

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**LACTARIUS PIPERATUS MANTARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SENTETİK
KİMYADA KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fulya ÖZ

**HAZİRAN 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**LACTARIUS PIPERATUS MANTARINDAN POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SENTETİK
KİMYADA KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Fulya ÖZ

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.05.2010
Tezin Savunma Tarihi : 17.06.2010**

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

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Lactarius piperatus* Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Biyokimya bilimini tanımamda ve bu alanda çalışmayı seçmemde büyük katkıları olan, yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK’a, tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardımlarını ve ilgisini benden esirgemeyen sevgili hocam Yrd.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya sonsuz şükranlarımı sunarım. Tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkısı olan Arş.Gör.Dr. Arzu ÖZEL’e, Öğr.Gör.Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na, Dr. Melike YILDIRIM’a, ve Biyokimya Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkürü ve minneti bir borç bilirim.

Çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmem için bana laboratuvarlarını kullanma imkanı verip, yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Ahmet Faik Ayaz ve Sayın Doç.Dr. Hüseyin Avni UYDU’ya, çalışma esnasında kullandığımız mantarların tanımlanmasında yardımcı olan Sayın Prof.Dr. Ertuğrul SESLİ’ye şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje No: 2007.111.002.7) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum. Hakkınızı ödeyemem, sizleri çok seviyorum. Sizlere sahip olduğum için çok şanslıyım.

Fulya ÖZ
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.2.1. <i>Lactarius piperatus</i> Makromantarının Morfolojik Özellikleri.....	4
1.3. Esmerleşme Reaksiyonları	5
1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri	7
1.5. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	10
1.6. Polifenol Oksidaz'ın Bazı Organizmalarda Bulunuşu	11
1.7. Çalışmanın Amacı	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	16
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	16
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar.....	17
2.1.3.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	17
2.1.3.2. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	18
2.1.3.3. Afinite Jelinin Sentezinde Kullanılan Tamponlar.....	19
2.1.3.4. Substrat Çözeltileri.....	19
2.1.3.5. Diğer Çözelti ve Tamponlar	20
2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme	21
2.3. Afinite Jelinin Sentezi	21

2.4.	Enzim Özüütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	23
2.5.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	23
2.6.	Protein Tayini	23
2.7.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroföresi	24
2.7.1.	Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama	25
2.8.	SDS Jel Elektroföresi	25
2.9.	Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar	26
2.9.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	26
2.9.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	26
2.9.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	27
2.9.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	27
2.9.5.	Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı	27
2.9.6.	Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı	27
2.9.7.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi	28
2.9.8.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	28
2.10.	Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkınlığının İncelenmesi	28
3.	BULGULAR	30
3.1.	Çalışılacak Mantar Türünün Belirlenmesi	30
3.2.	Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	30
3.3.	Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu	32
3.3.1.	Polifenol Oksidazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu	32
3.3.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu	33
3.3.2.1.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	33
3.3.2.2.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	34
3.3.2.3.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	35
3.3.2.4.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	36
3.3.2.5.	Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı	38
3.3.2.6.	Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı	38
3.3.2.7.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi	39
3.3.2.8.	Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	42
3.4.	Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkınlığının İncelenmesi	42
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45

5.	ÖNERİLER.....	52
6.	KAYNAKLAR	54
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, polifenol oksidaz (PFO), yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Lactarius piperatus* 'tan, Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak, afinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant halinde ortaya konuldu. Optimum PFO aktivitesi, katekol substratı kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı 7,0, optimum sıcaklığı ise, 20 °C olarak belirlendi. 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra *L. piperatus* PFO'sunun pH 3,0-9,0 aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Enzim, pH 3,0-9,0 aralığında, 4 °C'de 72 saat inkübe edildikten sonra, aktivitesini %60'ın üzerinde koruduğu tespit edildi. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 4 saatlik inkübasyondan sonra, 0-50 °C aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda, *L. piperatus* PFO'su için K_m ve V_{maks} değerleri, katekol substratı varlığında, sırasıyla 1 mM ve 25000 U/mg protein olarak belirlendi. PFO tarafından katalizlenen katekol oksidasyonu için elde edilen I_{50} değerlerine göre, askorbik asit ve sodyummetabisülfid başta olmak üzere askorbik asit, sodyum metabisülfid, sodyum azid ve benzoik asitin *L. piperatus* PFO'sunu inhibe ettiği gözlemlendi. Ayrıca bazı metal iyonlarının PFO aktivitesi üzerine farklı şekillerde etkilediği tespit edildi.

L. piperatus 'tan saflaştırılan PFO'nun, heptan, toluen ve diklorometan gibi organik çözücülerde, kateşin substratı kullanılması durumunda, etkili bir biyokatalizör olabileceği belirlendi.

Bütün elde edilen bulgular, *L. piperatus* 'ta bulunan difenolaz aktivitesinin, bitki polifenol oksidazlarıyla benzer özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lactarius piperatus*, Polifenol Oksidaz, Afinite Kromatografisi, Karakterizasyon, İnhibisyon

SUMMARY

Purification, Characterization of Polyphenol Oxidase from *Lactarius piperatus* and Investigation of its Catalytic Efficiency on Synthetic Chemistry

In this study, a polyphenol oxidase (PPO) was purified from a wild edible mushroom, *Lactarius piperatus*, by using a Sepharose-4-B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity column and characterized. The purified enzyme migrated as a single band on native- and SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and optimum temperature of the enzyme were found to be 7.0 and 20 °C, respectively, in the presence of catechol as a substrate. After 24 h of incubation at 4 °C, the *L. piperatus* PPO was extremely stable in the range of pH 3.0-9.0. The enzyme retained over 60% of its original activity in the range of pH 3.0-9.0 after 72 h incubation at 4 °C. When the thermal stability profile of the purified enzyme was analyzed, it was determined that the enzyme was highly stable in the range of 0-50 °C after 4 h incubation. The K_m and V_{max} values of *L. piperatus* PPO were calculated as 1 mM and 25000 U/mg protein, respectively, from the Lineweaver-Burk plot. According to I_{50} data, in the presence of some PPO inhibitors like sodium metabisulfite, ascorbic acid, sodium azide and benzoic acid, *L. piperatus* PPO was all inhibited, especially by sodium metabisulfite and ascorbic acid. In the experiments done with metal ions, it is established that the enzyme activity was very sensitive to metal ions.

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

All the verities support the presence of an active diphenolase in *L. piperatus* having similar properties to plant polyphenoloxidases.

Key Words: *Lactarius piperatus*, Polyphenol Oxidase, Affinity Chromatography, Characterization, Inhibition

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri.....	3
Şekil 2. <i>Lactarius piperatus</i> mantarının früktofikasyon organları	5
Şekil 3. Glukoz ve bir amino asit (RNH ₂) arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonunun ilk basamağı	6
Şekil.4. HMF'nin oluşumu ve amadori-yeniden düzenlemesi	6
Şekil 5. Enzimatik eşmerleşme mekanizması	8
Şekil 6. PFO'nun bakır mekezleri	8
Şekil 7. PFO tarafından katalizlenen reaksiyon için önerilen mekanizma.....	9
Şekil 8. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları	22
Şekil 9. Afinite kromatografisi ile <i>Lactarius piperatus</i> 'tan PFO'nun saflaştırılması	31
Şekil 10. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi	32
Şekil 11. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	33
Şekil 12. PFO aktivitesinin pH ile değişimi.....	34
Şekil 13. PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	35
Şekil 14. PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi	36
Şekil 15. Katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi.....	37
Şekil 16. Katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği	37
Şekil 17. <i>L. piperatus</i> PFO'sunun pH kararlılığı	38
Şekil 18. PFO'nun 4 saat sonunda ısıl kararlılık eğrisi	39
Şekil 19. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.....	40
Şekil 20. PFO'nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi	40
Şekil 21. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.....	41
Şekil 22. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.....	41
Şekil 23. Heptan varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği.....	43
Şekil 24. Toluene varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği.....	43
Şekil 25. Diklorometan varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği	44

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar	16
Tablo 2. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	17
Tablo 3. Doğal PAGE bileşenleri	24
Tablo 4. SDS-PAGE bileşenleri	26
Tablo 5. Çalışılacak mantarın belirlenmesinde kullanılan mantarların spesifik aktivite değerleri	30
Tablo 6. PFO'nun <i>L. piperatus</i> 'tan saflaştırılması	31
Tablo 7. <i>L. piperatus</i> 'tan saflaştırılan PFO'nun inhibitörlerine ait I_{50} değerleri	41
Tablo 8. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	42

SEMBOLLER DİZİNİ

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	: Etilendiamintetra asetik asit
EU	: Enzim Ünitesi
HMF	: Hidroksimetilfurfural
IUB	: Uluslar arası Biyokimya Derneği
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
mA	: Miliamper
MBTH	: 3-metil-2-benzotiyozolinon
mM	: Milimolar
PAGE	: Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
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

Bitkilerde ve memelilerde, esmerleşme veya kararına olarak bilinen en yaygın oksidasyon reaksiyonlarından biri, sarıdan kahverengi ve siyaha kadar değişebilen renk dönüşümleriyle sonuçlanan, fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonudur. Oluşan bu kinon bileşikleri canlılarda bulunan en reaktif ara ürünlerdir ve enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonlarıyla hızlı ve kolay bir şekilde polimerleşirler. Meydana gelen polimerleşme ile kinonların koyu renkli, suda az çözünen ve melanin olarak bilinen polimerik yapılara dönüşümleri sağlanmış olur. Oluşan bu melaninler antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterirken, sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına da yardımcı olurlar (Marshall vd., 2000).

Sağlıklı meyve ve sebze dokularında, Polifenol oksidaz (PFO) enzimlerinin substratları olan fenolik bileşiklerle teması, yok denecek kadar sınırlıdır. Bunun başlıca nedeni, enzim ve substratlarının bitkisel hücrenin farklı kısımlarında yer almalarıdır. Nitekim PFO enzimlerinin bir kısmı sitoplazmada serbest halde bulunurken, büyük bir kısmı hücrenin tilakoid ve kloroplast gibi unsurlarında, membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Buna karşın, fenolik bileşiklerin neredeyse tamamı vakuollerde yoğunlaşmış halde bulunmaktadır. Ancak doku olgunlaşmasının ileri aşamalarında hücredeki pektinazların faaliyetiyle, doku kontrollü ve sınırlı bir şekilde doğal olarak değişimlerle uğrar. Ayrıca, hasat, taşıma ve işleme sırasındaki etkiler veya uygulanan çeşitli işlemlerle hücre ve buna bağlı olarak doku bütünlüğü bozulmaktadır. Böylece, PFO enzimleri kendi substratları olan fenolik bileşiklerle ve havadaki oksijen ile bir araya gelmektedirler (Muchuweti vd., 2006).

Enzimatik esmerleşme genellikle fenol bileşiklerince zengin bitkilerde görülür. Özellikle meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşme sonucu önemli renk sorunları ortaya çıkar. Bitkilerde dokunun hastalıklı olması veya çeşitli işlemler sırasında zarar görmesi kolaylıkla esmerleşmeye neden olur. Bu durum elma, armut, kayısı şeftali, muz, patates ve mantar gibi çeşitli ürünler için söz konusu olabilir. Ancak limon ve turunçgiller kahverengiye dönüşmez, çünkü içerdikleri sitrik asit nedeniyle oksitlenme renksiz gerçekleşir (Aehle, 2004).

Besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi esnasında meydana gelen esmerleşme reaksiyonları ve bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan renk değişimleri çoğu kez istenilen seviyede durdurulamamaktadır. Bu da besinin ekonomik ve besinsel değerini kaybetmesine sebep olarak ciddi bir problem teşkil etmektedir (Whitaker ve Lee, 1995). Ancak enzimatik esmerleşme her zaman istenmeyen bir durum değildir. Şöyle ki, bazı enzimatik esmerleşme reaksiyonları, besin için çok yararlıdır. Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi enzimatik esmerleşmeye bağlıdır. Bu reaksiyonlar ayrıca, üzüm erik hurma ve incir gibi meyvelerin kurutulmasıyla, karakteristik renk ve lezzetlerini kazanmasında oldukça yardımcı olur (Ensminger vd., 1995).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının tümü bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin olgunluğuna göre değişim gösterir. Esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlıdır. Bitkilerde enzimatik esmerleşme, aktif PFO konsantrasyonuna, pH'ya, sıcaklığa ve dokularda mevcut bulunan oksijene bağlıdır. Bunlardan birinin ortamda bulunmaması veya optimum değerinden uzak olması reaksiyonu durdurabilir veya hızını azaltabilir (Pekyardımcı, 1992).

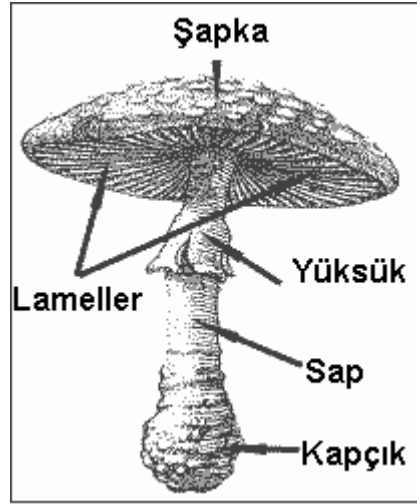
Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve istenen esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için en geçerli yöntem, bu reaksiyonları katatlizleyen enzimlerin ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin iyi bilinmesi gerekir. Bu durum gıda endüstrisinde, meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren uygun teknolojilerle, kişi başına düşen tüketimdeki artış, birçok ülke için ekonomik faydalar sağlayacaktır (Labuza, 1992).

1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

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 rüzgarla 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'ı sudan oluşur. Bu sebepten dolayı yaşam süresi kısadır ve hemen çürür (URL-1, 2010).

Şekil 1’de olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri görülmektedir. Mantarların toprak altı kısmını miseller, toprak üstü kısmını ise şapka ve sap oluşturur. Şapka; yapıtaşı hif (lifler) adı verilen tüp şeklinde iplikçiklerdir. Hifler uç kısımdan gelişen ve lateral dallanma yeteneğine sahip olan tek diziden ibaret ipliklerdir. Hiflerin bir araya gelerek oluşturdukları vejetatif yapıya ‘tallus’ denir. Tallusu oluşturan hif topluluğuna ise ‘misel’ denir (Özkaragöz, 1978). Toprak altı kısmını oluşturan miseller bitkilerdeki kökler gibi ortamdan su ve besin maddelerinin alınarak başka noktalara nakli görevini üstlenirler.

Sap, yukarı doğru yükseltmiş olduğu şapkayı topraktan korur, böylece şapkada bulunan sporlar rüzgarla birlikte yayılabilir. Sap kısmı, uzun ve silindirik veya kısa, eğri ve dayanıklı olabilir. Bu özellikler her cins için genelde karakteristiktir. Lameller, gençken açık renkli, daha sonra ise üzerinde taşıdığı sporların olgunlaşarak renk değiştirmesi nedeniyle koyu renkli olup, ince ve düşey levhalar şeklinde ve sapın şapkayla birleştiği noktadan, sıra sıra çıkarak yayılırlar. Himenyumu oluşturan lameller, sporları oluşturan hücrelerle kaplanmıştır. Bu sporlar, uygun bir ortam bulduğunda, çimlenerek mantarı oluşturmaya başlarlar. Yüksük, şapka uçlarını sap kısmına bağlayarak, olgunlaşmamış lameleri örter. Mantarın büyümesiyle bu örtü bozularak sap halkası şeklini alır (URL-1, 2010).



Şekil 1. Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri

Mantarlar çok eski zamanlardan beri bilinmekte olup, insanların çeşitli amaçlarla yararlandıkları türlere sahiptir. Bazı *Saccharomyces* türleri fermentasyon yaparak alkollü içkilerin hazırlanmasında ve ekmek yapımında, bazı *Penicillium* türleri ise antibiyotik

eldesinde kullanılırlar. Mantar cinsleri içinde 60 kadar tür ile temsil edilen *Amanita* cinsi ayrı bir öneme sahiptir. *Amanita* türleri içinde özellikle, yenebilen bir mantar olan *Amanita caesarea* ile zehirli ve halüsinojen etkili *Amanita muscaria* ve *Amanita pantherina* önemlidir (URL-1, 2010).

Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Yapılan araştırmalara göre mantar kandaki şeker seviyesini düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler, kolesterolü düşürücü özelliği ile kalp ve damar hastalarının da diyetlerinde kullanabileceklerini göstermiştir (Boztok, 1990). Elde edilen verilerden mantarların besleyici gıdalar olduğu görülmektedir. Sebzelele karşılaştırıldıklarında yüksek oranda protein içeriğine ve iyi bir vitamin ve mineral dengesine sahip oldukları anlaşılmaktadır. Mantarlar az miktarda yağ ve sindirilebilir karbohidrat içerirler ki; bu durum onların düşük kalorili gıdalar sınıfında olmalarını sağlar (Murugkar ve Subbulakshmi, 2005).

1.2.1. *Lactarius piperatus* Makromantarının Morfolojik Özellikleri

Yenilebilir, şapkalı bir mantar olan *Lactarius piperatus*, mantarlar aleminin *Basidiomycetes* sınıfına ait olup, yaz ve sonbahar dönemlerinde yetişir. Kırıldığı ya da kesildiği zaman kesit yüzünden beyaz renkli ve acımsı bir süt akar. Amerika, Avrupa ve Türkiye'nin yaprak döken ağaçlık alanlarda yaygın olarak görülür (Şekil 2). Şapka kısmı 6-16 cm genişliğinde ve krem-beyaz renktedir. Huni şeklinde olan şapkanın yüzeyi pürüzsüzdür, yer yer kurumuş ve çatlamış olabilir. Sap uzunluğu 3-7 cm ve genişliği 2-3 cm aralığında değişmekte olup, silindir şeklinde, beyaz renkli ve kırılmandır. Şapkanın iç kısmında bulunan lameller sık ve beyaz renkliyken ilerleyen dönemlerde krem rengini alır. Acımsı ve hoş olmayan tadına rağmen farklı şekillerde tüketilebilir, ancak çiğ yenmesi durumunda sindirimi zor olur (Haas, 1968; Pegler, 1983).

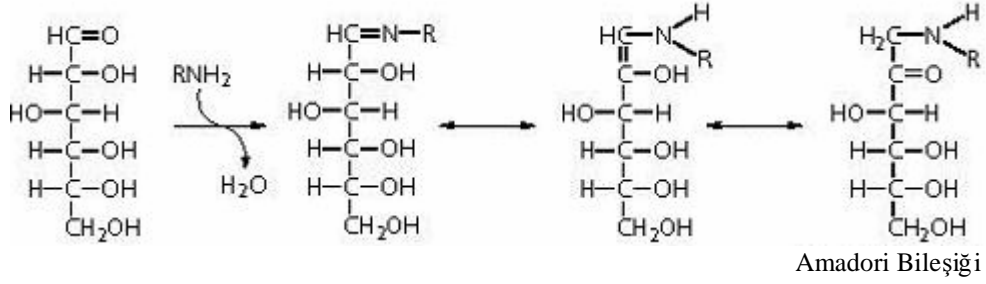


Şekil 2. *Lactarius piperatus* mantarının fruktifikasyon organları

1.3. Esmerleşme Reaksiyonları

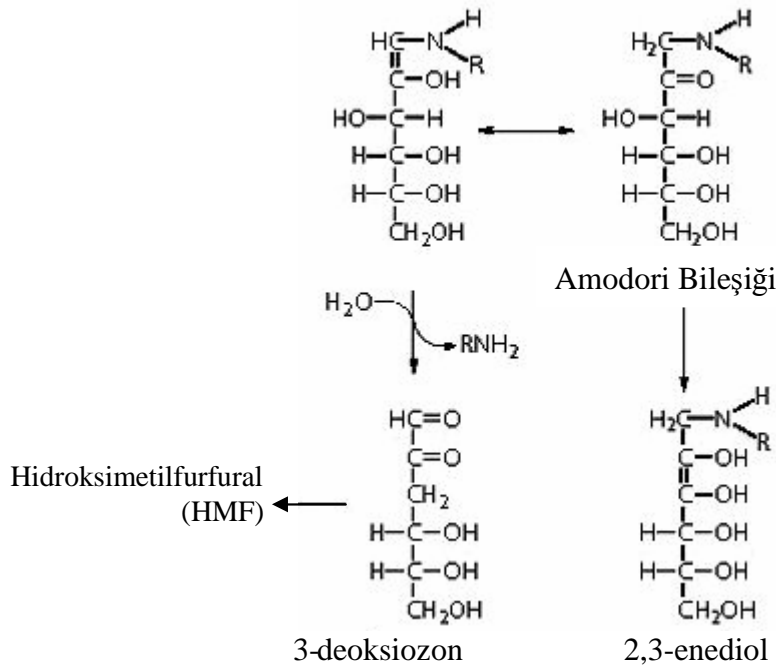
Hasat sonrası depolama veya meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında mekanik zedelenmelerden kaynaklanan renk değişimleri esmerleşme olarak bilinir. Meyve ve sebzelerde görülen bu esmerleşme reaksiyonları PFO enziminin fenolik bileşiklerle reaksiyonu sonucu meydana gelmektedir (Godfrey ve West, 1996). Esmerleşme reaksiyonları, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları ve enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları olmak üzere iki şekilde meydana gelebilir.

Enzimatik olmayan esmerleşmenin en yaygın çeşidi Maillard reaksiyonlarıdır. Maillard reaksiyonu, tek bir reaksiyon değildir, amino asitler ve indirgen şekerlerin arasında, genellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların, bir kompleks serisidir. Maillard reaksiyonu üç basit evrede gerçekleşir ve ilk basamağı, glukoz gibi indirgen bir şekerin, bir aminoasitle reaksiyonudur. Bu reaksiyon amadori bileşiği denilen bir reaksiyon ürününün oluşumu ile sonuçlanır (URL-2, 2010).



Şekil 3. Glukoz ve bir amino asit (RNH_2) arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonlarının ilk basamağı

Bir sonraki basamaklar, amadori bileşiğinin izomerine bağlı olarak farklılık gösterir. Herbirinde amino asit yer değiştirir ve en sonunda önemli lezzet bileşikleri olan furfural ve hidroksimetil furfurala (HMF) indirgenen reaktif bileşikler oluşur. Diğer reaksiyon, amadori-yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılan, temel esmerleşme reaksiyonlarının başlangıç noktasıdır. Furfural ve hidroksimetil furfural, Maillard reaksiyonlarında oluşan karakteristik lezzet bileşikleridir. Furfural, pentoz şekerlerin (riboz gibi) reaksiyonlarının sonucunda oluşur; HMF ise heksoz şekerlerin (glukoz, fruktoz) reaksiyonu sonucu oluşur (URL-2, 2010).



Şekil 4. HMF'nin oluşumu ve amadori-yeniden düzenlemesi

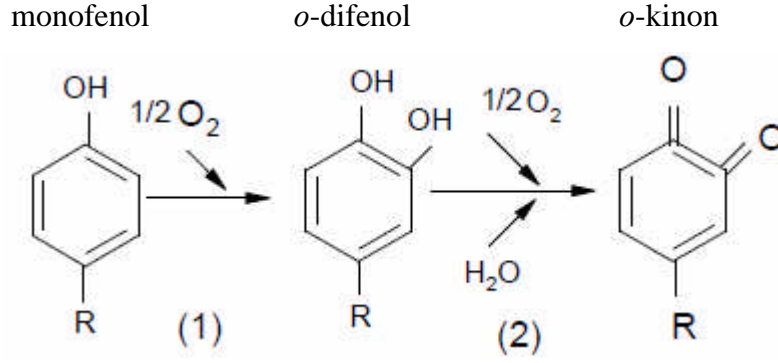
Bu üç yol sonucunda, lezzet bileşenleri ve kahverengi, yüksek molekül ağırlıklı pigmentleri, melanoidin, içeren çok kompleks karışımlar oluşur. Melanoidler yararlı antioksidan özelliğe sahiptir (Owen, 1996).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları ise bitkilerde iki farklı şekilde gözlenebilir (Friedman, 1996; Friedman, 1997). Bunlardan birisi meyve ve sebzelerde bulunan fenol bileşiklerinin kinonları vermek üzere PFO ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Oluşan kinon yapıları bileşikler, daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlarla, siyah renkli melanin pigmentlerine polimerleşirler (Laurila vd., 1998).

Diğer enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise, polifenol türevli kinonların, serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır (Labuza vd., 1992). Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlardır. Tüm enzimatik esmerleşme olayları bitki tür ve çeşidine göre farklılıklar gösterir ve PFO'nun aktivitesi, aktif PFO konsantrasyonuna, pH'ya, sıcaklığa ve dokularda mevcut bulunan oksijene bağlıdır. Bunlardan birinin ortadan kaldırılmasıyla bu reaksiyonlar durdurulabilir veya azaltılabilir (Pekyardımcı, 1992).

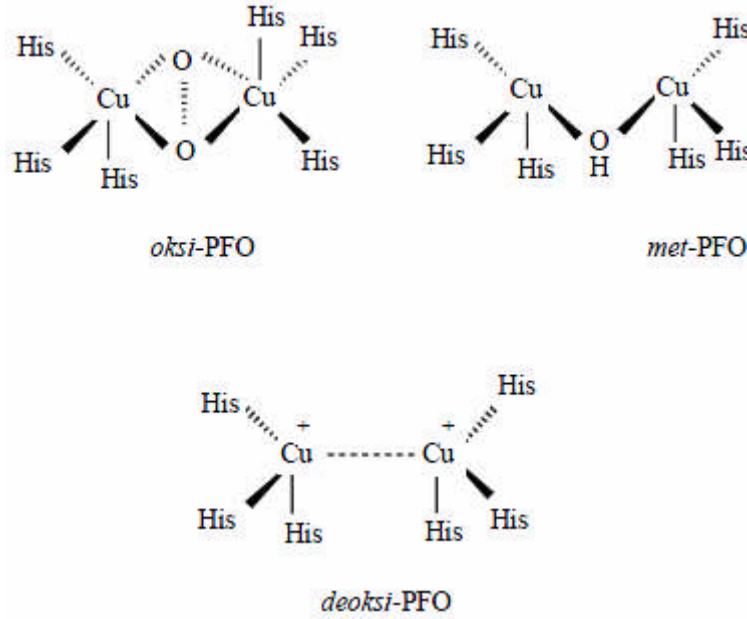
1.4. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Özellikleri

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



Şekil 5. Enzimatik eşmerleşme mekanizması, 1) Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi), 2) *o*-Difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi)

PFO ortalama 55-65 kDa molekül ağırlığına sahip olup, yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu aktif bölgenin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğu ve Tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığı belirtilmiştir (Fenton, 1995).

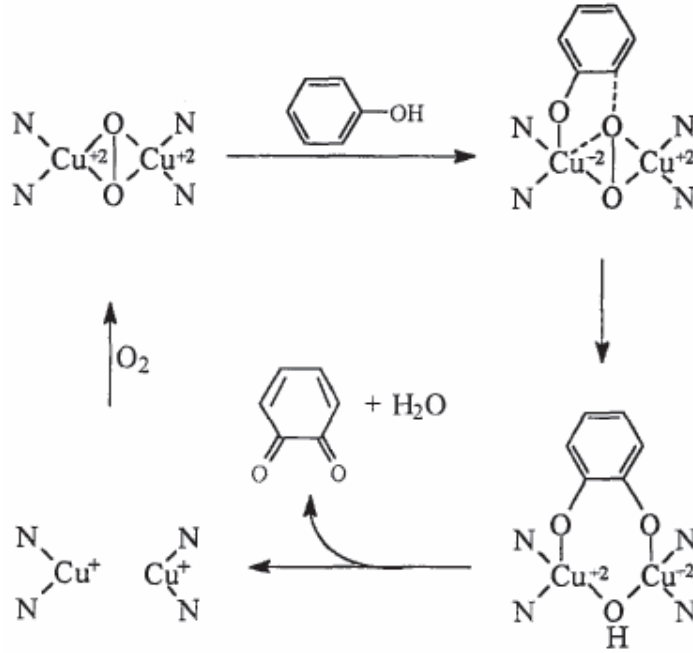


Şekil 6. PFO'nun bakır merkezleri

Saf PFO renksizdir. Konsantre PFO çözeltileri nötral pH değerlerinde oldukça kararlıdır, ancak bu çözeltiler kısa bir süre için 60 °C'ye ısıtıldığında ise enzim tamamen inaktif olur. Enzimin nötral pH değerlerinde ve fosfat tamponundaki konsantre çözeltileri 1 °C'de veya -25 °C'de dondurulmuş olarak aktivitede kayıp olmaksızın birkaç ay

saklanabilir. Ancak uzun süreli saklamalarda aktivitede kayıplar gözlenebilir ve bu kayıplar geri dönüşümsüzdür. Patates, tütün ve mantarda bakır içeriğinin %0,2-0,3 değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Taze hazırlanan enzim özütünde bakırın Cu(I) şeklinde olduğu ancak zamanla Cu(II) şeklinde yavaşça okside olduğu ve bu değişimin aktivitede kayba yol açmadığı belirlenmiştir. Bakırın uzaklaştırıldığı apoenzim aktif değildir. Ancak Cu(II) ilavesiyle aktivite geri kazanılabilmektedir (Kertes, 1962).

PFO'ların fenolik bileşikler üzerindeki etki mekanizması çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Enzimin deoksi formu önce oksijen ile oksî-PFO formunu oluşturur ve fenolik substrat bu oksî-PFO formundaki bakır atomlarının birine aksiyal olarak koordine olur. Oluşan beş-koordinatlı ara ürünün yeniden düzenlenmesinden sonra, fenolik substratın *o*-hidroksilasyonu, su kaybı ve difenolik ürünün koordinasyonu gerçekleşir. Molekül içi elektron transferi sonucu, *o*-benzokinin ürünü oluşur ve bu sırada enzimin deoksi-PFO hali böylece yeni bir katalitik çevrime girmek üzere hazır hale gelmiş olur (Siegbahn, 2003).



Şekil 7. PFO tarafından katalizlenen reaksiyon için önerilen mekanizma

Böyle bir mekanizmayla substratlar önce *o*-difenollere ve *o*-difenollerde, *o*-kinon bileşiklerine dönüşür. Oluşan *o*-kinon bileşikleri enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile hızlı ve kolayca polimerleşerek koyu kahve renkli suda az çözünen

polimerik yapılar oluşur ki böylece, esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan pigmentler oluşmuş olur.

1.5. Polifenol Oksidaz'ın Aktivitesinin Belirlenmesi

PFO aktivitesi, farklı monofenolik ve difenolik substratlar varlığında, manometrik, palografik, kronometrik ve spektrofotometrik gibi çeşitli teknikler yardımıyla ölçülebilmektedir.

Fenolik substratın oksidasyonu sırasında kullanılan O₂, bir respirometre ile sistemin oksijen harcaması esasına göre manometrik olarak yada bir oksijen elektroduyla palografik olarak ölçülebilir (Mayer vd., 1966).

Spektrofotometrik işlemlerde ise genelde ya substratların oksidasyonu izlenir ya da esmerleşme reaksiyonunun bir ürününün oluşma hızını ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir ve bu metot daha çabuk ve kolay olduğundan diğerlerine göre tercih edilir (Whitaker, 1972).

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

3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon yerine, her bir tiyol molekülü başınabir mol kinon tüketen ve renksiz kondenzasyon ürünü oluşturan, sarı renkli bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit de kullanılabilir. Enzim aktivitesi, 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin 412 nm'de absorbansındaki azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edilebilir (Esterbauer vd., 1977).

1.6. Polifenol Oksidazın Bazı Organizmalarda Bulunuşu

Polifenol oksidazların bitki ve mantarlarda ki en önemli fonksiyonu, hastalıklara karşı koruma ve fenollerini kinonlara yükseltgenmesini katalizleyip, bitkilerin proteinlerini ve besinsel değerlerini kısıtlamasıyla bitki yiyen böceklere karşı savunmada rol oynamasıdır. Bitkilerdeki fenolik substratlar vakuollerde bulunmasına karşılık bitki dokularının çoğunda PFO enzimi plastidlerde yerleşmişlerdir. Bu dokular kesildiğinde, zarar gördüğünde veya hastalıklı dokular oluştuğunda ya da dokular böceklerin saldırısına uğradığında bu enzim aktif hale geçmektedir. Plastidlerde yerleşmiş olan bu enzim bir membran proteini olmasına karşın integral membran proteini değildir (Mazzafera ve Robinson, 2000). Çok geniş bir filogenetik yelpazede bulunan PFO sahip olduğu önemli fonksiyonları nedeniyle bir çok araştırmacı tarafından, farklı organizmalarda çalışılmıştır.

Sebzelerin ve meyvelerin saklanması, depolanması esnasında ve bazı mekanik zedelenmeler sonucunda, esmerleşme reaksiyonları oldukça yaygın bir problemdir (Zhou ve Feng, 1991). Malatya kayısı (*Prunus armeniaca* L.) Türkiye’de yetiştirilen çeşitler içinde en iyisidir ancak depolama esnasında dış yüzeyi kararmaktadır ve bu ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında PFO’nun fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Augustin vd., 1985). Malatya kayısından elde edilen enzimin aktivitesinin pH 8,5’te maksimuma ulaştığı, 40 °C’de 40 dakika ısıtıldığında enzim aktivitesinde önemli bir kaybın söz konusu olmadığı ancak 60 °C’de 47 dakika ve 80 °C de 16 dakika ısıtıldığında aktivitenin %50 kayba uğradığı gözlenmiştir. Ayrıca enzimin monofenolaz aktivitesine sahip olmadığı, askorbik asit ve 2-merkaptolanın bu enzim için en iyi inhibitör olduğu belirtilmiştir (Arslan vd.,1998).

Mineral ve vitaminler açısından oldukça zengin bir meyve olan dut, zayıflık semptomlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu meyveden hazırlanan ham enzim özütünden Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak, PFO afinite kromatografisi yöntemiyle 74 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin optimum pH’sı 4-metilkatekol varlığında 5,0 ve katekol varlığında 7,0 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değeri ise 4-metilkatekol varlığında 20 °C ve katekol varlığında 45 °C olarak bulunmuştur. Dut PFO’sunun difenollerini okside ettiği buna karşı monofenollerle aktivite göstermediği belirlenip, enzim aktivitesinin difenolaz aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Aslan vd., 2004).

Karayemiş bitkisinin (*Laurocerasus officinalis* Roem.) henüz olgunlaşmamış meyvelerinde yapılan incelemede doğal elektroforez de Rf değeri 0,50 ve 0,57 olan iki band gözlenmiş buna bağlı olarakta meyvedeki PFO'nun en az iki izoformunun olduğu sonucuna varılmıştır. 3-(3,4-Dihidroksifenil)propionik asid (DHPPA) varlığında optimum pH'ın 5,0 olduğu ve yüksek pH'larda enzimin %80 oranında aktivitesinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 40 °C ve aktivitenin askorbat ve metabisülfite karşı hassas olduğu gözlenmiştir (Colak vd., 2005).

Filipinlerde yetiştirilen bir muzda yapılan araştırmada meyvenin soyulmuş etli kısmında yüksek miktarda dopamine rastlanmış ve bu maddenin ham veya kısmen saf PFO tarafından oksidasyona uğratıldığı bildirilmiştir (Riggin vd., 1976). Saflaştırma ve karakterizasyon esnasında yapılan işlemlerde oksidasyonun en hızlı gerçekleştiği dopaminin en iyi substrat olduğu anlaşılmıştır. Muzdan elde edilen enzimin substrat özgünlüğü Japon armudu (Tono vd., 1986), lahanaya (Fujita vd., 1991) ve patlıcandan (Fujita ve Tono, 1998) farklılık göstermektedir. Saflaştırılmış enzimde dopamin için K_m 2,8 mM ve optimum pH 6,5 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca pH 3,0-11,0 arasındaki pH'larda enzimin 48 saatlik inkübasyonundan sonra pH 5,0-11,0 arasında başlangıç aktivitesini %90 oranında koruduğu gözlenmiştir. Saf enzimin optimum sıcaklığının 30 °C olduğu ve 70 °C üzerinde 10 dakika ısıtıldığında aktivitenin %80 oranında kaybolduğu bildirilmiştir. Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} gibi metal iyonlarının zayıf inhibitörler olduğu, *L*-askorbik asid ve sisteinin 1 mM konsantrasyonunun tamamen inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir (Galeazzi vd., 1981; Sojo vd., 1998). SDS-PAGE elektroforezinde molekül ağırlığı 42 kDa olan saf enzime ait tek bir band görülmüş ve jel filtrasyon yöntemiyle de bu proteinin molekül ağırlığı yaklaşık 41 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuç saf enzimin bir monomer olabileceğini göstermektedir (Yang vd., 2000).

Ünal (2007), Anamur muzundan polifenol oksidaz enzimini saflaştırıp, enzimin karakteristik özelliklerini belirlemiştir. PFO'nun muz için optimum sıcaklığı 30 °C ve optimum pH derecesi 7,0 olarak bulunmuştur. 60-75 °C'deki termal inaktivasyon çalışmalarından, enzimin yarı ömür değeri 7,3 ve 85,6 dakika arasında değişmektedir. E_a ve Z değerleri, sırasıyla, 155 kJ.mol⁻¹ ve 14,2 °C olarak hesaplanmıştır. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 8,5 mM ve 0,754 ODdak⁻¹'dir. İnhibitör testlerinde ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitör olarak tespit edilmiştir.

Monofenolaz aktivitesi, avakado bitkisinde tespit edilmiş olup, bu bitkideki PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır (Khan, 1980).

Avakadoda monofenolaz aktivitesi, asetonla toz haline getirilen örneklerle hazırlanan özütler kullanılarak tayin edilmiş ve *p*-kresol varlığında yapılan denemelerde enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. Ayrıca avakado monofenolaz aktivitesi çeşitli substratlar varlığında radyometrik ve spektrofotometrik metodlar yardımıyla tespit edilmiştir. Triton X-114 kullanılarak kısmen izole edilen PFO, 4-hidroksi anisol kullanılarak karakterize edilmiştir (Espin, 1997).

PFO kahvenin (*Coffea arabica* L.) yapraklarından ve meyve endospermilerinden (PFO-E) ekstrakte edilerek karakterize edilmiş ve bir çok bitkide olduğu gibi erken gelişme safhasında yaprak ve endospermelerde yüksek olduğu gözlenmiştir (Ratjen ve Robinson, 1992; Dry ve Robinson, 1994). Yaprak ve endosperm için optimum PFO aktivitesinin pH 6,0-7,0 de ve optimum sıcaklığın 20-30 °C arasında olduğu gözlenmiştir. Klorojenik asidin bitkinin her iki kısmı için de en iyi substrat olmasına rağmen, 4-metilkatekol durumunda PFO'nun yapraklarda yüksek aktivite fakat endospermde düşük aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Kahve PFO proteinlerinin katalitik olarak aktif bölge dışında proteolitik olarak duyarlı bir bölge içerdiği ortaya konmuştur (Mazzafera ve Rabinson, 2000).

Çilek PFO'su amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Substrat olarak prokateşol kullanılmış ve bu substratta K_m değeri 11,2 mM, optimum pH değeri 50 °C'de SDS varlığında ise 7,2 olarak bulunmuştur (Serradell vd., 2000).

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

Özel vd., (2010), *Boletus erythropus* mantarından elde ettikleri PFO'yu affinite kromatografisi kullanarak saflaştırıp, enzimin karakteristik özelliklerini belirlemiştirler. *Boletus erythropus* PFO'sunun optimum sıcaklığı 20 °C ve optimum pH derecesi 8,0 olarak bulunmuştur. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 1428,6 U/mg protein olarak belirlenmiştir. İnhibitör testlerinde ise askorbik asit ve sodyum metabisüfit en etkili inhibitör olarak tespit edilmiştir.

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

İlk defa İsviçre kırmızı pazı bitkisinden PFO saflaştırılan Zhao ve ark. (2009), saf enzimin protein ağırlığını yaklaşık 41 kDa olarak belirlemiş, *L*-DOPA ve katekol substratlarıyla difenolaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmiştir. Optimum pH'sı 7,5 ve optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur. Pazı PFO'sunun aktivitesinin K⁺ ve Na⁺ metalleri varlığında arttığını ve askorbik asid, sistein, β-merkaptolanol, sodyum sülfid ve sodyum metabisülfid varlığında inhibe olduğunu ortaya koymuştur.

1.7 Çalışmanın Amacı

Enzim teknolojisinin günümüzde giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlere yönelik çalışmaları daha da önem kazanmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Bu yönüyle enzim katalizli reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir. Günümüzde besinlerin sağlıklı bir şekilde korunması ve raf ömürlerinin uzatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyeceklerin, sentetik yöntemlerle elde edilmiş kimyasallarla korunmaları sonucu gıdalarda lezzet ve besin değeri kaybı oluşmakta ve çeşitli toksik maddeler meydana gelmektedir. Bu nedenle, esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarını optimize etmek için, besinlerin bileşimindeki değişimlerin, besinsel ve toksikolojik açılarından tanımlanması ve bu arzu edilmeyen yönlerin durdurulmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca enzimatik esmerleşme sonucunda oluşan melaninlerin, antibakteriyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olmaları, araştırmacıların enzimatik esmerleşmeye büyük bir ilgi duymasına neden olmuştur (Labuza, 1992).

Bu çalışmanın amacı, Trabzon merkezinin Boztepe mevkinden toplanan, yabani ve yenilebilir bir makromantar olan *L. piperatus*'tan, bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO, bir afinite jeli (Arslan vd., 2004) sentezlenerek, afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 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 ulaşılmış ve ayrıca, *L. piperatus* PFO'sunun, bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkınlığı incelenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. 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
Enzim Özütlü Hazırlama Çözeltisinde Kullanılan Triton X-114, PMSF, EDTA ve MgCl ₂	Sigma, Aldrich, Fluka
Protein Elektrofrezinde Kullanılan TEMED, SDS, Amonyum persülfat (APS), N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Bromofenol Mavisi, Gliserol, β -merkaptotanol, Glisin, Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, Fluka
Tampon Çözeltilerde Kullanılan Sodyum Asetat, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ve Tris Bazı	Sigma, Merck
Çözücüler HCl, Asetik Asit, metanol ve aeton	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 (w/v) 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.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) 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.
- Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 24,2 g Tris 150 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 200 mL'ye tamamlandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS 50 mL saf suda çözüldü hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 10 g APS 50 mL saf suda çözüldü, hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı ve 250 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözüldü hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- SDS Jel Yükleme Tamponu: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptotanol'ün karıştırılması ile hazırlandı (200 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı).
- SDS Jel Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 450 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Doğal Jel Yükleme Tamponu: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı (200 µL'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı).
- Doğal Jel Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 450 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Boyama (Staining) 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 (Destaining) Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

- Substrat Boyama Çözeltisi (*L*-DOPA): 24 mM *L*-DOPA 100 ml saf suda biraz ısıtılarak 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'sı 10,0'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'sı 8,8'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'sı 6,0'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'sı 5,0'a ayarlanıp hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Elüsyon Tamponu (50 mM pH 8,0 Fosfat Tamponu içinde 1M NaCl): 3,10 g K₂HPO₄ ve 29,25 g NaCl 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8,0'a ayarlanıp hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.4. Substrat Çözeltileri

- 100 mM 4-metil katekol: 0,24 g 4-metil katekol az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- 100 mM Katekol: 0,11 g katekol az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- 100 mM DHPPA (3-(3,4-dihidrosifenil)propiyonik asit): 0,82 g DHPPA az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- 100 mM *L*-DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin): 0,197 g *L*-DOPA az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- 100 mM *L*-Tirozin: 0,181 g *L*-tirozin az saf suda biraz ısıtılarak çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.5. Diğer Çözelti ve Tamponlar

- Ham Enzim Özütle Hazırlama Çözeltisi: 0,84 g sodyum asetat (50 mM), %6 (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.
- 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 Na₂HPO₄·2H₂O'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.

- 10 mM MBTH (3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon): 0,022 g MBTH az saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Asetonla Çöktürme

Trabzon merkezinin (Boztepe ve Üniversite Kampüsü) ormanlık alanlarından Eylül 2009 tarihinde toplanan, 10 tür yabancı mantar (*Macrolepiota gracilentia*, *Agaricus xanthodermus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius deterrimus*, *Suillus luteus*, *Hypholoma fasciculare*, *Agaricus silvicola*, *Amanita vaginata*, *Russula queletii* ve *Russula cyanoxantha*), laboratuara ulaştırıldıktan sonra temizlenip 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 havanda iyice öğütüldü ve üzerlerine 100'er ml enzim özütü hazırlama çözültisi ilave edildi. Dört katlı tülbentten süzülen ham enzim özütleri, 4 °C'de 20,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanalara, hacmi kadar soğuk asetona, buz banyosunda, yavaş yavaş ilave edildi. Bir gece 4 °C'de bekletilen ham enzim özütleri, 4 °C'de 20,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılıp, elde edilen çökelekler çözünebildiği en az hacimde 50 mM pH 5,0 asetat tamponuyla çözüldü. Bu özütlerde yapılan ön aktivite çalışmalarında, katekol substratı varlığında, 25 °C'de ve asetat tamponu (pH 5,0) mevcudiyetinde, *L. piperatus* mantarının PFO aktivitesinin en yüksek olmasından dolayı, bu çalışmada adı geçen mantardan enzim saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

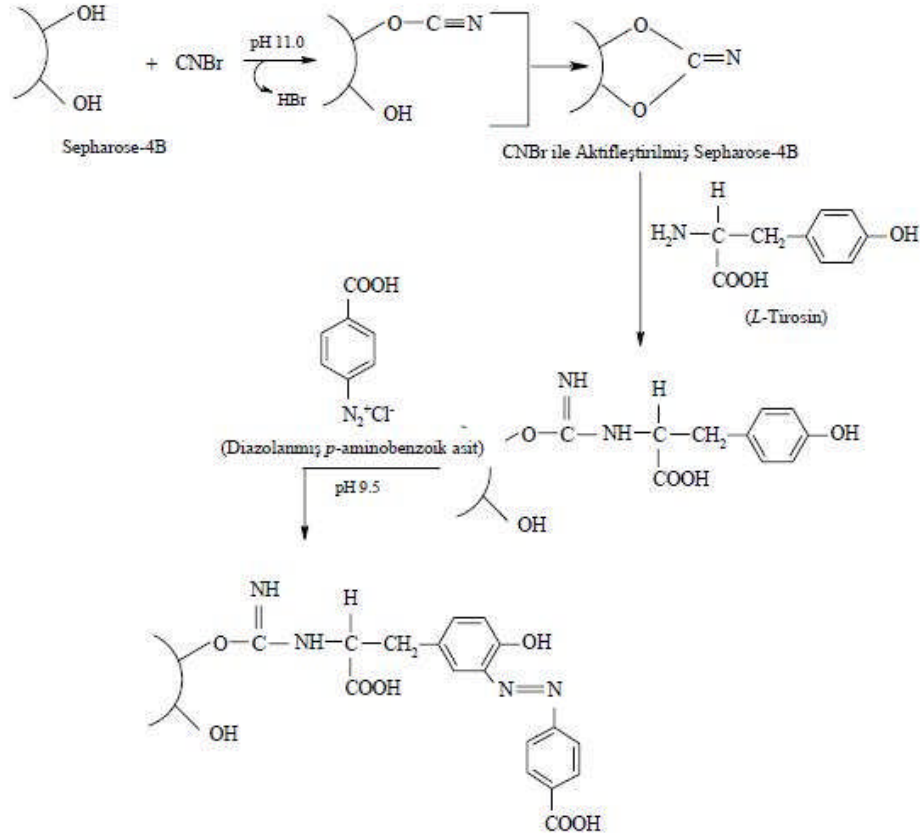
2.3. Afinite Jelinin Sentezi

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 *L. piperatus*'tan 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 banttın süzülürdü. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan kısım, 0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ tamponunun 250 mL'siyle yıkandı ve süzülerek bir beher içerisine alındı. Süspansiyonun üzerine 20 mL'sinde 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 banttın süzülen süspansiyon bol saf su ile yıkandı. Mavi bant üzerinde kalan kısım, 0,2 M NaHCO₃ tamponunun 100 mL'siyle 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*-aminobenzoik 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'ı 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 (Aslan vd., 2004).



Şekil 8. Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları

2.4. Enzim Özütünün Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Sentezlenen afinite jeli, 1×15 cm boyutlarındaki kolona, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde damla damla yüklendi ve 50 mM pH 5,0 asetat tamponu ile yıkandı (kolonun üstünden ilave edilen ve kolonun altından toplanan tamponun 280 nm’de absorbans değerleri eşit oluncaya kadar). 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 4 mL halinde elüe edildi. Enzim elüatlarının toplandığı her bir tüpte 280 nm’de protein tayini ve 500 nm’de katekol substratı ile aktivite tayini yapıldı.

2.5. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Afinite kromatografisi sonrası toplanan her bir tüpte PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 4-metil katekol için 496 nm’de ve diğer tüm substratlar (katekol, *L*-DOPA, PHPPA, DHPPA ve *L*-tirosin) için 500 nm’de, absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995). Reaksiyon karışımı, substratla eşit hacimde 10 mM MBTH ve 20 µL DMF içeren karışıma, saf enzim elüatıyla birlikte son hacmi 1000 µL olacak şekilde tampon çözelti ilave edilerek hazırlandı. Saf enzim elüatının konulmadığı reaksiyon karışımı da kör olarak kullanıldı.

Bir ünite PFO aktivitesi; 1 mL reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0,001 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak, PFO’nun spesifik aktivitesi ise; 1 mg protein başına aktivite (ünite) olarak tanımlandı (Galeazzi ve Sgarbieri, 1981).

2.6. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı.

- 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 konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olmaktadır.

- Diğer tüplere enzim özütünden ve saf enzim elüatından 10 µL ilave edildi.
- Standartlara ve örneklerle, hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edildi ve vortekslendi.
- Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi 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 ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek enzim özütünün ve saf enzim elüatının protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yükleme jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak yapıldı. Jeller hazırlandıktan sonra, önceden saf su ve etil alkolle temizlenmiş ve arasına boşluk oluşturmak için plastik aparat yerleştirilen cam plakalar arasına hiçbir hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dolduruldu. Yaklaşık 30 µg protein, doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp Hamilton şırıngası yardımı ile önceden bir tarak yardımıyla oluşturulmuş kuyucuklara yüklendi. Tank, doğal elektrofrez yürütme tamponuyla dolduruldu ve buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1–1,5 saat 25 mA'de yürütüldü.

Tablo 3. Doğal PAGE bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%8)	Yükleme Jeli (%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1,25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2,5 mL	---
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	2,7 mL	1,67 mL
Saf Su	4,6 mL	6,97 mL
% 10 APS	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,006 mL	0,01 mL

2.7.1. Substrat ve Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama

Enzim özütünde ve saf enzim elüatında PFO'nun varlığı, SDS'siz ve soğuk ortamda yapılan doğal elektroforez sonrası jelin, hem substrat hem de Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmasıyla ortaya konuldu. PAGE sonrası sistemden çıkartılan, bir tarafında ham enzim özütü ve saf enzim elüatı, diğer tarafında ise, sadece enzim elüatı bulunan jel ikiye bölündü. İkiye bölünen jelin bir tarafı, substrat boyama çözeltisi (*L*-DOPA), diğer tarafı da Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi içerisinde yaklaşık olarak 1 saat çalkalanarak bekletildi. Protein bantlarını görüntülenebilir hale getirmek için Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan jel, boyama uzaklaştırma çözeltisiyle (Destaining) 2-3 saat çalkalandı. Bantları görünür hale getirilen jel UV ışık yardımıyla kaydedildi.

2.8. SDS Jel Elektroforezi

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli %8'lik ve yükleme jeli %5'lik olacak şekilde Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) yapıldı.

Tablo 4'te belirtildiği şekilde hazırlanan jeller, cam plakalar arasına döküldü. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde 30 µg protein olacak şekilde SDS yürütme boyasıyla karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika bekletilip, Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektroforez işlemi sona erdikten sonra, jel sistemden dikkatlice alınarak, yaklaşık 1 saat boyunca boyama çözeltisi içerisinde bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilebilmesi için jel, boyama uzaklaştırma çözeltisiyle (Destaining) 2-3 saat çalkalandı. Bantları görünür hale getirilen jel, UV ışık yardımıyla kaydedildi.

Tablo 4. SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%8)	Yükleme Jeli (%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1,25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2,5 mL	---
% 10 SDS	0,1 mL	0,1 mL
% 30 Akrlamid/Bisakrlamid	2,7 mL	1,67 mL
Saf Su	4,6 mL	6,87 mL
% 10 APS	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,006 mL	0,01 mL

2.9. Polifenol Oksidaz ile İlgili Kinetik Çalışmalar

PFO'nun kinetik özelliklerini araştırmak amacıyla, belirlenen en iyi substratı kullanılarak (katekol), optimum pH ve sıcaklık değerleri, ısı ve pH kararlılığı, protein miktarı ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi, V_{maks} , K_m değerleri, bilinen bazı inhibitörleri kullanılarak I_{50} değerleri ve bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkınlığı incelendi.

2.9.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla sitrat-fosfat tamponu (pH 3,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tampon sistemleri ve difenolik substrat olarak katekol kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Bundan sonraki çalışmalar, bu substrat varlığında ve belirlenen optimum pH değerinde gerçekleştirildi (Colak vd., 2005).

2.9.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

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

2.9.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere, PFO aktivitesi, katekol substratı varlığında, enzim konsantrasyonu 0,05-7 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olacak şekilde ölçüldü ve elde edilen verilere göre PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi incelendi (Kolcuoğlu vd., 2007).

2.9.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, nihai konsantrasyonu 0,0625-20 mM aralığında değişen katekol çözeltisi, uygun konsantrasyonda PFO ve aktivite tayininde kullanılan diğer çözeltiler kullanılarak optimum pH'da reaksiyon karışımı hazırlandı. Optimum şartlar altında enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi (Lineaweaver ve Burk, 1934).

2.9.5. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

PFO'nun pH kararlılığını incelemek amacıyla, elde edilen saf enzim elüatı, 50 mM konsantrasyonundaki pH 3,0-7,0 sitrat-fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 Tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 4 °C'de 24 saat, 72 saat ve 120 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bu enzim-tampon karışımlarından, uygun miktarda nihai enzim konsantrasyonu içerecek şekilde alınarak, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivitesi ölçüldü. Ayrıca enzim, inkübasyona tabi tutulmadan, aynı tamponlar içerisindeki karışımı hazırlanır hazırlanmaz hemen aktivitesi ölçüldü ve enzimin yüzde kalan aktivitesi belirlendi (Özen vd., 2004).

2.9.6. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

PFO'nun ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, saf enzim elüatından uygun miktarda ependorf tüplerine alınarak, 10 °C'lik artışlarla, 0-20 °C aralığında soğutmalı inkübatörde ve 30-70 °C aralığında da Thermoblokta, saatte bir ölçüm alınarak, toplam 4 saat inkübe

edildi. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığına kadar soğutulan saf enzim elüatında, optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı. Aynı şartlarda inkübasyona tabi tutulmayan saf enzim elüatının aktivitesiyle karşılaştırılarak, % kalan aktivite hesaplandı (Colak vd., 2005).

2.9.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi, PFO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit (0,005-0,03 mM), sodyummetabisülfid (0,01-0,05 mM), benzoik asit (2-10 mM) ve sodyum azid (50-400 mM), substrat olarak da katekol kullanılarak belirlendi. Optimum şartlarda, katekolün inhibisyon sonrasında kalan yüzde aktivitesine karşılık, inhibitör konsantrasyonundan çizilen grafikten, %50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu, I_{50} değeri olarak belirlendi (Colak vd., 2005).

2.9.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Li^+ , Na^+ , K^+ , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı (Kolcuoğlu vd., 2007).

2.10. Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkınlığının İncelenmesi

PFO'nun bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkınlığı heptan, toluen ve diklorometan organik çözücülerini kullanılarak belirlendi. Tüm organik çözücüler, susuz sodyum sülfatla bir gece kurutuldu. Reaksiyon karışımı, kateşinin metanolde hazırlanan 400 mM stok çözeltisinden 5 μ L ve saf enzim elüatından uygun miktarda içecek şekilde hazırlanıp, hacmi organik çözücüyle 200 μ L'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı 25 °C'de vorteksle 5 dakika karıştırıldı ve enzimatik reaksiyonu durdurmak için, reaksiyon ortamına 200 μ L aseton ilave edildi. Saf enzim elüatının haricindeki tüm bileşenleri içeren bir kör hazırlanıp, aynı sürede aynı işlemlere tabi tutuldu. Heptan, toluen ve diklorometan reaksiyon ortamında PFO katalizli son ürünlerin renk şiddeti, spektrofotometrik olarak

ölçüldü. 330-700 nm arasındaki absorbans değişimi, enzim katalizli ve enzim bulunmayan reaksiyon karışımları için izlendi (Kermasha vd., 2001).

3. BULGULAR

3.1. Çalışılacak Mantar Türünün Belirlenmesi

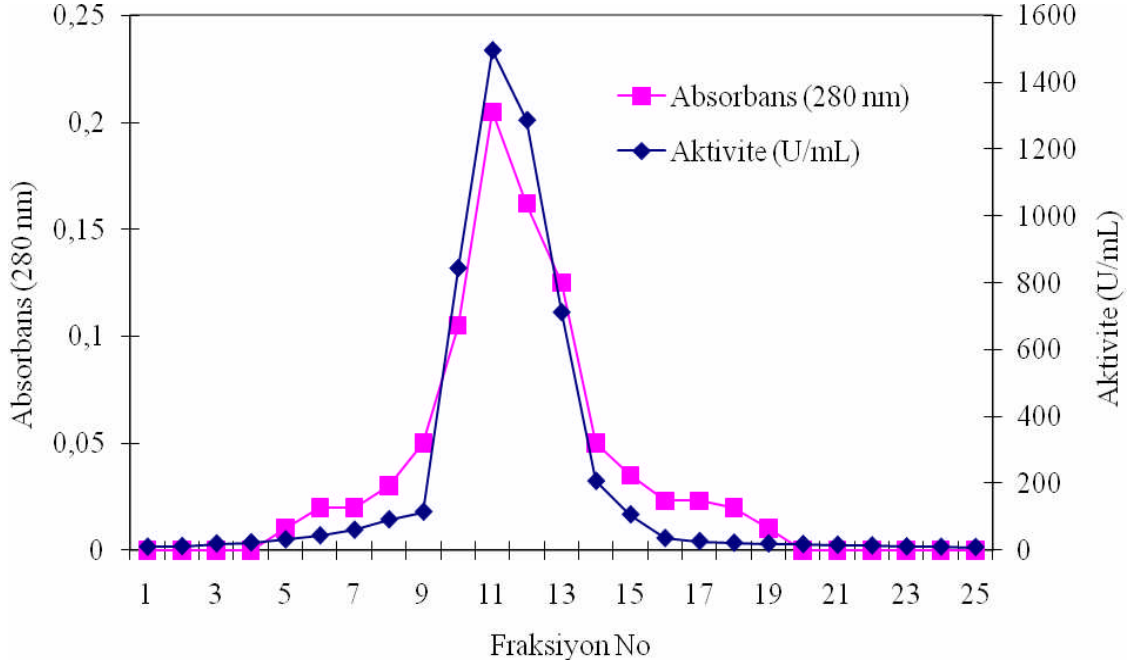
Çalışmalar esnasında kullanacağımız mantar türünü belirlemek amacıyla önceden hazırlanmış 10 tür yabani mantar (*Macrolepiota gracilentia*, *Agaricus xanthodermus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius deterrimus*, *Suillus luteus*, *Hypholoma fasciculare*, *Agaricus silvicola*, *Amanita vaginata*, *Russula queletii* ve *Russula cyanoxantha*) özütlerinde, katekol substratı varlığında, 25 °C’de ve asetat tamponu (pH 5,0) kullanılarak yapılan ön aktivite çalışmaları yapılmıştır. *L. piperatus* PFO’sunun spesifik aktivitesinin en yüksek olmasından dolayı (Tablo 5), bu çalışmada adı geçen mantardan enzim saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Tablo 5. Çalışılacak mantarın belirlenmesinde kullanılan mantarların spesifik aktivite değerleri

Mantar İsmi	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Mantar İsmi	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
<i>M. gracilentia</i>	0.683	<i>H. fasciculare</i>	0.516
<i>A. xanthodermus</i>	1.340	<i>A. silvicola</i>	1.070
<i>L. piperatus</i>	4.362	<i>A. vaginata</i>	1.368
<i>L. deterrimus</i>	2.478	<i>R. queletii</i>	3.960
<i>S. luteus</i>	0.260	<i>R. cyanoxantha</i>	1.789

3.2. Polifenol Oksidazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sepharose-4B-L-tirosin-*p*-aminobenzoik asit jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisi sonrası toplanan elüatlerden oluşan fraksiyonlar için, spektrofotometrik olarak, 280 nm’de protein tayini ve 500 nm’de PFO aktivitesi tayin edildi. Grafikte tek bir pik görülmesi, PFO’nun bu fraksiyonlarda saf olarak toplandığını göstermektedir.



Şekil 9. Afinite kromatografisi ile *Lactarius piperatus*'tan PFO'nun saflaştırılması

1'den 25'e kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine 4'er mL halinde elüatlar toplandı. 500 nm'de spektrofotometrik olarak yapılan aktivite tayini sonucuna göre saf PFO içeren fraksiyonlar birleştirilerek, saf enzim elüatında ve ham enzim özütünde Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim elüatında 0,18 mg/mL ve ham enzim özütünde ise 3,2 mg/mL protein miktarı belirlendi. Bu değerler kullanılarak saf enzim elüatının ve ham enzim özütünün spesifik aktiviteleri hesaplandı, böylece enzimin kaç kat saflaştırıldığı tespit edildi. Tablo 6'da görüldüğü gibi ham enzim özütünde PFO aktivitesi 1923 U/mg protein iken, saf enzimdeki spesifik aktivite 26667 U/mg protein olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlara göre PFO'nun 13,9 kat saflaşmış olduğu belirlendi.

Tablo 6. PFO'nun *L. piperatus*'tan saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Aktivite (U/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg Protein)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	6154	3,2	1923	—
Saf Enzim Elüatı	4800	0,18	26667	13,9

3.3. Polifenol Oksidazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.3.1. Polifenol Oksidazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu

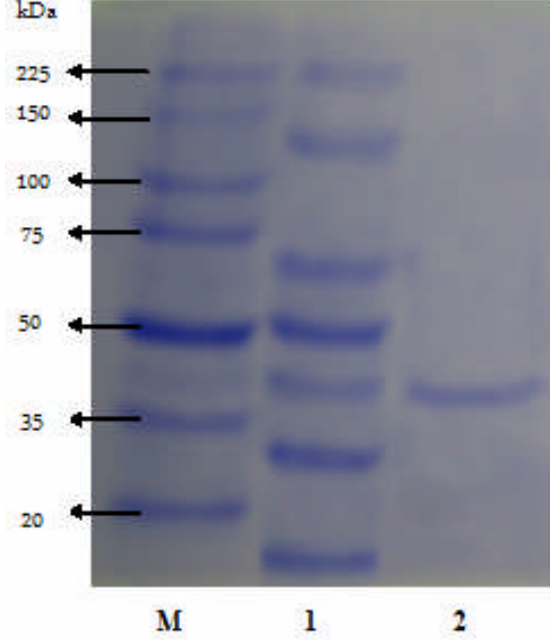
Ham enzim özütünde ve saf enzim elüatında PFO varlığı, SDS'siz ve soğuk ortamda yapılan doğal elektroforezle ortaya kondu. Yapılan elektroforezde, jelin bir yanına ham enzim özütü ve saf enzim elüatı, diğer yanına ise sadece saf enzim elüatı yüklendi. Elektroforez sonrası jel ortadan ikiye bölündü ve ham enzim özütü ile saf enzim elüatının olduğu taraf substrat boyama çözeltisi (*L*-DOPA) ile, diğer taraf ise Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi ile boyandı. Oluşan bantlar UV ışık altında kaydedildi.



Şekil 10. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi, A) Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama, B) Substrat Boyama, 1) Saf Enzim Elüatı, 2) Ham Enzim Özütü

Yapılan doğal elektroforez sonucunda substrat boyama ile hem ham enzim özütünde, hem de saf enzim elüatında bir bant gözlenmesi *Lactarius piperatus*'ta PFO varlığını ispatlamaktadır. Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama ile de, saf enzim elüatında tek bir protein olduğu ve bununla substrat boyamasıyla PFO'ya ait olduğu ortaya konulmuştur.

SDS jel elektroforeziyle, hem ham enzim özütünde hem de saf enzim elüatında PFO'ya ait yaklaşık 40 kDa'lık bir protein bandı gözlenmiştir.



Şekil 11. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi, M: Protein Standartları, 1: Ham Enzim Özütü, 2: Saf Enzim Elüatı

3.3.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

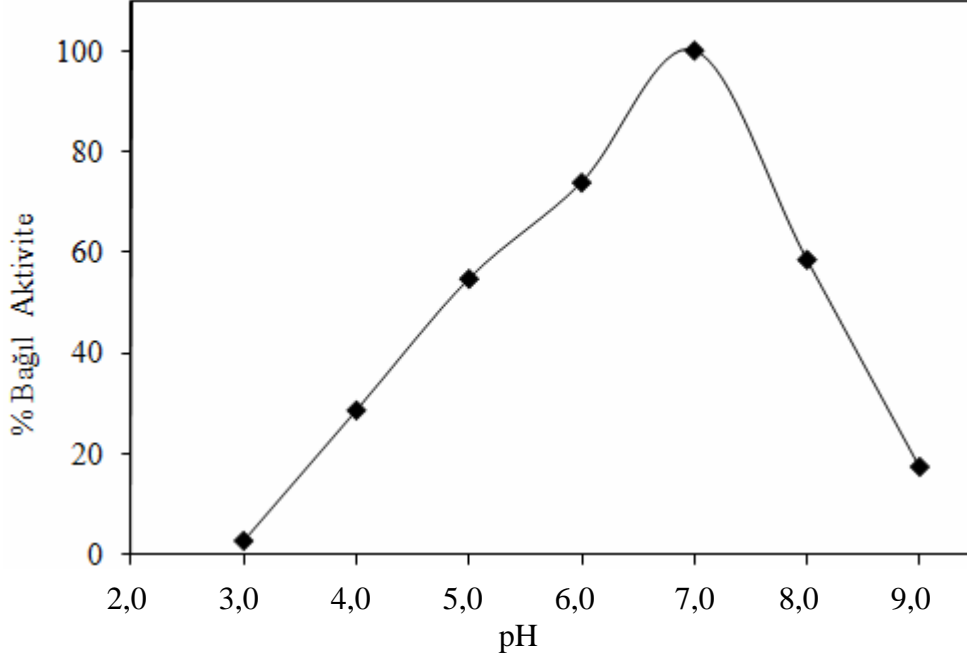
L. piperatus'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO için kullanılan tirozin, PHPPA, katekol, 4-metil katekol, *L*-DOPA ve DHPPA substratları içerisinde, enzim en iyi aktiviteyi katekol varlığında gösterdi. Yapılan tüm biyokimyasal karakterizasyon işlemlerinde substrat olarak katekol kullanıldı.

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

3.3.2.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

L. piperatus PFO'sunun optimum pH değerini belirlemek için, farklı pH değerleri (3,0–9,0) arasında hazırlanan tamponlar kullanılarak, her bir pH'da enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiğinden enzimin en iyi

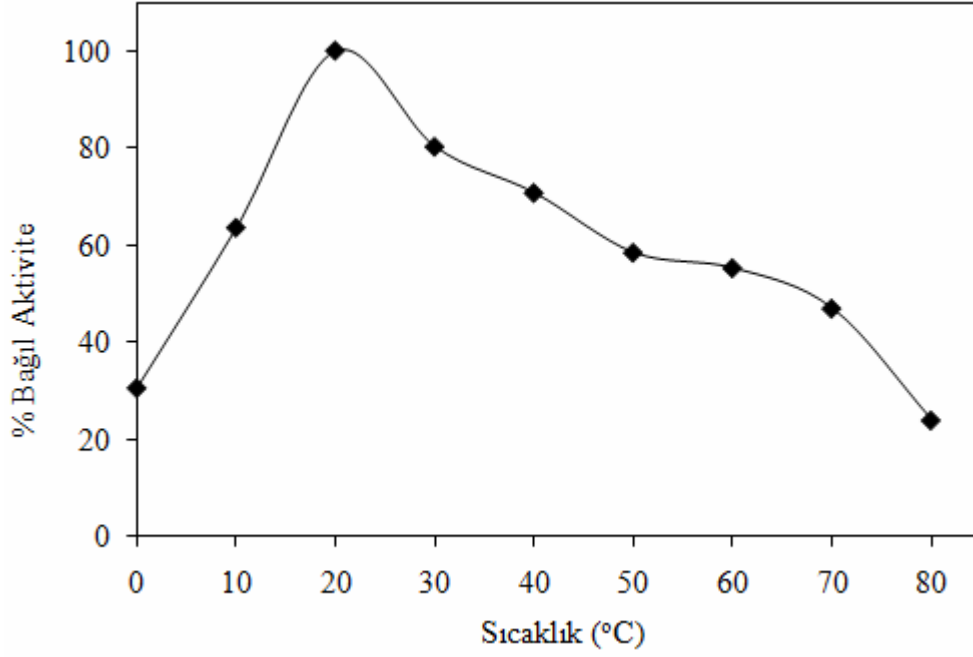
aktivite gösterdiği pH değeri, 7,0 olarak belirlendi (Şekil 12). Grafik göz önünde bulundurulduğunda, pH 6,0'da aktivitenin %70'e yakını korunurken, pH 5,0 ve pH 8,0'de aktivite yaklaşık %60 korunmuştur. pH 3,0, pH 4,0 ve pH 9,0'da ise PFO aktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 12. PFO aktivitesinin pH ile değişimi

3.3.2.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

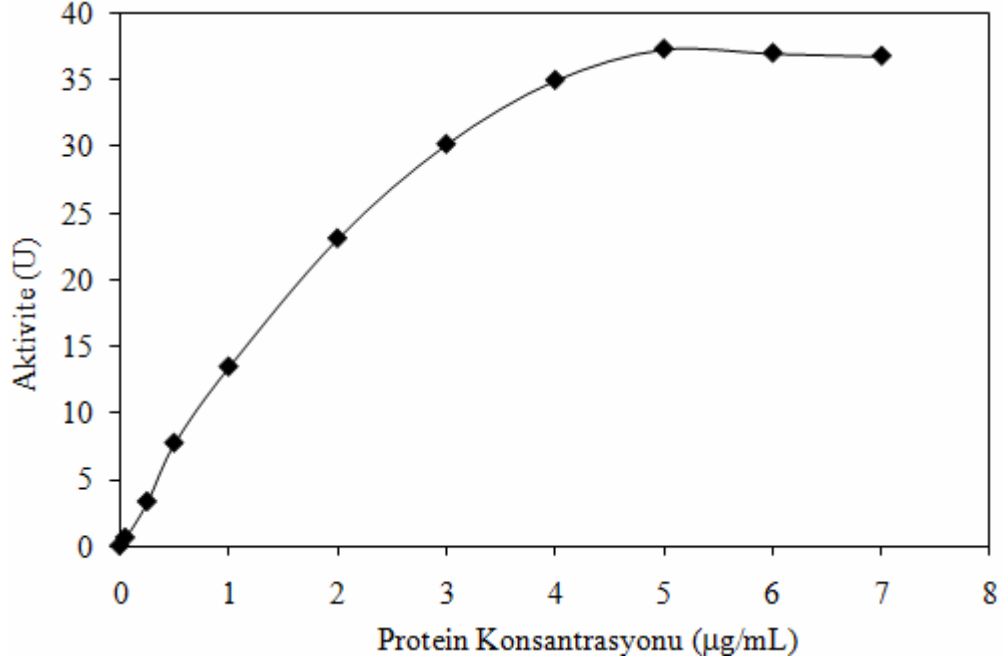
L. piperatus'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun optimum sıcaklık değerini belirlemek için 0-80 °C aralığında 10'ar derece aralıklarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre çizilen, sıcaklık-% bağlı aktivite grafiğine göre, 0-10 °C aralığında enzim aktivitesi %60 civarlarında iken, 20-40 °C aralığında enzim aktivitesini %70' in üzerinde korumuştur. Enzimin en iyi etkinlik gösterdiği sıcaklık değeri 20 °C, PFO için optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir (Şekil 13). 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesi giderek azalmış ve 80 °C 'de enzim aktivitesinin %80'ini kaybetmiştir.



Şekil 13. PFO aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

3.3.2.3. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonun Etkisi

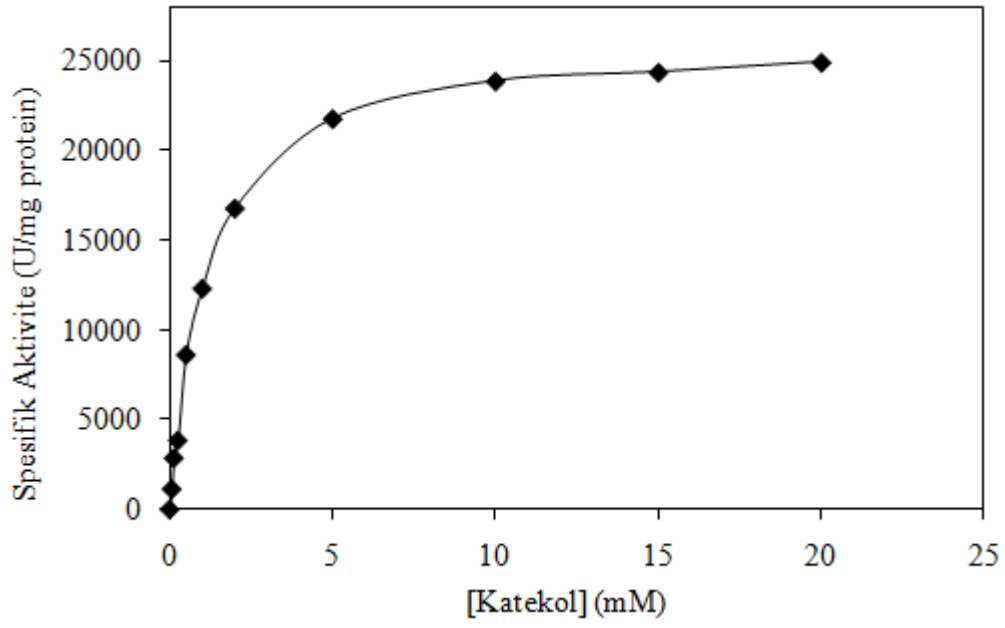
L. piperatus'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO'nun aktivitesi, katekol konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki proteinin 0,05-7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığındaki konsantrasyonuna bağlı değişimi incelendi. Elde edilen hiperbolik eğriden maksimum PFO aktivitesi için optimum enzim konsantrasyonu 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlendi (Şekil 14).



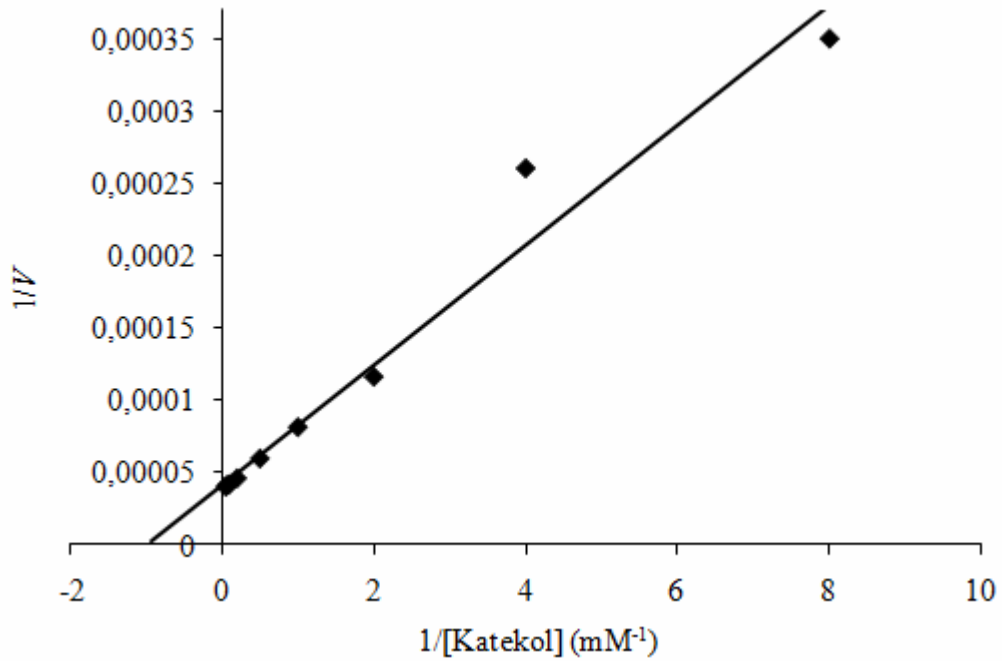
Şekil 14. PFO aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.3.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

L. piperatus'tan afinite kromatografisi ile saflaştırılan PFO' ya ait bazı kinetik verileri belirlemek amacı ile, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0,0625-20 mM aralığında değişen katekol varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi tayin edildi. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrisi çizildi (Şekil 15). Saflaştırılan PFO aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve etkin enzim aktivitesi için katekol konsantrasyonunun 15 mM olması gerektiği tespit edildi. Kinetik verilerin belirlenmesi için ise Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. *L. piperatus* PFO' sunun aktivitesi için katekol substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 25000 U/mg protein ve 1 mM olarak hesaplandı (Şekil 16).



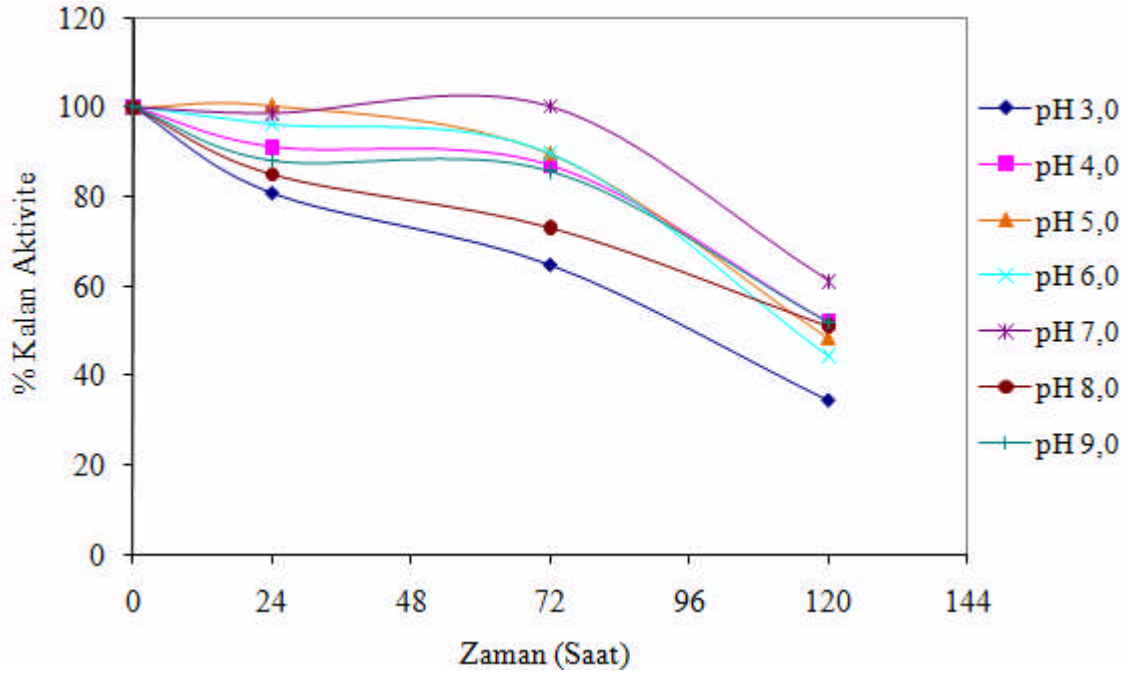
Şekil 15. Katekol varlığında PFO'nun substrat doygunluk eğrisi



Şekil 16. Katekol varlığında PFO aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

3.3.2.5. Polifenol Oksidazın pH Kararlılığı

L. piperatus PFO'sunun pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim pH 3,0-9,0 aralığındaki farklı tamponlar içerisinde, 4 °C'de 24 saat, 72 saat ve 120 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyon uygulanmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi. Şekil 17'de görüldüğü gibi, 24 saatlik inkübasyon sonrasında enzimin pH 5,0-7,0 arasında aktivitesini tamamen koruduğu tespit edilmiştir. 72 saat inkübe edilen enzim optimum pH'sı olan 7,0'de aktivitesinin tamamını korumaya devam ederken, diğer pH değerlerinde aktivitesini %70' in üstünde korumuştur. 120 saatlik inkübasyon sonunda ise enzimin aktivitesini %30-60 arasında değişen değerlerde koruduğu gözlenmiştir.

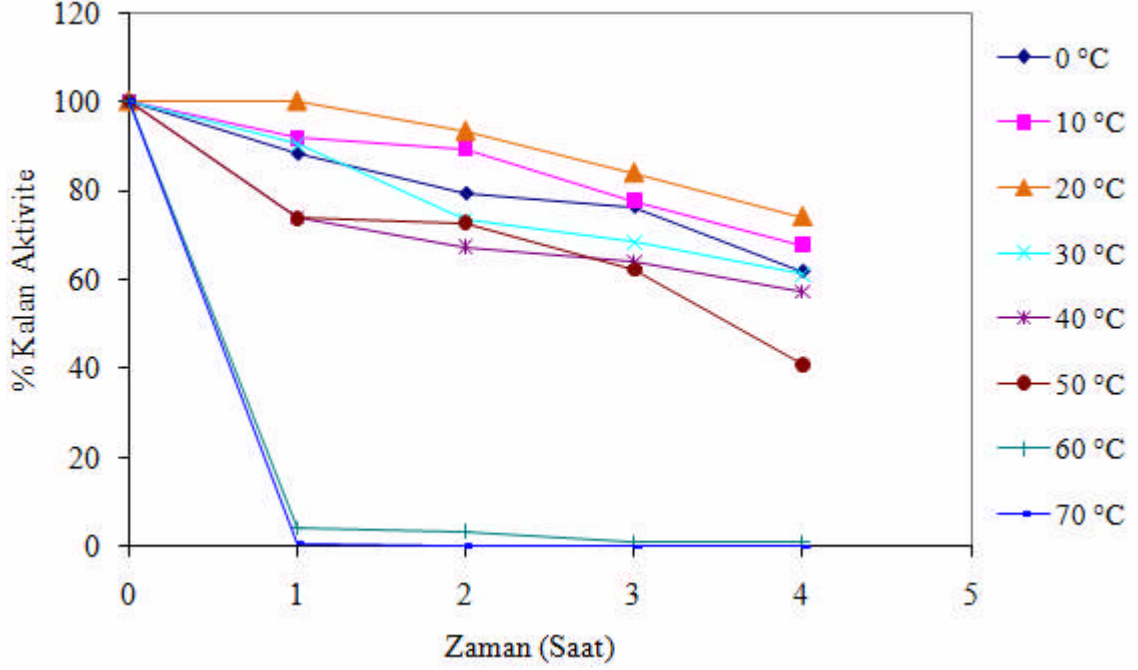


Şekil 17. *L. piperatus* PFO'sunun pH kararlılığı

3.3.2.6. Polifenol Oksidazın Isıl Kararlılığı

L. piperatus'tan saflaştırılan PFO'ya ait ısıl kararlılık profilini belirlemek amacıyla ham enzim elüatınının 0-70 °C aralığında, 10 °C'lik artışlarla 4 saat inkübasyonundan sonraki, katekol substratı varlığında ölçülen aktiviteleri, herhangi bir ön işlem

uygulanmamış saf enzim elüatının optimum şartlarda belirlenen aktivite değeriyle karşılaştırılarak hesaplandı ve tipik bir ısıl kararlılık grafiği çizildi.



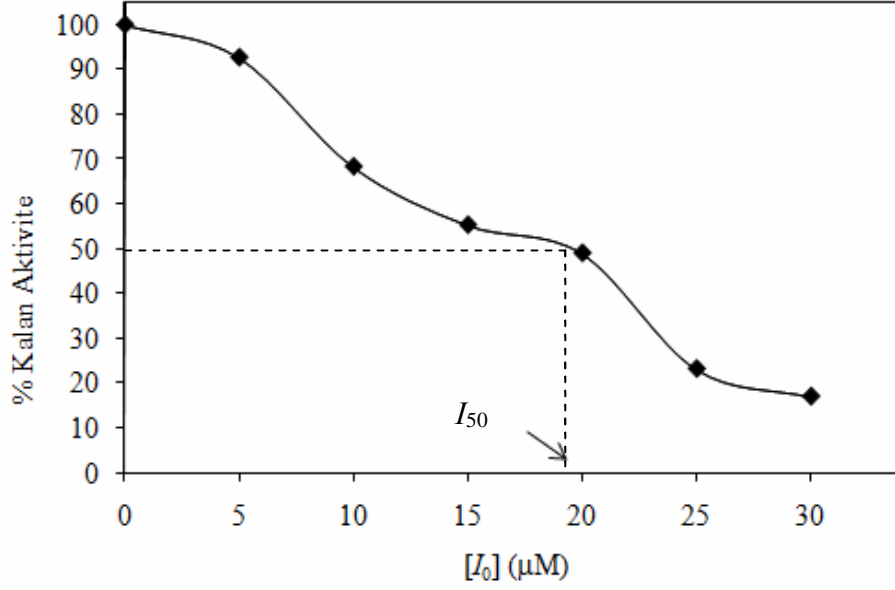
Şekil 18. PFO'nun 4 saat sonunda ısıl kararlılık eğrisi

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla, enzim 0-70 °C aralığında, 10 °C'lik artışlarla 1 saat zaman aralıklarında aktivite ölçmek suretiyle 4 saat inkübe edildi. Elde edilen sonuçlarda, enzimin aktivitesini 0-40 °C aralığında, 4 saat inkübasyon sonunda %60'ın üzerinde koruduğu görülmüştür. 50 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin yaklaşık %70' ini korurken, artan inkübasyon süresinde aktivitesini giderek kaybettiği gözlemlenmiştir. 60°C ve 70°C'de ise, enzim aktivitesi 1 saatlik inkübasyon sonunda %10'un altına düşmüş ve inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 18).

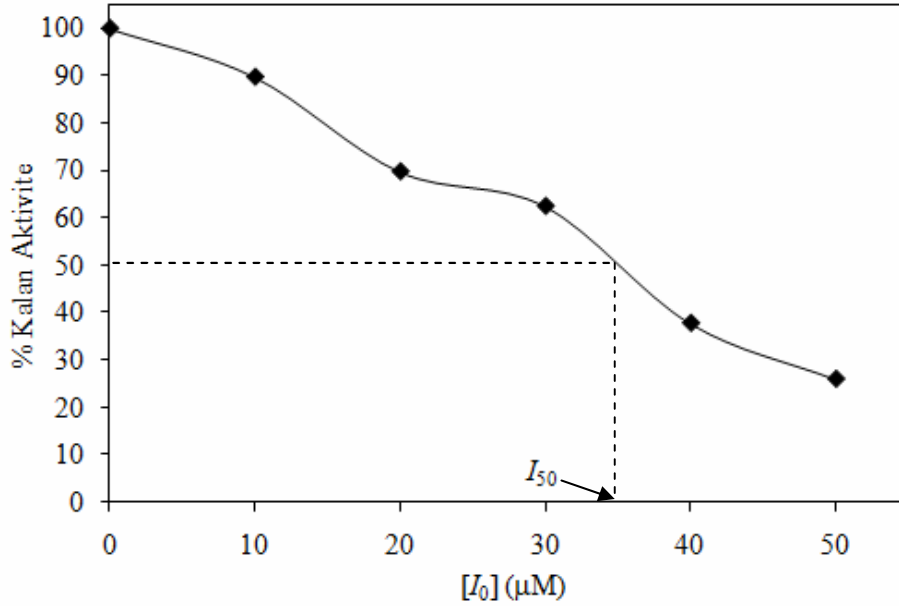
3.3.2.7. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi

L. piperatus'tan saflaştırılan PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisini incelemek için PFO'nun bilinen dört genel inhibitörü kullanıldı. Her bir inhibitörün, inhibitör konsantrasyonuna karşılık enzimin inhibisyon sonrasında % kalan aktivitesi grafiğe

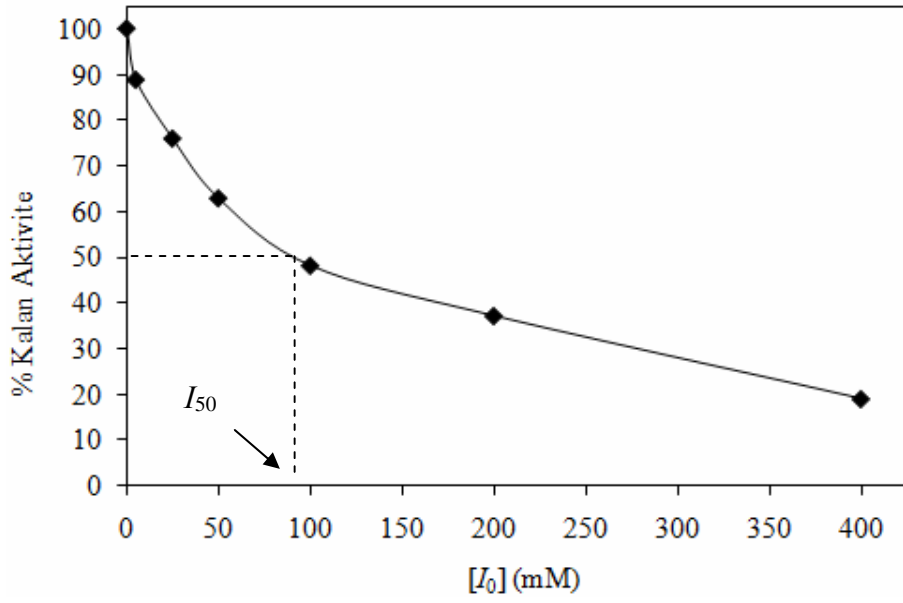
geçirilerek elde edilen eğriden, enzimin %50 aktivitesinin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu I_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 19, 20, 21, 22). Bulunan I_{50} değerleri Tablo 7’de verilmiştir. Her bir inhibitör varlığında gözlenen inhibisyon değerleri, saf PFO’nun inhibitörsüz ortamda elde edilen aktivite değerleriyle karşılaştırıldığında, inhibitörlerin *L. piperatus* PFO’suna karşı oldukça etkili olduğu gözlenmiştir.



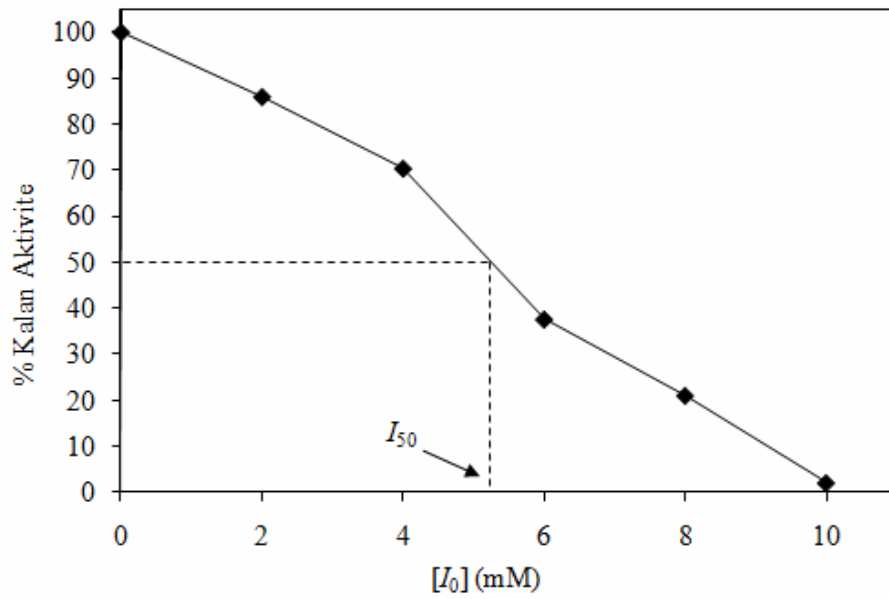
Şekil 19. PFO’nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 20. PFO’nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 21. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi



Şekil 22. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi

Tabo 7. *L. piperatus*' tan saflaştırılan PFO' nun inhibitörlerine ait I_{50} değerleri

İnhibitör	I_{50}
Sodyum metabisülfid	0.035 mM
Askorbik asit	0.019 mM
Sodyum azid	90 mM
Benzoik asit	5.2 mM

3.3.2.8. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

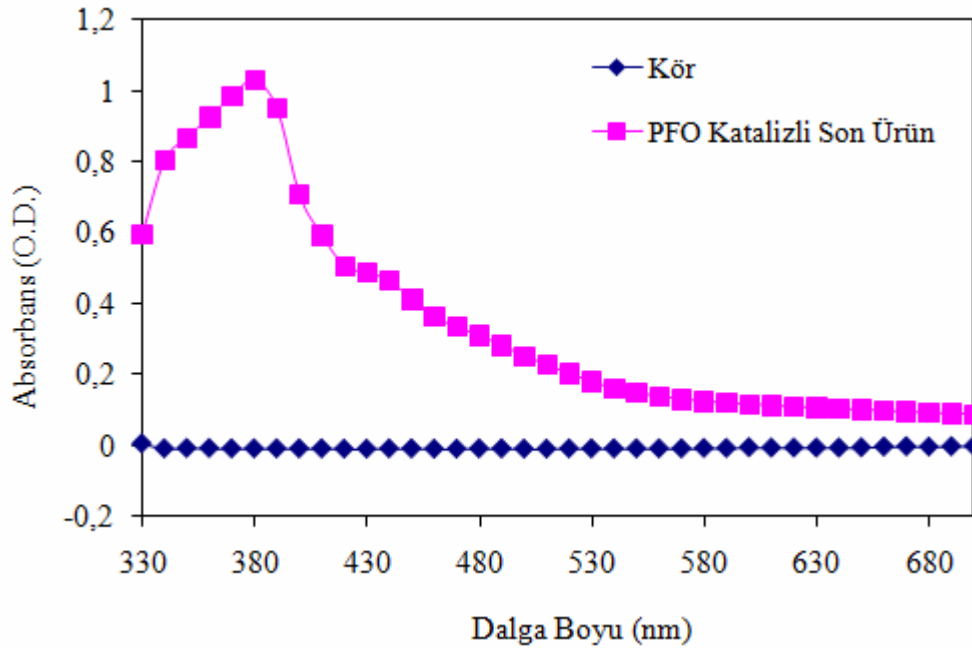
Bazı metal iyonlarının saf *L. piperatus* PFO aktivitesi üzerine etkisini ortaya koymak amacı ile, monovalent Li^+ , Na^+ , K^+ , divalent Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , ve Cr^{2+} ve trivalent olarak da Al^{3+} iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. 1 mM'lık konsantrasyonlardaki metal iyonları varlığında PFO aktivitesindeki değişimler incelendi. Kontrol olarak metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışımdaki PFO aktivitesi %100 kabul edildi (Tablo 8).

Tablo 8. PFO aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

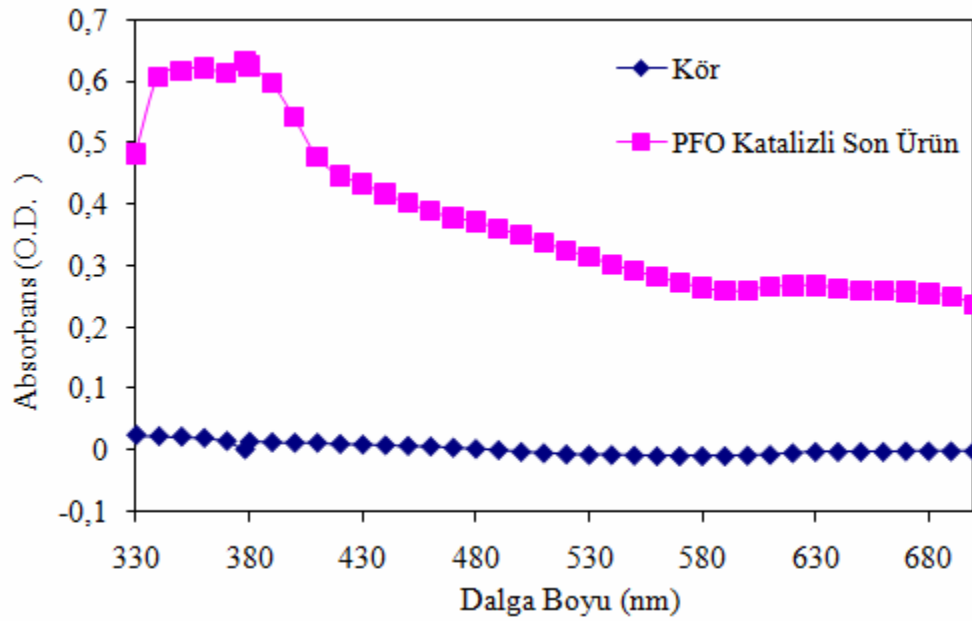
Metal İyonu	% Aktivite	Metal İyonu	% Aktivite
Yok	100	Co^{+2}	114.1
Li^+	98.5	Mn^{2+}	116.9
Na^+	105.8	Cu^{+2}	66.5
K^+	75.6	Cd^{+2}	85.4
Mg^{+2}	91.3	Zn^{+2}	82.8
Ca^{+2}	99.7	Cr^{+2}	110.2
Hg^{+2}	65.5	Al^{+3}	93.6

3.4. Polifenol Oksidazın Bazı Organik Çözücülerdeki Reaksiyon Yatkılığının İncelenmesi

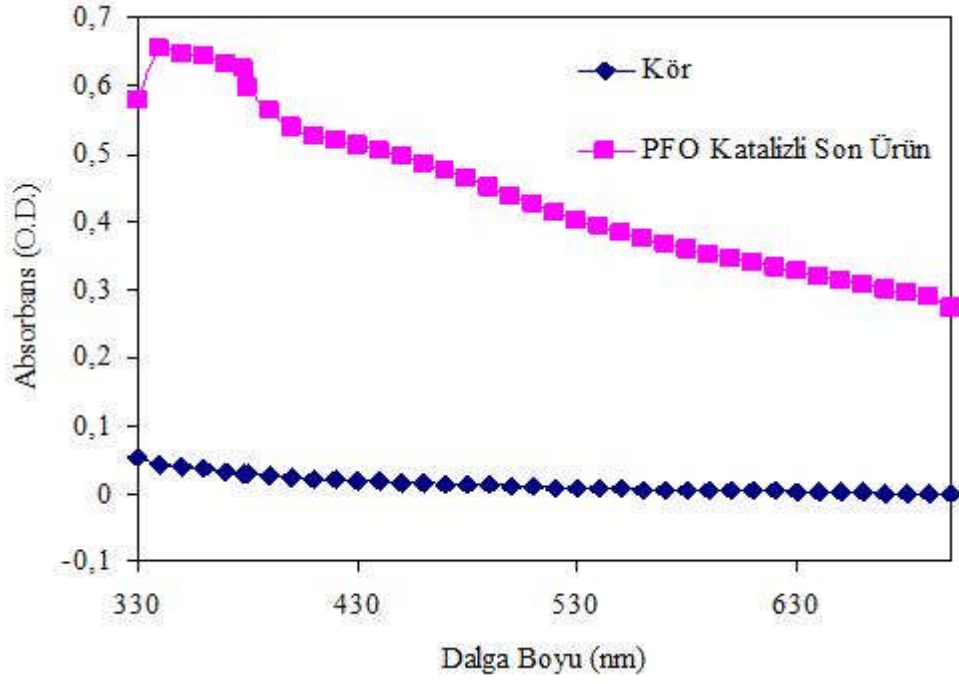
Saf *L. piperatus* PFO'sunun bazı organik çözücülerdeki reaksiyon yatkılığını incelemek amacıyla kateşin substratı kullanılarak, heptan, toluen ve diklorometan gibi organik çözücüler varlığında ürün oluşturması, spektrofotometrik olarak incelendi. Enzimin bulunmadığı reaksiyon karışımı kör olarak kullanıldı ve her bir organik çözücü varlığında hazırlanan körde, 330-700 nm aralığında absorbansta belirgin bir artış gözlenemedi. Enzimin bulunduğu reaksiyon ortamında ise özellikle 350-400 nm aralığında, absorbansta belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, kateşinin ilgili *o*-kinonlara biyodönüşümü için seçilen çözücüler ortamında, saflaştırılan PFO'nun gerekliliğini desteklemektedir.



Şekil 23. Heptan varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği



Şekil 24. Toluen varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği



Şekil 25. Diklorometan varlığında kateşinin ve PFO katalizli son ürünün ilgili pigmentinin spektrofotometrik tarama grafiği

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, *Lactarius piperatus* mantarında, bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PFO'nun varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Bu amaçla; *L. piperatus*'tan 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 ile organik reaksiyonları katalizleyebilme yetkinliği araştırılıp, elde edilen veriler diğer organizmalarda çalışılan PFO'lar ile karşılaştırılmıştır.

Membran proteinlerinin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan TX-114 deterjanıyla (Sanchez-Ferrer vd., 1994; Bricker vd., 2001) PFO, *L. piperatus*'tan çözünürleştirilip ham enzim özütü hazırlanmıştır. Bu özütten PFO, soğuk aseton çöktürmesiyle kısmen saflaştırılmıştır.

Arslan ve çalışma arkadaşlarının (2004) jel 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. piperatus* PFO'sunun, afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ham enzim elüatında enzimin spesifik aktivitesi 1923 U/mg protein iken, afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan PFO'nun spesifik aktivitesi 26667 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, enzim *L. piperatus*'tan 13,9 kat saflaştırılmıştır. Daha önce aynı afinite jeli sentezlenip, yapılan afinite kromatografisi ile PFO'nun dut meyvelerinden 74 kat (Arslan vd., 2004), *Boletus erythropus* mantarından ise 28,5 kat (Özel vd., 2010) saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yine bir afinite jeli olan fenil sepharose kullanılarak yapılan afinite kromatografisinde, Barbados kirazından PFO, 60 kat saflaştırılmıştır (Kumar vd., 2008). Afinite kromatografisinin yanında, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel flitasyon kromatografisi, PFO'nun çeşitli organizmalardan saflaştırılmasında çok yaygın kullanılan tekniklerdir. Taze fasulyenin yeşil kabuğundan iki PFO izoenzimi, Sephadex G-100 kolonu ile 17 kat ve 9,4 kat (Gua vd., 2009), aynı fasulyenin tanelerinden yine iki PFO izoenzimi, DEAE-selüloz kolonu ile 6,6 kat ve 3,8 kat (Gua vd., 2009), İsviçre pazısının yapraklarından PFO, önce sephadex G-75 ve ardından DEAE-Sepharose kolonuyla 39 kat (Gao vd., 2009),

brokoliden PFO, DEAE-Sephadex A-50, ardından Sephadex G-50 ve daha sonra da Sephadex G-100 kolonları ile 47,4 kat (Gawlik-Dziki vd., 2007) saflaştırılmıştır.

Afinite kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra, elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edilmiştir. Hazırlanan %8'lik doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen ham enzim özütünün ve saf enzim elüatının, *L*-DOPA substrat boyaması sonucunda, PFO'nun varlığını gösteren tek bir bant gözlenmiştir. Ayrıca, aynı jel üzerine uygulanan saf enzim elüatında, yapılan coomassie brilliant blue R-250 boyama ile, tek bir protein bandının varlığı ve bu bandın da PFO'ya ait olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 9). Birden fazla PFO izoenzimlerinin varlığı da, daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Bunlardan bazıları, Trabzon hurması (Özen vd., 2004), karayemiş (Colak vd., 2005), *Macrolepiota mastoidea* mantarı (Kolcuoglu vd., 2007), hintyağı ağacı (Wititsuwannakul vd., 2002) şeklindedir.

Ham enzim özütü, saf enzim elüatı ve protein standartları, hazırlanan %8'lik SDS poliakrilamid jeline aynı ayna tatbik edilip yapılan elektroforezde, coomassie brilliant blue R-250 boyama sonucunda, ham enzim özütünde çok sayıda protein bantlarının varlığı gözlenmiştir. Ayrıca, standart proteinlerle karşılaştırıldığında, saf enzim elüatında, yaklaşık 40 kDa'a karşılık gelen bir protein bandı belirlenmiştir (Şekil 11). Ancak saflaştırdığımız enzimin alt birim içerip içermediğine dair kesin bir sonucumuz olmadığı için, elde edilen bu bulgularla, saflaştırılan PFO'nun moleküler ağırlığının kesin olarak 40 kDa olduğunu söyleyemeyiz. İleriki çalışmalarda, HPLC veya jel flitasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak, *L. piperatus*'tan saflaştırılan PFO'nun dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı belirlenebilir.

Çalışmada denenen ve difenolik substratlar olan 4-metilkatekol, katekol, *L*-3,4-dihidroksifenil alanin (*L*-DOPA) ve 3-(3,4-dihidroksifenil)propiyonik asit (DHPPA) *L. piperatus* PFO'su tarafından yükseltgenmiş olmasına rağmen, monofenolik substratlar olan tirozin ve 3-(4-hidroksifenil)propiyonik asit (PHPPA), enzim tarafından yükseltgenememiştir. Bu denemeler sonunda elde edilen bilgiler, enzimin gözlenen aktivitesinin, diğer bazı bitki kaynaklarında gözlenen PFO aktivitelerinde olduğu gibi (Özel vd., 2010; Arslan vd., 2004; Perez-Gilabert ve Carmona, 2000; Beena ve Gowda, 2000; Özen vd., 2004), bir difenolaz aktivitesi olduğunu göstermiştir. *L. piperatus* PFO'sunun, seçilen bu difenolik substratlar arasından, en yüksek aktiviteyi gösterdiği substrat, katekol olarak belirlenmiştir. Fasulye PFO'sunun (Guo vd., 2009), *Macrolepiota mastoidea* mantarı PFO'sunun (Kolcuoğlu vd., 2007), *Portabella* mantarı PFO'sunun

(Zhang ve Flurkey, 1997) ve brokoli PFO'sunun (Gawlik-Dziki vd., 2007) 4-metil katekol ve katekol substratlarına oldukça büyük ilgi duydukları bildirilmiştir.

pH, enzimlerin aktivitelerinin ifadesinde, belirleyici bir faktördür. *L. piperatus* PFO'sunun pH'ya bağımlılığı, 3,0-9,0 pH değerleri arasında incelendiğinde, enzimin asidik ve bazik pH değerlerinde düşük aktivite gösterdiği, nötral pH değerlerinde ise enzimin yüksek aktiviteye sahip olduğu, pH 7,0'de ise enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği ve bu noktada pik oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 12). pH-% bağıl aktivite profilinde tek bir optimum pH'nın gözlenmesi, doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile de belirlendiği gibi, *L. piperatus*'ta tek bir PFO izoformunun olabileceğini desteklemektedir. Benzer sonuç daha önce *B. erythropus*'tan saflaştırılan PFO için de bulunmuş olup, optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenmiştir (Özel vd., 2010). Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda, PFO için optimum pH, İsviçre pazısı yapraklarında 7,5 (Gao vd., 2009), dutta 5,0 (Arslan vd., 2004), ahudududa 8,0 (Gonzales vd., 1999) ve Anamur muzunda 7,0 (Ünal, 2007) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *L. piperatus* difenolazının, önceden bildirilen difenolazlarla, pH optimumu açısından uygunluk gösterdiği görülmektedir.

L. piperatus PFO'sunun aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 0-80 °C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin optimum sıcaklığı 20 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 13). Enzim aktivitesi 30 °C'de %80, 40 °C'de ise %70 korunmuştur. 50 °C ve üzeri sıcaklıklarda, enzim aktivitesi giderek azalmış ve 80 °C'de ise enzim, aktivitesinin %80'ini kaybetmiştir. Farklı kaynaklarda PFO'nun optimum sıcaklıkları *B. erythropus* mantarında (Özel vd., 2010), kara dutta (Colak vd., 2007) ve şeftalide *L. piperatus*'taki gibi 20 °C (Mihalyi vd., 1978), patlıcanda 30 °C (Concellon vd., 2004), çilekte 50 °C (Serradell vd., 2000), *Thermomicrobium roseum* bakterisinde 50 °C (Kong vd., 2000) olarak bildirilmiştir.

L. piperatus PFO'su, farklı pH değerlerinde 4 °C'de, 24 saat, 72 saat ve 120 saat inkübasyona maruz bırakılıp kalan aktiviteye bakıldığında, 72. saatin sonunda, enzimin aktivitesini pH 4,0-9,0 aralığında %70'in üzerinde ve bu süre sonunda, optimum pH'da enzimin hemen hemen %100 aktivitesini koruduğu görülmüştür. Dolayısıyla, *L. piperatus* PFO'sunun sahip olduğu difenolaz aktivitesi açısından, yüksek pH kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 17). Enzim, 4 °C'de 120 saat inkübe edildikten sonra, optimum pH'da aktivitesini %60 civarında korurken, diğer pH değerlerinde aktivitesini önemli ölçüde kaybettiği gözlenmiştir. 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). Muzdan saflaştırılan PFO'nun, pH 5,0-11,0 değerleri arasında, 4 °C'de 48 saat inkübasyonu sonunda aktivitesini %90'ın üzerinde koruduğu gözlenmiştir (Yang vd., 2000).

L. piperatus PFO'sunun, ısı kararlılığı incelenmek üzere, 0-70 °C aralığında, saatte bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam 4 saatlik inkübasyonu sonunda kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 18). Elde edilen verilere göre, optimum sıcaklık olan 20 °C'de, 1 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesini tamamen korumuştur. 4 saatlik inkübasyon sonunda ise enzimin hala %70'in üzerinde aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. 0-50 °C aralığında, 3 saatlik inkübasyon sonunda, enzim aktivitesinin, %60'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir. 60 °C ve 70 °C'de ise, 1 saatlik inkübasyondan itibaren enzim aktivitesi hemen hemen tamamen kaybetmiştir. Guo ve arkadaşları tarafından (2009), yeşil fasulye tanelerinden saflaştırılan PFO'nun, 0-40 °C aralığında, 30 dakikalık inkübasyon sonunda oldukça kararlı olduğu ve aktivitesini hemen hemen tamamen koruduğu bildirilmiştir. Isıl kararlılığın kullanılan enzim kaynağına göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir. Bazı araştırmacılar, bitki PFO'larının 20 °C ve 40 °C arasında kararlı olduğunu ortaya koymuştur (Arslan vd., 1997; Aydemir, 2004; Gawlik-Dziki vd., 2008). Muz PFO'sunda olduğu gibi (60 °C), daha yüksek sıcaklıklarda, yüksek ısı kararlılığına sahip PFO'ların varlığı da bildirilmiştir (Yang vd., 2000). Verilen bu bilgiler doğrultusunda, *L. piperatus* PFO'sunun, 0-50 °C aralığında 4 saatlik inkübasyonu sonucunda, ısı kararlılığının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ise, enzimin aktivitesindeki düşmeler, sıcaklığın etkisi ile, enzimin tersiyer yapısında negatif değişmelerin olmasından kaynaklanabilmektedir (Jiang, 1999; Arslan vd., 1997; Özel vd., 2010).

L. piperatus PFO'sunun aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, 5 µg/mL'lik protein içeriğine kadar, PFO aktivitesinin arttığı, daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, PFO aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Şekil 14). Sonuç olarak, optimum enzim konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra, difenolün oksidasyon hızının, enzim miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir.

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak, değişen substrat konsantrasyonlarında çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, *L. piperatus* PFO'sunun basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görülmüştür (Şekil 15). Çizilen bu grafikten yararlanılarak,

enzimin optimum substrat konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiştir. 10 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda, hızının değişmediği saptanmıştır. Enzimin, difenolik substratı katekol varlığındaki kinetik verileri olan Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri, çizilen Lineaweaver-Burk grafiğinden sırasıyla, 1,0 mM ve 25000 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 16). Daha önce yapılan çalışmalarda, PFO aktivitesi için K_m değerleri, *B. erythropus* mantarında 2,8 mM, Amasya elmasında 3,1 mM (Dogan ve Dogan, 2004), Barbados kirazında 5,2 mM (Kumar vd., 2008), *Portabella* mantarında 2,1 mM (Xiaodong ve Flurkey, 1997) ve çakşır otu saplarında 6,78 mM (Erat vd., 2006) olduğu bildirilmiştir.

Bitkilerde enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla, literatürde araştırmacılar tarafından kullanılan birçok inhibitör vardır (Dogan ve Dogan, 2004; Şakiroğlu vd., 1996; Yang vd., 2001). Mantarların olgunlaşması ve işlenmesi esnasında, mantar endüstrisinde de ciddi ekonomik kayıplara yol açan, enzimatik esmerleşmenin önlenmesi için, en sık başvurulan yol, inhibitörlerin kullanımudur. Bu çalışmada da, bir çok bitki PFO'su için inhibitör olarak denenilen, askorbik asit, sodyummetabisülfid, sodyum azid ve benzoik asit denenmiş ve her bir inhibitör için belirlenen I_{50} değerleri Tablo 7 verilmiştir. Elde edilen veriler, kullanılan inhibitörler arasında, enzimin en etkili inhibitörünün askorbik asit ve bunu takiben de sodyummetabisülfid olduğu görülmüştür. Askorbik asitin 0,030 mM konsantrasyonunda, enzimin hemen hemen tamamen inhibe olduğu görülmüştür (Şekil 19). Askorbik asidin etkili inhibisyonu, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Özel vd., 2010; Gao vd., 2009; Colak vd., 2005; Paul ve Gowda, 2000; Aydemir, 2004). Askorbik asit, ortamda bulunan oksijenle daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğinden, enzim aktivitesini azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Ros vd., 1993). Daha çok bir antioksidan olarak etki eden askorbat, esmerleşmeye neden olan pigmentlerin oluşmasına izin vermeden, PFO tarafından difenolden oluşturulan kinonu indirger (Aydemir, 2004). Bir diğer inhibitör olan sodyummetabisülfidin de etkili bir inhibisyon yaptığı ve 0,050 mM konsantrasyonunda, enzim aktivitesini %75 inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 20). Sodyummetabisülfidin gözlenen etkili inhibisyonu, daha önce belirtildiği gibi, tiol bileşiklerinin PFO'lar için etkili inhibitörler olduklarını desteklemektedir (Friedman ve Bautista, 1995; Ding vd., 1998; Yang vd., 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). PFO aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından, Na^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Cr^{2+} 'un enzim aktivitesini %5-17 değerleri arasında arttırdığı, Li^+ , Ca^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı, K^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 'un aktiviteyi inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 8). Bu çalışmada denenen metal iyonlarının, PFO aktivitesi üzerine yapmış oldukları etkiler, daha önce bildirilen bazı metal iyonlarının *Macrolepiota mastoidea* PFO'su (Kolcuoğlu vd., 2007) ve muz PFO'su (Yang vd., 2000) üzerine yapmış oldukları etkiler ile benzerdir. Aktivasyona veya inhibisyona sebep olma gibi durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu, enzimin yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabilir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001).

Enzimlerin organik çözücüler ortamında biyokatalizör olarak kullanımı, endüstride potansiyel uygulama alanlarından dolayı, birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir (Tse vd., 1997). PFO'nun sulu ortamda biyokatalizör olarak kullanımı, oluşan kinonların polimerleşmesi ve bu polimerlerin de enzimi inaktive etmesi nedeniyle sınırlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, organik çözücü ortamında PFO'nun *o*-kinon polimerizasyonunu sınırlandırdığı ve böylece doğal kararlı pigmentlerin oluşturulduğu bildirilmiştir (Estrada vd., 1991; Kermasha vd., 2001). Organik çözücülerin kullanılmasının diğer avantajları ise, tersinin birçok reaksiyonda eşitliğin arzu edilen ürünün oluşturulması yönüne olduğu ve enzimin organik çözücülerde sınırlı çözünürlülüğünden dolayı, yeniden geri kazanımının ve aktivitesini kazanmasının daha kolay olmasıdır (Kermasha vd., 2002). Bütün bunlar dikkate alınarak yapılan çalışmada, heptan, toluen ve diklorometan organik çözücüler ortamında, kateşinin enzimatik oksidasyonu ile oluşan renkli bileşiklerin, spektrofotometrik tarama grafikleri Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25'de görülmektedir. Elde edilen bu grafiklere göre, her bir çözücü ortamında, enzimin kullanılmadığı reaksiyon karışımının spektrofotometrik taraması sonucunda, absorbansın hemen hemen sıfır civarında ve neredeyse hiç değişmediği belirlenmiştir. Her bir çözücü ortamında, enzimin bulunduğu reaksiyon karışımlarının spektrofotometrik taramasında ise, özellikle 350-400 nm aralığında, absorbansta belirgin bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, kateşinin ilgili kinonlara biyodönüşümünün, saflaştırılan PFO ile gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Elde edilen bu bulgular, daha önce bu konu ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlarla (Özel vd., 2010; Tse vd., 1997; Kermasha vd., 2001) uyum içindedir.

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

5. ÖNERİLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yüksek saflıkta ürün oluşumunu sağlayan biyokatalizörlerdir. Bu nedenle enzimler birçok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlüğü olan enzimlerin kullanımının artması, değişik kaynaklardan yeni enzimlerin keşfine olan ilgiyi de artırmıştır.

Polifenol oksidaz'ın meyve ve sebzelerde 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 ve sebze 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 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.

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. Ticari olarak sentezlenmesi oldukça güç olan ve toksik maddeler kullanılmadan elde edilen fenolik bileşiklerin fonksiyonel polimerlerinin PFO ile sentezi, bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli tehlikeler oluşturan fenolik bileşiklerin, atık sularla kirlenen akarsularda ve bunlarla sulanan topraklarda varlığını tespit etmek amacıyla, çevreye ekstra kirlilik vermeyen ve oldukça hassas olan biyosensörlerin, mantar PFO'sunun immobilize edilmesiyle kullanımı oldukça ilgi çekicidir.

Çok geniş bir uygulama alanına sahip olmasından dolayı, şüphesiz bu enzimin saflaştırılması ve ondan sonra uygun işlemlerle endüstride kullanılabilir hale sokulmasını kaçınılmaz kılmaktadır. Bu açıdan önemli olan PFO enzimi de değişik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi de PFO'nun saflaştırılması için uygulanan metotlardan biridir. Bu teknikle, saflaştırma, kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir. Bu nedenle, PFO için afinite kromatografisinde kullanılabilecek alternatif afinite jelleri sentezlenebilir. Ayrıca, ileriki

çalışmalarda, *Lactarius piperatus*'tan saflaştırılan PFO'nun, altbirim içerip içermediği ve böylece dördüncül yapısı ile toplam molekül ağırlığının belirlenebilmesi için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi veya jel flitrasyon kromatografisi teknikleri uygulanabilir. Çeşitli kimyasal maddeler varlığındaki saflaştırılan PFO'nun davranışları incelenerek, yeni inhibitörlerin araştırılması ve bu inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir Şekilde ortaya konulması, özellikle gıda sektörü için önemli yararlar sağlayacaktır.

L. piperatus gibi mantarların yüksek antioksidan özelliğe sahip olması sebebiyle, bu mantarlara olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle, bu mantarın kültürünün yapılabilirliği incelenebileceği gibi, bu organizmada monofenolaz ve difenolaz enzimini kodlayan genin belirlenip, uygun bir organizmaya klonlanarak ileri derecede ekspres edilmesi sağlanabilir, böylece enzimin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi sağlanabilir.

6. KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa, Germany.
- Arslan, O., Erzen, 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.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, I., 1998. Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1239-1241.
- Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, İ., 1997. Polyphenol oxidase from *Allium* sp., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1091-1096.
- Augustin, N.A., Hasanah, M.G ve Hasimah, H., 1985. Polyphenol oxidase from guava (*Psidium guajava* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture. 36, 1259-1265.
- 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.
- Boztok, K., 1990. Mantar üretimi tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir,
- Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. ve O'Conner, K. E., 2004. Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 486-492.
- Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F., 1994. Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates, Biochimica et Biophysica Acta, 917, 190-197.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:24, Ankara.
- 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., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation, Food Chemistry, 90, 801-807.

- Concellon, A., Anon, M. C. ve Chaves, A. R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature, Food Chemistry, 88, 17-24.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae), Food Chemistry, 77, 1-7.
- Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Imahori, Y., 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4144-4149.
- Dogan, S. ve Dogan, M., 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), Food Chemistry, 88, 69-77.
- Dry, I. B. ve Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase, Plant Molecular Biology, 26, 495-502.
- Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Kolande, J. E. ve Robson, J. R. K., 1995. The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition, CRC Pres, Boca Raton, LA.
- Erat, M., Sakiroglu, H. ve Kufrevioglu, O. I., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp., Food Chemistry, 95, 503-508.
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Analytical Biochemistry, 43, 2807-2812.
- Espin, J. C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1084-1090.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A. ve Wichers, H. J., 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1187-1193.
- Esterbauer, H., Schwarzl, E. ve Hayn, M., 1977. A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid, Analytical Biochemistry, 72, 643.
- Estrada, P., Sanchez-Muniz, R., Acebal, C., Arche, R. ve Castillon, M. P., 1991. Characterization and optimization of immobilized polyphenol oxidase in low-water organic solvents, Biotechnology and Applied Biochemistry, 14, 12-20.
- Fenton, D.E., 1995, Dioxygen management-involvement in enzymes Biocoordination Chemistry, Oxford Science Publications, Oxford, Great Britan, 52-53.

- Friedman, M. ve Bautista, F. F., 1995. Inhibition of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 69-76.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 631-653.
- Fujita, S. ve Tono, T., 1988. Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*), Journal of the Science of Food and Agriculture, 46, 115-123.
- Fujita, S., Tono, T. ve Kawahara, H., 1991. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*), Journal of the Science of Food and Agriculture, 55, 643-651.
- Galeazzi, M. A. M. ve Sgarbieri, V. C. J., 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.), Journal of Food Science, 46, 1404-1406.
- Gao, Z., Han, X. ve Xiao, X., 2009. Purification and characterization of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves, Food Chemistry, 117, 342-348.
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U. ve Baraniak, B., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets, Food Chemistry, 105, 1047-1053.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Industrial Enzymology. Stockton Pres, NewYork.
- Gonzales, E. M., Ancos, B. ve Cano, M. P., 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4068.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. ve Xue, S., 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Food Chemistry, 117, 143-151.
- Haas, H., 1969. The Young Specialist looks at Fungi. Burke, 74, ISBN 0-222-79409-7.
- Jiang, Y. M., 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit., Food Chemistry, 66, 75-79.
- Kermasha, S., Bao, H. ve Bisakowski, B., 2001. Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media, Journal of Molecular Catalysis, 11, 929-938.
- Kermasha, S., Bao, H., Bisakowski, B. and Yaylayan, V., 2002. Characterization of the biocatalysis of tyrosinase in selected organic solvent media using model phenolic substrates, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19-20, 335-345.

- Khan, V. ve Pomerantz, S.H., 1980. Monophenolase Activity of Avocado Polyphenol Oxidase, Phytochemistry, 19, 379-385.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), Food Chemistry, 101, 778-785.
- Kong, K. H., Hong, M. P., Choi, S. S., Kim, Y. T. ve Cho, S. H., 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 113-118.
- Kumar, V. B. A., Mohan, T. C. K. ve Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase of 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.
- Laurila, E., Kervinen, R. ve Ahvenainen, R., 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits, Postharvest News and Information, 9, 53.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C., Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods.
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>,
03 Ocak 2010.
- Mayer, A. M., Harel, E. ve Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods, Phytochemistry, 5, 783.
- Mazzafera, P. ve Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee, Phytochemistry, 55, 285-296.
- Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo, L., Kiss-Kutz, N. ve Babos-Szbenly, E., 1978. The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 7, 57.
- Muchuweti, M., Mupure, C. H., Ndhlala, A. R. ve Kasiyamhuru, A., 2006. Characterization of Polyphenoloxidase from *Uapaca kirkiana* Fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86, 328-332.

- Murugkar, D. ve Subbulaskhmi, G., 2004. Nutritional value of edible mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. Food Chemistry, 89, 599-603.
- Owen R., 1996, Fennema, Food Chemistry, 3rd Edition.
- 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.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B. ve Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae, Food Chemistry, 85, 431-437.
- Özkaragöz, K., 1978. Alerji Hastalıkları Kitabı, Emek Matbaası, Ankara.
- 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.
- Pegler, D.N. 1983. Mushrooms and Toadstools. London: Mitchell Beazley Publishing. pp. 77. ISBN 0855335009.
- Pekyardımcı, Ş., 1992. Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları, Gıda, 17, 181.
- Perez-Gilabert, M. ve Garcia-Carmona, F., 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 695-700.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J. ve Dawlwy, R., 1994. Tyrosinase, laccase and peroxidase in mushroom. Journal of Food Science, 59,4.
- Rathjen, A.H. ve Robinson, S.P., 1992. Abberant processing of polyphenol oxidase in a varited grapevin mutant. Plant Phsiology, 99, 1619-1625.
- Riggin, R. M., McCarthy, M. J. ve Kissenger, P. T., 1976. Identification of salsolinol as a major dopamin metabolite in the banana, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 189-191.
- Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J. ve Garcia-Canovas, F., 1994. A continuous spectrophotometric method fort he determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone, Analytical Biochemistry, 216, 205-212.
- Ros, J. R., Rodriguez-Lopez, J. N. ve Garcia-Canovas, F., 1993. Effect of ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase, Biochemical Journal, 295, 309-312.
- Siegbahn, P. E. M., 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 8, 567-576.

- Serradell, M. A., Rozenfeld, P. A., Martinez, G. A., Civello, P. M., Chaves, A. V. ve Anon, M. C., 2000. Polyphenol oxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1421-1427.
- Sojo, M. M., Nuez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. ve Sanchez-Ferrer, A., 1988. Partial purification of banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8,000 for removal of polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4924-4930.
- Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Oktay, M. ve Onganer, Y., 1996. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) Polyphenol Oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 2982-2986.
- Tono, T., Fujita, S., Kawasaki, H. ve Li, Z. F., 1986. Purification and high *L*-epicatechin oxidase activity in polyphenol oxidase of Japanese pear, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 60, 705-712.
- Tse, M., Kermasha, S. ve Ismail, A., 1997. Biocatalysis by tyrosinase in organic solvent media; a model system using catechin and vanillin as substrates, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2, 199-213.
- URL-1, <http://www.geocities.com/rainforest/andes/8046/structure.html> Structure of a Mushroom, 18 Aralık 2009.
- URL-2, <http://www.food-info.net/tr/colour/maillard.htm> Maillard Reaksiyonları, 5 Ocak 2010
- Ünal, M. Ü., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*), Food Chemistry, 100, 909-913.
- Whitaker, J. R., 1972. Principles of enzymology for the food sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York.
- Whitaker, J. R. ve Lee, C. Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. Enzymatic Browning and Its Prevention, C. Y. Lee ve J. R. Whitaker, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, DC, 2-7.
- Wititsuwannakul, D., Chareonthiphakornb, N., Pscec, M. ve Wititsuwannakul, R., 2004. Polyphenol oxidase from latex of Hevea brasiliensis: Prufication and characterisation, Phytochemistry, 61, 115-121.
- Xiaodong, Z. ve Flurkey, W. H., 1997. Phenoloxidases in *Portabella* Mushrooms, Journal of Food Science, 62, 97-100.
- Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusaboyashi, A., Ashafuzzaman, M. A. ve Hayashi, N., 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel, Journal of Agricultural Chemistry, 49, 1446-1449.

- Yang, C. P., Fujita, S., Kohno, K., Kusaboyashi, A., Ashafuzzaman, M. A. ve Hayashi, N., 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel, Journal of Agricultural Chemistry, 49, 1446-1449.
- Yang, C. P., Shuji, F., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N. ve Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp, Journal of Agricultural Chemistry, 48, 2732-2735.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. ve Beldüz, A. O., 2005. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* strains K1 and K4^T, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 501-507.
- Zhang, X. ve Flurkey, W. H., 1997. Phenoloxidases in *Portabella* Mushrooms, Journal of Food Science, 62, 97-100.
- Zhao, J.G., Xiao, H.H. ve Xing, G.X., 2009. State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Haidian District, Beijing 100193, China.
- Zhou, H. ve Feng, X., 1991. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*), Journal of the Science Food and Agriculture, 57, 307-313.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kırklareli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kırklareli’de tamamladı. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı ve 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. İyi derece İngilizce bilmektedir.