri belirlemek için, nihai konsantrasyonu 0,25-14 mM aralığında değişen 4-MK, DHPPA, *L*-DOPA substratları varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi tayin edildi. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrileri çizildi. Saflaştırılan PFO aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Kinetik verilerin belirlenmesi için ise Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. *L. eucalypti* difenolazı için 4-MK substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 2500 U/mg protein ve 0,25 mM olarak (Şekil 25), DHPPA substratı varlığında 2000 U/mg ve 0,4 mM (Şekil 26), *L*-DOPA substratı varlığında 1666 U/mg ve 0,83 mM (Şekil 27) olarak belirlendi.



Şekil 25. 4-MK varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği



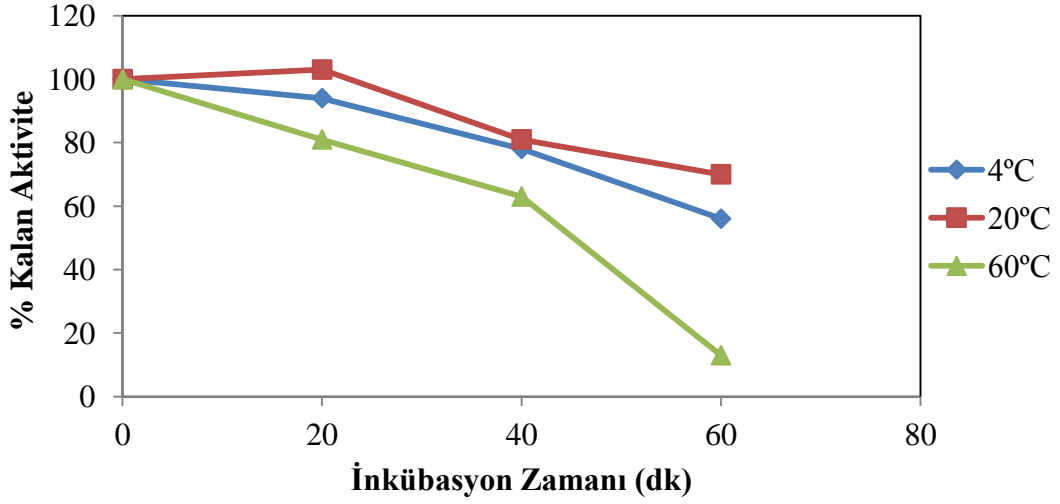
Şekil 26. DHPPA varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 27. L-DOPA varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği

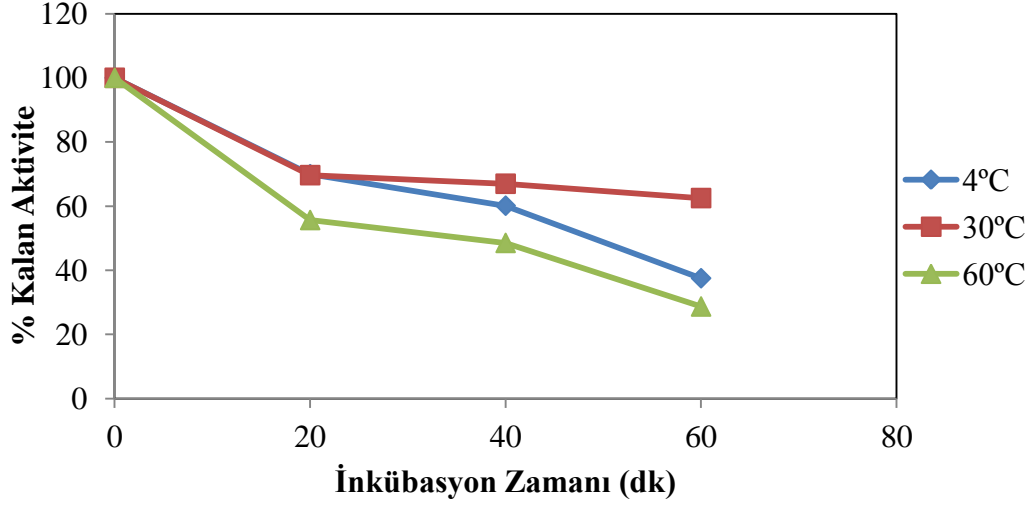
3.2.2.5. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

Enzimin ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim elüatları ependorf tüpler içerisinde +4°C’de, 60°C’de ve her bir substrat için belirlenen optimum sıcaklıkta 20 dakikalık aralıklarla toplam bir saat inkübe edildi. Herhangi bir ön işlem uygulanmamış saf enzim elüatının optimum şartlarda belirlenen aktivite değeriyle inkübasyon sonucu elde edilen değerler karşılaştırılarak hesaplandı ve ısıl kararlılık grafikleri çizildi(Şekil 28, 29 ve 30).



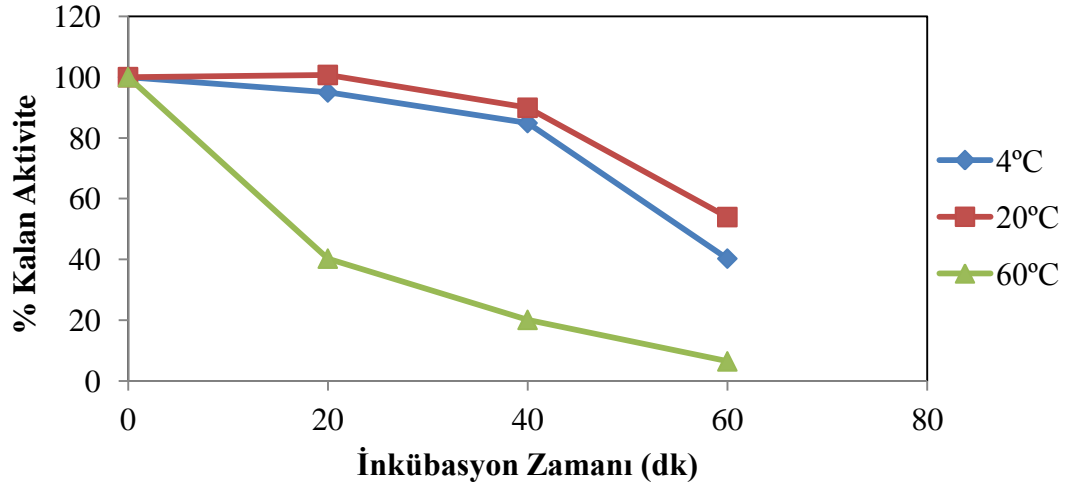
Şekil 28. 4-MK substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi

4-MK substratının varlığında enzim 20 dk sonunda +4°C ‘de ve optimum sıcaklığı olan 20°C’de aktivitesini korurken, 60°C’de ise aktivite % 80’dir. 40 dk sonra aktivite +4°C ve 20°C’de %80 iken 60°C’de PFO aktivitesinin % 50’si kaybolmuştur. İnkübasyon sonunda ise +4°C’de %60, 20°C’de %70 aktivite varken 60°C’de neredeyse aktivite kalmamıştır.



Şekil 29. DHPPA substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi

DHPPA substratı varlığında ilk 20 dk'da +4°C ve 30°C'de enzim aktivitesinin yaklaşık %70'i korunurken, 60°C'de aktivitenin yarısına yakınının kaybedildiği gözlenmiştir. İnkübasyon sonunda 30°C'de aktivite değişmezken +4°C ve 60°C'de PFO aktivitesinin %50'nin altına düştüğü gözlenmiştir.

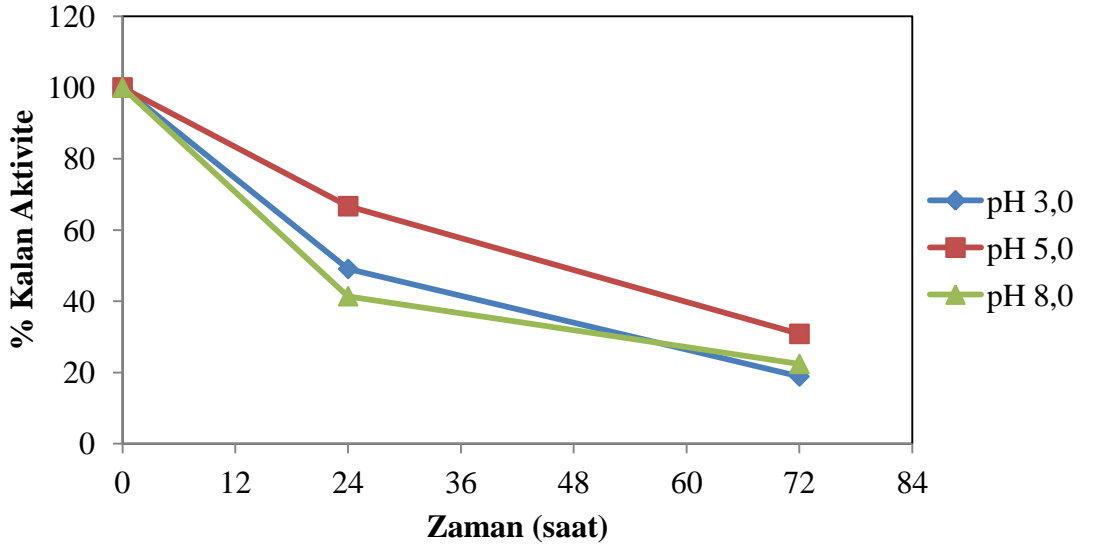


Şekil 30. L-DOPA substratı varlığında enzimin zamana bağlı ısıl kararlılık eğrisi

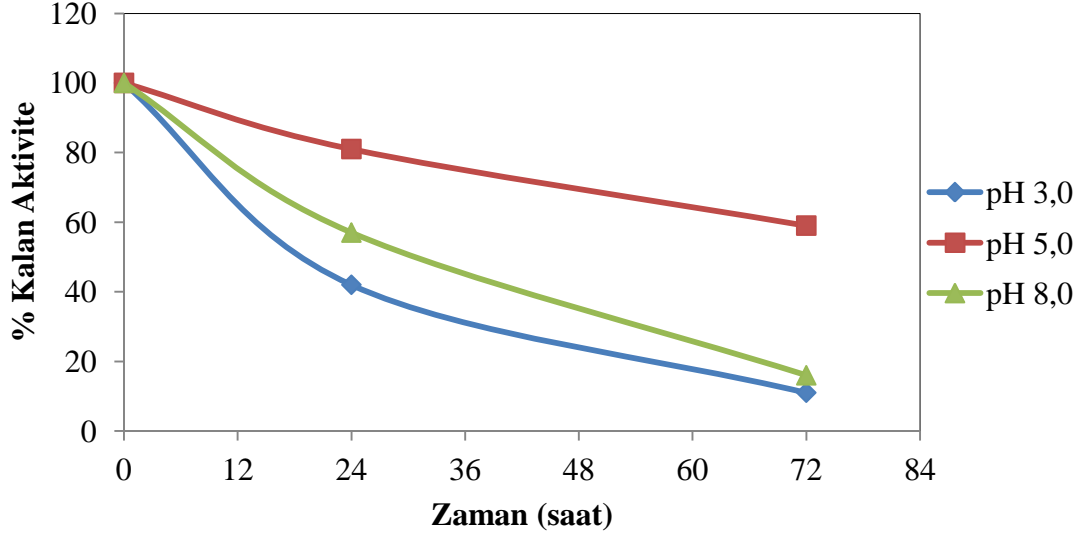
L-DOPA substratı varlığında ise PFO aktivitesinin 20 ve 40. dk sonunda +4°C ve 20°C'de %80'den fazlasının korunduğu ancak 60°C'de %50 oranında azaldığı gözlenmiştir. İnkübasyon sonunda 60°C'de aktivite neredeyse sonlanırken optimum sıcaklık değerinde enzim %50 aktivitesini korumaktadır.

3.2.2.6. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

PFO'nun pH kararlılığını incelemek amacıyla, her bir substrat için üç farklı pH değerinde tayin yapıldı. 50 mM Mcilvaine (pH 3,0 ,5,0, 7,0, 8,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırılan enzim elüatları 4°C ve yine her bir substratın optimum sıcaklık değerlerinde 24 saat ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası optimum şartlarda aktivite tayinleri yapıldı, aynı şartlarda fakat inkübasyona tabi tutulmayan enzim-tampon karışımlarının da hazırlanır hazırlanmaz optimum şartlarda aktivite değerleri belirlendi.

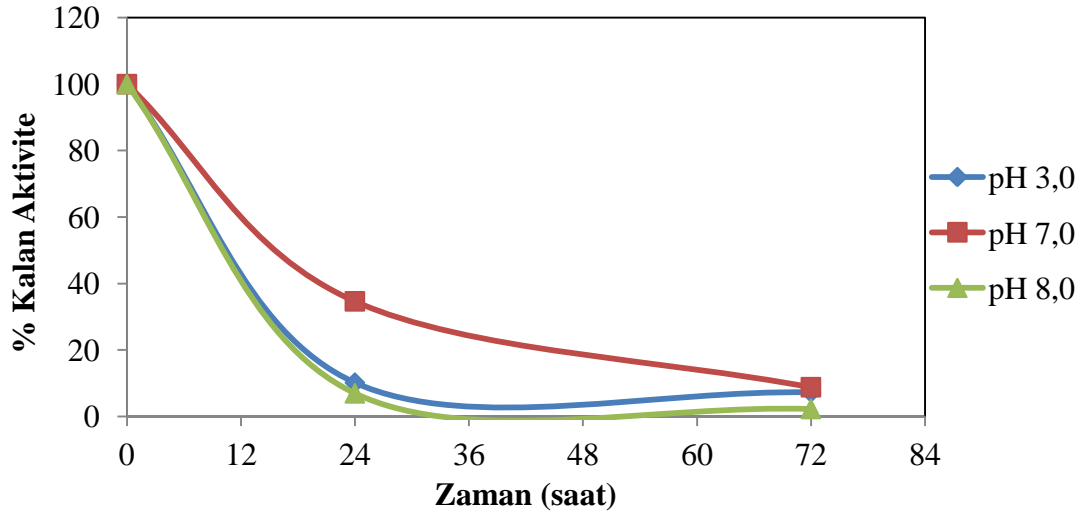


Şekil 31. +4°C'de enzimin 4-MK substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

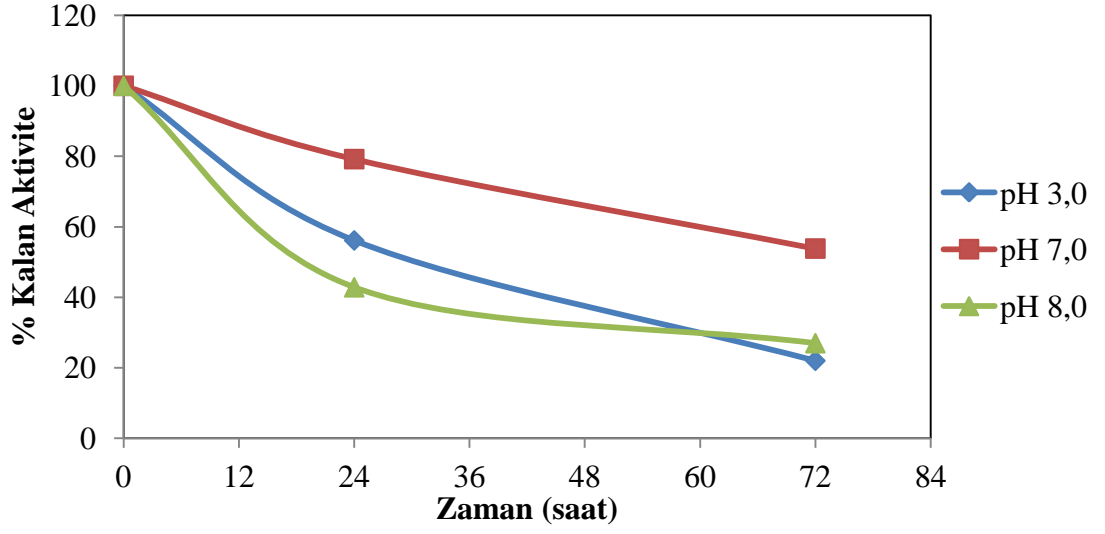


Şekil 32. 20 °C’de enzimin 4-MK substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

4-MK substratı varlığında 24 saat 4°C ve 20°C’de inkübasyon sonunda enzim aktivitesinde pH 3,0 ve pH 8,0 değerlerinde %50 civarlarında kayıp gözlenmektedir. Optimum pH değeri olan pH 5,0’de 20°C ise’de yaklaşık %80, 4°C’de ise %70’e yakın aktivite korunmaktadır.72 saatlik inkübasyon sonunda enzim 4°C’de %30 20°C’de ise %60 aktivite gösterirken pH 5,0 ve pH 8,0 ‘ aktivitede % 80 kayıp gözlenmiştir.

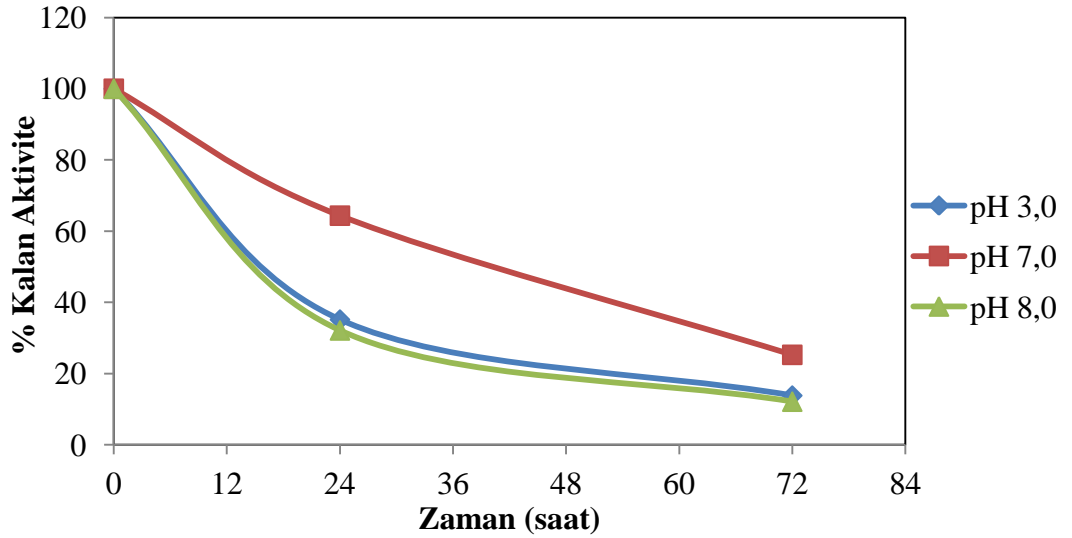


Şekil 33. +4°C’de enzimin DHPPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

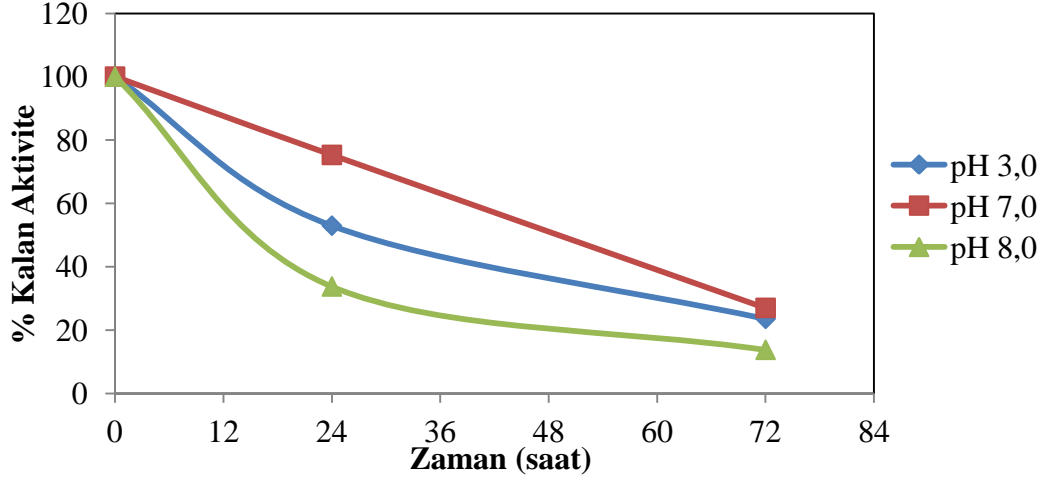


Şekil 34. 30 °C’de enzimin DHPPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

DHPPA substratı varlığında 4°C’de pH 3,0 ve pH 8,0’de enzim aktivitesi 24 saat sonunda %90’a yakın kaybolmuştur, pH7,0’de ise bu kayıp % 60 olarak görülmektedir.72 saat sonunda her üç pH değeri içinde aktivite %10’un altındadır.20°C’de ilk 24 saatte optimum pH’da aktivite %80 korunurken, pH 3,0’de %60 pH 8,0’ % 40’dır.İnkübasyon sonunda optimum pH’da enzim %50 aktivite göstermektedir.



Şekil 35. +4°C’de enzimin L-DOPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

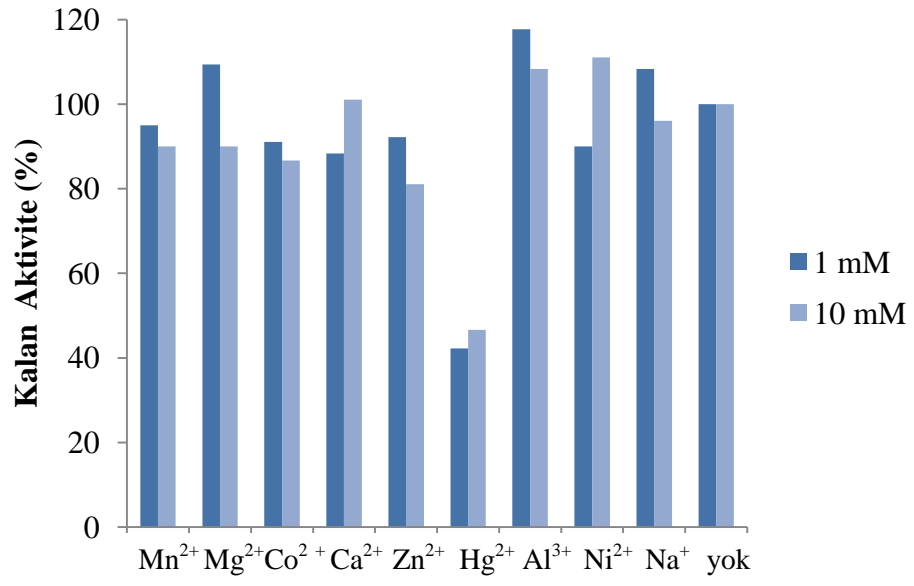


Şekil 36. 20°C’enzimin *L*-DOPA substratı varlığında zamana bağlı pH kararlılık eğrisi

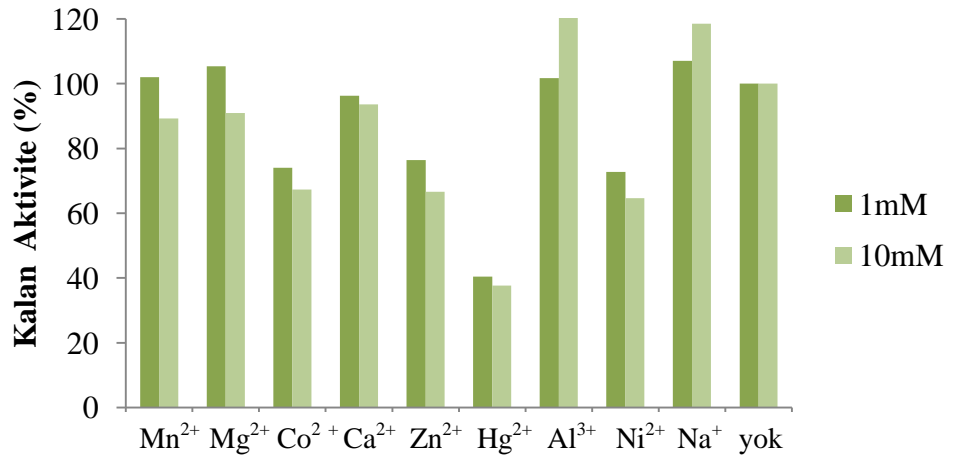
L-DOPA substratı varlığında hen 4°C’de hemde 20°C’de 24 sat sonunda enzim aktivitesini %70 oranında korumuştur. pH 3,0 ve pH 8,0’ de ise aktivite % 50’nin altına inmiştir. 72 saat sonunda iki sıcaklıktada optimum pH’da aktivite % 30’a düşmüştür.

3.2.2.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

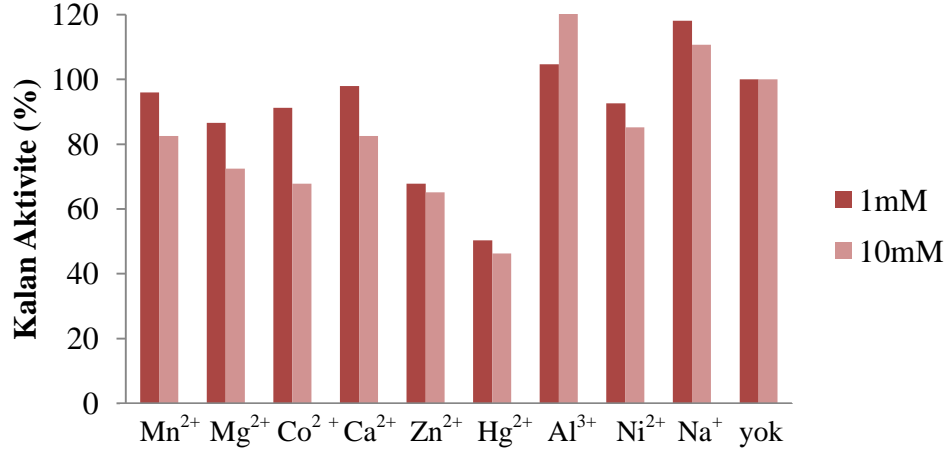
PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Na⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM’lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımının PFO aktivitesi %100 kabul edildi. Metal iyonu ilave durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı.



Şekil 37. 4-MK varlığında metal iyonları etkisi



Şekil 38. DHPPA substratı varlığında metal iyonları etkisi



Şekil 39. *L*-DOPA substratı varlığında metal iyonları etkisi

3.2.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisini incelemek amacıyla PFO için yaygın olarak bilinen dört genel inhibitör kullanılmıştır. Her bir substrat için, Askorbik Asit (0,005-0,03 mM), sodyummetabisülfid (0,01-0,05 mM), sodyumazid (50-400 mM), tiyoüre (50-400 mM) inhibitörleri ile optimum şartlarda aktivite tayinleri yapıldı. İnhibitör konsantrasyonu % kalan aktiviteye karşı grafiğe geçildi ve aktivitenin % 50 korunduğu inhibitör konsantrasyonu I_{50} değeri olarak belirlendi.

Tablo 8. PFO inhibitörlerine ait I_{50} Değerleri

Substrat / İnhibitör	Sodyumazid (mM)	Sodyummetabisülfid (mM)	Askorbik Asit (mM)	Tiyoüre (mM)
4-MK	120	0,024	0,007	145
DHPPA	65	0,015	0,006	58
<i>L</i> -DOPA	115	0,010	0,008	180

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Kolay elde edilebilirliği ve yüksek besin değerleriyle mantarlar yıllardan beri önemli bir besin olarak tüketilmektedir. Besin olarak tüketilmesinin yanı sıra endüstrinin bir çok alanında da kullanılmaktadırlar, özellikle kaliteli ve ucuz olması nedeniyle polifenol oksidaz kaynağı olarak bir çok endüstri alanında mantarlar rol almaktadır.(Maursek, 2006).

Yapılan bu çalışmada, *Lactarius eucalypti* mantarında, bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO'nun varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Bu amaçla, *L. eucalypti*'den hazırlanan enzim özütünden afinite kromatografisiyle, PFO saflaştırılmıştır. Enzimin varlığı, saf enzim elüatında ve ham enzim özütünde elektroforetik olarak ortaya konmuştur. Ayrıca, enzimin biyokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılıp, elde edilen veriler mantarlar ve diğer organizmalarda çalışılan PFO'lar ile karşılaştırılmıştır.

Zar proteinerinin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan TX-114 deterjanıyla (Sanchez-Ferrer vd., 1994; Bricker vd., 2001) PFO, *L. eucalypti*'den çözünürleştirilip ham enzim özütü hazırlanmıştır. Bu özütten PFO, soğuk aseton çöktürmesiyle kısmen saflaştırılmıştır. Ham enzim elüatında enzimin spesifik aktivitesi 83 U/mg protein iken aseton çöktürmesi sonrası kısmen saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 250 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre enzim *L. eucalypti*'den 3,01 kat saflaştırılmıştır.

Arslan ve çalışma arkadaşlarının (2004) PFO için afinite jeli sentezleme yöntemi kullanılarak, Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli başarı ile sentezlenmiştir. Aseton çöktürmesi sonrasında elde edilen enzim özütü, sentezlenen bu jele tatbik edilmiştir ve böylece *L. eucalypti* PFO'sunun, afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ham enzim elüatında enzimin spesifik aktivitesi 83 U/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 2187 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, enzim *L. eucalypti*'den 26,3 kat saflaştırılmıştır. Daha önce aynı afinite jeli sentezlenerek, yapılan afinite kromatografisi ile PFO'nun (*Morus alba* L.) dut meyvesinden 74 kat (Arslan vd., 2004), *Boletus erythropus* mantarından 28,5 kat (Özel vd., 2010) , *Macrolepiota gracilentia* mantarından 65,3 kat (Kolcuoğlu, 2012), *Lactarius piperatus* mantarından ise 13,9 kat (Öz vd., 2013) saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yine bir afinite jeli olan fenil sepharose kullanılarak da yapılan afinite kromatografisi çalışmaları mevcuttur. Bu yöntem ile PFO *Pouteria sapota*

meyvesinden 98 kat (Palma-Orozco vd., 2011), Barbados kirazından 60 kat (Kumar vd., 2008), fesleğenden 11,5 kat (Doğan vd., 2005) saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinin yanı sıra, hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, ve jel flitasyon kromatografisi de PFO'nun çeşitli organizmalardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Hanımeli çiçeğinin *Lonicera japonica* türünün tomurcuklarından PFO, DEAE-seluloz kolonu ile 30,76 kat (Liu vd., 2013), örümcek çiçeği yapraklarından önce DEAE-Sepharose kolonu ve ardından Sephadex G-75 kolonu ile 37,81 kat (Gao vd., 2011), zehirli ve zehirsiz iki farklı sardunya bitkisinden DEAE-seluloz kolonu sonrasında HiLoad Superdex kolonu ile sırasıyla 33,5 ve 99,5 kat (Zucca vd., 2013) saflaştırılmıştır.

Afinite kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra, elde edilen *L. eucalypti* PFO'sunun elektroforetik özelliklerini belirlemek amacıyla doğal ve denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezleri yapıldı. Doğal-PAGE'de saf enzim yürütülüp Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucunda saf elüatta (Şekil 21C) tek bir bant gözlenmesi enzimin etkin bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir. Ayrıca aynı özelliklerde hazırlanan ve yürütülen başka bir jele *L-DOPA* ile substrat boyaması yapılarak proteinin PFO'ya ait olduğu ortaya konuldu (Şekil 21B). Yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görülen tek bandın R_f değeri kullanılarak molekül ağırlığı 58,1 kDa olarak hesaplandı (Şekil 21A).Yapılan farklı çalışmalar ve hesaplanan molekül ağırlıkları şöyledir; yılan meyvesi PFO'su 38 kDa (Zaini vd., 2013), kolza çiçeğinden saflaştırılan PFO'nun 60,4 kDa (Sun vd., 2012), karnabahar PFO'su 60 kDa (Rahman vd., 2012), *Agaricus bisporus* PFO'su 67 kDa (Espin vd., 1999) *Lactarius salmonicolors* 36kDa, (Dedeoğlu, 2009). Molekül ağırlığı açısından elde edilen sonucun literatürle uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

L. eucalypti'den elde edilen PFO'nun substratlara bağlı olarak gösterdiği aktiviteyi belirlemek amacı ile difenolik substrat olarak katekol, 4-MK, DHPPA, *L-DOPA*, katekin monofenolik substrat olarak da tirozin ve PHPPA kullanıldı. Enzimin en yüksek aktiviteyi difenolik substratlar olan 4-MK, DHPPA ve *L-DOPA* varlığında gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşılık, *L. eucalypti* PFO'sunun monofenolik substratlar olan PHPPA ve tirozine karşı aktivitesinin yok denecek kadar düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler *L. eucalypti* PFO'sunun bir çok kaynakta olduğu gibi Domates tohumları, *Solanum tuberosum* (Coetzer vd.,2001), Sorghum taneleri (Dicko vd., 2002), yılan meyvesi (Zaini vd., 2013), malta eriği (Selles vd., 2006), Guava meyvesi (Beena ve Gowda, 2000),

Trametes sp. MS39401 mantarı (Motoda, 1999) yüksek difenolaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Enzimlerde, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ham enzim özütü hazırlama yöntemine ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir (Jiang, 1999). *L. eucalyptius* PFO'su 4-MK substratı varlığında pH 5,0'de optimum difenolaz aktivitesi gösterirken (Şekil 22), DHPPA ve *L*-DOPA substratları ile pH 7,0'de optimum aktivite göstermiştir (Şekil 23 ve 24). Değişik organizmalardaki difenolazların, karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, PFO için optimum pH, dutta 5,0 (Arslan vd., 2004), fasulye tohumlarında 4,0 (Paul ve Gowda, 2000), *Ferula* sp. 6,0 (Erat vd., 2006), pazı yaprakları 7,5 (Gao vd.,2009), kolza çiçeği 5,5 (Sun vd., 2012), *M. gracilentia* makromantarı 5,0 (Kolcuoğlu, 2012) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *L. eucalypts* difenolazının, önceden bildirilen difenolazlarla, pH optimumu açısından benzer davranış sergilediği gözlenmiştir.

L. eucalypti PFO'sunun aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 0-60°C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin optimum sıcaklığı 4-MK, DHPPA ve *L*-DOPA substratları varlığında sırasıyla 20, 30 ve 20°C olarak belirlendi. Farklı kaynaklarda PFO'nun optimum sıcaklıkları *B. erythropus* mantarında (Özel vd., 2010) ve *L. salmoicolor* ve *A. bisporus* mantarlarında (Dedeoğlu, 2009) 20°C, Emir üzümü (Ünal ve Şener, 2006) 25 °C, yılan meyvesi 30°C (Zaini vd., 2013), sardunya (Zucca vd.,2013), *Pouteria sapota* meyvesi (Palma-Orozco vd., 2011) 35°C, fasulye sürgünleri 40°C (Nagai ve Suzuki, 2003) ve pazı yapraklarında 45°C (Gao vd., 2009) olarak belirlenmiştir.

Saf enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan denemeler sonucunda, 4-MK, DHPPA, *L*-DOPA substratları için sırasıyla 3 , 6 ve 5 µg/mL olarak belirlendi. Daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, PFO aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Şekil 24).

L. eucalypti'den afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'ya ait bazı kinetik verileri belirlemek için, nihai konsantrasyonu 0,25-14 mM aralığında değişen 4-MK, DHPPA, *L*-DOPA substratları varlığında, çizilen substrat-doygunluk grafiklerinden, *L. eucalypti* PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görülmüştür. Enzimin difenolik substratları, 4-MK, DHPPA, *L*-DOPA varlığındaki kinetik verileri olan Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri, çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden sırasıyla, 0,25 mM ve 2500 U/mg protein (şekil 25), 0,4 mM ve 2000 U/mg protein (Şekil 26) ve 0,83 mM ve 1666 U/mg protein (Şekil 27)

olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, PFO aktivitesi için K_m değerleri, marula meyvesinde DHPPA substratı ile 3,43 mM (Mdluli, 2005), yılan meyvesinde katekol substratı ile 5,46 mM (Zaini vd., 2013), *Agaricus bisporus*'da 0,67 mM (Wu vd., 2013), 4-MK substratı ile sardunya bitkisinde 7,46 mM (Zucca vd.,2013), fesleğende 1,62 mM (Doğan vd., 2005), *Annona cherimola* Mill.'de 1,33 mM (Martinez-Cayuela vd.,1988), çilekte 2,71mM (Wesche-Ebeling ve Montgomery, 1990), *L-DOPA* substratı ile Barbados kirazında 4,1 mM (Kumar vd., 2008), pazı yapraklarında 3,17mM (Gao vd.,2009) olarak bulunmuştur. K_m , enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir (Yıldız vd., 2006). *L. eucalypti* PFO'sunun literatür ile kıyaslandığında her üç substratına da olan ilgisinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Çoğu endüstriyel enzimin K_m değerinin, biyoteknolojik öneme sahip substratlar varlığında 10^{-1} – 10^{-5} M aralığında değişmekte olduğu bildirilmiştir. (Kolcuoğlu, 2012). *L. eucalypti* PFO'sunun K_m değeri göz önüne alındığında çeşitli uygulamalarda kullanılabilir olduğu görülmektedir.

Enzimin ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla +4°C 'de, 60°C'de ve her bir substrat için belirlenen optimum sıcaklıkta ve pH'larda 20 dakikalık aralıklarla toplam bir saat inkübasyon sonunda kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 28, 29 ve 30). 4-MK ve DHPPA substratları varlığında substratların optimum sıcaklıklarında (20°C ve 30°C) toplam bir saatlik inkübasyon sonrası *L. eucalypti* PFO'sunun aktivitesini %70 oranında *L-DOPA* substratı ile ise optimum sıcaklıktaki (20°C) inkübasyon sonrası aktivitenin %60 korunduğu gözlenmiştir. Kolcuoğlu ve arkadaşları (2007) *M. mastoidea* PFO'sunun 20-80°C aralığında 10°C' lik artışlarla 60 dakika bekletildiğinde optimum sıcaklığında (20°C) başlangıç aktivitesini korurken sıcaklığın artışıyla birlikte aktivitenin giderek azaldığını ve 80°C de ise yine benzer şekilde enzim aktivitesini tamamıyla yitirdiğini gözlemlemişlerdir. *Armillaria mellea* PFO'su 20°C-40°C arasında bir saat inkübasyon sonunda aktivitesini korurken 60°C' bir saat sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir, *Lepista nuda* PFO'su 20°C ile 40°C'de aktivitesi yaklaşık %65 oranında korurken, *Hypholoma fasciculare* PFO'su 20°C'de bir saat inkübasyon sonrası %70 aktivite göstermektedir (Çolak vd., 2007). Tüm veriler doğrultusunda *L. eucalypti* PFO'sunun 4-MK, DHPPA ve *L-DOPA* substratları varlığında özellikle optimum sıcaklık değerlerinde oldukça kararlı olduğu söylenebilir.

L. eucalypti PFO'sunun pH kararlılığı her bir substrat için pH 3,0 ve 8,0 ve ayrıca optimum pH değerlerinde (pH 5,0, 7,0) 4°C ve her bir substratın optimum sıcaklık

değerlerinde 24 saat ve 72 saat inkübasyon sonrası aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. 72 saat sonunda 4-MK substratı varlığında enzim aktivitesinin 20°C 'de pH 5,0'de %60 oranında korunduğu gözlenmektedir. DHPPA substratı varlığında 30°C'de 24 saat sonunda optimum pH olan pH 7,0'de aktivite %80, L-DOPA substratında ise bu oran %70'dir. Benzer şekilde, daha önce *B. erythropus* PFO'sunun da yüksek pH kararlılığına sahip olduğu ve özellikle 4 °C'de 24 saat inkübe edildiğinde, enzimin aktivitesini, %85'in üzerinde koruduğu bildirilmiştir (Özel vd., 2010). *M. gracilenta* mantarında pH 5,0'de 4°C'de ve 30°C'de, 48 saat inkübasyon sonunda PFO aktivitesinin %63 oranında korunduğu gözlenmiştir (Kolcuoğlu, 2012).

Enzimatik esmerleşme mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında, mantar endüstrisinde de ciddi ekonomik kayıplara yol açan bir olaydır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler arasında pH, ısı, ışık ve bazı fiziksel faktörler, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, reaksiyon ürünleri, çeşitli iyonların varlığı, hormonlar ve bazı biyokimyasal faktörler ve inhibitörler ya da inhibitör etkisi gösteren bileşikler yer almaktadır (Lehninger, 2005). Sebzelerin enzimatik kararması oksijen ve fenolik bileşikler gibi reaktantları ortamdaki gidererek veya PFO inhibitörlerini kullanarak geciktirilebilir ya da tamamen önlenir. Sebzelerin ve mantarların işlenmeleri sırasında ortamdaki oksijenin tamamen giderilmesi oksijenin atmosferdeki mevcudiyetinden dolayı oldukça zordur (Roudsari vd., 1981). Bu nedenle en sık başvurulan yol, inhibitör kullanımınıdır. Bu çalışmada da, birçok bitki ve mantar dokusundan elde edilen PFO için inhibitör olarak denenilen, askorbik asit, sodyummetabisülfid, sodyum azid ve tiyoüre denenmiş ve her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 8). Elde edilen veriler, kullanılan inhibitörler arasında, enzimin etkili inhibitörünün askorbik asit ve bunu takiben de sodyummetabisülfid olduğu görülmüştür. Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Özel vd., 2010; Gao vd., 2009; Colak vd., 2005; Paul ve Gowda, 2000).

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). *L. eucalypti* PFO'su aktivitesi üzerine Na^+ , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{+3} iyonlarının etkisi 1 mM ve 10 mM nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde 4-MK, DHPPA ve L-DOPA substratları için incelendi (Şekil 37, 38 ve 39). Üç substrat

varlığında da hem 1 mM hem de 10 mM metal konsantasyonları için yapılan denemelerde Hg^{2+} 'nin aktiviteyi en çok inhibe eden metal iyonu olduğu gözlemlendi. Na^+ ve Al^{3+} iyonları ise PFO aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Motoda (1999) *Trametes* sp. MS39401 ile yapılan çalışmada Hg^{2+} ve Sn^{2+} iyonlarının aktiviteyi inhibe ettiğini bildirmiştir. Pazı yapraklarında elde edilen PFO'nun Na^+ varlığında aktive olduğu gözlenmiştir(Gao vd.,2009). *Macrolepiota mastoidea* mantarı ile yapılan çalışmada difenolaz aktivitesinde Cu^{2+} ve Hg^{2+} inhibisyona sebep olurken diğer metal iyonları aktivasyona sebep olduğu görülmüştür (Kolcuoğlu vd., 2007).

5. ÖNERİLER

Polifenol oksidaz'ın meyve, sebzeler ve kültür mantarlarında esmerleşmeye ve dolayısıyla hem bitkinin özellikleri ve hem de ekonomik açıdan istenmeyen bazı kayıplara yol açtığı çok çeşitli bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu esmerleşmenin, farklı meyve, sebze ve mantar kültürlerindeki fenolik içeriğe ve polifenol oksidaz aktivitesine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde ise en geçerli yöntem, PFO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Meyve, sebzelerin ve mantarların işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren, uygun yeni teknolojilerle birlikte, bunların kişi başına düşen tüketimindeki artış, birçok ülke için ekonomik yararlar sağlayacaktır.

Günümüzde PFO enzimini inaktive etmek amacıyla kullanılan birçok ticari yöntem mevcuttur, ancak bu yöntemler uygulandığı zaman besinde istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Bu yüzden besinlerde istenmeyen esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi noktasında PFO enzimlerinin incelenmesi, yapı ve mekanizmasının aydınlatılması günümüzde bir ihtiyaç olmuştur. PFO'lar klinik öneme sahip bazı kimyasalların sentez reaksiyonlarını katalizlemesinde kullanılabilirliğinden, kozmetik sektöründe kullanımına hatta çevrede kirlilik yaratan fenolik bileşiklerin teşhisine kadar çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ayrıca PFO, tıpta, atık suların temizlenmesi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır.

PFO' nun tüm bu uygulamaları düşünüldüğünde bu enzimin saflaştırılması ve endüstride kullanılabilir hale getirilmesi oldukça önemlidir. Afinite kromatografisi, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında güçlü bir tekniktir. Bu nedenle, PFO için afinite kromatografisinde kullanılacak alternatif afinite jelleri sentezlenebilir. Ayrıca, ileriki çalışmalarda *L. eucalypti* PFO'sunun inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması, organik çözücü ortamlarındaki kararlılığının incelenmesi gerekmektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile *L. eucalypti*'nin bireysel fenolik içeriği belirlenerek PFO açısından nasıl bir metabolizmaya sahip olduğu ortaya konulup bu anlamda farklı çalışmalara ışık tutulabilir.

L. eucalypti mantarı yılın belli zamanlarda bulunabilmesi ve henüz kültürü yapılamaması nedeniyle kolay ulaşılamayan bir tür olması, bu türden elde edilen difenolaz enzimlerinin saflaştırılması için çok uygun bir kaynak olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, bu mantarın kültürünün yapılabilirliği incelenebilir.

Ayrıca, bu organizmadan elde edilen difenolaz enziminin oldukça düşük K_m 'ye sahip olması, bu enzimin biyoteknolojik açıdan birçok uygulama alanı olabileceğini göstermektedir. Bu sebeple, *L. eucalypti*'den difenolaz kodlayan genin belirlenip, uygun bir organizmaya klonlanarak ileri derecede ekspres edilmesi sağlanabilir. Böylece enzimin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi mümkün hale getirilebilir. Bu sayede, ele geçecek rekombinat gen üzerinde yapılabilecek çeşitli mutasyonlarla, enzimin farklı substratlarla etkileşmesi, optimum değerlerinin değiştirilmesi ya da kararlılık düzeyinin arttırılması söz konusu olabilir.

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Enzimlerin reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi ve böylece birçok kez kullanılabilmesi nedeniyle immobilize enzimlerin kullanımı oldukça önemlidir. Bu nedenle *L. eucalypti* PFO'su özellikle tekrar kullanılabilmesi ve endüstri için daha çekici hale gelebilmesi açısından immobilize edilebilir.

6. KAYNAKLAR

- 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.
- Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E. ve Mehmetoglu, U., 2006. "Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor", Enzyme and Microbial Technology, 40, 4, 683-687.
- 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.
- Beşel, E., 2003. Use of Triton X-114 Aqueous Two Phase System for Recovery of Mushroom(*Agaricus Bisporus*) Polyphenoloxidase, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Blackwell, W.H., 1998. "Poisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall", New Jersey.
- Bock, C.W., Katz, A.K., Markham, G.D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions, Journal of the American Chemical Society, 121, 7360-7372.
- Boztok, K., 1990. Mantar üretimi tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları, İzmir.
- Breene, W.M., 1990. Nutritional and medicinal value of specialty of mushrooms, J. Food Protect., 53, 10, 883-894.
- Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F., 1994. Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of Lserine. Spectrophotometric determination of intermediates, Biochimica et Biophysica Acta. 917, 190-197.
- Coca, M., Garcia, M.T., Gonzalez, G., Pena, M. ve Garcia, J.A., 2004. Study of colored compounds formed in sugar beet processing, Food Chemistry, 86, 3, 421-433.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J. ve Tumer, N., 2001. Control of Enzymmatic Browning in Potato (*Solanum tuberasum L.*) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenol oxidase, J. Agric. Food Chem, 49, 652-657.
- 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., Sahin E., Yildirim M., ve Sesli E., 2007. Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon Food Chemistry, 103, 1426–1433.
- Creumière, F., 2000. Inhibition of Enzymatic Browning in Food Products Using Bio-Ingredients. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements of the Degree of Master of Science. Department of Food Science and Agricultural Chemistry.
- Çelebi, I., 2006. Color formation in wheat starch based glucose syrups and use of activated carbons for sugar decolorization, A thesis of Master, Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- Çiçek, H., 2000. Beyaz-çürükçül Fungus Kültürlerinde Tirozinaz Enziminin Sentezinin Taranması Ve optimizasyonu , Bilim Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Traore, A.S., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., ve Voragen, A.G.J., 2002. Comparison of Content in Phenolic Compounds, Polyphenol Oxidase, and Peroxidase in Grains of Fifty Sorghum Varieties from Burkina Faso, J. Agric. Food Chem, 50, 13, 3780-3788.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of metal ion binding. 1. metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Dedeoğlu, N., 2009. Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflastırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dogan, S., 2002. *Origanum L.* (Lamiaceae) Taksonlarının (*Origanum onites L.* ve *Origanum vulgare L.spp. hirtum* (Link) Ietswaar) Çevre Faktörleriyle Olan İlişkilerinin ve PFO Aktivitesinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dogan, S., Dogan M., ve Arslan, O., 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis var. Subisophyllus*), Advances in Food Science. 25, 2, 56-64.
- Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. chaubardiivar. Chaubardii*) Food Chemistry, 88 69-77.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Arslan, O. ve Alkan, M., 2005. Characterization of *Ocimum basilicum L.* Polyphenol Oxidase, J. Agric. Food Chem. 53, 10224-10230.

- Edwards, W.P., 2000. The Maillard Reactions. In: The Science of Sugar Confectionery, Edited by W.P. Edwards, Royal Society of Chemistry Publication, Cambridge, 9–13.
- Erat, M., Sakiroglu, H. ve Kuhrevioglu, I.O., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp., Food Chemistry, 95, 503-508.
- Erkel, İ., 1992. Dünyada ve Türkiye'de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, Kasım, İstanbul, Bildiriler Kitabı 1:2-8.
- Erzengin, M., 2002. Farklı Kaynaklardan Affinite Kromatografisi İle Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- 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, C.E., Garcia-Ruiz, P.A., Varon R. ve Garcia-Canovas, F., 1998. Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases, J. Agric. Food Chem, 46, 2968–75.
- Espin, J.C., Leeuwen J.V. ve Wichers HJ., 1999. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. J Agric Food Chem, 47, 3509–17.
- 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
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.
- 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.
- Gao, ZJ., Han, X.H. ve Xiao, G.X., 2009. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris subspecies cicla*) leaves Food Chemistry, 117, 342–348.

- Gao, Z., Liu J. ve Xiao, X., 2011. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from leaves of *Cleome gynandra* L. , Food Chemistry, 129, 1012–1018.
- Gücin, F. ve Dülger, B., 1997. Yenen ve Antimikrobiyal Aktiviteleri olan Keme Mantarı Üzerine Araştırmalar, Ekoloji Dergisi, 23, 27-33.
- Güngör, K., 2008. Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Güray, M., 2009. Partial Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase From Thermophilic *Bacillus* Sp. İzmir Institute Of Technology In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Master Of Science In Biotechnology
- Harel, E., Mayer, A.M., ve Shain, Y., 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition, Physiol Plant, 17, 921.
- Hermann, K., 1974. Über die Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. Erwerbsastbau, 16,1
- Jen, J.J. ve Kahler, K.R., 1974. Characterization of Polyphenoloxidase in Peaches Grown in the Southcast, Hort Science, 9, 590.
- Jiang, Y.M., 1999. Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase of Longan Fruit, Food Chemistry, 66, 75-79.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J.C. ve Krieb, B., 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center, Nature Structural Biology. 12,1084-1090.
- Kocatürk, S., 2008. Enginar Polifenol Oksidazının Alginat Ve Karragenan Jellerde İmmobilizasyonu Ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Kolcuoğlu, Y., 2005. Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepiota Gracilenta* 'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2005
- Kolcuoğlu, Y., Çolak A., Sesli E., Yildirim M. ve Sağlam N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild mushroom (*Macrolepiota mastoidea*) Food Chemistry, 101, 778–785.
- Kolcuoğlu, Y., 2012. Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilenta*) Process Biochemistry, 47, 2449–2454.
- Kovacz, Z., Racz, L., Papp, L. ve Prokai, B., 1996. Trace element determination in cultivated mushrooms: an investigation of manganese, nickel and cadmium intake in cultivated mushrooms using ICP atomic emission, Microchem. J., 54, 444-451.

- Kumar, V.B.A., Mohan, T.C. ve Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*) Food Chemistry, 110, 328–333.
- Labuza, T.P., Lillemo, J.H. ve Taoukis, P.S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes, Fruit Processing, 2, 9-13
- David L.Nelson-Michael M.cox /Çeviri Editörü:Prof Dr.Nedret Kılıç, 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Liu, N., Liu W., Wang, D., Zhou, Y., Lin, X., Wang, X. ve Li, S., 2013.Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica Thunb.*, Food Chemistry, 138,478–483.
- 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.
- Martinez-Cayuela, M., De Medina, L.S., Faus, M.J., and Gil, A., 1988.“Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) Polyphenoloxidase: Monophenolase and Dipydroxyphenolase Activities, Journal of Food Science, 53, 4, 1191.
- Marusek, CM., Trobaugh NM., Flurkey WH. ve Inlow JK., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species, J Inorg Biochem, 100-108.
- Mathewson, P.R., 2000. Enzymes, Eagen Press Handbook Series, 37-38.
- Mattila, P., Outila, T., Piironen, V. ve Lamberg-Allardt, C., 1999. Bioavailability of vitamin D from edible mushrooms (*Chanterellus tubaeformis*) as measured with human bioassay, Am.J.Clin.Nutr., 69, 94-98.
- Mcweeny, D.J., 1974. The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites, J. Sci. Food Agric, 25, 735.
- Mdluli, K.K., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp.*) Caffra, Food Chemistry, 92, 311–323
- Mos'ko, A.A., Shcherbakova, T.A., Glushko, N.A. ve Klenitskaya, I.A., 1992. Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus, Eurasian Science, 5, 60-65.
- Motoda, S., 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Trametes* sp. MS39401, Journal of Bioscience and Bioengineering Volume 87, 2, 137–143.
- Nagai, T. ve Suzuki, N., 2003. Polyphenol Oxidase From Bean Sprouts (*Glycinemax L.*), Journal Of Food Science, 68, 1, 16-20.

- Önez, Z., 2006. Üzümünden (*vitis vinifera* l.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. ve Yildirim, M., 2010. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents, Food Chemistry, 119, 1044-1049.
- Öz, F., 2010. *Lactarius Piperatus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- Öz, F., Colak, A., Özel A., Ertunga, S.N. ve Sesli, E., 2013. Purification And Characterization Of A Mushroom Polyphenol Oxidase And Its Activity In Organic Solvents, Journal of Food Biochemistry, 37, 1, 36-44.
- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno A., Alvarez, L.D., Sampedro, J. ve Hugo N., 2011 Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*), Phytochemistry, 72, 82-88.
- 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.
- Rahman, A.N.F., Ohta, M., Nakatani, K. and Fujita, S., 2012. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Cauliflower (*Brassica oleracea* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 3673-3678.
- Ragazzi, E. and Veronese, G., 1967. Ricerche sulle fenolossidasi esul contenuto in o-difenolli delle olive, Ann. Chim., 57, 1476.
- Roudsari, M.H., Signoset, A. ve Crovzet, J., 1981. Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties, Food Chemistry, 7, 227- 235.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A. ve Bollog, J.M., 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils, Soil Biol. Biochem, 21, 2, 223-230.
- Sato, M., 1962. The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid, Phytochemistry, 8, 353.
- Selles-Marchart, S., Casado-Vela, J., ve Bru-Martinez, R. 2006. Isolation of a latent polyphenoloxidase 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.

- Sesli, E. 1994. Trabzon Yöresinde Yetisen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Arastırma, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sesli, E., Tuzen, M. ve Soylak, M., 2008. Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from black sea region, Turkey, J. Hazard. Mater., 160, 462-467.
- Solomon, E. I., ve Lowery, M.D., 1996. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry, Science, 259, 1575-1581.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., ve Machonkin, T.E.,1996. Multi copper-per oxidaes and oxygenases, Chem. Rev., 96, 2563-2605.
- Spille, G.A., 1997. Caffeine, Tea: The Plant and Its Manufacture, Chemistry and Consumption of the Beverage, CRC Press, 3, 1-38.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. ve Riberio, S., 1972. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel, Phytochemistry, 11, 535.
- Sun, H., Wang, J., Tao X.M., Shi, J., Huang M.Y. ve Chen, Z., 2012. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Rape Flower*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 823–829
- Swain, T., 1962. Economic İmportance of Flavonoid Compounds. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press, 513.
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W. ve Steffens, J.C., 2004. Supression of polyphenol oxidase increases stress tolarence in tomato, Plant Science. 167, 693-703.
- Toth, B., 1995. Mushroom toxins and cancer (review), Int. J. Oncol., 6-137.
- Turan, P., 2005. *Ocimum basilicum* L. Polifenol Oksidazı Saflastırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- URL-1 www.agromantar.com/mantarnedir.html. 13 Aralık 2013.
- URL-2 <http://qldfungi.org.au/wp-content/uploads/2012/10/Lactarius-eucalypti.pdf> Leonard, P., Queensland Mycological Society, 11 Ekim 2013.
- URL-3 www.food-info.net/tr/colour/enzymaticbrowning.htm. 15 Mayıs 2013.
- Ünal, M.Ü. ve Şener, A., 2006. Determination Of Some Biochemical Properties Of Polyphenol Oxidase From Emir Grape (*Vitis Vinifera* L. Cv. *Emir*). Journal of The Science Of Food And Agriculture, 86, 2374-2379.

- Wesche-Ebeling, P. ve Montgomery, M.W., 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization, *Journal of Food Science*, 55, 1320.
- Whitaker, J. R., 1972. Principles of enzymology for the food sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York.
- White, J.S. ve White, D.C., 1997. Source Book of Enzymes, CRC Press LLC, Florida, 33431.
- Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. ve Solomon, E.I., 1985. Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase, *J. Am.Chem. Soc.*, 107, 4015-4027.
- Wu, J., Gao, J., Chen, H., Liu, X., Cheng, W., Ma, X. ve Tong.P., 2013. Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase From *Agaricus Bisporus*, *International Journal Of Food Properties*, 16,1483–1493.
- Yıldız, O., Sahin, H., Kara, M., Yazıcıoğlu, R.A., Tarhan, Ö. ve Kolaylı, S., 2010. Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi, *Akademik Gıda* 8, 6, 44-51.
- Yang, C.P., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., ve Hayashi, N., 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum L.*) Peel, *J. Agric. Food Chem.*,49, 1446-1449.
- Zaini, N., Osman, A., Hamid A.A., Ebrahimpour A. ve Saari N., 2013. Purification and Characterization of Membrane-bound Polyphenoloxidase (mPPO) From Snake Fruit [*Salacca zalacca (Gaertn.) Voss*], *Food Chemistry*, 136, 407–414.
- Ziyan, E., 1998. Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus communis*)’ndan İzole Edilmesi, Saflastırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zucca, P., Sanjust, E., Loi, M., Sollai, F., Ballero, M., Pintus, M. ve Rescigno A., 2013. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Sardinian poisonous and non-poisonous chemotypes of *Ferula communis (L.)* *Phytochemistry* 90, 16–24.

ÖZGEÇMİŞ

6 Temmuz 1987 'de Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2011 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizcedir.