

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Agaricus bitorquis (Quel)Saccardo 'den Tirosinaz Enziminin Elde Edilmesi
ve Karakterizasyonu*

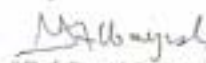
CANER YALÇIN

TEMMUZ 2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürünün onayı



Bu Tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK
Anabilim Dalı Başkanı

Bu Tezi Okuduğumu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.


Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜLER
Danışman

Tez Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜLER

Yrd. Doç. Dr. Sema TAN





ÖZET

Agaricus bitorquis(Quel.) Saccardo ' den Tirozinaz Enziminin Elde Edilmesi
ve Karakterizasyonu

Yalçın, Caner

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yard. Doç. Dr. Perihan Güler

Temmuz 2005, 47 sayfa

Günümüzde arıtım teknolojilerinde kullanılan ve endüstriyel alanda, gıda sanayinde , tıbbi alanda birçok aktivitelere neden olan tirozinaz enzimi hayvan , bitki ve mantarlardan izole edilmiştir.Hemen hemen tüm canlılarda bulunan tirozinazın mantarlarla yapılan çalışmalarda çoğunlukla, enzimin izolasyonu ve inhibisyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada, *Basidiomycetes* sınıfında yer alan ve ülkemizde doğal yayılış gösteren *Agaricus bitorquis*(Quel.)Saccardo' ten tirozinaz enziminin elde edilmesi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. *Agaricus bitorquis'* ten izole edilen tirozinaz enziminin özgül aktivitesi üzerine değişik faktörlerin etkileri hem misel aşamasında hem de fruktifikasyonlarda araştırılmıştır.Sıvı besiyerinde geliştirilen misellerde oluşan tirozinazın özgül aktivitesine miselyar pelet sayısı, inkübasyon süresi, karbonhidrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi

faktörlerin etkileri araştırılmıştır.Fruktifikasyon çalışmalarında; kültür mantarı ortam sıcaklığının etkisi araştırılmıştır.Elde edilen mantarlardan hazırlanan ekstraktlarda tirozinazın özgül aktivitesi ölçülmüştür.

Elde edilen sonuçlar grafiklendirilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Agaricus bitorquis*, tirozinaz, özgül aktivite, misel gelişimi, fruktifikasyon

ABSTRACT

Obtaining Tyrosinase Enzyme from *Agaricus bitorquis* (Quel.) Saccardo and
its Characterization

YALÇIN, Caner

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Perihan Güler

July 2005, 47 pp.

The tyrosinase that is used for refining technologies, industrial areas, food industries and in medicinal sciences which causes lots of activities are isolated from animals, plants and mushrooms of tyrosinase, which is present in most all living things, on mushrooms mostly the isolation and inhibition of enzyme has been worked. In this study, the production of tyrosinase enzyme from *Basidiomycetes* class *Agaricus bitorquis* (Quel.) Saccardo, which is a natural spread in our country and its characterization, has been worked. The effects of different factors on the specific activities of tyrosinase enzyme, which is isolated from *Agaricus bitorquis*, are investigated both on mycelia and fructifications. The tyrosinase that is developed in broth medium, The effects of mycelia pellet number, incubation period, carbohydrate concentration, heat and pH factors to its specific activities. During fructification studies; the effect of the environment heat

to the carpophores, which are produced in culture rooms by using the cultural mushroom production techniques. The specific activities of tyrosinase were measured at the extracts prepared from the produced mushrooms.

The final results were put in graphics and evaluated statistically.

Key Words: *Agaricus bitorquis*, tyrosinase, specific activity, mycelium growth, fructification.

TESEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde her türlü yardım, öneri ve eleştirilerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Perihan Güler'e, her konuda önerileri ve eleştirileri ile yardımlarını gördüğüm Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince bilimsel konularda daima yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Aysun Ergene'ye, Sayın Yard. Doç. Dr. Sema Tan' a ve her konuda yardımlarını gördüğüm arkadaşım Seher Yıldırım' a teşekkür ederim.

Ayrıca, tezimin her aşamasında yardımlarını ve desteklerini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TERMİNOLOJİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Fenol Oksidazlar.....	4
1.2. Tirozinazın Moleküler Özelliği.....	6
1.3. Enzimatik Tepkimeye Bağlı Olarak Tirozinazın İnaktivasyon Mekanizması.....	7
1.4. Tirozinazın Katalizlediği Tepkimeler.....	8
1.5. Tirozinazın Uygulama Alanları	10
1.5.1. Endüstriyel Alandaki Uygulamalar.....	10
1.5.2. Tıbbi Alandaki Uygulamalar	10
1.5.3. Gıda Endüstrisindeki Uygulamalar	10
1.5.4. Fenollerin Uzaklaştırılmasında Tirozinaz Kullanımı.....	11
1.6. Kültür Mantarının Tanımı.....	14
1.6.1. Morfolojisi.....	14
1.6.2. Türkiye'deki Yayılışı.....	15

2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
2.1. Kullanılan Organizma	17
2.2. Spor Alınması.....	18
2.3. Besiyeri Hazırlığı	19
2.3.1. Katı besiyeri Hazırlığı	19
2.3.2.Sıvı Besiyeri Hazırlığı.....	19
2.4. Ana Kültür Hazırlığı	19
2.5.Sıvı Besiyerine Misel Transferi	20
2.6. Tirosinaz Aktivitesinin Ölçümü	20
2.7. Hücre Dışı Protein Miktarının Ölçümü.....	21
2.8. Enzim Üretimine Etki Eden Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi.....	21
2.8.1. Pelet Sayısının Etkisi.....	21
2.8.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	22
2.8.3. Glikoz Miktarının Etkisi.....	22
2.8.4. pH 'ın Etkisi.....	22
2.8.5. Sıcaklığın Etkisi.....	23
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	26
3.1. Pelet Sayısının Etkisi	26
3.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi	27
3.3. Glikoz Miktarının Etkisi.....	29
3.4. pH'ın Etkisi.....	30
3.5. Sıcaklığın Etkisi.....	31
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

1.1. Farklı kaynaklardan izole edilen tirozinazların amino asit ve moleküler ağırlık içeriklerinin karşılaştırılması.....	7
3.1. Pelet sayısının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	27
3.2. İnkübasyon süresinin tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	28
3.3. Glikoz miktarının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	30
3.4. pH'ın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	31
3.5. Sıcaklığın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1.L-Dopa' nın tirozinaz tarafından L-Dopa kinona dönüşüm tepkimesi.....	3
1.1. <i>Agaricus bitorquis</i> fruktifikasyonu.....	15
1.3. <i>Agaricus bitorquis</i> 'in Türkiye'deki yayılış alanları.....	16
1.4. Toprak altında yetişen <i>Agaricus bitorquis</i> fruktifikasyonları.....	16
2.1. <i>Agaricus bitorquis</i> 'in toplandığı Aşağı Hacıosmanoğlu köyü.....	17
2.2. <i>Agaricus bitorquis</i> 'in spor izi.....	18
2.3. Tohumluk misel aşılınmış ve ağızları kapatılmış kompost torbaları.....	24
2.4. Örtü toprağı uygulanması yapılmış kompost torbaları.....	25
3.1. Pelet sayısının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	26
3.2. İnkübasyon süresinin tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	28
3.3. Glikoz miktarının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	29
3.4. pH'ın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	30
3.5. Sıcaklığın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	32

TERMİNOLOJİ

Annulus : Mantarın oluşumu sırasında velum partiale'nin yitilmesi sonucu sap üzerinde kalan halka şeklindeki yapı.

Basidiomycetes : Basid'li mantarlar.

Enzim : Biyokimyasal reaksiyonlara katılarak aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandıran ve reaksiyon sonunda hiçbir değişikliğe uğramayan protein yapılı organik bileşiklerdir.

Eukaryot : Gerçek bir çekirdeğe ve zarlı çevrili organellere sahip hücreleri bulunan sistematik birim

Fruktifikasyon : Makro ve mikro funguslarda spor meydana getiren yapı.

Karpofor : Yüksek yapılı mantarlarda sap ve şapkadan oluşan yapı.

Lamel : Yüksek yapılı mantarlarda şapkanın altında bulunan üreme organları.

Primer misel : Hiflerin birleşmesi ile oluşan genç misellere verilen ad.

Sekonder misel : Primer misellerin birleşmesiyle oluşan vejetatif çoğalma yeteneğinde olan misel. Sekonder miseller tipik olarak iki nukleusa sahiptir ve bu hücreler birbirinden orta duvar ile ayrılmıştır.

Spor : Mantarın, şapka altında bulunan lameller üzerindeki üreme hücresi.

1.GİRİŞ

Doğadaki canlılar ve doğal kaynaklar arasında kurulan denge, çevre problemlerini hemen hemen yok edilebilecek düzeydedir. Ancak hızlı nüfus artışı, sanayileşme ve düzensiz kentleşme, doğal dengeyi hızlı, sürekli ve düzeltilmesi zor bir seviyede bozmuş; kaynağı ne olursa olsun suda, karada ve havada artan kirlilik, başta insan yaşamı olmak üzere tüm canlıların yaşamını olumsuz yönde etkilemiştir. Bu olumsuz etkileri azaltmak için atık ve artıkların arıtımı ile ilgili birçok araştırma yapılmaktadır ve bu çalışmalar özellikle endüstriyel atıksuların arıtımında enzimlerin kullanımına yöneliktir⁽¹⁾.

Atık maddeler grubunun büyük bir kısmını, fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Fenolik bileşikleri oluşturan kaynaklar arasında; kömür, petrol, plastik, metal kaplama, odun, boya, tekstil, maden, kağıt yapımı ve işlenmesini sağlayan endüstriler sayılabilir⁽²⁾. Bu işletmelerin oluşturduğu atık maddelerin arıtım işlemlerinde son yıllarda enzimler kullanılmaktadır.

Enzimleri ön plana çıkaran özellikler arasında;

Enzimin maddeye özgül olması ve son zamanlarda biyoteknolojide yaşanan gelişmelere bağlı olarak daha iyi izolasyon ve saflaştırma yöntemleri kullanılarak enzimin organizmalardan daha ucuz ve kolay elde edilebilir olması gelmektedir⁽¹⁾.

Aritım teknolojilerinde kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında enzimlerin bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar arasında; düşük ve yüksek kirletici konsantrasyonlarında işlev görebilmesi, sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi etkenlere karşı toleransının yüksek olması, biyokitle oluşmaması nedeni ile arıtım sonrası ortaya çıkabilecek artık madde miktarında azalma ve işlemin kontrolünün kolay olması sayılabilir. Endüstriyel atık sulardaki fenolik bileşiklerin arıtımında kullanılan enzimler, peroksidaz ve fenoloksidaz grubundaki enzimlerdir⁽¹⁾.

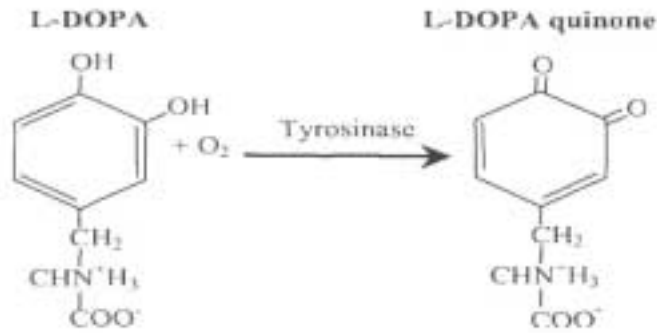
Peroksidazlar, oksidoredüktaz sınıfı enzimlerden olup oksitleyici ajan olarak H_2O_2 'yi kullanarak aktivite gösterirler. Bu aktivasyon sonucunda fenoksi radikaller ortaya çıkar. Fenoksi radikaller, çözelti içerisindeki diğer fenol molekülleriyle ve aromatik bileşiklerle tepkimeye girerek polimer oluştururlar. Reaksiyon sonucunda oluşan polimerler, suda çözünmezler ve bu nedenle su ortamında çökerler⁽³⁾. Bu çöküntüler basit bir filtrasyon yoluyla ortamdaki uzaklaştırılabilir. Bu yolla atıksulardaki fenolik bileşikleri, hidrokarbonları ve poliklorlu bifenilleri uzaklaştırmak mümkündür⁽⁴⁻⁷⁾. Arıtma sürecinde peroksidazlar için oksitleyici ajan olarak kullanılan H_2O_2 'ın maliyetinin yüksek olmasından dolayı ; çalışmalarda oksitleyici ajan olarak O_2 kullanan fenol oksidazlar tercih edilmektedir.

Fenoloksidazlarda oksidoredüktazlar sınıfında yer alır, tirozinaz ile lakkaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır⁽¹⁾.

Tirozinaz ardışık iki tepkimeyi katalizler. Bunlar :

-Moleküler O₂ varlığında monofenollerin ortodifenollere hidroksilasyonları (kserolaz)⁽¹⁾,

-Oluşan ortodifenollerin kinonlar oluşturmak üzere dehidrojenasyonları (kateşolaz)⁽²⁾. Eğer ikinci tepkimede substrat olarak L-DOPA kullanılır ise tepkimede son ürün olarak suda çözülmeyen bir polimer olan L-DOPA kinon oluşur. Oluşan bu madde filtrasyon yöntemiyle kolayca sulardan uzaklaştırılabilir⁽⁸⁾.



Şekil 1.1. L-Dopa' nın tirozinaz tarafından L-Dopa kinona dönüşüm tepkimesi ⁽⁸⁾

Tirosinaz enzimi, ökaryotik canlıların hemen hemen tüm gruplarında bulunur. Bu canlılar arasında yer alan mantarlarla ilgili enzim çalışmaları, üretim ve tüketim açısından dünyada ilk sırada yer alan *Agaricus bisporus* ile ilgilidir⁽⁹⁻¹¹⁾. Ayrıca *Portabella*⁽¹²⁾, beyaz çürükcül funguslar⁽¹³⁾, parazit yaşayan *Aspergillus* ve *Penicillium*^(14,15) gibi mantarlarda kullanılmıştır.

Basidiomycetes sınıfında yer alan *Agaricus bitorquis* (Quel). Saccordo kısa sürede üreme periyodunu tamamlaması, yetiştiricilik maliyetinin düşük

olması ve bu mantar ile yapılan çalışmaların azlığı sebebi ile bu tezin konusunu oluşturmuştur.

1.1. Fenol Oksidazlar

Polifenol oksidazlar, fenolaz, kateşol oksidaz, monofenol oksidaz ve kserolaz oksidaz olarak bilinen tirozinaz (EC 1.41.18.1) mantarlar, bitkiler ve hayvanlardan izole edilmiştir^(16,17).

Bitkilerle yapılan çalışmalarda enzimin sadece kloroplastlarda tilakoid zarı üzerinde bulunduğu bildirilmiştir.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Güney Asya'da yetişen *Sago palm* (Palmiye ağacı) dan alınan bir ekstraktta, selüloz kromatografisi ve jel filtrasyonu yöntemleri ile polifenol oksidazın iki izoenzimine rastlanmıştır. Bu izoenzimlerin farklılıkları; birinin 35°C ve alkali ortamlarda, diğerinin ise 45°C ve asidik ortamlarda aktif olmasıdır⁽²¹⁾. Gri renk oluşumu gözlenen üzümlemlerden alınan ekstraktta, lakkaz ve tirozinaz enzimine rastlanmıştır⁽²²⁾. Klapp ve arkadaşları, elma ile yapmış oldukları çalışmada, tirozinazın karboksil asit tarafından inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada; NaF, NaCl, NaBr, NaI'ün tirozinaz enziminin çalışmasını yavaşlattığını bildirmişlerdir⁽²³⁾. Ispanak bitkisinden santrifüjleme yoluyla elde edilen süpernatant elektroforez yöntemiyle tespit edilmiştir⁽²⁴⁾. Likenlerle yapılan invitro çalışmada tirozinaz enziminin varlığı gösterilmiştir⁽²⁵⁾.

Enzim çalışmaları, hayvansal organizmalarda da sürdürülmüştür. Omurgasız hayvanlardan böceklerde⁽²⁶⁾, kabuklularda⁽²⁷⁾ tirozinaz enzimine rastlanmıştır. Omurgalı hayvanlarda, fare ve insanlarla yapılan çalışmalarda pigmentasyon sağlayan melanozomların tirozinaz tarafından uyarıldığı

saptanmıştır. Böylece tirozinazın insanlarda derinin rengini, farelerde ise kürk renginin oluşumunu sağladığı bildirilmiştir⁽²⁸⁾. Ayrıca insanlarda melanin oluşumunu sağlayan bu enzimin TRY geni tarafından şifrelendiği bulunmuştur⁽²⁹⁾.

Fenol oksidazlarla yapılan mantar çalışmalarında birçok türle çalışılmıştır. *Basidiomycetes*'lerden *Boletus luciferus*'u kullanan Schobein, elde ettiği ekstraktta mavi bir pigment tespit etmiş⁽³⁰⁾ ve bundan 30 yıl sonra Yoshida⁽³¹⁾ lak ağacının lateksinde bu rengin lakkaz enziminin varlığından kaynaklandığını tespit etmiştir. Bertrand, *Russula fortens* ve *Russula nigricans*'ı kullanarak bu mantar türlerinden elde ettiği ekstraktların oksidasyon boyunca renginin kırmızıdan, koyu kahverengi-siyaha dönüştüğünü gözlemiştir. Bertrand çalışmasında izole ettiği enzimi, tirozinaz olarak tanımlamıştır⁽³²⁾.

Mantarlarla yapılan çalışmalarda çoğunlukla *Agaricus bisporus* kullanılmış ve özellikle enzimin izolasyonu ile inhibisyonu çalışılmıştır⁽²⁹⁾.. Yapılan çalışmalarla, dünyada her yıl milyonlarca ton hasara maruz kalan tarım ürünlerinde görülen kaybın azaltılması için bu enzimin inhibe edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Enzimin inhibisyonunu sağlayan maddeler arasında kojikasit^(33,34) ve bisülfid^(35,36) sayılabilir.

1.2.Tirosinazın Moleküler Özelliği

Tirosinazın aminoasit kompozisyonu canlılarda farklılık göstermesine karşın, tüm tirosinaz enzimleri iki bakır atomu taşır. Kompozisyon farklılığı bu iki bakır atomunun amino asitlere bağlanma yerlerinden kaynaklanır. Örneğin; insanlarda birinci bakır atomu enzimin yapısında bulunan 260. aminoaside, ikinci bakır atomu ise 360. aminoaside bağlanırken, *Agaricus bitorquis* (Quel)'de ilk bakır atomu 100. aminoaside, ikinci bakır atomu ise 210. aminoaside bağlanmıştır⁽²⁹⁾. Tirosinaz tipi fenol oksidazların moleküler ağırlıkları izole edildikleri canlılara göre değişiklik göstermektedir. Tirosinazın moleküler ağırlığı insanlarda 62.610 kD, farelerde ise 57.872 kD' dir. Sherman yapmış olduğu çalışmada; domates , bakla ve üzüm kullanarak enzimin moleküler ağırlığının 40.680-58.082 kD arasında değiştiğini bildirmiştir⁽³⁷⁾. Mantarlarda bulunan tirosinazın moleküler ağırlığı ise 128.000 kD'dur ⁽³⁸⁾. Ancak bu rakamın çok altında moleküler ağırlığa sahip mantarlar da vardır. Örneğin; tirosinazın moleküler ağırlığı *Streptomyces glaucescens*' de 30.900 kD, *Neurospora crassa*' da 46.000 kD' dur ⁽³⁹⁾ (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Farklı kaynaklardan izole edilen tirosinazların amino asit ve moleküler ağırlık içeriklerinin karşılaştırılması

Tirosinaz	Amino Asit		MA (kD) (Olgun)
	İşlenmemiş Protein	Olgun Protein	
Patates 1	588	500	56.500
Patates 2	584	501	56.613
Domates	587	500	56.500
Bakla	606	514	58.082
Üzüm	607	360	40.680
<i>Neurospora crassa</i>	~	407	46.000
Mantar	~	1130	128.000
<i>Homo sapiens</i>	560	548	62.610
<i>Mus musculus</i>	537	513	57.872
<i>Streptomyces glaucescens</i>	~	273	30.900

1.3. Enzimatik Tepkimeye Bağlı Olarak Tirosinazın İnaktivasyon Mekanizması

Tirosinaz enziminin, katalizlediği iki tepkimenin ardından çoğunlukla inhibisyona uğrayarak yavaş bir şekilde geri dönüşümünün gerçekleştiği tespit edilmiştir⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Önceleri bunun nedeninin enzimin aktivitesi için gerekli olan bir amino grubunun o-benzokinon ile tepkimeye girmesi olduğu

düşünülmekteydi⁽⁴³⁾. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise tepkime sırasında açığa çıkan serbest radikal grubun, bakır atomunun bağlandığı histidin aminoasidine etki ederek bakırın salınımını sağladığı ve böylece enzimin inhibe edildiği ortaya çıkmıştır.^(40,44,45)

Tirosinaz enzimi iki şekilde inhibe edilir;

1-Aktivatör olarak kullanılan bakır iyonunun tepkime ortamına eklenmemesi veya tepkime ortamında mevcut ise uzaklaştırılmasıyla

2-Tirosinazın substrat olarak kullandığı L-DOPA veya tirosin amino asidi gibi maddelerin yerine substrat olarak inhibitörlerin kullanılmasıyla

Tirosinazın ürün meydana getirmesi veya inhibisyonu, kullanıldığı çalışma konusuna göre farklılık gösterir. Örneğin; arıtım teknolojisinde enzim faaliyeti ön planda tutulurken, gıda sektöründe daha çok inhibisyonu konulu çalışmalar sürdürülmektedir. Ancak enzimin inhibisyonu, tüm gıda ürünleri açısından yararlı değildir. Örneğin çay, kakao, kuru üzüm, kuru incir gibi maddelerin renk oluşumu ve kalitesi açısından enzimin fonksiyonu önemlidir.

1.4. Tirosinazın Katalizlediği Tepkimeler

Tirosinaz, aktif merkezinde iki bakır atomu bulunan, ardışık iki tepkimeyi katalizleyen bir enzimdir. Bu tepkimelerden birincisi monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, ikincisi ise o-difenollerin o-kinon ile tepkimesinin ardından suda çözünmeyen kinonlara dönüşmesidir. Sırasıyla bu tepkimeler, kserolaz (monofenolaz veya hidroksilaz) ve kateşolaz (difenolaz veya oksidaz) aktivitesi olarak isimlendirilir⁽⁴⁶⁾.

Tirosinazın aktivitesinin oluşumu için, ortama kofaktör olarak BH₂ eklenmesi gerekir. Eğer ortama kofaktör ilave edilmezse enzim bir lag fazı geçirir. Daha sonra enzim, ihtiyaç duyduğu bu kofaktörü monofellerin o-hidroksilasyonlarından elde edebilir⁽³⁹⁾. Enzimin oluşturduğu kateşolaz aktivitesi kserolaz aktivitesine göre 5-10 kat daha yüksektir⁽⁴⁷⁾.

Yapılan araştırmada, bazı bitki türlerinin, (kiraz, armut, muz) kserolaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir⁽⁴⁶⁾. Ayrıca Matheis ve Belitz patatesde⁽⁴⁸⁾, Zawistowski⁽⁴⁹⁾ise yer elmasında kserolaz aktivitesinin tirosinazın yüksek moleküler ağırlıklı biçiminin monofenollerini oksitleyebildiğini bildirmişlerdir .

Tirosinaz enziminin birden fazla substratı bulunmaktadır. Bu maddeler arasında kateşinler, 3,4-dihidroksi fenilalanin (DOPA), sinamik asit esterleri ve tirozin sayılabilir. Ayrıca substratların oksidasyon oranları mono ve o-difenollerde bulunan yan grubun tipine ve pozisyonuna göre değişiklik gösterir. Monofenoller sadece parapozisyonunda bir metil (-CH₃) grubu taşıyorlarsa, tirosinaz tarafından hidroksillenebilirler. Ayrıca, o-difenollerin oksidasyon oranları taşıdığı grupların elektron verme isteği arttıkça yükselirken, parapozisyondaki yan grubun elektron alma isteği arttıkça azalmaktadır.

1.5. Tirozinazın Uygulama Alanları

1.5.1. Endüstriyel Alandaki Uygulamalar

Tirozinazın kullanım alanı, arıtım teknolojisiyle sınırlı değildir. Özellikle meyve ve sebzelerin işlenmesinin ardından ve buna bağlı olarak maddi kayıplara yol açması nedeniyle gıda sektöründe araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Çalışmalar özellikle ürünün hasat, işleme ve depolama sonrası enzim aktivitesinin inhibisyonuyla ilgilidir⁽⁵⁰⁾. Ayrıca sağlık ve kozmetik gibi tıbbi alanlarda da tirozinazla çalışmalar giderek artmaktadır.

1.5.2. Tıbbi Alandaki Uygulamalar

Tirozinaz enzimi, hayvansal organizmalarda melanin sentezinde görev almaktadır. Melanin canlıyı güneşin zararlı U.V. ışınlarından korumaktadır ve bu özelliğinden dolayı kozmetik sektörü ile sağlık alanlarında büyük ilgi çekmiştir. Ayrıca melanin, ilaç tutuklanması olaylarında kullanılmaktadır. Tirozinazın kullanıldığı diğer önemli alanlardan biri de kanser araştırmalarıdır. Bazı kanser türlerinde, hücrede tirozinaz faaliyetinin arttığı gözlenmiş ve tedavide enzimin bu özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir⁽³⁸⁾.

1.5.3. Gıda Endüstrisindeki Çalışmalar

Tarımsal kökenli gıda maddeleri tirozinaz içeriği nedeniyle enzimatik kararmaya uğrar ve bunun sonucunda ürünün kalitesi düşer. Özellikle meyve ve sebzelerin işleme sürecinde O₂ teması ile tirozinaz aktivitesine bağlı olarak kararma oluşmakta ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu

nedenle, gıda sektörü için çeşitli inhibitörler kullanılarak tirozinaz enziminin aktivitesinin kontrolü ve buna bağlı olarak enzimatik kararmanın önlenmesi oldukça önemlidir. Tirozinaz aktivitesini inhibe eden birçok birleşik bilinmesine karşın, bu inhibitörlerin enzimatik kararmayı kontrol edebilme yetenekleri; inhibitör, substrat O₂ konsantrasyonu, pH , sıcaklık ve enzim kaynağına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Ayrıca enzimatik kararmayı önleyen etkili inhibitörlerin kullanımı, yiyeceğin tat, koku, sindirilebilirlik üzerine olan etkileri ve yarattıkları toksiside nedeniyle kısıtlanmıştır.

Tirozinaz metal içeren bir protein olduğundan siyanür, karbonmonoksit, sodyum dietil-difosforikarbonat, tropolon, 2-merkaptobenzotiyazol asit ve EDTA gibi çeşitli metal ajanlar kullanılarak inhibe edilmektedir^(39,51,52). Ayrıca tuzlar da dahil olmak üzere bazı inorganik iyonlarda tirozinazı inhibe edilebilmektedir. NaCl dışında bu bileşiklerin çoğu toksik olduğundan sınırlı kullanılmaktadır⁽⁴⁶⁾.

Tirozinaz aktivitesi bazı gıda ürünleri açısından önlenmesi gereken bir durum olmakla birlikte aktif tirozinaz çay, kahve, kakao, kuru üzüm, kuru erik, kuru incir gibi gıda ürünleri açısından oldukça önemlidir. Özellikle çay en çok tüketilen gıda maddesidir. Çayın kalitesi, içerdiği theaflavin maddesinin miktarına bağlıdır ve bu maddenin oluşumunu da tirozinaz sağlar⁽⁵³⁾.

1.5.4. Fenollerin Uzaklaştırılmasında Tirozinaz Kullanımı

Bazı endüstriyel atıksularda fenolik bileşiklere rastlanır. Günümüzde bu bileşiklerin sulardan uzaklaştırılması için fenol oksidaz grubunda yer alan biyokatalizörler kullanılmaktadır. Bu enzim grubunda yer alan peroksidazın,

fenolik bileşiklerin arıtım sürecinde oluşacak pH ve sıcaklık değişimlerine karşı inhibisyonu düşük düzeydedir^(2,5).

Bu durum ticari anlamda büyük kolaylık getirirken, enzimin oksitleyici ajan olarak kullandığı hidrojen peroksidin yüksek maliyeti, endüstriyel ölçekte olumsuz bir kriter olarak göze çarpar. Bu nedenle peroksidazlara alternatif olarak bakterilerde, meyva ve sebzelerde, funguslarda ve hayvanlarda tespit edilen ve oksitleyici ajan olarak havanın serbest O₂'ni kullanan tirozinaz enziminin kullanılması maliyeti düşüreceğinden, bu konuda yapılan çalışmalar hızla artmıştır.

Fenolik bileşiklerin sulardan uzaklaştırılmasında mantarın kullanılması 1984 yılında Atlow ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ile başlamıştır⁽³⁾. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada organizma olarak *Agaricus bisporus*' u kullanmışlar ve mantardan elde ettikleri tirozinaz enzimi ile 0,01-1,0,g/L yoğunluğundaki fenollerin çözeltiden uzaklaştırıldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin, değişik pH ve sıcaklık koşullarındaki atık arıtımında bile verimli olduğunu göstermişlerdir. Atlow ve arkadaşları aynı çalışmada tirozinazın substratı olmadığı halde fenollerle birlikte kullanıldığında bazı yan grup taşıyan kirleticileri çöktürebildiğini bildirmişlerdir. Deneyler sonucunda ortaya çıkan olumsuz durum ise, arıtımda kullanılan enzim miktarının fazla olmasıdır. 50mg/L lik bir fenol çözeltisinden yaklaşık % 99 oranında bir fenol bileşiği çöktürmek için gerekli enzim miktarının 60 ünite/ml' dir. Diğer önemli bir sorun ise, enzimin tekrar kullanılmamasıdır.

1993 yılında Wada ve arkadaşları⁽⁵⁴⁾ enzimin arıtım olaylarında kullanılması ile ilgili yaptıkları çalışmalarında; fenolik çöktürme oluşumunun olmadığını, yalnızca sıvının başlangıçta açık renkli iken giderek koyulaştığını gözlemişlerdir. Wada ve arkadaşları, bunun nedeninin enzimin içerdiği protein miktarına ve enzimin saflık derecesine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar fenol çözeltilerinin tirozinaz ile muamelesi sonucunda çökme oluşumunu gözlemediklerinden dolayı oluşan tepkime ürünlerini uzaklaştırmak için kitin ve kitozan gibi absorbant özellikteki maddelerin kullanılmasını önermişlerdir.

Kitin, kabuklu deniz hayvanlarının dış iskeletini ve mantarların hücre çeperlerini oluşturan, doğada bol miktarda bulunan bir polisakkarit olup tepkime sonucunda oluşan ürünleri absorbe edebilme özeliğine sahiptir. Kitozan ise kitindeki asetil grubunun uzaklaştırılması sonucu ortaya çıkan renkli ürünleri uzaklaştırmada kitine göre daha verimlidir. Arıtım tepkimelerinde enzimlerin kullanılmasının olumsuz yönlerinden biri de, daha önce belirtildiği gibi enzimin tepkime sonrası tekrar kullanılamamasıdır. Wada ve arkadaşları bu sorunu ortadan kaldırmak için yapmış oldukları diğer bir çalışmada⁽⁵⁵⁾ tirozinaz enzimini amino grupları kullanarak magnetit (Fe_3O_4) üzerine tutuklamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda tirozinazın magnetit üzerine tutuklanmasının enzimin dayanıklılığını arttırdığını ve $+4^{\circ}C$ ' de 15 gün süresince serbest enzimde %70' lik bir aktivite kaybı olurken, tutuklanmış enzimdeki aktivite kaybının aynı koşullarda %5 olduğunu bildirmişlerdir. Wada ve arkadaşları bu çalışmanın ardından hem tutuklayıcı, hem de absorbent özellikteki maddeleri kullandıkları çalışmalarında⁽⁵⁴⁾ çözeltideki fenolün %100 oranında giderildiğini göstermişlerdir.Çalışmada

ayrıca absorbentlerle birlikte kullanıldığında serbest enzimin aktivasyonunun azaldığı bildirilmiştir⁽⁵⁴⁾.

Tirosinaz aktivitesi sonucunda oluşan kinonları ve diğer ara ürünleri absorbe etmek amacıyla Sun ve arkadaşları, sudaki fenollerı uzaklaştırmak için iki basamaklı bir yöntemle kitozanı kullanmışlardır⁽⁵⁶⁾. Çalışmada birinci basamakta fenollerın serbest tirosinaz ile oksidasyonu, ikinci basamakta ise oksidasyon ürünlerinin kitozana absorbe edilerek ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ayrıca tirosinazın onisol ve benzil alkol gibi fenolik olmayan bileşiklere karşı reaktif olmadığı, özgül olarak fenolik birleşiklerle tepkimeye girdiği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak kitozanın sadece tirosinazın oksidasyon ürünlerini absorbe ettiği, tepkimeye girmeyen fenolik birleşikler ile fenolik olmayan birleşikleri absorbe etmediği bildirilmiştir.

1.6. Kültür Mantarının Tanımı

1.6.1. Morfolojisi

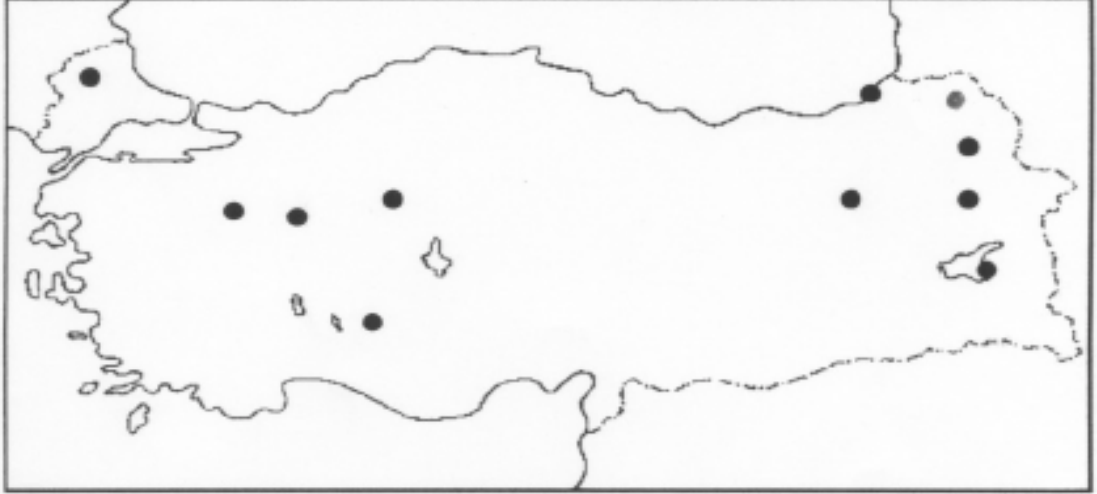
Agaricus bitorquis'in morfolojisi incelendiğinde, toprak altında yer alan ve vejetatif organları olarak bilinen miseller ile toprak üstünde yer alan sap ve şapkanın meydana getirdiği karpofordan oluştuğu görülür. Karpofor insanlar tarafından sebze olarak tüketilir. Şapka genellikle açık renkli, beyaz, krem veya açık kahverengidir. Sap üzerinde iki sıralı annulus bulunmaktadır. (Şekil 1.2)⁽⁵⁷⁻⁶⁵⁾.



Şekil 1.2. *Agaricus bitorquis* fruktifikasyonu

1.6.2. Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de doğal olarak yetişen *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. Eskişehir (Çiftler- Sadıroğlu Köyü), Konya, Bursa (Yenişehir), Van, Erzurum, Ağrı, Kars, Artvin (Ardanuç), Ankara (Polatlı-Aşağı Hacıosmanoğlu Köyü)'da yayılış göstermektedir. (Şekil1.3) ⁽⁶⁶⁻⁷⁷⁾.



Şekil 1.3. *Agaricus bitorquis*'in Türkiye'deki yayılış alanları

Ülkemizde halk arasında göbelek olarak tanınan *A.bitorquis*, ormanlık alanlarda, çayirlarda, meraya dönüştürülen eski bataklıklarda, bitki örtüsünün tahrip olduğu yerlerde gruplar halinde görülmektedir. Fruktifikasyonlar toprak altında gelişmekte, yağışlardan hemen sonra ortaya çıkmaktadır. (Şekil 1.4)

(67)



Şekil 1.4. Toprak altında yetişen *Agaricus bitorquis* fruktifikasyonları

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Organizma

Çalışmada, *Basidiomycetes* sınıfından *Agaricus bitorquis* (Quel) fruktifikasyonları ve sıvı besiyerinde üretilen miselleri kullanıldı. Fruktifikasyonlar, Ankara Polatlı İlçesi, Aşağı Hacıosmanoğlu Köyünden 2004 yılında Haziran ayında toplandı. Laboratuvara getirilen mantarların, yüzey dezenfeksiyonları yapıldı, sporları alındı ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere buzdolabında +4°C'de saklandı. *Agaricus bitorquis*'in toplandığı arazi sazlık bir alan olup, toprak süngerimsi bir yapıdadır. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. *Agaricus bitorquis*'in toplandığı Aşağı Hacıosmanoğlu Köyü
(Ankara- Polatlı)

2.2. Spor Alınması

Araziden toplanan örneklerin, ilgili literatürlere göre^(61,63,65) tür tayinleri yapıldı. Laboratuvara getirilen örneklerin şapkalarının üzerindeki topraklar temizlenip, saplar 1cm kalacak şekilde kesildi. Üzerleri %70' lik alkol ile silindi ve hızlı bir şekilde alevden geçirildi. Dezenfekte edilen mantarlar lameller aşağı gelecek şekilde temiz bir petri kabına yerleştirildi. Üzerleri cam fanus ile kapatıldı. Steril aşılama kabinde, oda sıcaklığında 2-3 gün bırakıldı. Şapkaların kendiliğinden açılması ve sporların dökülmesi sağlandı (Şekil 2.2) Alınan sporlar ayrı ayrı petri kaplarında bulunan steril katı besiyeri merkezine çoklu spor yöntemi ile inoküle edilerek çimlendirildi⁽⁷⁸⁾.



Şekil. 2.2. *Agaricus bitorquis*' in spor izi

2.3. Besiyeri Hazırlığı

2.3.1. Katı Besiyeri Hazırlığı

Çalışmada besiyeri olarak Malt Ekstrakt Agar (MEA)(Merck) kullanıldı⁽⁷⁹⁾. MEA 33.6 (gr/lt) malt ekstrakt olarak hazırlandı. Hazırlanan besiyeri otoklavda (Nüve Marka) 121°C'de 15 dakika steril edildi. Steril aşılama kabiniinde (Holten Marka), pastör fırınında (Nüve Marka) 190°C'de 90 dakika bekletilerek sterilizasyonu sağlanan petrilere döküldü ve soğumaya bırakıldı.

2.3.2. Sıvı Besiyeri Hazırlığı

Agaricus bitorquis misellerinde enzim varlığını araştırmak ve optimize etmek amacıyla Vogel minimal besiyeri kullanıldı⁽¹³⁾. Vogel minimal besiyeri 2ml makroelement [(gr/100 ml) 15 Na-sitrat(Sigma), 25 KH₂PO₄,1.0(Merck) MgSO₄.7H₂O(Fluka), 0.5 CaCl₂.2H₂O)(Sigma)]; 1 ml mikroelement [(gr/100 ml) 2.5 sitrik asit.1H₂O(Sigma), 2.5 ZnSO₄.7H₂O(Riedel-de Haen Ag), 0.5 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O(Sigma),0.125CuSO₄.5H₂O(Sigma),0.025MnSO₄.H₂O(Merck), 0.025 H₃BO₃(Merck), 0.025 H₃P(MO₃O₁₀). H₂O)(Sigma)] ve 97 ml. distile su ilave edilerek hazırlandı.

2.4. Ana Kültür Hazırlığı

Bölüm 2.2'de anlatıldığı gibi çimlendirilen sporlardan geliştirilen primer misellerden alınan 8 mm çapındaki miselyal agar diskleri, içlerinde MEA bulunan petrilere merkezine inokule edildi ve 30±1°C' de 20 gün süre ile

inkübe edildi. Sağlıklı gelişerek petrinin $\frac{3}{4}$ ' ünü kaplayan, ışınal doğrultuda gelişen primer misellerden alınan 8 mm çapındaki miselyal agar diskleri yine 90 mm çapındaki petrilere bulunan MEA besiyeri merkezine inoküle edilerek 30 ± 1 °C' de 20 gün süre ile inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda elde edilen sekonder miseller çalışmanın ana kültürlerini oluşturdu.

2.5. Sıvı Besiyerine Misel Transferi

Bölüm 2.3.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 100 ml'lik sıvı besiyerleri 250 ml'lik erlenmayerlere konuldu. Sekonder misel ana kültürlerinden alınan 8 mm çapındaki miselyal agar diskleri sıvı besiyerlerine 5, 10, 15, 20 adet eklenerek 30 ± 1 °C' de 140 rpm de çalkalamalı etüvde (Sellecta Marka) 10 gün süreyle inkübe edildi.

2.6. Tirosinaz Aktivitesinin Ölçümü

Tirosinaz aktivitesi hem sıvı besiyerinde üretilen misellerle, hem de kültür mantarı yetiştiricilik tekniklerinin uygulandığı yetiştirme odalarında yetiştirilen fruktifikasyonlarda ölçüldü. Sıvı besiyerinde üretilen misellerde tirosinaz aktivitesini ölçmek için substrat olarak L-DOPA (Sigma) kullanıldı. Katı halde bulunan L-DOPA fosfat tamponu (pH=7.0) ile süspanse edildi. Bölüm 2.3.2' de anlatıldığı gibi hazırlanan sıvı kültürlerdeki enzim kaynaklarından 0,1ml alınarak 3ml L-DOPA ile ayrı ayrı olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 475 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Sellecta Marka) olarak okundu.

Çalışmamızda; ortam sıcaklığı 30-32°C olan üretim odalarında yetiştirilen fruktifikasyonlardan alınan 50 gr'lık parçalar, 10 ml fosfat tamponu (pH=6.0) bulunan havanlarda ezildi ve elde edilen süspansiyonlar santrifüjde (Nüve Marka) 4100 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi ve aktivite ölçümü için kullanılacak süpernatantlar elde edildi.

Bir ünit enzim aktivitesi deney koşullarında 1 dakikada absorbans miktarında 0,001 artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.7. Hücre Dışı Protein Miktarının Ölçümü

Sıvı besiyerindeki misellerin hücre dışı protein miktarı Lowry yöntemi ile ölçüldü⁽⁸⁰⁾.

2.8. Enzim Üretimine Etki Eden Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

2.8.1. Pelet Sayısının Etkisi

Tirosinaz üretimine pelet sayısının etkisini belirlemek için Bölüm 2.3.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan besiyerlerine 8 mm çapındaki miselyal agar disklerinden 5,10,15 ve 20 adet pelet ayrı ayrı inoküle edildi ve 30°C' de 140 rpm' de 10 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Çalışmada deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

2.8.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Çalışmamızda, inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için tirozinaz aktivitesinin maksimum düzeye ulaştığı belirlenen 20 adet miselyal agar diskleri kullanıldı. Çalkalamalı etüvde 30°C' de 140 rpm' de inkübe edilen kültürlerde misellerin tirozinaz aktivitesi spektrofotometrede(Sellecta Marka) 475 nm' de ölçüldü. İlk ölçümler misellerin gelişmeye başladığı ilk gün olan 6. günde yapıldı ve ölçümler iki gün arayla sürdürüldü. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

2.8.3. Glikoz Miktarının Etkisi

Tirosinaz verimi açısından karbon kaynağı olarak seçilen glikozun, etkisini belirlemek için farklı miktarlarda (gr/100ml) 0,1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20) glikoz içeren besiyerleri hazırlandı. 20 adet miselyal agar diskleri inoküle edilen sıvı besiyerleri, 30°C' de 140 rpm' de 10 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

2.8.4. pH'ın Etkisi

pH' ın tirozinaz aktivitesine etkisini incelemek için pH değerleri 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 olan sıvı besiyerleri hazırlandı ve 20 adet miselyal agar diskleri inoküle edildi. 30°C' de 140 rpm' de on gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

2.8.5. Sıcaklığın Etkisi

Çalışmamızda sıcaklığın etkisi hem sıvı besiyerinde geliştirilen misellerde, hem de kültür odalarında yetiştirilen fruktifikasyonlarda araştırıldı.

Sıvı besiyeri çalışmalarında 20 adet miselyal agar diskleri inoküle edilerek çalkalamalı etüvde 30°C, 32°C, 34°C ve 36°C'de 140 rpm' de 10 gün süre ile inkübe edildi.

Fruktifikasyon çalışmalarında birçok araştırmada *Agaricus bitorquis* miselleri için optimum sıcaklık olarak belirtilen 30°C kontrol olarak alındı⁽⁸¹⁾. Sıcaklığın fruktifikasyonlardaki tirozinaz aktivitesine etkisini araştırmak için; ana kültürlerde geliştirilen misellerden tohumluk misel hazırlandı⁽⁶⁰⁾ ve kültür mantarı yetiştiricilik teknikleri uygulandı⁽⁸²⁾. Buna göre tohumluk miseller tabakalı ekim yöntemine göre yetiştirme odalarındaki kompostlara aşılandı. Bunun için 5 gr tohumluk misel kültürü ve içlerinde 1kg kompost bulunan naylon torbalar kullanıldı. Naylon torbalara 350 gr kompost konuldu ve üzerine 2 gr misel serpildi, üzerine tekrar 350 gr kompost konuldu ve 2 gr misel serpildi. Son aşamada kompostun geri kalan 300gr' lık kısmı torbalara konuldu ve kalan 1 gr misel yüzeye dağıtıldı. Bu şekilde 10 torba hazırlandı ve 30°C' de %90 nem içeren ortamda inkübe edildi.



Şekil 2.3. Tohumluk misel aşılansmış ve ağızları kapatılmış kompost torbaları

Kompostlarda misel gelişimi tamamlandıktan sonra torba üstleri, dezenfekte edilmiş örtü toprakları ile örtüldü. Bunun için torba kenarları dışa doğru kıvrıldı. Kompost yüzeyi düzleştirilerek sıkıştırıldı ve üzeri 3-3.5 cm kalınlığında örtü toprağı ile örtüldü.



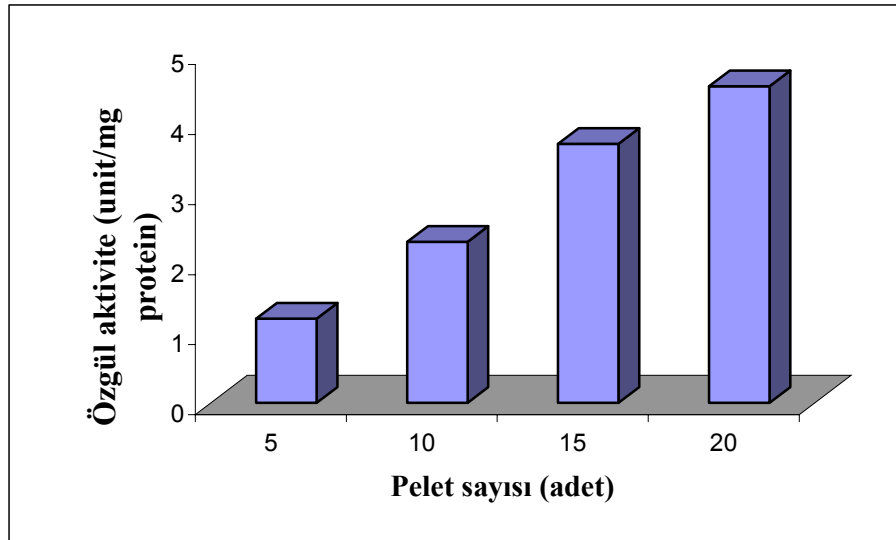
Şekil. 2. 4. Örtü toprağı uygulaması yapılmış kompost torbaları

Örtü toprağında misel gelişimi tamamlandıktan sonra hasat olgunluğuna erişen 3-5 cm şapka genişliğindeki karpoforlar hasat edildi. Çalışmada fruktifikasyonlar, ortam sıcaklıkları 30°C, 32°C, 34°C olan üretim odalarında ayrı ayrı geliştirildi. Elde edilen fruktifikasyonlarda tirozinaz aktivitesi ölçüldü. 34°C'de fruktifikasyon oluşmadığı için aktivite ölçülemedi ve bu sıcaklık, mantar için termal letal nokta olarak belirlendi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1.Pelet Sayısının Etkisi

A.bitorquis' in maksimum tirozinaz aktivitesi oluşturduğu pelet sayısının saptanması Bölüm 2.8.1.'de anlatıldığı Şekilde yapıldı.Çalışma sonunda maksimum verimin 20 miselyal agar disk, minimum verimin ise 5 miselyal agar disk içeren besiyerlerinde olduğu saptandı. Misellerin oluşturduğu enzim aktiviteleri Şekil 3.1'de , enzim aktivitesine ait istatistiksel veriler ise Çizelge 3.1' de verilmiştir.



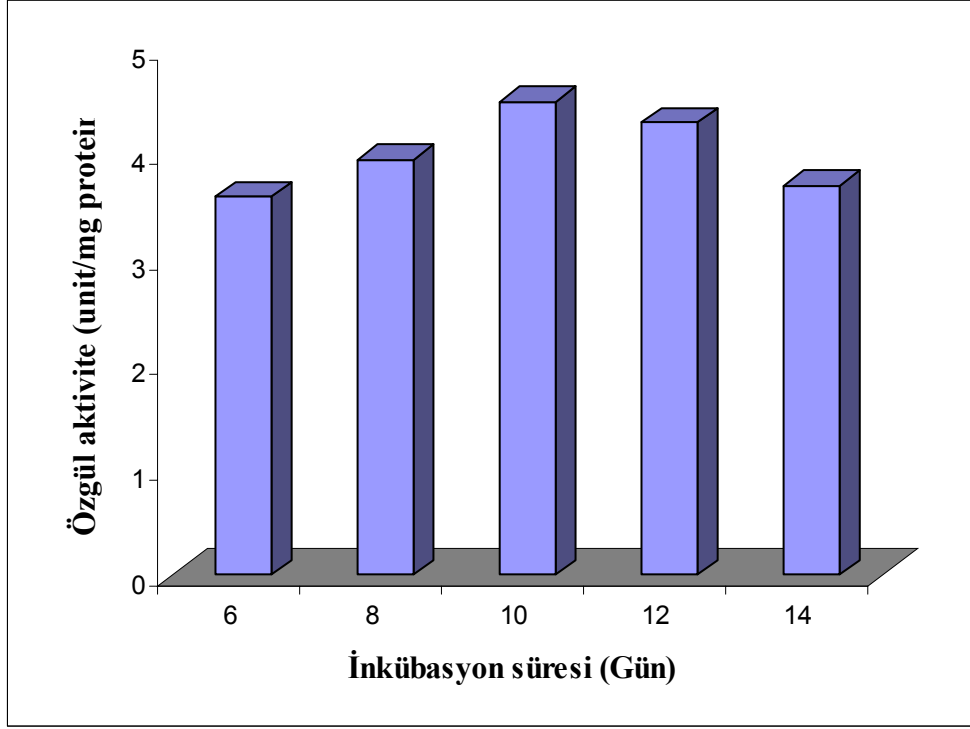
Şekil 3.1. Pelet sayısının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.1. Pelet sayısının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

Pelet Sayısı (adet)	Ortalama ve Standart Hata
5	1.2 ± 1.22
10	2.3 ± 0.44
15	3.7 ± 0.54
20	4.52 ± 1.12

3.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi

A.bitorquis misellerinin maksimum tirozinaz aktivitesine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi Bölüm 2.8.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. En yüksek özgül aktivitenin inokülasyonun 10. gününde olduğu tespit edildi. Misellerin oluşturduğu enzimlerin inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri aktiviteler Şekil 3.2' de, enzim aktivitesine ait istatistiksel veriler ise Çizelge 3.2' de verilmiştir.



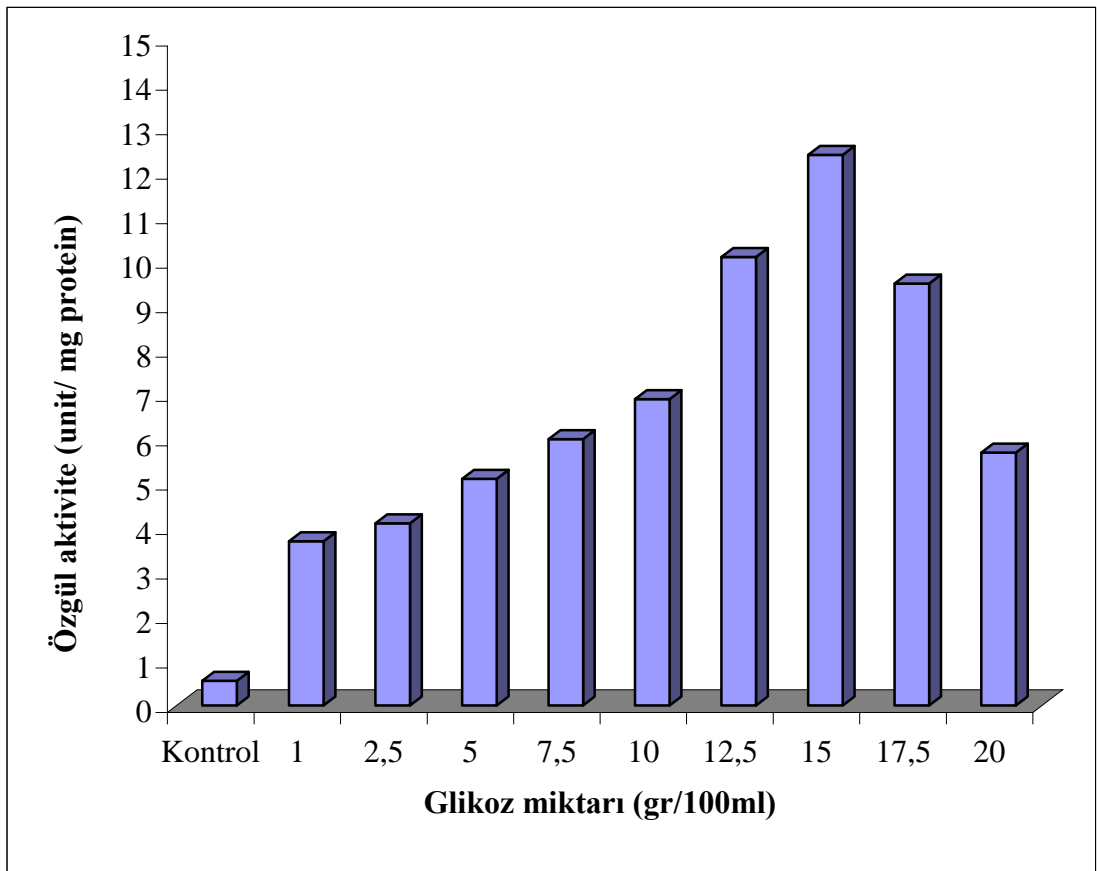
Şekil 3.2. İnkübasyon süresinin tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.2. İnkübasyon süresinin tirozinaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi(ort:ortalama,sh:standart hata)

Süre (gün)	Orta. ve Sh.
6	3.60 ± 0.32
8	3.95 ± 0.07
10	4.5 ± 0.31
12	4.30 ± 0.17
14	3.70 ± 0.25

3.3.Glikoz Miktarının Etkisi

A.bitorquis' in tirosinaz aktivitesine glikoz miktarının etkisi Bölüm 2.8.3.'de anlatıldığı şekilde çalışıldı.Ölçümler sonucunda maksimum enzim aktivitesinin 15 gr glikoz eklenen kültürde, minumum enzim aktivitesinin ise glikoz eklenmeyen kontrol grubunda oluştuğu gözlemlendi. Misellerin oluşturduğu enzim aktiviteleri Şekil 3.3' de, enzim aktivitesine ait istatistiksel veriler ise Çizelge 3.3' de verilmiştir.



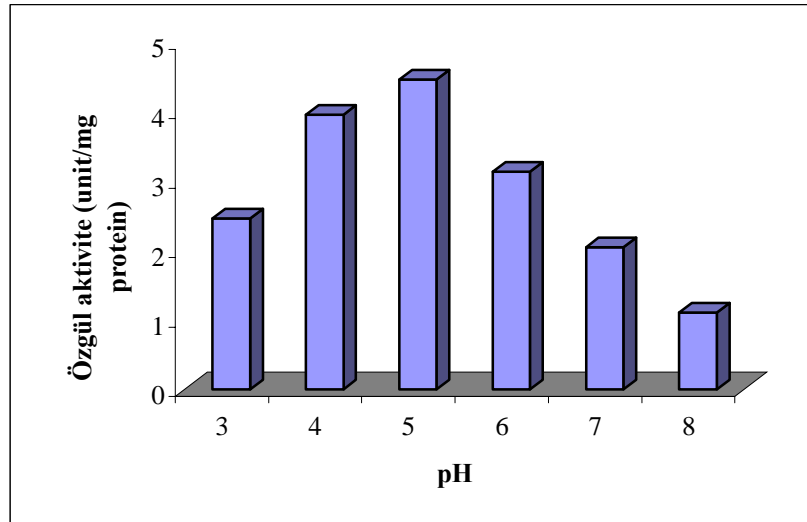
Şekil 3.3. Glikoz miktarının tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.3. Glikoz miktarının tirozinaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

Glikoz Konsantrasyonu(gr)	kontrol	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Ortalama ve Standart Hata	0.56±4.15	3.70±1.93	4.46±1.40	5.1±0.94	6±0.31	6.9±0.32	10.1±2.58	12.4±4.21	9.5±2.16	5.7±0.52

3.4. pH' in Etkisi

A.bitorquis misellerinin enzim aktivitesine pH' in etkisinin belirlenmesi çalışmaları Bölüm 2.8.4.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Maksimum enzim özgül aktivite pH5.0 olan kültürlerde belirlendi. Farklı pH değerlerinde elde edilen tirozinaz aktivitesi değerleri Şekil 3.4' de, enzim aktivitesine ait istatistiksel veriler ise Çizelge 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4. pH'ın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

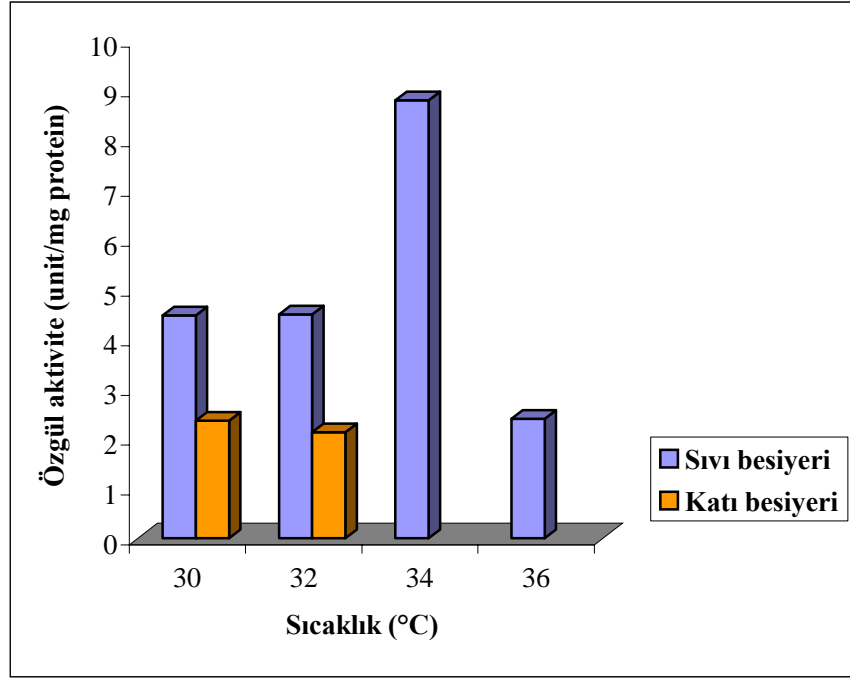
Çizelge 3.4 pH' ın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

pH	Ortalama ve Standart Hata
3	2.46 ± 0.37
4	4.46 ± 0.67
5	3.95 ± 1.03
6	3.15 ± 1.1
7	2.04 ± 0.67
8	1.9 ± 0.77

3.5. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın *A. bitorquis*' in tirozinaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar Bölüm 2.8.5.'de anlatıldığı şekilde yapıldı. En yüksek özgül aktivitenin 34°C' de olduğu belirlenirken, en düşük özgül aktiviteyi ise 36°C' de üretilen misellerin oluşturduğu gözlemlendi.

Fruktifikasyonların kullanıldığı sıcaklık denemelerinde ise en yüksek özgül aktivitenin 30°C' de üretilen mantarlarda , en düşük özgül aktivitenin ise 32°C' de üretilen mantarlarda olduğu belirlendi. Ortam sıcaklığı 34°C olan kültür odalarında fruktifikasyonların gelişmediği gözlemlendi. Fruktifikasyon gelişimi için 34°C, termal letal nokta olarak belirlendi. Sıcaklık denemeleri sonunda elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 3.5' de, enzim aktivitelerine ait istatistiksel veriler ise Çizelge 3.5' de verilmiştir.



Şekil 3.5. Sıcaklığın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.5. Sıcaklığın tirozinaz aktivitesine etkisinin istatistiksel analizi

Sıcaklık (°C)	Sıvı besiyeri	Fruktifikasyon
30	4.48 ± 0.39	2.36 ± 0.081
32	4.50 ± 0.38	2.13 ± 0.081
34	8.80 ± 2.65	-
36	2.40 ± 1.87	-

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada, *Agaricus bitorquis* (Quel)' den tirozinaz enziminin elde edilmesi ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Sıvı besiyeri çalışmalarında mantar miselleri kullanılarak enzimin özgül aktivitesi üzerine pelet sayısı, inkübasyon süresi, glikoz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir. Fruktifikasyon çalışmalarında da mantarın içerdii enzimin özgül aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda enzimin özgül aktivitesine etkileri incelenen faktörlere ait deneylerde, maksimum sonuç veren değerler bir sonraki deneylerde kullanılmıştır.

Sıvı besiyeri çalışmalarında birinci faktör olarak pelet sayısının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada 5, 10, 15 ve 20 adet miselyal agar diskleri sıvı besiyerine ayrı ayrı inoküle edilmiş ve 30°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası sıvı besiyerlerinde oluşan enzim aktiviteleri sırasıyla 1.24, 2.34, 3.74 ve 4.52 (Unit/mg protein) olarak tespit edilmiştir. Ölçümler sonrası yapılan incelemede en yüksek enzim aktivitesinin 20 adet pelet eklenen sıvı besiyerinde oluştuğu gözlenmiştir. Pelet sayısının artmasıyla birlikte enzim aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir.

İkinci faktör olarak; enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi incelenmiştir. Sıvı besiyeri bulunan erlenmayerlere 20 adet miselyal agar disk inoküle edilerek 30' °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 6. gününde misel gelişiminin başladığı gözlenerek enzim aktivitesi ölçülmeye başlanmıştır. İkişer gün arayla yapılan enzim aktivite ölçümlerinde maksimum değerin inkübasyonun 10. gününde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada üçüncü faktör olarak, glikoz konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir 0 gr,1 gr, 2.5 gr, 5 gr, 7.5 gr, 10 gr, 12.5 gr, 15 gr, 17.5 gr, 20 gr glikoz eklenen sıvı besiyerlerine 20 adet miselyal disk inoküle edilmiş ve 30°C' de 10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda en yüksek enzim aktivitesinin 15 gr glikoz eklenen besiyerlerinde olduğu belirlenmiştir. Çiçek⁽¹³⁾ çürükçül funguslar ile yaptığı araştırmada tirozinazın en yüksek aktivitesinin 15 gr glikoz içeren örnekte olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla elde ettiğimiz veriler Çiçek'in çalışmasıyla uyum içerisindedir.

pH' in enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde pH' ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 olarak hazırlanan sıvı besiyerlerine 20 adet miselyal agar disk inoküle edilmiş ve 10 gün süreyle 30°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda maksimum aktivite pH 5.0 olan sıvı besiyerinde tespit edilmiştir. İketaha ve arkadaşları⁽⁸³⁾ L-tirozini substrat olarak kullandıkları çalışmalarında enzim aktivitesinin pH5.0-8.0 aralığında maksimum olduğunu bildirmişlerdir. Espin ve arkadaşları⁽⁸⁴⁾, p-hidroksifenil propionic acidi substrat olarak kullandıkları çalışmada en yüksek enzim aktivitesinin pH4.3' de görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar substrat

olarak L-DOPA' yı kullandıkları bir başka çalışmada⁽⁸⁵⁾ optimum enzim aktivitesinin pH5.0' de bulunduğunu bildirmişlerdir. Çiçek ⁽¹³⁾ yaptığı araştırmada L-DOPA'yı substrat olarak kullanmış ve maksimum enzim aktivitesinin pH4.7' de olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Kwang-Hoon Kong ve arkadaşları ⁽⁸⁶⁾ termofilik bir bakteri olan *Thermomicrobium roseum* ile yaptıkları çalışmada enzimin çalışmasını pH4.0-10.5 aralığında incelemişlerdir. Sonuçlar enzim aktivitesinin %50' sinin pH7.5' un altında ve pH10.5' in üstünde oluştuğunu, pH9.5' da maksimum sonuç verdiğini, en düşük değerin ise pH9.0-9.5 aralığında oluştuğunu ve bu sonuçların *Neuspora crassa* ile uyum gösterdiğini bildirmişlerdir. Xiaodong Zhang ve arkadaşlarının ⁽¹²⁾ *Portabella* mantarı ile yapmış oldukları çalışmada pH 3.5-7.5 arasındaki değerlerde enzimin özgül aktivitesinin diğer pH değerlerinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar enzimin pH7.0' de maksimum aktivite gösterdiğini, pH 7.5' un üstünde aktivitenin olmadığını ve pH 3.5' un altında aktivitenin hızlı bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgular İketaha ve arkadaşlarının⁽⁸³⁾ ve Espin ve arkadaşlarının ⁽⁸⁵⁾ L-DOPA ile yaptıkları çalışmalar ile ayrıca Xiaodong ve arkadaşlarının ⁽¹²⁾ yapmış oldukları çalışmadaki pH3.5 değerleriyle benzerlik içerisindeyken, Espin ve arkadaşlarının ⁽⁸⁴⁾ p-hidroksifenil propronik acidi kullandıkları çalışma, Çiçek'in ⁽¹³⁾ bulguları Kwang-Hoon Kong ve arkadaşlarının ⁽⁸⁶⁾ çalışmaları ile uyum göstermemektedir. pH ile ilgili çalışmalarda bildirilen tüm farklı değerlerin enzim kaynağının doğasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda bir başka faktör olarak enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi, hem sıvı besiyerinde, hem de fruktifikasyonlarda incelenmiştir. Sıvı besiyerine 20 adet miselyal pelet inoküle edilerek 30 °C , 32 °C, 34 °C ve 36°C' lerde ayrı ayrı 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda farklı sıcaklıklarda geliştirilen kültürlerde enzim aktiviteleri sırasıyla 30°C'de 4.48 , 32°C' de 4.50 , 34°C' de 8.80 ve 36°C'de 2.40 (Unit/ mg protein) olarak ölçülmüştür. En yüksek enzim aktivitesinin 34°C' de olduğu saptanmıştır. Çiçek ⁽¹³⁾ funguslarla yaptığı araştırmada en yüksek tirozinaz aktivitesinin 30°C olduğunu bildirmiştir. Elde ettiğimiz veriler Çiçek ⁽¹³⁾'in çalışmaları ile benzerlik göstermemektedir.

Sıcaklık ile ilgili yapılan fruktifikasyon çalışmalarında denemeler, Günay⁽⁶⁰⁾ 'ın *Agaricus bisporus* için belirttiği yetiştiricilik tekniklerine göre ve ortam ısısı 30°C ve 32°C olan kültür odalarında sürdürülmüştür. Elde edilen mantarlardan Bölüm 2.6' da anlatıldığı gibi süpernatant hazırlanarak enzim aktivasyonları oluşturulmuştur. En yüksek enzim aktivitesinin 30°C' de üretilen mantarlarda olduğu tespit edilmiştir. 34°C' de misel gelişimi gözlenirken, primordiumlar gözlenmediği için ölçüm yapılamamıştır ve bu sıcaklık noktası fruktifikasyonlar için termal letal nokta olarak belirlenmiştir.

L-DOPA' nın substrat olarak kullanıldığı enzimin özgül aktivite ölçümlerinde, ölçüm öncesi hazırlanan enzim kaynağı ve substratı içeren süspansiyonlarda kırmızıyla başlayan ve siyaha kadar değişim gösteren bir pigmentasyona rastlanmıştır. Wada ve arkadaşlarının⁽⁵⁴⁾ yaptıkları çalışmada enzime ait süspansiyonlarda pigmentasyon gözlenirken herhangi bir çökme görülmemiştir. Atlow ve arkadaşları,⁽³⁾ yapmış oldukları araştırmada ise

enzim süspansiyonlarında hem pigmentasyon olduğunu hem de gözle görülür bir çökmenin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren *Basidiomycetes* sınıfına ait *Agaricus bitorquis*’ den tirozinaz enziminin elde edilmesi ve enzimin karakterizasyonu incelenmiştir. Sonuçlarımız, hücre içi enzim olarak bilinen tirozinazın hem hücre içi, hem de hücre dışında faaliyet gösterdiğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. J. Karam and J. A. Nicell, Potential applications of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 69, 141-153, (1997).
2. J.A. Nicell, L. Al-Kassim, J.K. Bewtra and K.E. Taylor, Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation, *Biodeterioration Abstracts*, 7(1),1-8, (1993).
3. S. C. Atlow, L. Banadonna –Apora, and A. M. Klibanov, Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 599-603, (1984).
4. B. N. Alberti and A. M. Klibanov, *Biothechnol. Bioeng, Symp*, 11, 373 (1981).
5. A. M. Klibanov, B. N. Alberti, E. D. Morris and L. M. Felshin, Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters, *J. Appl. Biochem* ., 2, 414-421 , (1980).
6. A. M. Klibanov and E. D. Morris, Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water, *Enzyme Microb. Technol*, 3, 119, (1981).
7. A. M. Klibanov, T. M. Tu and K. P.Scott, Peroxidase catalysed removal phenols from coal conversion wastewater, *Science* , 221, 259-

261, (1983).

8. R. Boyer, Modern Experimental Biochemistry (3rd Ed). Benjamin Cummings , San Francisco, (2000).
9. J. C. Espin, J. H. Wichers, Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol, J. Agric Food Chem, 47, 3503-3508 , (1999).
10. J. H. Wichers, Y. A. M. Gerritsen and G. J. Chapelon, Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*, Phytochemistry , Vol. 43. No. 2 , pp., 333 –337, (1996).
11. W. H. Flurkey, Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing, Journal of Food Science, volume 56, no. 1, (1991)
12. X. Zhang, J. V. Leeuwen, H. J. Wichers, Flurkey. W. H, Characterization of tyrosinase from the cap flesh of *Portabella* mushrooms J. Agric Food Chem, 47, 374-378, (1999).
13. H. Çiçek, Beyaz-çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin taranması ve optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, (2000).
14. R. Kinoshita, R. Shikata, On toxic moldy rice In Mycotoxins in Foodstuffs; Wogan, G. N. , Ed ; MIT Press: Cambridge, MA , pp, 111-132, (1964).
15. F. N. Parrish, B. J. Wiley, E. G. Simmons, L. Long, Jr. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*, Appl. Microbiol., 14, 139, (1966).
16. J. C. Espin, R. Varon, J. Tudela and F. G. Canovas, Kinetic study of the oxidation of 4- hydroxyanisole catalyzed by tyrosinase, Biochemistry and Molecular Biology International, pages 1265-1276, (1997).

17. J. R. Ros, J. N. R. Lopez and F. G. Canovas, Tyrosinase: kinetic analysis of transient phase and the steady state, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1204, 33-42, (1994).
18. A. F. Olah and W. C. Mueller, Ultrastructural localization of oxidative and peroxidative activities in a carrot suspension cell culture, *Protoplasma* , 106, 231-248, (1981).
- 19 K. C. Vaughn and S. O. Duke, Tissue localization of polyphenol oxidase in sorghum, *Protoplasma*, 108, 319-327, (1981).
20. K.C.Vaughn, Polyphenol oxidase. In: *Handbook of plant cytochemistry*, K. C. Vaughn, ed., CRC Press, Boca Raton, vol. 1, 159-162, (1987).
21. A. Okamoto, H. Imagawa, Y. Arai and T.Ozawa, Partial Purification and Some Properties of Polyphenoloxidases from Sago Palm, *Agric. Biol. Chem.*, 52 (9) 2215-2222, (1988).
22. Y. Z. Gunata, J. C. Sapis and M. Moutounet, Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of Grape phenol oxidases, *Phytochemistry.*, vol .26, No. 6, pp. 1573 –1575, (1987).
23. A. H. J. Klapp, F. C. Richard, P. M. Goupy and J. J. Nicolas, Inhibition studies on Apple polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem .*, 38, 926 –931, (1990).
24. Y.Oda, H. Kato, Y. Isado, N. T. Hashi , T. Yamamoto, Y. Takada and S. Kudo, Purification and properties of phenol oxidase from Spinach leaves, *Agric. Biol. Chem.*, 53 (8), 2053- 2061, (1989).
25. M. Higuchi, Y. Miura, J. Boohene, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, I. Yoshimura and Y. Yamada, Inhibition of tyrosinase activity by cultured Lichen tissues and bionts, Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Kyoto 606, Japan, (1992)

26. M. Sugumaran, Molecular mechanism for cuticular sclerotization, *Adv. Insect Physiol.*, 21 (9), 179-231, (1988).
27. J. S. Chen , C. Wei, R. S. Rolle, W. S. Otwell, M. O. Balaban and M. R. Marshall , Inhibitor effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases, *J. Agric. Food Chem .*, 39 , 1396-1401, (1991).
28. C. J. Witkop, Inherited disorders of pigmentation. In: *Genodermatoses: Clinics in dermatology* , R.M. Goodman , ed , J.M. Lippincott, Philadelphia, vol. 2, 70-134, (1985).
29. J. Frasen tyrosinase concentration and specific activity in five wild mushroom species of central Minnesota: A Biochemical Analysis Athesis Saint John 's University, April, (2000).
30. C. F. Schobein, *Phil. Mag.*, 11, 137-139, (1856).
31. H. Yoshida, Chemistry of lacquer (Urushi). Part I, *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486, (1886).
32. G. Bertrand, Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxydant, d'origine vegetale, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 122-1215, (1896).
33. L. A. Appwhite, W. S. Otwell, M. R. Marshall, Kojic acid-A bisulfite alternative ? Presented at the Second Joint conference of the Tropical and Subtropical Fisheries Technology and Atlantic Fisheries Technology Societies , Dec 2-5, (1990).
34. R. Saruno, F. Kato, T. Ikeno, Kojic acid , a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus* , *albus* , *Agric. Biol. Chem*, 43, 1337-.1339, (1979).
35. V. Kahn and A. Andrawis, Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolene, *Phytochemistry.*, 24: 905-908, (1985).

36. C.J.G.Canovas , F. Tudela , J, Lazono , J. A. G. Carmona, F,L-Mimosine , a slow binding inhibitor of mushroom tyrosinase, *Phytochemistry.*, 26:917-919, (1987).
37. T. O. Sherman, K. C. Vaughn and S.O. Duke, A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase, *Phytochemistry.*, 30, 2499-2506, (1991).
38. H. S. Mason, Oxidases, *Ann; Rev. Biochem*, 34, 595-634, (1965).
39. J.R.Whitaker, Polyphenol oxidase. In: *Food enzymes: Structure and mechanism*, Dominic W. Swong, ed, Chapman and Hall., New York, 271-307, (1995).
40. J. M. Nelson and C. R. Dawson, Tyrosinase, *Adv. Enzymol*, 4, 99-152 ,(1944).
41. L. L. Ingraham, Polyphenol oxidase at low pH values. In: *Pigment cell biology*, M.Gordon, ed, Academic Pres., New York, 609-617, (1959).
42. D. W. Brooks and C. R. Dawson , *Aspects of tyrosinase Chemistry*. In : *The Biochemistry of copper* , J. Peisach, P. Aisen and W.E. Blumberg, eds, Academic Pres., New York, 343-357, (1966).
43. B. J. B. Wood and L. L. Ingraham, Labelled tyrosinase from labelled substrate, *Nature*, 205, 291-292, (1965).
44. C. Dietler and K. Lerch , Reaction inactivation of tyrosinase, In: *Oxidases and related redox systems*, T. E. King, H.S, Mason and M.Morrison,eds, Pergamon Pres., New York, 305-317, (1982).
45. G. A.Goldhirsh and J.R.Whitaker, kcat inactivation of mushroom polyphenol oxidase , *J, Mol. Catal.*, 32,141-147, (1984).

46. J. Zawistowski, C. G. Biliaderis and N. A. M. Eskin, Phenol oxidase. In: Oxidative enzymes in foods, D. S. Robinson and N. A. M. Eskin, eds, Elsevier Applied Science., London and New York, 217-273, (1991).
47. J. Zawistowski, G. Blank and E. D. Murray, Polyphenol oxidase activity in Jerusalem artichokes (*Helianthus tuberosus* L.). Can Inst. Food Sci. Technol . J., 19, 210-214, (1986).
48. G. Matheis and H. D. Belitz, Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen-oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). II. Partial characterization of the enzyme forms with different molecular weights, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 163, 279-282, (1977).
49. J. Zawistowski, C. G. Biliaderis and E. D. Murray, Purification and characterization of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) polyphenol oxidase, J. Food Biochem., 12, 1-22, (1988 A).
50. N. A. M. Eskin, Biochemistry of foods, Academic, Press., New York (1990).
51. A. M. Mayer and E. Harel, Review: Polyphenol oxidases in plants, Phytochemistry., 18, 193-215, (1979).
52. L. V. Vigyazo, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables CRC Critic Rev. Food Sci. Nutr., 15, 49-127, (1981).
53. P. J. Hilton and R. T. Ellis, Estimation of the market value of central African tea by theaflavins analysis, J. Sci. Food Agric., 23, 227-232, (1972).
54. S. Wada, H. Ichikawa and K. Tatsumi, Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase, Biotechnology and Bioengineering., 42, 854-858, (1993).
55. S. Wada, H. Ichikawa and K. Tatsumi, Removal of phenols with tyrosinase

immobilized on magnetite , Water Science and Technology., 26 (9-11), 2057-2059, (1992).

56. W. Q. Sun and G. F. Payne, M. Moas, J. H. Chu and K. K. Wallace, Tyrosinase reaction, chitosan adsorption for removing phenols from wastewater, Biotechnology Progress., 8, 179-186, (1992).
57. G. Pacioni, Guide to Mushrooms, 511 p, Published by Simon & Schuster, Roskefeller Center, New York, (1981).
58. T. J. Elliott , The general biology of the mushroom , The Biology Technology of Cultivated Mushroom. Chapter, 2 , 9-22, (1985 a).
59. K. Boztok , Mantar Üretim Tekniği, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 489, 212 S., Bornova-İzmir, (1989).
60. A. Günay , Mantar yetiştiriciliği , İlke Kitabevi Yayınları , No:22, 469s, Ankara ,(1995)
61. D .Arora , Mushrooms Demystified, 959 p, Berkeley, California, (1989).
62. M. J. Carlile and S. C. Watkinson , The Fungi, Academic Pres, 482p, London, (1996).
63. A. R. Bessette , A. E. Bessette, D. W. Fischer , Mushrooms of Northeastern North America, 582 p, Syracuse University Pres, Syracuse, New York, (1997).
64. V. S. Evenson , Mushrooms of Colorado and the Southern Rocky Mountains, 207 p, Denver- Colorad, (1997).
65. H. G. Lincoff, N ational audubon society field guide to North American Mushrooms, 926, New York, (1997).
66. N. Öder , İç Ege ve Batı karadeniz bölgelerinin halkımızın tanıdığı bazı önemli yenen mantar türleri, Türkiye I. Yemeklik Mantar Kongresi, 49-59,

Ankara, (1976).

67. N. Öder, Halkın faydalandığı bazı önemli yenen mantarlar, TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi, 785-798, Kuşadası-Aydın, (1980).
68. K. Gezer , 1988, Eskişehir ili sınırları içinde yetişen bazı makrofunguslar üzerine taksonomik araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, (1988).
69. A. Afyon , *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc.'un kültürü üzerine araştırmalar, Selçuk Üniv. Eğitim Fak. Dergisi, 3, 295-307 (1989).
70. M. Yamaç , Bazı şapkalı mantarların kültürü. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, (1990).
71. M. H. Solak, F. Gücin, Bursa'nın yenen mantarları, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, Cilt 1, Yalova-İstanbul, (1992).
72. K. Demirel ve M. Işıloğlu, Ardanuç (Artvin) yöresi makrofungusları-I., Yüzüncü Yıl Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Fen Bilimleri Dergisi, Cilt: 4, Sayı: 4, 49-57, (1993).
73. F. Gücin, Makromantarlar, Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Aylık Popüler Bilim Dergisi, Cilt, 27, Sayı, 325, 74-78, (1994).
74. K. Demirel, Doğu Anadolu'da yetişen ve halkın tanıdığı bazı yenen mantarlar. Türkiye 5. Yemeklik Mantar Kongresi, 173-179, Yalova, (1996).
75. O. Arkan, P. Güler, *Agaricus bitorquis* (Quel.) Saccardo yetiştiriciliği, Türkiye 5. Yemeklik Mantar Kongresi, 166-172, Yalova, (1996).
76. G. Stojhev, A. Aslan, F. Gücin, Türkiye' nin Trakya bölgesinden bazı makrofungus türleri, Turkish Journal of Botany., cilt 22, sayı 5, 341-36, (1998).
77. P. Güler, Yabani bazı *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. çeşitlerinin

kültürel özellikleri ve ıslahı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, (1999).

78. G. Frische, Experiments on the maintenance of strains of cultivated mushroom. III. propagation by multispore culture, Mushroom News, 20, 8, 4-19, (1972).
79. E. G. Üregen, *Morchella conica* Pers. Vegetatif misel gelişiminde bazı karbonhidratların etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, (2004).
80. O. H. Lowry, Rosebrougy. N. J, Farr. A. L and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1951).
81. F. Zadrazil and K. Grabbe, Edible mushrooms, Biotechnology., vol. 3, 145-187, (1983).
82. İ. Erkel, Kültür mantarı yetiştiriciliği, 160 s, Kocaoluk Yayınevi, Yalova, (1993).
83. K.I ketaka, J. A. Nicell, Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, Bioresource Technology., 74, 191-199, (2000).
84. J. C. Espin, M. Morales, R. Varon, J. Tudela, F.G. Canovas, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Blanquilla pear, Phytochemistry., 44 (1), 17-22, (1997a).
85. J. C. Espin, M. F. Trujano, J. Tudela, F. G. Canovas, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado, J. Agric. Food Chem., 47 (4) 1091-1096, (1997b).
86. K. H. Kong, M. Y. Hong, S. S. Choi, Y. T. Kim and S.H . Cho , Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium*

roseum, Biotechnol.Appl. Biochem., 31, 113-118 (Printed in Great Britain),
(2000).

