

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN YÖRESİNDE YETİŞEN YENİLEBİLİR KANLICA MANTARINDAN
(*Lactarius salmonicolor*) TİROZİN AZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

BETÜL YILMAZOĞLU
OCAK 2017

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

Prof. Dr. Başak TAŞELİ

...../...../.....

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak KİMYA Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Birsen Şengül OKSAL



Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

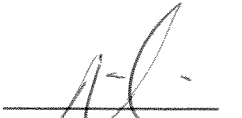

Danışman


Jüri Üyeleri


Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Doç. Dr. Nurhan GÜMRÜKÇÜOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Tamer AKKAN







ÖZET

GİRESUN YÖRESİNDE YETİŞEN YENİLEBİLİR KANLICA MANTARINDAN (*Lactarius salmonicolor*) TİROZİNAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YILMAZOĞLU, Betül

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Ocak 2017, 71 sayfa

Bu çalışmada, Giresun İli ve çevresinde bol miktarda yetişen Kanlıca (*Lactarius salmonicolor*) mantarından tirozinaz enzimi ilk defa saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi.

Optimum pH ve sıcaklık değerleri, pH ve sıcaklık stabilitesi, optimum reaksiyon süresi, optimum reaksiyon süresinin tayini, uygun enzim ve substrat konsantrasyonu belirlendi. Kanlıca mantarından saflaştırılan tirozinazın optimum pH'sının 6,0; optimum sıcaklığının 40°C olduğu bulundu.

SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu.

L. salmonicolor tirozinaz enziminin optimum pH ve sıcaklıkta L-tirozin substratı için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kanlıca Mantarı (*Lactarius salmonicolor*), Tirozinaz, Saflaştırma, Karakterizasyon.

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TYROSINASE ENZYME FROM THE EDIBLE KANLICA MUSHROOMS (*Lactarius salmonicolor*)

YILMAZOĞLU, Betül

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

January 2017, 71 pages

In this study, Giresun Province and around plenty of grown Kanlıca (*Lactarius salmonicolor*) from mushroom tyrosinase enzyme was purified for the first time and examined the kinetic properties.

Optimum pH and temperature, pH and temperature stability, optimum reaction time, determining the optimum reaction time was the appropriate enzyme and substrate concentrations. The optimum pH of the purified tyrosinase from mushroom Kanlıca 6.0 was found to be optimal at 40°C.

The purified enzyme, which showed SDS-PAGE, had a molecular weight of 30 kDa.

The K_m and V_{max} values of *L. salmonicolor* tyrosinase toward were determined by Lineweaver Burk method.

Key Words: Kanlıca Mushroom (*Lactarius salmonicolor*), Tyrosinase, Purification, Characterization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarda yardımcı olan değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Tamer AKKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kanlıca mantarının teşhisini yapan Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca cihaz kullanımı ve bilgileri konusunda deneyim ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Kimyager Rıdvan İLGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım annem Habibe YILMAZOĞLU ve canım babam Rifai YILMAZOĞLU'na en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, **Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Biriminin FEN-BAP-C-200515-15** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	1
1.1.2.Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler.....	2
1.1.2.1. Enzim Konsantrasyonu.....	3
1.1.2.2. Substrat Konsantrasyonu.....	3
1.1.2.3. Sıcaklık.....	4
1.1.2.4. Ortam pH'ı.....	5
1.1.2.5. Reaksiyon Ürünleri.....	5
1.1.2.6. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler.....	5
1.1.2.7. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler.....	5
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi.....	6
1.2.1. Kanlıca Mantarı ve Özellikleri.....	8
1.2.2. Kanlıca Mantarı (<i>Lactarius salmonicolor</i>)'un Morfolojik Özellikleri..	8
1.2.3. Kanlıca Mantarı (<i>Lactarius salmonicolor</i>)'un Yetiştığı Bölgeler.....	9
1.2.4. Mantarlar ve İnsan Sağlığı.....	10
1.3. Tirozinaz Enziminin Biyokimyası.....	11
1.3.1. Tirozinaz'ın Adlandırılması.....	11
1.3.2. Tirozinaz'ın Doğadaki Dağılımı.....	13
1.3.3. Tirozinaz'ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları.....	13
1.3.4. Tirozinaz'ın Substratları.....	14
1.3.5. Enzimatik Kararma.....	15
1.3.6. Tirozinaz İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi.....	16
1.3.7. Tirozinazın Saflaştırılması	17

1.3.8. Bulunduğu Yerler Ve Önemi.....	19
1.3.9. Biyolojik İşlev ve Tirozinazın Dağılımı.....	20
1.3.10. Tirozinazların Endüstriyel Uygulamaları.....	20
1.3.11. Tirozinaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar.....	21
1.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	22
1.4.1. İlgili Literatür Işığında Projenin Yeri.....	22
2. MATERYAL VE METOD.....	25
2.1. Materyal.....	25
2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	25
2.1.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	25
2.2. Metod.....	26
2.2.1. Kanlıca Mantarı Ham Ekstresinin Hazırlanması.....	26
2.2.2. Kanlıca Mantarı (<i>Lactarius salmonicolor</i>) Ham Ekstresinde Tirozinazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması.....	26
2.2.3. Kanlıca Mantarının Ham Ekstresinde Tirozinazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi.....	27
2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi.....	28
2.2.4.1. DEAE-Selülozun Hazırlanması.....	28
2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi.....	28
2.2.5. Protein Miktar Tayini.....	29
2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	29
2.2.6.1. Deneyin Yapılışı.....	29
2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi.....	29
2.2.7. E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	30
2.2.8. Tirozinaz Aktivitesinin Tayini.....	31
2.2.8.1. Deneyin Yapılışı.....	32
2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS - PAGE).....	32
2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler.....	32
2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması.....	33
2.2.9.3. SDS - PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	33

2.2.10. Kanlıca Mantarından Elde Edilen Tirozinazın Enzim Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.....	35
2.2.10.1. Optimum pH.....	35
2.2.10.2. Optimum Sıcaklık.....	35
2.2.10.3. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması.....	35
2.2.10.4. Kinetik Parametreler.....	36
2.2.10.5. Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi...36	
2.2.10.6. Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi..36	
3. BULGULAR.....	37
3.1. Kanlıca Mantarından Tirozinazın Saflaştırılması.....	37
3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu.....	37
3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi.....	37
3.1.3. SDS-PAGE Elektroforezi.....	39
3.1.4. Optimum pH.....	40
3.1.5. Optimum Sıcaklık.....	40
3.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması.....	41
3.1.7. Tirozinaz Enziminin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	42
3.1.8. Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	42
3.1.9. Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	43
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
5. KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	59

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

2.1. E_{280}/E_{260} Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu.....	30
3.1. Kanlıca Mantarının Tirozinaz Aktivitesine Göre İncelenmesi.....	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Enzim Substrat İlişkisi.....	2
1.2.Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi.....	3
1.3.Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi	4
1.4.Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi	4
3.1. Kanlıca Mantarı Ham Ekstresinin % 60 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz kolon kromatografisi Elüsyon Grafiği.....	37
3.2. SDS-Page Jel Elektroforezi.....	39
3.3. Optimum pH.....	40
3.4. Optimum Sıcaklık.....	41
3.5. Zamanın Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	41
3.6. Tirozinaz Enziminin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	42
3.7. Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	43
3.8. Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi.....	43

RESİMLER DİZİNİ

RESİM

1.1.Kanlıca Mantarı (*L. salmonicolor*).....9



SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µmol	Mikromol
mM	Milimolar
µg/mL	Mikrogram / Mililitre
kDa	Kilo Dalton
mg/mL	Miligram/Mililitre
µg	Mikrogram
M	Molar
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
Nm	Nanometre

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşturmayan, %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir ve proteinlerin en büyük özelleşmiş grubunu temsil etmektedirler (1).

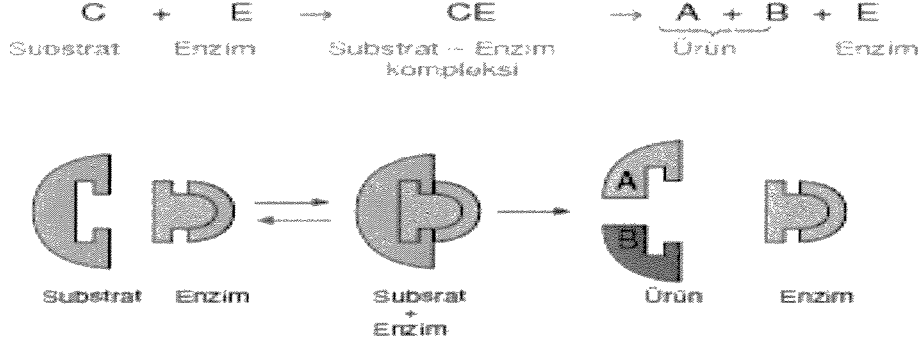
Hücre içinde oluşan binlerce reaksiyonun hızını ve spesifikliğı enzimin kendisi değışikliğe uğramadan düzenlemektedir. Metabolik reaksiyonların büyük bir kısmı enzimler aracılığıyla kontrol edilip hızlandırılır. Reaksiyonun başlangıç safhasında enzimin etkilediğı madde, substrat olarak adlandırılırken; reaksiyon sonucu miktarında artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Enzim, substratın dış yüzeyinden itibaren etki etmeye başlar, şeklini bozar ve ürünü oluşturur. Ürün meydana geldikten sonra enzim diğerk bir substrat molekülüne aynı işlemi yapmak için hazırlanır (2).

Enzimler, canlı hücrelerde oluşan ve canlılardaki tüm reaksiyonların çok ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir (3).Hücre içerisinde üretilmesine rağmen birçoğı hücre dışında da aktivitelerinedevam edebilirler (4,5). Enzimlerbu özellikleri sayesinde endüstriyel alanlarda kullanım imkanı bulmaktadır.

Enzimin etkilediğı maddeye '**substrat**' adı verilir ve enzimin adlandırılmaları etki ettiğı maddenin isminin sonuna -az (-ase) eki getirilerek yapılır. Enzimlerin şifresi genler üzerinde kodlanmaktadır. Dolayısıyla aminoasit dizilimi spesifiktir(4).

Doğadaki bütün metabolik reaksiyonların temelinde enzimlerin etkisi söz konusudur. Enzim reaksiyona girer ve değışikliğe uğramadan reaksiyondan çıkar. Tekrar başka bir substrat ile aynı reaksiyonu başlatır. Buna benzer kimyasal katalizörler maddelerin büyük çoğunluğu ile reaksiyona girip birçok reaksiyonu katalizleyebilirler. ancak bunlar çoğunlukla hem özgül hem de seçici değıldirler. Buna karşılık, enzimler oldukça spesifik reaksiyonlara katalizör etkisi gösteriler. Bu

özellik, enzim molekülünün şeklinden kaynaklanır. Enzim-substrat ilişkisi basitçe anahtar- kilit uyumu ile açıklanmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Enzim Substrat İlişkisi

Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimler peptid zincirleri halinde temel yapı taşı olarak aminoasitlerden oluşan 3-boyutlu bir yapıyı teşkil eder. Enzimler bu 3-boyutlu tersiyer yapıları sayesinde, bağlanacakları ve değişime uğratacakları substrat moleküllerini seçme özelliğini kazanmışlardır. Kuaterner yapılar sahip birden fazla alt birimli enzimler mevcuttur. Enzimlerin kendilerine özgü bu 3-boyutlu yapıları substrat molekülünün uygun şekilde bağlanabilmesini sağlar. Bu durum enzimin katalitik aktivitesini sağlar.

1.1.2. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler

Enzimler biyolojik sistemlerde çok düşük miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle enzim proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde göstermiş olduğu aktiviteden yola çıkarak enzimin miktarı ölçülür (5).

Bir enzim aktivitesi birimi: 25°C'de 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak kabul edilmektedir.

Özgül (spesifik) aktivite: Miligram protein başına düşen enzim aktivitesidir. Bu tanım daha çok izole edilen enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla kullanılır.

Dönüşüm sayısı (k_{kat}): Her bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır (6).

Enzim reaksiyon hızı üzerine enzim ve substrat konsantrasyonu, sıcaklık, ortam pH'ı, zaman, reaksiyon ürünlerin, hormonlar, ışık vb. gibi fiziksel faktörlerin etkisi vardır(5).

1.1.2.1. Enzim Konsantrasyonu

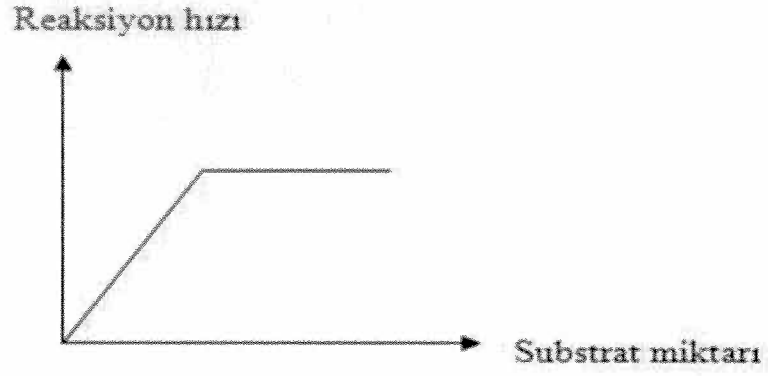
Substratın yüksek miktarda bulunduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_0), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Belirli bir süre sonra ortamda enzimin reaksiyona girebileceği substrat sınırlı olduğundan hız giderek azalmaya başlar (5).



Şekil 1.2 Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi

1.1.2.2. Substrat Konsantrasyonu

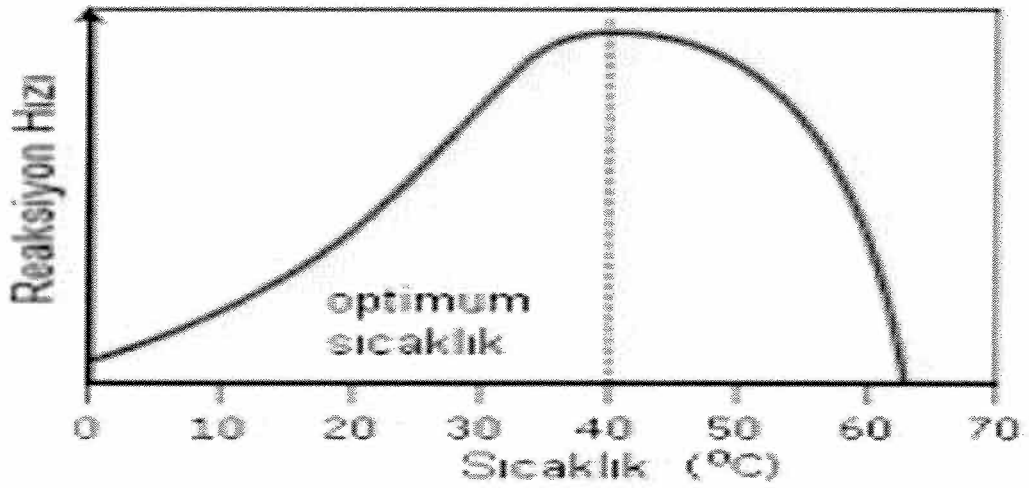
Enzim konsantrasyonu ve diğer tümkoşulların sabit olduğu bir ortamda enzimatik reaksiyonun hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat eklendiği takdirde ortamda reaksiyona girebilecek enzim bulunmadığından hız gittikçe daha az artar ve belirli bir maksimum hız (V_{max}) düzeyinde dengeye gelir ve sabitleşir (5). Aşağıda farklı kaynaktan alınan şekiller gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi

1.1.2.3. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonların hızı, sıcaklık artışıyla belirli bir noktaya kadar artar. Ancak belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimlerin yapısı denatüre olduğundan etkilerini kaybederler (5,7). Her enzimin substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir maksimum sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa “*optimum sıcaklık*” denir. *In vitro* enzim reaksiyonları genel olarak 37-40°C’de yapılır (5).



Şekil 1.4 Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi

1.1.2.4. Ortam pH'ı

Her enzimin aktivitesinin maksimum olduğu belirli bir pH aralığı vardır. Bu pH'ya enzimin “optimum pH'ı” denir.Örneğin; üreaz pH 6-7 aralığında en yüksek aktiviteyi gösterir. Enzimin optimum pH'sının altın dave üstünde reaksiyon hızı azdır. Enzim belirli bir pH'da tamamen etkisiz kalır ve yapısı bozulur (5).

Enzimatik çalışmalarını istenilen pH'da sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli duruma getirmek için tampon çözeltiler kullanılır. Optimum pH'a genellikle kullanılan tampon çözeltinin cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin izole edildiği kaynağa bağlıdır (7).

1.1.2.5. Reaksiyon Ürünleri

Enzim reaksiyonu devam ettikçe, reaksiyon ürünleri belli bir zamandan sonra enzimin aktivitesinde düşmeye sebep olur ve enzim reaksiyonunun hızı azalır.Bu inhibisyonun temel sebebi, reaksiyon ürünlerinin moleköl yapısı bakımından substrata benzemeleri ve enzime substrattan daha fazla bağlanma isteğidir (8).

1.1.2.6. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler

Enzimlerin etkisi ışığa bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Enzim çözeltilerinin kuvvetlice çalkalanması neticesinde enzimin yapısında bozulmaya yol açar (8).

1.1.2.7. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler

Hormonlar, aminoasitler ve diğer biyokimyasal maddelerde enzim aktivitesinde birtakım değişiklikler meydana getirirler. Örneğin, östrojenik, androjen yapısında ve bazı steroid gebelik hormonları, glutamat dehidrojenaz enziminin dört alt ünitesini ayrıştırarak enzimin yapısında değişikliğe sebep olarak aktivitesini kaybetmesine neden olurlar; böylelikle, lösin, metiyonin, izolösin, adenzin difosfat (ADP) tarafından geri çevrilebilir (6).

1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

Elde edilme şekli ve yüksek besin değerleri ile mantarlar çok eski zamanlardan beri önemli bir besin olarak tüketilmektedir. Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanında kaliteli ve ucuz olması nedeniyle potansiyel tirozinaz kaynağı olarak endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır (9). Özellikle de gıda endüstrisinde enzimatik kararmaya neden olması ile tirozinaz enzimi gıda teknologlarının dikkatlerini üzerine çekmiş ve enzimatik kararmanın önlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Enzimatik kararma, meyve ve sebzelerin depolanması aşamasında kesme, çarpma, kabuk soyma ve dilimleme gibi zedelenmeler sonucunda tirozinaz enziminin havadaki oksijen ile teması sonrası meydana gelen, meyve ve sebzelerin renginde pembeden mavimsi-siyaha kadar farklı tonlarda meydana gelen renk değişimine sebep olarak meyve ve sebzelerin görünümünü, tadını ve besleyici değerini bozan bir oksidasyon reaksiyonudur.

Birçok sebze ve meyve ürünlerinde bu renk değişimleri bir dereceye kadar istenir, fakat çoğu zaman istenilen düzeyde de durdurulamazlar. Bu durum ise tüketicinin istemediği bir durum olmakla birlikte üretici için ise büyük bir ekonomik problem yaratmaktadır. Bu nedenle enzimatik kararmanın engellenmesi ve sınırlandırılması amacı ile tirozinaz enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (10). Tirozinaz enzimi birçok sebze ve meyvede bulunan ve bitkinin hastalıklara karşı direncin artmasına sebep olan bir metaloenzimdir. Gıda da ise önemi, enzimatik kararmaya sebep olmasıdır. Kararmadan sorumlu tutulan tirozinaz enzimi, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır (11). Renk bozulmaları enzimatik ve/veya enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzimatik kararma için tirozinaz, bunun etkilediği polifenolik substratlar ve oksijenin bir araya gelmeleri gerekir. Enzimatik kararma bu üç maddeden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulabilir veya azaltılabilir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi esnasında oksijenin varlığı kaçınılmazdır. Bunun yanında, bütün bitkilerin belirli oranlarda fenolik

bileşen içerdiği bilinmektedir. Bu bileşikleri uzaklaştırmak kesinlikle pratik değildir. Enzimatik kararmanın engellenmesinde en geçerli yöntem, tirozinaz aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Mantarlar çok eski zamandan beri bilinmekte olup, çok çeşitli alanlarda insanlığa faydalı olmuşlardır. Fakat mantarların hakiki yapıları ve büyüme şekilleri hakkındaki bilgiler, ancak 17. asırda mikroskobun keşfiyle elde edilmeye başlanmıştır. Mantarlar, çok eskiden bu yana bilinen bir besin olmasına karşın yetiştiriciliğinin ilk kez 16. yüzyılda Fransa'da yapılmaya başlandığı pek çok kaynakta bildirilmektedir. Başlangıçta mevsime bağlı olarak açıkta yetiştirilmeye başlanan mantar, 19. yüzyılın başlarında, taş ocakları, mağara ve tünel gibi sıcaklık ve nemin epey düzenli olduğu kapalı alanlarda ilkel yöntemlerle üretilmiştir. 20. yüzyılın doku kültüründen misel üretiminin gerçekleştirilmesi yeni tekniklerin gelişmesiyle mantar bu amaçla kurulmuş özel işletmelerde yetiştirilmeye başlanmıştır (12,13). Hücre çeperinin bileşimi, hücrenin yaşına ve çevre koşullarına, sıcaklığa, ortamın pH'sına göre farklılık gösterir. Hücrenin içi protoplazma ile doludur. Renksiz ve saydam olan stoplazma lipidik granüller ve çubuk şeklinde oluşumlar içerir. Vakuoller hücrenin gaz alışverişini düzenler, hem de stoplazmanın artıklarını barındırır (14). Mantar proteininin hazmolma değeri %72-83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, lizin, arginin, histidin ve treonin için iyi bir kaynaktır. İnsan beslenmesi için gerekli bütün amino asitleri içermesine rağmen triptofan seviyesi kısmen düşüktür. Ayrıca mantar brom, mangan, çinko, sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindir (14). Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Mantar içerikli diyet, folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisi için etkili olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre mantar kandaki seker seviyesini düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler kolesterolü düşürücü özelliği ile kalp ve damar hastalıklarında da diyet olarak kullanılacaklarını göstermiştir (14).

Mantarlar geleneksel bir ilaç olarak yan etkilerden uzak olması sebebi ile çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak

önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilebilmesi ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Araştırmalar antifungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaştırmalarına sebep olmuştur. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak kullanılmışlardır (12,15).

1.2.1.Kanlıca Mantarı ve Özellikleri

1.2.2. Kanlıca Mantarı (*Lactarius salmonicolor*)'un Morfolojik Özellikleri

Bilimsel Sınıflandırma

Alem: Fungi

Bölüm: Basidiomycota

Sınıf: Homobasidiomycetae

Alt Takım: Russulales

Familiya: Russulaceae

Cins: *Lactarius*

Tür: *Lactarius salmonicolor*

Yenilebilir, şapkalı bir mantar olan *L.salmonicolor*,mantarlar aleminin Homobasidiomycetae sınıfı, Russulales takımının Russulacea ailesine aittir (Şekil 1.5). Çam ağaçlarının asidik topraklarında, çayırhıklarda, Avrupa'da yapraklı ağaç ormanlarında ilkbahar ve sonbahar yağmurlarından sonra görülür. Şapka büyüklüğü 5-15 cm kadardır. Mantar gençken ortası hafifçe çukur, kenarı içeri kıvrıktır, büyüdükçe ortası gittikçe çukurlaşarak hemen hemen huni şekline döner. Rengi turuncudur, açık sarıdan erik sarısına kadar değişir. Kenarı, 1 milimetre genişlikte

halka halinde açık parlak sarıdır ve belirgindir. Genel görünüşü, turuncu ve sarıdan oluşan halkalı bir yapısı vardır. Lameller, başlangıçta kırmızımtırak sarı beyaz daha sonra açık portakal rengi tonundadır. Sapa doğru kıvrımlı şekil alır. Sap üzerinde birazcık devam eder. Sap, 3-65 cm boyunda 08-25 cm kalınlığında silindirik şeklindedir. Renk açısından portakal sarısı, dip kısmında kırmızımtırak sarı beyaz, yukarı kısmında sarı kırmızısı turuncudur. Sapa etli kısmı kırmızı-pembedir ve koparıldığında turuncu renkte bir sıvı çıkarır. Gençken içi dolguludur fakat daha sonra şapkaya kadar olan alt kısmında boşlukludur. Etli kısım kırmızımtırak sarı beyaz renkli meyve kokulu ve yumuşak sünger gibidir. Spor izi parlak kırmızımtırak sarı tunç rengindedir (16,17).



Resim 1.1 Kanlıca Mantarı (*L. salmonicolor*) (18)

1.2.3. Kanlıca Mantarının (*L. salmonicolor*) Yetiştığı Bölgeler

Eylül ve Ekim aylarında yağmurlardan sonra ortaya çıkan bu mantar halk arasında “melki” ya da “Kanlıca mantarı” olarak adlandırılır. Türkiye’de yerel halk bu mantarı toplayıp pazarlarda satarlar, ayrıca bu mantar çeşitli Avrupa ülkelerine de ihraç edilir. Türkiye’nin kuzey ve güney bölgelerinin özellikle iklim ve vejetasyonu yabancı mantarlar için uygundur (19,20). *L. salmonicolor* Kuzey Amerika, Chile, Avustralya, Yeni Zelanda, Kıbrıs ve Avrupa’nın birçok kısmında yetişmektedir.

İtalyan, Polonyalı, Ukraynalılar ve diğer batı Avrupalıların sonbahar yağmurlarından sonra mantar toplamak için seyahat ettikleri bilinmektedir (21).

1.2.4. Mantarlar ve İnsan Sağlığı

Mantarların yapısında az miktarda şeker ve yağ bulunmaktadır. Bu sebeple diyet yemekleri içerisinde mantarın ayrı bir yeri vardır. 100 g taze mantar yenildiği zaman ancak 20-40 kalori vermektedir. Bu da zayıflamak isteyen kişiler için mantarları ideal bir gıda niteliğindedir. Öte yandan, mantarlar kalp ve damar hastalıkları bulunan kişiler için de tavsiye edilen bir yiyecektir.

Mantarların protein miktarı, tür ve çeşidine göre değişmekle beraber ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g'dır. Bu proteinlerin ortalama %70'i sindirilebilir niteliktedir. Böylelikle, 100 g mantarın yenilmesi ile yaklaşık 2-5 g'ı protein olarak vücuda alınır. Mantarlardan alınan proteinler vücutta depolanmaz, günlük olarak harcanırlar.

Hayvansal gıdalarda ortalama olarak %8-15 oranında protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin ortalama %30-40'ı sindirilir; yani yenilen 100 g hayvansal gıdadan alınan protein miktarı yaklaşık 3-8 g kadardır. Bu proteinlerin fazlası vücutta depolanarak amonoasitler biçiminde damar çeperinde birikir. Bu özellikle erkeklerde görülen kalp-damar hastalıklarının sebeplerinden biridir.

Kalp damar hastalıklarına sahip kişiler için hayvansal gıdaların alınması sakıncalıdır. Mantarlardaki protein miktarı, hayvansal yiyeceklerdeki protein miktarından biraz az da olsa, vücutta birikme tehlikesi olmamasından ötürü tercih sebebi olmalıdır. Yanı sıra, mantarlardaki proteinlerde insanların beslenmesi için gerekli bütün amonoasitler de bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı mantarlar sağlığımız açısından önemli besinlerdir.

1.3. Tirozinaz Enziminin Biyokimyası

1.3.1. Tirozinaz'ın Adlandırılması

Tirozin; 1846'da Alman kimyager Justus von Liebig ("*Yustus fon Libig*") tarafından peynirde bulunmuştur ve proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Yan zincirinde amit fonksiyonel grubu içerdiğinden dolayı polar özellik gösterir. Amit grubu dışında benzen halkası taşır. Non esansiyel, glukojenik ve ketojenik asittir.

Tirozinaz (Polifenol oksidaz); funguslarda, yüksek bitkilerde ve hayvanlarda bulunan; moleküler oksijeni kullanarak monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu; odifenollerinde o-kinonlara oksidasyonunu katalizleyen, bakır içeren bir enzimdir.

Tirozinaz (EC. 1.14.18.1) bitkiler, bakteriler ve memeliler dahil olmak üzere çok geniş bir canlı grubunda bulunmaktadır. Krezolaz ve katekolaz aktivitesi olmak üzere iki ayrı aktiviteye sahiptir (22). Tirozinazlar (PFO-EC.1.14.18.1), oksido-redüktaz sınıfı enzimlerdir ve bakır kofaktörlüdürler. Moleküler oksijenin varlığında orto ve vicinal -OH gruplu (3,4,5-trihidroksi) fenolik bileşikler oksitlemelerine ek olarak monofenollerin o-dihidroksifenollere çevrilmesinde de rol oynadıkları bildirilmektedir (23). İlk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur. Daha sonra birçok meyve ve sebze tirozinaz belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (24). Tirozinazlar, bitkilerin mikrobiyal veya viral enfeksiyonlara karşı direnç göstermesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bitkilerin olası kötü iklim koşullarına karşı dayanıklı olmalarının bir sebebi de tirozinazların varlığıdır. Gıda teknolojisi açısından tirozinaz önemli bir enzimdir. Enzimatik kahverengileşme gıda teknolojilerini çok uğraştıran bir durumdur. Elma, armut, şeftali, muz gibi meyveler; patates, yemeklik mantar gibi sebzelerin saklanması ve işlenmeleri esnasında bu enzim sorunlara yol açmaktadır.

Tirozinaz, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak rastlanan bir enzimdir. Bitkilerde tüm kısımlarda bulunabilirken, gelişmiş hayvanlarda deri, saç, tüy ve gözlerde bulunur. Bitkisel dokularda özellikle inaktif formda sentezlenmekte ve

zamanla çeşitli faktörlerle, proteazlar ve etilen gibi bir takım solunum metabolitlerince aktif hale gelmektedir. Yenilebilir bitkilerdeki tirozinaz dağılımı, birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Son zamanlarda farklı kaynaklardan da izole edilmiş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Tirozinaz aktivitesine sahip bazı gıda maddeleri; çay, muşmula, enginar, Cassava bitkisi, ananas, Napoleon üzümü, patlıcan, elma, zambak, Anamur muz ve çilek olarak sayılabilir. Bitkilerdeki tirozinaz miktarı çeşit, kültürel işlemler, olgunluk ve yaşa bağlıdır (25). Tirozinaz'lar sebze ve meyvelerin hasat, depolama ve işleme kalitesi ve ekonomisini belirleyen çok önemli enzimlerdir. Oksijen geçişine sebep olan hasat, depolama ve işleme sırasındaki zedelenme, kesilme ve diğer mekanik zararlar çoğu meyve ve sebzelerde melonin oluşumuna, bu da hızla esmerleşmeye sebep olur. Esmerleşme yüzünden meyvelerde önemli kayıplar olmaktadır. Muz, şeftali, kayısı, yapraklı sebzelerde istenmeyen esmerleşmeler görülmektedir. Bunlardan farklı olarak, çay, kahve, kakao, siyah üzüm ve siyah incirlerde tirozinaz aktivitesi istenen bir durumdur (25). Çünkü enzim sayesinde bu ürünler istenen son ürün karakteristiklerine kavuşurlar.

Enzimatik kahverengileşme, çoğu kez istenmeyen bir olay değildir. Siyah çay, çekirdeksiz kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen güzel renkleri, açık renkli meyvelerden elde edilen meyve suyu ve içkilerin altın sarısı renkleri ılımlı ve kontrollü bir kahverengileşme ile elde edilir (24). Pek çok bitkisel kaynaktan tirozinaz enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış; yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır: Fasulye (26), armut (27), kereviz (28,29), kuşburnu (30). Tirozinaz aktivitesi, optimum pH'ı enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle pH 4.0-7.0 arasında değişir. Birçok kaynaktan elde edilen tirozinazın, pH 4,0'ın altında inaktif olduğu belirtilmiştir (28,30-32).

Tirozinazın kullanım alanları incelendiğinde melanin sentezi, bu enzimin kullanıldığı en kritik noktalardan biridir. Melanin, derinin ve saçın rengini sağlayan etkenlerden biri olan polifenol gibi kompleks yapıdaki bir biyopolimerdir. Melaninin görevi, deriyi UV ışınlarından korumak ve reaktif oksijen türlerini gidermektir. Tirozinaz, melanin sentezindeki iki kritik tepkimeyle L-tirozinin monofenolaz ile hidroksilasyonu ve L-dopanin difenolaz ile o-dopakinona oksidasyonunu katalizler. Birçok dermatolojik bozukluk, melanin pigmentinin aşırı salgılanmasından

kaynaklanmaktadır. Tirozinaz inhibitörleri, dermal melanin üretimini baskıladıkları için beyazlatıcı veya anti-hiperpigment ajanları olarak tercih edilmektedirler. Günümüzde kozmetik ve medikal endüstrilerinde tirozinaz inhibitörleri gittikçe önem kazanmaktadır. İnsan beyninde, tirozinaz, nöromelanin oluşumunda önemli bir role sahiptir. Bu durum da, dopamin nörotoksitesine ve hatta Parkinson hastalığıyla ilişkilendirilen nörodejerasyona bile neden olabilir. Gıda endüstrisinde ise tirozinaz inhibitörleri sebze ve meyvelerin kalitesinin kontrol altında tutulabilmesi için kullanılmaktadırlar. Tirozinaz sebze ve meyvelerde kararmaya yol açan, fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonunda rol oynamaktır.

1.3.2. Tirozinaz'ın Doğadaki Dağılımı

Tirozinaz enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (32). Bundan sonra, bazı turunçgiller hariç, pek çok meyve ve sebze tirozinaz enzimi belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (22). Tirozinaz doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı topraktürlerinde glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra tirozinaz enziminin varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir (33,34). Farklı bitkilerin tirozinaz içeriği türeve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta, aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Birçok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek tirozinaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (35). Enzimin bitki hücrelerindeki lokalizasyonu bitkinin türüne, yaşına; sebze ve meyvelerde ise olgunluğa bağlıdır (36,37).

1.3.3. Tirozinaz'ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları

Uluslararası Biyokimya Derneği'ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün Tirozinaz'ların, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için, birinci sınıf enzim oldukları belirlenmiştir. Bu

sınıflandırmaya göre yapısında bakır içeren tirozinaz enzimi moleküler oksijen varlığında birbirinden tamamen farklı iki aktivite göstermektedir. Bunlardan biri, monofenollerin *o*-difenollere *o*-hidroksillenme reaksiyonudur (E.C.1.14.18.1) ve enzimin bu aktivitesi, monofenolaz veya kresolaz aktivitesi olarak bilinir. Diğeri ise, *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyondur (E.C.1.10.3.2) ve enzimin bu aktivitesi de difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinir (38,39).

1.3.4. Tirozinaz'ın Substratları

Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı tirozinaz enzimine substrat olabilmektedir. Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyonlar sonucu sebze ve meyvelerde renk bozulmalarına sebep olmalarının yanı sıra, meyvelerin tatlarına da etkileri vardır.

Polifenol bileşikler, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına sebep olurlar. Bu bileşiklerden bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden otooksidasyona uğrarlar ve oluşan bileşikler polimerleşerek koyu renkli makro molekülleri oluştururlar (40,41). Tirozinaz'ın sebze ve meyvelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenil alenin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (42).

Doğal fenolik substratların her birinin sebze ve meyvede sebep oldukları enzimatik kararmaya katkıları fenollerin konsantrasyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olduğu kadar, farklı kinonlardan elde edilen makro moleküler pigmentlerin renk şiddetine de bağlıdır. Bazı sebze ve meyvelerde tirozinazın ana substratı bitki materyallerinde genelde çoğunlukla bulunmayan fenolik bileşiklerdir (43,44). Şeker pancarı tirozinaz enzimi, tirozine karşı aktivite göstermezken L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmaktadır. Fakat ilginç olan şudur ki şeker pancarı dokularında kayda değer miktarda L-DOPA bulunmazken, oldukça fazla miktarda tirozin bulunmaktadır (45). Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen "*Tirozinaz enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman en iyi tirozinaz substratları bulunmaz*" tezini desteklemektedir (46,47). Substrat spesifikliği yalnız sebze ve

meyvenin cinsine bağılı değildir aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiği kısmına ve yetiştirilişine bağılıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH'da substratın kullanılabilirliğini etkiler (48,49).

1.3.5. Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişmeleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine *kararma* denir. Tirozinaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır (11).

Meyve sularının ve dondurulmuş sebze ve meyvelerin endüstriyel amaçla hazırlanmaları sırasında ortaya çıkan bu tür reaksiyonlar kaliteyi düşürerek, ürünün pazar değerini de azaltır. Ayrıca karides, istakoz ve yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarının hazırlanmaları ve depo edilmeleri sırasında kabukta meydana gelen ezilmeler sonucu, tirozinaz enziminin etkisiyle ortaya çıkan melanozis sonucu oluşan siyah renkli lekeler ürünün değerini düşürür (50). Esmerleşme reaksiyonuna yol açan sebepler üç grup altında toplanmaktadır;

- *Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları.
- *Enzimatik olmayan oksidatif esmerleşmeler.
- *Maillard reaksiyonu sonucu oluşan esmerleşmeler.

Bu reaksiyonlar içinde en yaygın olarak rastlanan enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Enzimatik esmerleşme sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan tirozinaz enziminin sebep olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenden temassız bir halde bulunur. Fakat, meyve veya sebze kesildiği yada zedelendiği zaman enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikleri oluşturur (51,52).

Enzimatik kararmanın olabilmesi için tirozinaz enzimi, bunun etkilediği polifenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların uygun bir seviyede olması gerekir. Enzimatik esmerleşme fenolik madde, moleküler oksijen ve tirozinaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenir (53).

Enzimatik kararma reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan *o*-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve nihayet bunlar daha büyük moleküllü bileşiklere polimerize olurlar. Renk bozulmalarının esas sebebi, esmer renkli olan polimerlerdir (54,55).

Diğer enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır (54). Patateste ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlardır.

1.3.6. Tirozinaz İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi

Mantarların ve diğer besinlerin olgunlaşması, depolanması ve işlenmesi esnasında, enzimatik esmerleşmeden kaynaklanan ciddi ekonomik kayıplar meydana geldiği için, enzimatik esmerleşmenin kontrolü, besin işleme endüstrisinde oldukça önemli olup tarafından da ilgi görmektedir. Tirozinaz katalizli esmerleşme, sadece enzimin inaktive edilmesiyle değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyon için gerekli olan O₂ veya fenolik substratın ikisinin ya da birinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla da önlenir. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumunun engellenmesiyle önlenir (56). Tirozinazın birçok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları

kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır (57).

Tirozinazlar, doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir ve birçok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak ta bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kabuk, kök ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze sebze, meyve ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel tirozinaz inhibitörleri; kompferol, kuarsetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir (58,59). Bu çalışmalara göre flavanoidlerin inhibisyon özelliği, aktif bölgedeki bakırla selat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir. Mantar tirozinazının benzoik asit ile inhibisyonu substrat olarak katekol kullanıldığında yarışmalı inhibisyon, O₂ kullanıldığında ise yarışmasız inhibisyon olarak bulunurken aynı enzimin aynı substratlarla siyanid ile inhibisyonu ise sırasıyla yarışmasız ve yarışmalı inhibisyonlar vermiştir. Bu durum enzim molekülü üzerinde iki farklı substrat bağlama bölgesinin varlığı ile açıklanabilir. Bu bölgelerden birisi fenolik substratları içeren aromatik bileşikler için yüksek afiniteye sahip iken, diğer bölge ise oksijen ve metal bağlama fonksiyonlarından sorumlu bakır ihtiva eden kısımdır (60,61).

1.3.7. Tirozinazın Saflaştırılması

Tirozinaz'ın en önemli özelliklerinden biri, bitki dokularında aktif olmayan bir halde bulunabilme yeteneğidir. Ancak, asit-bazlar, üre, poliaminler, anyonik deterjanlar, proteazlar ve yağ asitleri tarafından aktive edilebileceği bildirilmiştir (62,63). Enzimin inaktif formunda izole edilebilmesi için aktivasyonunu veya modifikasyonunu önlemek amacıyla, uygun koşullarda çalışılması gereklidir. Bitkisel örneklerin, soğuk aseton ile toz haline getirilmesi veya amonyum sülfat ile çöktürülmesi, böyle bir işlem için oldukça uygundur. Böyle bir işlemle elde edilen özütlerde, daha sonra Triton X-114, Triton X-100 veya Tween-80 gibi iyonik olmayan bir deterjan yardımıyla ve sıcaklıkla indüklenmiş faza katılma tekniği olarak tanımlanan bir işlemle oluşturulan iki fazdan, sulu fazda enzimin çözünürleştirilip diğer bileşenlerden ayrılması sağlanmış olur (64). Bazı bitkisel özütlerden tirozinaz

içeren dokuların homojenizasyonu sırasında, doku hasarına bağlı olarak oluşan ve fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ortaya çıkan esmerleşme reaksiyonları dolayısıyla oluşan ve suda çözünürlüğü az olan pigmentler, işlem sırasında problem olabilir. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda çalışmak, bu problemi bir miktar azaltabilir ki sıvı azot ortamında böyle bir homojenizasyon işlemi, uygun tampon çözeltiler varlığında gerçekleştirilebilir (64,65).

Asetonile enzimin bitkisel özütlerden çöktürülmesi de oldukça tercih edilen bir yöntemdir ve böyle bir işlemle genellikle oldukça yüksek tirozinaz aktivitesi elde edilmiştir. Homojenizasyon çözeltilisinin pH değerinden enzimin aktivitesi etkilenebileceğinden, tampon çözeltilinin seçimi de enzimin izolasyonunda önem taşır. Bazı durumlarda, homojenizasyon çözeltilisine, çeşitli indirgenme-yükseltgenme olaylarını önlemek ve böylece enzim aktivitesini korumak amacı ile, indirgen reaktifler ya da enzim inhibitörleri katılabilir. Sodyum azid, askorbik asit, glutatyon, ditiyotritol, sistein, sodyum metabisülfid veya tiyoüre gibi çeşitli bileşikler bu amaçla kullanılmıştır (66). Tirozinazın bitki dokularından izolasyonu sırasında, fenolik bileşiklerin oksidasyonunun ve dolayısıyla polimerleşmelerinin engellenmesi amacıyla, genellikle ortama, bu fenolik bileşikleri bağlayıp ortamdaki uzaklaştırabilecek ve genelde polimerik yapıda olan polivinilpirrolidin, poliamit ve polikaprolaktam gibi bir madde ilave edilir. Daha sonra bu polimerik yapı, ortamdaki uygun tamponlarla yıkama yoluyla uzaklaştırılarak, fenolik oksidasyon engellenmiş olur. Bazı durumlarda da polietilen glikol bu tür oksidasyon işlemlerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır (67).

Homojenize edilen enzim özütlerinden tirozinaz saflaştırılması, genellikle amonyum sülfat veya aseton ile çöktürmeyi takiben, kromatografik basamakları içerir. Bu kromatografik işlemlerde santrifüjlenip hazırlanan berrak çözeltili, dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex veya DEAE-selüloz gibi anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 veya Sephadex G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemlerine tabi tutulur (68). Kromatografi sonrasında, tirozinaz içeren elüatlar birleştirilir ve bazı durumlarda asetonla veya amonyum sülfatla çöktürülerek tirozinaz konsantre edilir. Bazı dokulardan tirozinazın saflaştırılması için bu kromatografik

tekniklerden biri yeterli olurken, genellikle kombinasyonları şeklinde kullanıldığında, daha yüksek saflıkta enzim saflaştırılması gerçekleştirilebilir. Örneğin, fasulye de ki tirozinaz, DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi, onu takiben fenil agaroz matrisi üzerine hidrofobik etkileşim kromatografisi ve son olarak da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile, üç basamaklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır (69).

Gawlik-Dziki ve arkadaşları (2007) tarafından, iki kromatografik teknik sırasıyla kullanılarak, birtür marul tirozinazı, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi teknikleriyle saflaştırmıştır (70). Bir tür mantar tirozinazı ise, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve onu takiben de hidroksiapatit kromatografisi ile saflaştırılmıştır (71). Ayrıca, daha önce fenil Sepharose-CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisiyle tirozinaz, tek basamakta çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır (72,73). Çok kullanılan bir teknik olan jel filtrasyon kromatografisi ile de tek adımda tirozinaz saflaştırma işlemi, Chazarra ve arkadaşları (2001) tarafından bir tür maruldan; Xu ve arkadaşları (2004) tarafından bir tür kestaneden; Erat ve arkadaşları (2006) tarafından *Ferula sp.*'den gerçekleştirilmiştir (74,75).

1.3.8. Bulunduğu Yerler ve Önemi

Tirozinaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalarda (birkaç bakteride, birçok küfte) özellikle mantarlarda bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir (76). Bazı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karides, küçük karides, Florida dikenli ıstakoz) bu enzimin varlığına rastlanmıştır (77). Bitki hücresinde enzimin lokalizasyonu enzimin türüne, yaşına, sebze ve meyvelerde olgunluklarına bağlıdır (76).

Tirozinazların sağlam bitki dokusundaki hücrelerin protoplazmalarında mitokondri ve kloroplast membranlarında lokalize olduğu, vakuollerdeki fenolik madde, organik asit ve tanenlerden etkilenmeden kendi fizyolojik görevini yaptığı belirlenmiştir (76,78). Ancak, doku dolayısıyla hücre herhangi bir dış etkenle parçalandığında, zedelendiğinde ya da aşırı olgunlaşma sonucunda tirozinaz;

substratları olan polifenoller ile etkileşip moleküler oksijen varlığında enzimatik esmerleşme süreci başlamaktadır. Bu olay birçok sebze ve meyvenin hasadından itibaren taşınması, depolanması ve tüketim için hazırlanması sırasında meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra dondurarak saklama, konserve veya meyve suyu yapımı gibi teknolojik sistemlerin gereği olarak kesme, dilimleme, kabuk soyma, çekirdek çıkarma, parçalama, ezme ve çözme gibi teknolojik işlemlerde daha büyük boyutlar kazanmaktadır (76).

1.3.9. Biyolojik İşlev ve Tirozinazın Dağılımı

İnsanlarda, melanin eksikliğinde ciltte, saçta ve gözde hastalıklara neden olur. Albinizm, vitiligo ve melanoma bunlardan birkaçıdır.

Bugüne kadar tirozinaz çoğunlukla görülmüştür. Bununla birlikte, homoloji protein veritabanları ve deneysel verilerle arar. Tirozinazlar bakterilerde de yaygın olduğu gösterilmiştir (79). Melaninler bakterilerde tirozinazın en iyi belgelenmiş fonksiyon oluşumudur. Melanin, bir polifenolik pigment, bakteri sporlarını ve hücreleri serbest radikallere ve UV radyasyonuna karşı korur (80).

1.3.10. Tirozinazların Endüstriyel Uygulamaları

Tirozinaz sanayi, kağıt hamuru ve kağıt sanayi, tekstil sanayi, ilaç ve çevre teknoloji bazı biyoteknolojik uygulamalar için çok uygundur. Gıda endüstrisinde, tirozinazlar için hiç arzu edilmez, ancak bu enzimlerin esmerleşme etkileri, çeşitli faydalı amaçlar için kullanılmaktadır. Tirozinaz, özellikle laktazlarla ilgili çapraz bağ biyopolimerleri (81) elde edilebilir. Onlar ayrıca antioksidan ve besin renklendirici biosentezi (82) gıda da değişik yönleriyle tirozinazların uygulamaları sanayi, renk oluşumu ve çay, kakao ve kahve lezzet geliştirmesini içerir ve askorbik asit tayini, şeker pancarı, pektin jelleşme ve biosensör olarak uygulanırlar (83).

1.3.11. Tirozinaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar

Elmadan elde ettikleri tirozinazın ısı inaktivasyon parametrelerinin belirlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada 6 çeşit elma ve 68°C, 73°C ve 78°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık kullanmışlardır. 78°C sıcaklıkta Amasya elmasının tirozinazını ısıya karşı en dirençsiz, Starking Delicious çeşidi elmanın tirozinazının ısıya karşı en dirençli çeşit olarak belirlenmiştir. Isıl inaktivasyonun hız sabitleri 78°C'de 15,99-28,27, dakika 10^{-2} , aktivasyon enerjisi 54,7-77,2 kcal/mol, Z değeri 7,1-10,0°C arasında bulunmuştur. Elmadan elde edilen tirozinaz'ın diğer meyvelerden elde edilene göre ısıya karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir (84). Türkiye'de yetiştirilen Emir üzümlerinden tirozinaz enzimini ekstrakte etmiş ve pH, optimumsıcaklık, termal inaktivasyon, kinetik parametreler ve bazı potansiyel tirozinaz inhibitörlerin karakteristik özelliklerini belirlemişlerdir.

Substrat olarak kateşol kullanıldığında üzüm kökenli tirozinazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4,2 ve 25°C olarak bulunmuştur. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 25,1±2,72 mmol L⁻¹ ve 0,925±0,04 OD₄₁₀ dakika⁻¹ bulunmuştur. Değişik inhibitörlerin etkileri incelenmiş ve en etkin inhibitörün sodyum metabisülfid olduğu ve bunu askorbik asitin takip ettiği bildirilmiştir. Enzimin E_a ve Z değeri sırasıyla 251,4 kJmol⁻¹ ($r^2=0,996$) ve 8,92 °C ($r^2=0,993$) olarak hesaplanmıştır (87).

Sultaniye üzümünden tirozinaz'ın ekstraksiyonu ve karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada enzimin optimum pH ve sıcaklığının 3,4 ve 30°C, K_m ve V_{max} değerinin mM ve 0,695 absorbans/dakika olduğunu, en etkili inhibitörlerin sodyum metabisülfid olduğunu ve bunu askorbik asitin izlediğini, termal inaktivasyon çalışmalarında 65-80°C sıcaklık aralığında enzimin yarılanma ömrünün 2,6-49,5 dakika arasında değiştiğini bildirmişlerdir (89). Akko XIII yenedünyadan tirozinaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlar ve A ve B harfler ile isimlendirdikleri iki adet tirozinaz izoenzimi elde etmişlerdir. Bunlardan izoenzim A'nın optimum pH değerinin 7,4; izoenzim B'nin optimum pH değerinin ise 4,98 olduğu, enzimlerin K_m değerlerinin sırası ile 15,3 mM ve 5,4 mM olduğu, her iki izoenziminde 30°C sıcaklıkta maksimum aktivite

gösterdiği, izoenzimlerin ısıya dirençlerinin ve inhibitörlere hassasiyetlerinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir (85).

Anamur muzundan tirozinaz enzimini saflaştırıp, enzimin özelliklerinin belirlenmesi konulu çalışmasında, Anamur Muzunun tirozinazın optimum sıcaklığını 30°C ve optimum pH'sını 7,0 olarak belirlemiştir. Ünal(2007)'a göre K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 8,5 mM ve 0,754 OD₄₁₀ dakika⁻¹ olarak tespit etmiştir (89).

1.4. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

1.4.1. İlgili Literatür Işığı Altında Projenin Yeri

Bu çalışmada, tirozinaz enziminin saflaştırılması amacıyla Eylül-Ekim aylarında Giresunyöresinde yetişen Kanlıca mantarı kullanıldı. Giresun yöresinde yaygın olarak bulunan yenilebilir Kanlıca mantarı besin olarak tüketilmektedir. Bileşiminde fosfor, kalsiyum, demir, B₁, C vitaminleri, protein, karbonhidrat ve çok az miktarda da yağ bulunur. Kansızlığa ve zihinsel yorgunluğa iyi gelmektedir. Çok düşük kalorili olduğu için de kilo problemi yaratmamaktadır. Kolestrol düşürücü etkisi vardır, bağışıklık sistemini güçlendirici etkiye sahiptir. Antioksidan özelliği sayesinde vücuttaki toksinleri atmada etkilidir. Yapılan literatür araştırmalarına göre tirozinaz enzimi çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış olup bitki ve mantar olarak az sayıda kaynak kullanılmıştır.

Literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına yeni tirozinaz kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boşluktan yola çıkılarak bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen bir mantar türü olan Kanlıca mantarından ilk kez tirozinaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, böylece literatüre bir katkı sağlanması amaçlanmıştır. Yapılan literatür araştırmalarına göre tirozinaz enzimi çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış olup bitki ve mantar olarak az sayıda kaynak kullanılmıştır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına yeni tirozinaz kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boşluktan yola çıkılarak bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen bir mantar türü olan Kanlıca mantarından ilk

kez tirozinaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, böylece literatüre bir katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılacak organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim katalizli polimerleşme reaksiyonları ile elde edilen polimerler, özel kimyasal maddelerin üretiminde, enzimlerin ne derece spesifik olduğunu göstermektedir. Bazı fenol türevlerinin, polifenollerin, polianilinlerin, tirozinazlar (95) kullanılarak ılımlı reaksiyon şartları altında yükseltgenme yoluyla polimerleştirildikleri belirtilmiştir.

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

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip yenilebilir Kanlıca mantarı (*L. salmonicolor*) tirozinaz enziminden elde edilen saf tirozinaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir.

Afinite jelinin sentezi, *L. salmonicolor* mantarından bu afinite jeli ile tirozinaz enziminin saflaştırılması, Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile tirozinaz enziminin yaklaşık molekül ağırlıklarının tespit edilmesi, çalışılan her bir substrat için optimum pH ve sıcaklıkların belirlenmesi, belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal

ifadesiolan K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması. Böylece endüstrinin farklı alanlarında enzimin stabilitesi ve kullanımını arttırmak için yenilebilir Kanlıca mantarından tirozinaz enzimi afinite kromatografisiyle ilk defa saflaştırılmış olacaktır.

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması,heminsan beslenmesi hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir. Buna göre, yöremizde yetişen ve tüketilebilen bu mantar, tüketilmenin yanında bir endüstriyel öneme de sahip olabilecektir. Bu kaynaklardan sağlanan özütten tirozinaz enziminin saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bunun sonucunda elde edilen tirozinaz aktivitesinin inhibisyonu verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel tirozinaz kaynaklarına adapte edilmesiyle, hem istenmeyen esmerleşmeden kaynaklanan ekonomik kayıplar azaltılmış veya önlenmiş hem de besin değerini kaybetmeksizin ürünlerin raf ömrü arttırılmış olacaktır. Buna göre, yukarıda da ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi, yapılan bu çalışmayla, yeni enzim kaynakları denenerek endüstrinin ihtiyaç duyduğu yeni ve potansiyel tirozinazların saflaştırılması ve elde edilen bu enzim için optimum çalışma şartlarının belirlenmesi, bu bilgiler dahilinde, çeşitli alanlarda enzimin kullanılması amacıyla, endüstriyel veya farmakolojik öneme sahip yüksek saflıkta bazı organik bileşiklerin sentezi ve bazı polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi, gibi farklı uygulamalar için kaynak teşkil edecektir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı: Arçelik

Destile Su Cihazı: Nüve-NS-108

Etüv: Binder

pH Metre: Butech

UV-VIS Spektrofotometre: T80+PG Instruments

Terazi: Shimadzu AUx220

Hassas Terazi: Sartorius

Su Banyosu: Memmert

Otomatik Pipetler: Brand Pipetleri, Dragon Lab.

Blender: King

Manyetik Karıştırıcı: Chiltern Hotplate HS 31

Soğutuculu Santrifuj: Sigma 3K 30

Vorteks: Velp Scientifica

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

L. salmonicolor tirozinaz enzimi saflaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada organik çözücü olarak petrol eteri (40-60°C) ve sokslet cihazı kullanıldı.

Saflaştırma işleminde yenilebilir Kanlıca mantarından, 200 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile hazırlanan ham ekstratlar kullanıldı. Fosfat tamponunun hazırlanmasında potasyum dibazik fosfat (Merck) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck)'tan yararlanıldı. Yenilebilir Kanlıca mantarından hazırlanan ham ekstratın amonyum sülfat kesiti için amonyum sülfat (Sigma) ve Sigma marka {D-9527 genişliği 43 mm (1.7"), çapı 27 mm (1.1")} dializ kesesi kullanıldı.

DEAE-selüloz kolon kromatografisinde, kolon dolgu maddesi olarak DEAE-selüloz (Sigma) kullanıldı. Hazırlanan ekstrelerin ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışında elde edilen fraksiyonların saklanması +4°C'lik buzdolabı ve dondurucusu kullanıldı.

Yenilebilir Kanlıca mantarından elde edilen ham ekstrede, %60'lık amonyum sülfat fraksiyonunda ve DEAE-selüloz kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlarda, enzim aktiviteleri tayinlerinde substrat olarak L-tirozin (Fluka), tampon olarak fosfat (Merck), yararlanıldı.

Protein miktar tayininde; Lowry metoduna göre standart olarak sığır serum albumini (Merck), protein miktar tayininde kullanıldı. Folin ayırıcı (Merck), Bakır Sülfat (Sigma), dipotasyum tartarat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit kullanıldı.

2.2. Metod

2.2.1. Kanlıca Mantarı Ham Ekstresinin Hazırlanması

Ham ekstre hazırlamak için Blender yardımıyla parçalanmış 100 g yenilebilir Kanlıca mantarı 500 mL 200 mM fosfat tamponu (pH= 7,0) içinde +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, ağzı kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat bezden süzüldü. 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda Kanlıca mantarı ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede tirozinaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

2.2.2. Kanlıca Mantarı (*L. salmonicolor*) Ham Ekstresinde Tirozinazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

Kanlıca mantarındaki tirozinazı çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL'lik 10 adet behere, 5'er mL kanlıca mantarı hamekstresi konuldu. Birinci behere ortamdaki konsantrasyonu %10 olacak

şekilde toz amonyum sülfattan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Her beherde konsantrasyon %10 arttırılarak, %90'a kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek karıştırıldı. Ham ekstreler içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 45 dakika daha karıştırıldı ve ağızları kapatılarak soğuk dolapta bir gece bekletildi. Ertesi gün, her beherdeki ham ekstre 0°C'de 18000 rpm'de, 30'ar dakika, santrifüje edildi. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi için alt ve üst fazlarda protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan kanlıca mantarı için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandı.

2.2.3. Kanlıca Mantarının Ham Ekstresinde Tirozinazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi

Kanlıca mantarı tirozinazını çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandığından, ortam konsantrasyonu %60 olacak şekilde ham ekstreye, katı amonyum sülfat azar azar ilave edildi. +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 45 dakika karıştırıldıktan sonra ağızı kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti pH'sı 7,0 olan 0,02 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltide de tirozinaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla dializ kesesine (Sigma) {genişliği 43 mm (1.7"), çapı 27 mm (1.1")} konuldu. Soğuk dolapta, 0,01 M sodyum fosfat tamponu (pH=7,0) ile çözelti sık sık değiştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar dializ işlemine devam edildi. Dializ işlemi tamamlanmış olan çözelti, dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla, 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika, santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve %60 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Tirozinaz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra uygun hacimlere bölünerek buzdolabının dondurucusunda saklandı.

2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi

2.2.4.1. DEAE - Selülozun Hazırlanması

20 g DEAE-selüloz yaklaşık 200 mL 1 mM pH'sı 7,6 olan sodyum fosfat tamponu içinde manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Çökmesi beklendi. Üstteki bulanık sıvı atıldı. Üzerine tekrar aynı miktarda tampon ilave edildi. Bu işlem birkaç kez yinelenildi. Bir gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün üstteki sıvı döküldü. Tekrar 1 mM tampon konuldu ve 30 dakika karıştırıldı. Bu yöntemle şişirilmiş olan DEAE-selüloz kullanılarak saflaştırma işlemlerine devam edildi.

2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Yukarıda belirtilen şekilde şişirilmiş olan DEAE-selüloz, 1 cm çapındaki alt ucu ince madde ile kapatılmış alt kısmı musluklu bir cam kolona, kolon yüksekliği 5 cm olacak şekilde dolduruldu ve üç kolon hacmi pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona 200 mg/mL protein olarak %60amonyum sülfat kesiti uygulandı. Kolondan öncelikle 0,5 mM'lık sodyum fosfat tamponu (pH=7,0) geçirildi. Daha sonra kolondan sırasıyla yaklaşık 200 ml 0,5 mM sodyum fosfat tamponunda çözülmüş 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 500 mM NaCl gradienti uygulandı. Fraksiyonlar her tüpte eşit hacim olacak şekilde toplandı (4-5 mL). Tüplerdeki çözeltilerin absorbansları elüe edilen tampona karşı spektrofotometrede, 280 nm'de okunarak elüsyon grafiği çizildi. Ayrıca, elüsyonlardaki tirozinaz aktivitesi tayin edilerek aktivite değerleri de aynı grafikte gösterildi. Enzimatik aktivite gösteren tüplerdeki çözeltiler bir araya toplandı ve bu çözeltinin tirozinaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Çözelti uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

2.2.5. Protein Miktar Tayini

Kanlıca mantarından tirozinazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve %60'lık amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Lowry yöntemine (90) göre tayin edildi. DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise E_{280}/E_{260} Warburg yöntemi (91) kullanıldı.

2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Ayıraçlar A ayıracı: 0,1 N NaOH içinde çözülmüş % 2 sodyum karbonat çözeltisi

B ayıracı: % 0,5 bakır (II) sülfat'ın %1 dipotasyum tartarattaki çözeltisi

Folin ayıracı: Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

C ayıracı (Alkali bakır çözeltisi): 50 mL A ayıracına 1 mL B ayıracı ilave edildi.

2.2.6.1. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne, protein miktarı tayin edilecek çözeltiden 0,5 mL kondu, üzerine 2,5 mL C ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,25 mL seyreltik Folin ayıracı ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Oluşan mavi–mor renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 500 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı %mg olarak saptandı.

2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Bovin serum albuminin distile sudaki %100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile %2 mg, %4 mg, %6 mg, %8 mg, %10 mg, %20 mg, %30 mg, %40 mg, %50 mg, %60 mg, %70 mg, %80 mg ve %90 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Lowry deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine

en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denkleminde standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı.

2.2.7. E₂₈₀/E₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Kolondan elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbansları elüe edildikleri tamponlara karşı spektrofotometrede okundu. E₂₈₀/E₂₆₀ oranı hesaplandı ve bu değere uyan faktör tablodan bulundu. Çözeltinin içerdiği protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Protein mg/mL} = \text{Faktör} \times E_{280} \quad (3,1)$$

$$\text{Protein Konsantrasyonu (mg/mL)} = 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260} \quad (3,2.)$$

Tablo 2.1E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu (86).

E ₂₈₀ /E ₂₆₀	% Nükleik asid	Faktör*
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682

0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

* 1 cm'lik ışık yolu

2.2.8. Tirozinaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi 30°C'de 410 nm'de 40 sn boyunca absorbanstaki artıştan belirlenmiştir. Absorbans-zaman grafiğinin lineer kısmının eğiminden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Ölçümler iki paralelli olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde ifade edilmiştir. Optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış ve 30°C'ye ısıtılmış 0,9 mL substrat çözeltisi 0,1 mL enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra absorbanstaki artış otomatik olarak kaydedilmiştir. Sadece inhibitörün etkisini belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 0,8 mL substrat, 0,1 mL inhibitör ve 0,1 mL enzim çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol olarak fosfat tamponunda hazırlanmış substrat kullanılmıştır. 1 ünite tirozinaz aktivitesi 30°C'de dakikada 0,001 birimlik absorban artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (87).

2.2.8.1. Deneyin Yapılışı

Tirozinaz aktivitesi, Ünal ve Şener'e göre substrat olarak L-tirozin kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (87). Bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinden 0,5'er mL konularak, 0,5 mL 0,2 M fosfat tamponu ilave (pH=7,0) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkube edildi. Çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 400 nm'de, 20 mM sodyum fosfat tamponuna karşı (pH=7,0) karşı okundu. Bu absorpsiyon değerinin regresyon denklemine uygulanmasıyla enzim tarafından, oda, sıcaklığında 5 dakikada açığa çıkarılan tirozin miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi.

2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE)

2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler

A. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 2,4228 g (0,1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=8,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

B. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8: 2,4228 g (0,1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

C. Numune Tamponu: 0,65 mL 1M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL % 87 gliserin, 1 mL % 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. 1M NaOH azar azar damlatılarak Mavi renk alması sağlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

D. Yürütme Tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL saf suda çözüldü, 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

E. Renklendirme Çözeltisi: 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asid ile 120 mL distile su ilavesiyle hazırlandı.

F. Renksizleştirme Çözeltisi: 7,5 hacim asetik asid, 5 hacim metanol ve 87,5 hacim destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması

Ayrırma Jeli: 5 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-% 0,8'lik bisakrilamid, 0,203 mL %10'luk SDS, 1-2µL % 99,99'luk N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) ve 3,13 mL distile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,266 mL % 1,5'lik günlük hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.

Yığıma Jeli: 1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %10'luk SDS'den 0,1 mL, % 99,99'lik TEMED'den 1µL ve distile sudan 5 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak günlük hazırlanmış % 1,5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0,2 mL ilave edildi. Yığıma jeli ile işlem yaparken distile su miktarı 5 mL çekildi.

2.2.9.3. SDS - PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü

Kanlıca mantarından tirozinazın DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen (101) yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Ayrırma jeli, ince uçlu bir enjektör yardımı ile 0,7 cm çapındaki cam tüplere, üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde, hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olması için etanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki

etanolmavi bant süzgeç kağıdı kesilerek ayırma jelinin yapısını bozmadan etanol emdirilmiş ve pürüzsüz yüzey elde edildikten sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Yığma jeli polimerleştikten sonra moleküler ağırlığı standart çözeltileri ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonunda elde edilen enzim çözeltisi toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Sırasıyla Ham ekstre, Hidroksiapatit kolon eluatı, ve Liyofize edilen DEAE kolon eluatı kuyucuklara yüklemesi yapıldı. Sığır sütünden elde edilen α-lactalbumin (14,2 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır serum albumini (66 kDa Monomer-132kDa Dimer) ve fasülyeden elde edilen üreaz (272 Trimer- 545 Heksamer) içeren standart protein çözeltileri, içerisinde 200 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı.

Kuyucuklara yüklendi. 40 mA akım geçirildi. Brom timol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0,5-0,3 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Elektroforez camlarındaki jel dikkatlice çıkarıldı, yığma jeli kesilip atıldı sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli, renklendirme çözeltisine konuldu ve 1,5-2 saat yavaş bir şekilde çalkalandı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. 30 dakikalık aralarla çözelti değiştirildi. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra %7'lik asetik asidde saklandı.

Kanlıca mantarı tirozinazın moleküler ağırlığı standart proteinlerin moleküler ağırlıkları yardımıyla grafikten hesaplandı. Bantların orijine göre R_f değerleri bulundu. Hesaplanan R_f değerleri apsise, protein bantlarına karşılık gelen moleküler ağırlıklarının logaritması da ordinata yazılarak moleküler ağırlığı grafiği elde edildi. Aynı şekilde tirozinaz R_f değeri hesaplanarak, grafikten moleküler ağırlığı tayin edildi.

2.2.10. Kanlıca Mantarından Elde Edilen Tirozinazın Enzim Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Kanlıca mantarından elde edilen tirozinaz aktivitesinde kinetik özellikleri incelemek sıcaklığın ve pH'nın etkisini incelemek için DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyonlar belirlenmiştir (89).

2.2.10.1. Optimum pH

Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'yı bulabilmek için 3,0-10,0 pH aralıklarında aktiviteler ölçülmüştür. pH=3-5 aralığında sitrik asid-NaOH tamponu, pH=6-8 aralığı sodyum fosfat tamponu, pH=9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Tirozinaz aktivitesi farklı tamponlarda, standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri optimum pH olarak belirlenmiş ve diğer deneyler bu pH'larda gerçekleştirilmiştir.

2.2.10.2. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklığı belirleyebilmek için enzimlerin 20–70°C arasındaki sıcaklıklarda aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tamponla hazırlanmış 0,9 mL kateşol çözeltisi ilgili sıcaklıkta su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 0,1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir (89).

2.2.10.3. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

Tirozinaz aktivitesinin uygun reaksiyon süresinin bulunması amacıyla substrat, enzim ve tampon çözeltilerden aktivite tayin yönteminde belirtilen miktarlarda alınarak reaksiyonun 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarında tirozinaz aktivitesi tayin edildi (87).

2.2.10.4. Kinetik Parametreler

Michealis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max})'ı belirlemek için substrat olarak çeşitli konsantrasyonlarda L-tirozin (0,00025–0,00125mM) çözeltisi kullanarak enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır.

2.2.10.5. Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

Enzim konsantrasyonunun tirozinaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla enzim çözeltisi, 180-1080 μ L arasında değişen hacimlerde alınarak 400 nM'de 5 dakika beklenerek ölçüm yapıldı ve tirozinaz aktivitesi tayin edildi.

2.2.10.6. Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun tirozinaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla enzim çözeltisi, 180-1080 μ L arasında değişen hacimlerde alınarak 400 nM de 5 dakika beklenerek ölçüm yapıldı ve tirozinaz aktivitesi tayin edildi.

3. BULGULAR

3.1. Kanlıca Mantarından Tirozinazın Saflaştırılması

3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu

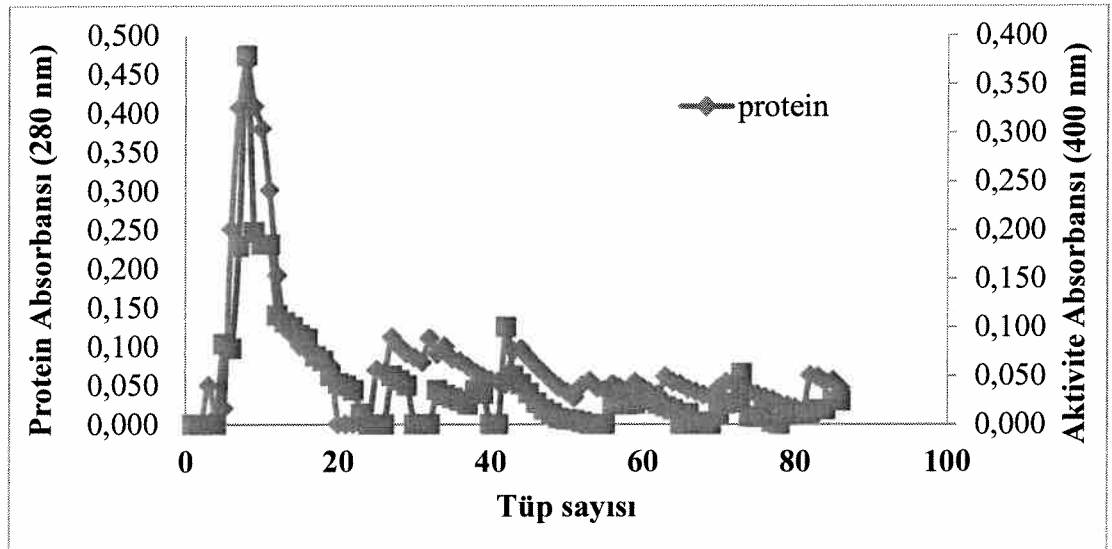
Kanlıca mantarı hamekstresindetirozinazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonununun %60 olduğu belirlendi.

3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

100 mM fosfat eluatının DEAE-selüloz kolonuna uygulanması sonucunda tirozinazın 1 mM NaCl/0,5 M fosfat tamponu ile tek pik şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1).

Kanlıca mantarından tirozinazın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 3.1’degösterildi.

Çalışmamızda Kanlıca mantarı ham ekstresi hazırlama, amonyum sülfat kesitive DEAE-selüloz kolonkromatografisi evrelerinde tirozinaz aktivitesi, tayin edildi. Kanlıca mantarından tirozinaz enzimi DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu 178,33 kat saflaştırıldı (Tablo 3.1) .



Şekil 3.1 Kanlıca Mantarı Ham Ekstresinin % 60 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği

Kolon Boyutu: 1.4x10 cm

Kolona uygulanan protein: 200 mg/mL

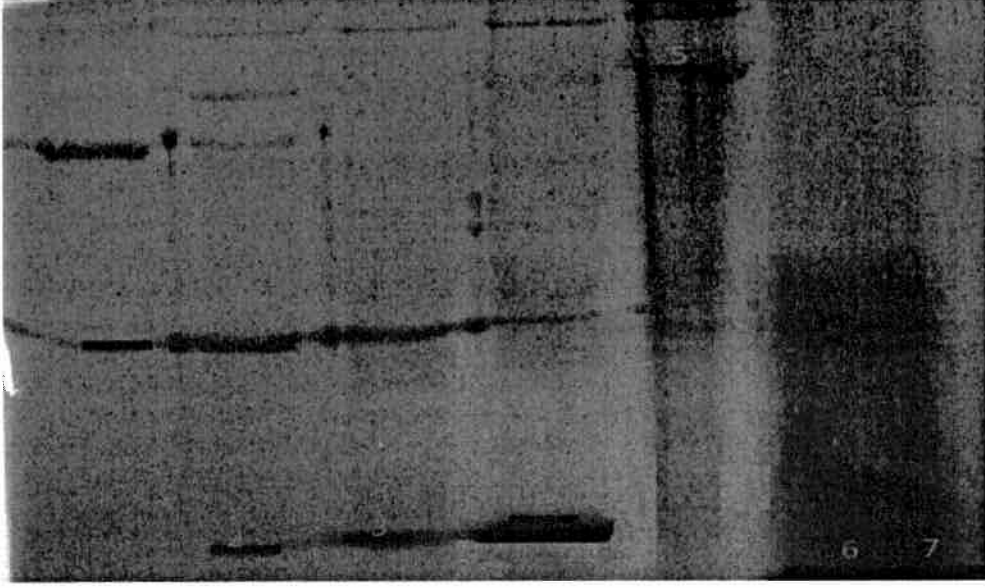
Elüsyon tamponları: pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfatta çözülmüş 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM NaCl.

Tablo 3.1 Kanlıca Mantarının Tirozinaz Aktivitesine Göre İncelenmesi

İşlem Evreleri	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstre	28687	16725	13,11	1
%60 Amonyum Sülfat Kesiti	2348	15845	13,49	1,03
Dializat	14582	9577	15,10	1,15
DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	53268	9647	2338	178,33

3.1.3. SDS-PAGE Elektroforezi

Saflaştırılan tirozinaz enziminin SDS-PAGE uygulanarak tek protein bandı içerdiği saptandı. Molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden tirozinazın molekül ağırlığının 30 kDa olduğu saptandı. (Şekil 3.2).

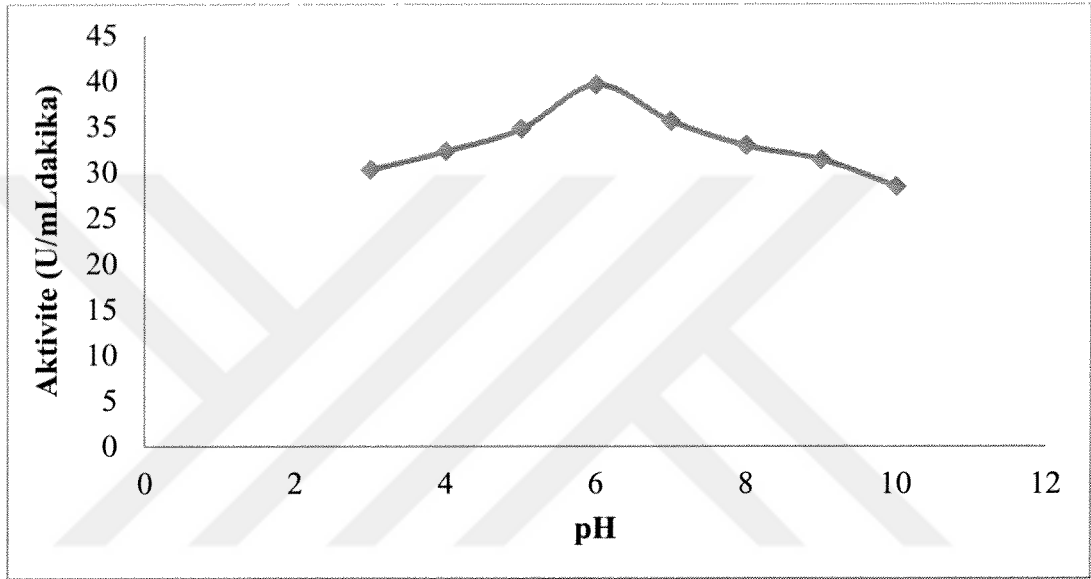


Şekil 3.2 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

1. Bovine serum albumin (Mr = 14,2 kDa)
2. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa)
3. Serum albumin (Mr = 45 kDa)
4. Alfa lakta albumin (Mr=132 kDa)
5. Üreaz (Mr= 272 kDa)
6. Ham ekstre (Mr = 20,5 kDa)
7. DEAE-selüloz enzim çözeltisi (Mr =30 kDa)

3.1.4. Optimum pH

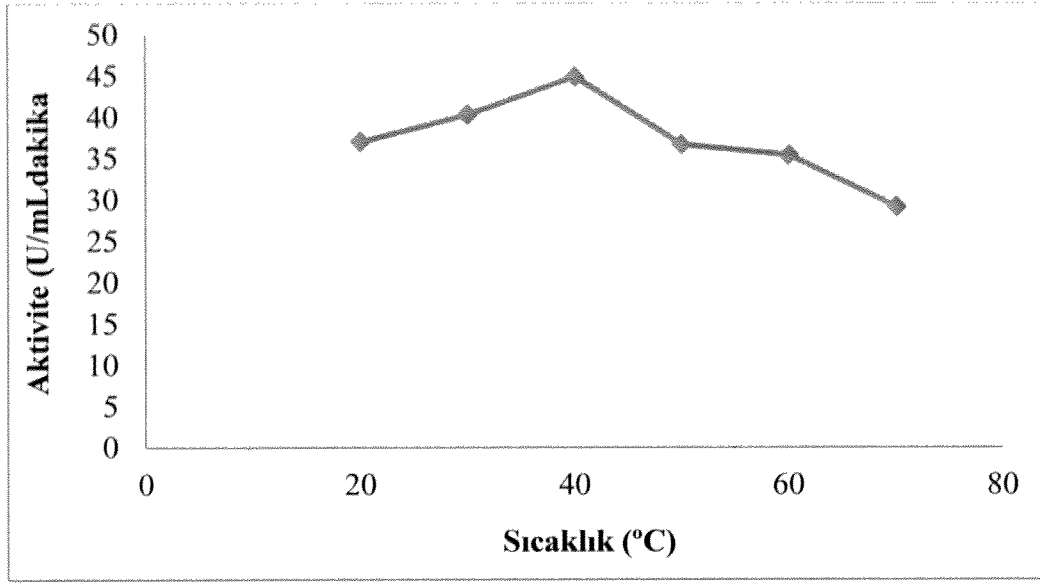
Tirozinaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (3-10 aralığı) L-tirozin kullanılarak reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen değerlerden yararlanılarak aktivitelere (87) hesaplandı. Böylece tirozinaz enzimi için optimum pH değeri tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Tirozinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

3.1.5. Optimum Sıcaklık

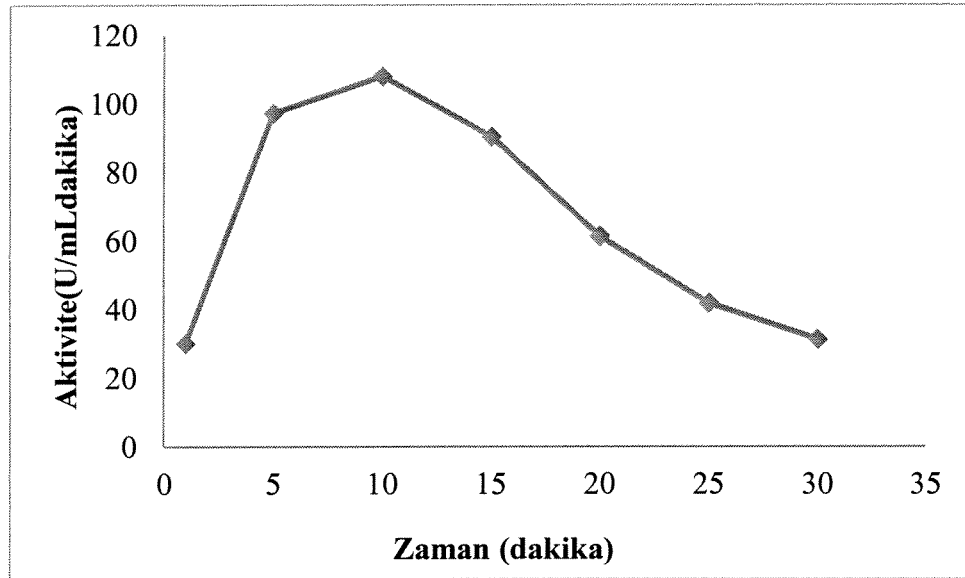
Tirozinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla L-tirozin kullanılarak 20-70°C'deki reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanılarak aktivitelere (87) hesaplandı. Böylece tirozinaz enzimi için optimum sıcaklık değeri belirlendi. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Tirozinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

3.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

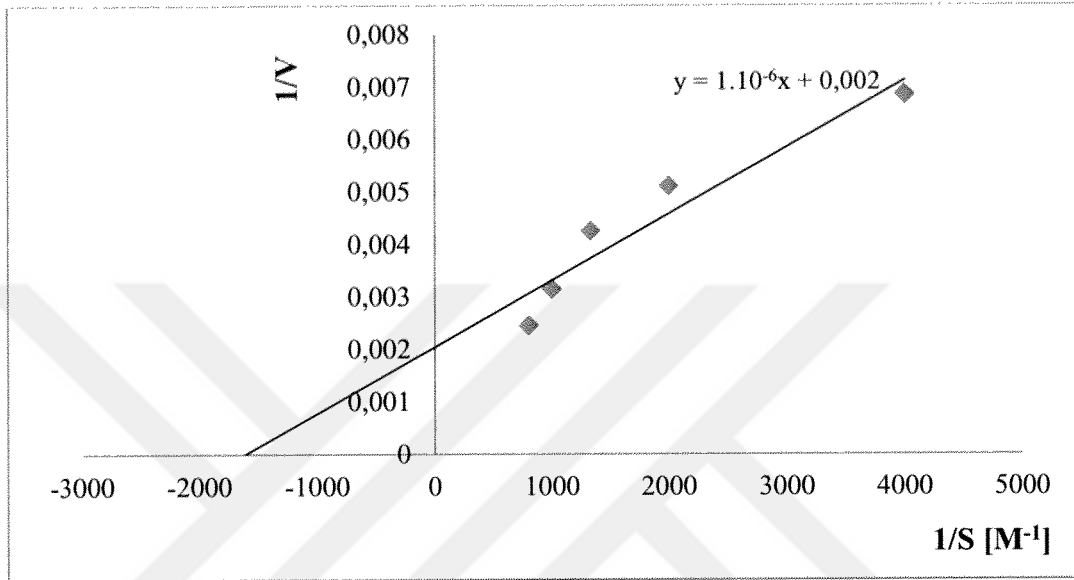
Tirozinaz aktivitesinin 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarındaki reaksiyonlar sonucunda aktivitenin zamana bağlı olarak arttığı saptandı. Ancak aktivitede artışın 5. dakikada başlaması nedeni ile aktivite tayininde 5 dakikada ölçümlerin yapılmasına karar verildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Zamanın Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

3.1.7. Tirozinaz Enziminin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

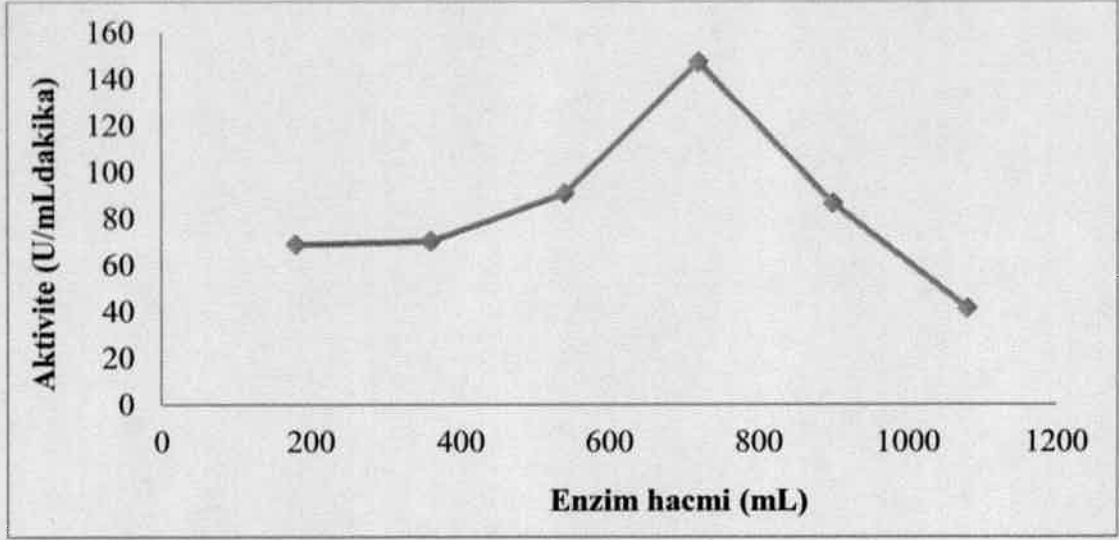
Tirozinaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk denkleminde yararlanılarak hesaplandı (91,92) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Tirozinaz Enziminin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

3.1.8. Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

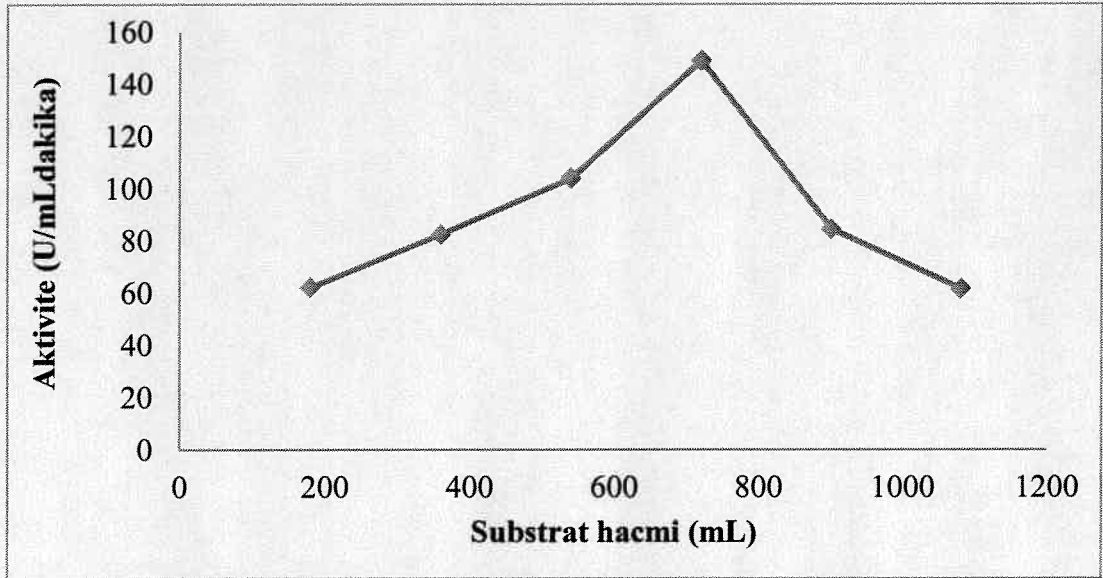
180-1080 μ L arasında değişen hacimlerde alınan enzim çözeltileriyle tirozinaz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Enzim hacminin artması ile tirozinaz aktivitesinin arttığı görüldü. Ancak 720 μ L enzim hacminde aktivite belli bir değerde dengelendiği, daha fazla substrat miktarının aktiviteyi arttırmadığı saptandı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Enzim Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

3.1.9. Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

180-1080 μL arasında değişen hacimlerde alınan enzim çözeltileriyle tirozinaz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Enzim hacminin artması ile tirozinaz aktivitesinin arttığı görüldü. Ancak 720 μL enzim hacminde aktivite belli bir değerde dengelendiği, daha fazla substrat miktarının aktiviteyi arttırmadığı saptandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Substrat Konsantrasyonunun Tirozinaz Aktivitesine Etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tirozinaz enzimi, bitkilerde hücrelerin sağlam kısımları olan plastit ve kloroplastlarda baskın olarak bulunur. Ham meyve hücrelerinde membran bağımlı olarak plastitlerde, olgunlaşma ve depolama sürecinde çözünmüş veya parçalanmış olarak bulunabilir. Bu sebeple tirozinaz bitki hücrelerinde aynı anda her iki formda dabilinir (96). Oksidoredüktaz sınıfı enzimler, protein yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle çok fazla çalışılmamış ancak tirozinaz enzimi son 30 yıl içerisinde birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (97). Bitkilerde meyvenin ham veya olgun olması bu enzimin katalizlediği reaksiyonu etkileyen bir unsurdur. Enzim özütü birçok izoenzim kombinasyonunu ve enzim olmayan protein karışımlarını içerebilir. Bu durum gıda endüstrisinde oldukça tercih edilen bir durumdur (98).

Yapılan bu çalışmada, *L. salmonicolor* mantarında bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan tirozinazın varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Bu amaçla; söz konusu mantarlardan hazırlanan enzim özütünden tirozinaz, sentezlenen bir afinite jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Enzimin varlığı, saf enzim elüatında elektroforetik olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin biyokimyasal, kinetik özellikleri araştırılıp, elde edilen veriler diğer organizmalarda çalışılan tirozinaz'lar ile karşılaştırılmıştır.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda tirozinaz, çaydan 3,32 kat, domat zeytininden 11,7 kat olarak saflaştırılmıştır. Çalışmamızda ise Kanlıca mantarından tirozinaz 178,33 kat saflaştırılmıştır. Bu değer, diğer bitkilerle ilgili çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Meyve dokularından tirozinazı ekstrakte edebilmek için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH, genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde

edilen enzimin yapısını etkileyebilir. Araştırmamızda birçok literatürde belirtildiği gibi 200 mM, pH: 7,0 fosfat tamponu kullanıldı.

Tirozinaz aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optikdan sitelerinin ölçümü ile spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Bu metot oldukça basittir ve rutin analizlerde kullanılır. Ayrıca bu metot diğer metotlar kadar hassas ve güvenilir olduğundan dolayı çalışmamızda tirozinaz aktivitesi 400 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Enzimlerde, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, hamenzim ekstresi hazırlama yöntemine ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir (99,100). Yapılan çalışmalarda Anamur muzunun optimum pH'sı 7,0; çayın optimum pH'sı 6,02; kaldırık bitkisinin pH'sı 5,0 olarak bulunmuştur. Bu yüzden, pH, enzim aktivitesinin ifadesinde önemli bir faktördür. *L. salmonicolor* tirozinazının pH'ya bağımlılığı, 3,0-10,0 pH değerleri arasında incelendiğinde, grafiğin tek pik verdiği ve optimum pH'nın L-tirozin substratı kullanılarak 6,0 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *L. salmoicolor* pH optimumu açısından uygunluk gösterdiği görülmektedir.

Bu çalışmada, sıcaklık ve pH göz önüne alındığında enzimin sıcaklığa dayanıklı bir enzim olduğu ve pH'nın da kararlı bir yapıda olduğu söylenebilir. Uygun enzim konsantrasyonu, substrat ve reaksiyon sürelerinin tayininde bulduğumuz değerler, enzim aktivitesinin uygun reaksiyon şartlarında yapıldığını göstermektedir.

Sonuç olarak Giresun yöresinde yetişen yenilebilir Kanlıca mantarından tirozinaz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Buna göre;

- Kanlıca mantarından tirozinaz 178,33 kat saflaştırıldı.
- Optimum sıcaklık değerinin 40°C, optimum pH değerinin 6,0 olduğu bulundu.
- Tirozinaz aktivitesi için uygun reaksiyon süresi ise 5 dakika olarak belirlendi.

- Tirozinaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin, sırasıyla 0,500 mM ve 500U olduğu bulundu.
- SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu.

Elde edilen sonuçlardan, ölkemizde yetişen ve yurt dışına ihraç edilen Kanlıca mantarından tirozinaz enziminin saflaştırılıp çeşitli endüstri alanlarında kullanılabileceği kanısına varılmıştır.



5. KAYNAKLAR

1. K hrevioğlu, İ.  ., Keha, E. E. 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, İstanbul
2. Bhat, M.K. 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
3. Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji*. pp. 193-243-353-383, Tübitak Yayınları, Aydın.
4. Kuzu, S.B. 2008. Kitinaz  reten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu.  ukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 82, Adana.
5. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. Kradeniz Teknik Üniversitesi, Kitap Satış Bürosu, Trabzon.
6. Altınışık, M. 2009. *Enzimler*. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>. Web adresinden 27 Ekim 2016 tarihinde edinilmiştir.
7. Can, A., Akev, N. 2008. *Eczacılık Fakültesi  ğrencileri İçin Biokimya Dersleri*. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.
8. Chaturvedi, M., Singh, M., Chugh, R. Man, Pandey, S. 2010. Lipase Production From Bacillus Subtilis MTCC 6808 by Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate. *Research Journal of Microbiology*, 5: 725-730.

9. Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H, Inlow, J.K. 2006. Comparative Analysis of Polyphenol Oxidase From Plant and Fungal Species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 108-123.
10. Önez, Z. 2006. Üzüm (*vitis vinifera l.*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
11. Laurila, E., Kervinen R., Ahvenainen, R. 1998. The İnhibition of Enzymatic Browning in Minimally Processed Vegetables and Fruits, *Postharvest News and Information*, 9(4): 53-66.
12. Erkel, D. 1992. Dünyada ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, 2-4 Kasım, İstanbul, Bildiriler Kitabı, Cilt 1: 2-8.
13. Sesli, E. 1994. Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
14. Boztok, K. 1990. Mantar Üretim Tekniği , Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi yayınları, İzmir.
15. Blackwell, W. H. 1998. Paisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall, *New Jersey*.
16. Ramsbottom J. 1953. Mushrooms & Toadstools. *Collins*. ISBN.
17. Linnaeus, C. 1753. Species Plantarum: Tomus II. Holmiae. (Laurentii Salvii), pp. 1172.
18. [http:// yukaritepekoyu.tr](http://yukaritepekoyu.tr) web adresinden 30 Ekim 2016 tarihinde edinilmiştir.

19. Solak M.,H., Işıloğlu M., Gücin F., Gökler I. 1999. Macrofungi of Izmir Province. *Turkish Journal of Botany*, 23: 383-90.
20. Gezer, K. 2000. Contributions to the Macrofungi Flora of Antalya Province. *Turkish Journal of Botany*, 24: 293-98.
21. Pekyardımcı, S. 1992. Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisinde Uygulamaları, *Gıda*, 17 (3): 181-186.
22. Laurila, E., Kervinen R., Ahvenainen, R. 1998. The İnhibition of Enzymatic Browning in Minimally Processed Vegetables and Fruits, *Postharvest News and Information*, 9 (4): 53-66.
23. Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables, *CRC Critical Rewievs in Food Science and Nutrition*, 14: 49-129.
24. Keleş, F. 1987. Gıdalarda Enzimatik Esmerleşme ve Kontrolü, *Doğa Dergisi*, 11: 105-121.
25. Spille, G. A. 1997. Caffeine, Chapter 3. Tea: The Plant and Its Manufacture; *Chemistry and Consumption of the Beverage*, CRC Press, 1-38.
26. Beena, P., Gowda, L. R. 2000. Purification and Characterization of Apolyphenol Oxidase From the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48: 3839-3846.
27. Halim, D.H., Montgomery, M.W. 1987. Polyphenol Oxidase of d'Anjou Pears (*Pyrus communis* L.), *Journal of food Science*, 43: 603-608.
28. Yagar, H. 2004. Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 34: 387-397.

29. Aydemir, T., Akkanli, G. 2006. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Celery Root (*Apium graveolens* L.) and The Investigation of the Effects on the Enzyme Activity of Some Inhibitors, *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1090-1098.
30. Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, O., Kocaçalışkan, I., Oktay, M., Onganer, Y. 1996. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 44: 2982-2986.
31. Park, E. Y.,Luh, B. S. 1985. Polyphenol Oxidase of Kiwi Fruit. *Journal of Food Science*, 50: 678-684.
32. Whitaker. J. R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker. New York, *Chapters 22 and 24*.
- 33.Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollog. J. M. 1989. Immobilization of Enzymes on Clays and Soils, *Soil Biology Biochemistry*, 21 (2): 223-230.
34. Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, and N. A., Klenitskaya, I. A. 1992. Immobilization of Polyphenol Oxidase by Soil Humus, *Eurasian Science*, 5: 60-65.
35. Ragazzi, E.,Veronese, G. 1967. Ricerche Sulle Fenolossidasi Esul Contenato in o-difenolli Delle Olive,*Annali di Chimica*, 57:1396-1397.
- 36.Tolbert, N.E. 1973. Activation of Polyphenol Oxidase hlof Coroplasts, *Plant Phatology Journal*, 51(2): 234-244.
- 37.Brooks, D.W.,Dawson, C.R. 1966. Aspects of Tyrosinase Chemistry, in *The Biochemistry of Copper*, Peicash, Academic Press, New York, 343.

38. Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F. 1994. Chemical and Anzymatic Oxidation of 4-methylcatechol in The Presence and Absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 917: 190-197
39. Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W. O'Conner, K.E. 2004. Biotransformation of Halophenols Using Crude Cell Extracts of *Pseudomonas Putida* F6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 486-492.
40. Matheis, G., Belitz, H. D. 1977. Studies on Enzymatic Browning of Potatoes 170 (*Solanum tuberosum*). Kinetics of Potato Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) Monophenol, Dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung*, 163(3): 191-195.
41. Herrmann, K. 1973. Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe Als Natüerliche Antioxydantein, *Astrochemistry*, 75: 499-504.
42. Şakiroğlu, H. 1994. Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
43. Gross. D., Coombs. J. 1975. Enzymaticc Colour Formation in Beet and Cane Juices. Paper presented at the 15th *General Assembly of C. I. T. S.*, Vienna. 74: 153-161.
44. Martin, W., Ruberte. R. 1976. The Polyphenol of *Dioscorea Alata* (yam) Tubers Associated with Oxidative Browning, *Journal of Agriculturel and Food Chemistry*, 24: 67-70.
45. Wilcox, D.E., Porras, A. G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., and Solomon, E.I. 1985. Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear

Copper Active Site in Tyrosinase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 107: 4015-4027.

46. Harel, E., Mayer. A. M., Shain. Y. 1964. Catechol Oxidases From Apples, Their Properties, Subcellular Location and Inhibition, *Physiologia Plantarum*,17:921-930.
47. Jen, J. J., Kahler K. R. 1974. Characterization of Polyphenoloxidase in Peaches Grown in the Southeast, *Hort Science*, 9:590-591.
48. Lavollay, J., Legrand. G. Lehongre G., Neumann, J. 1963. Enzyme-Substrate Specificity in Potato Polyphenol Oxidase, in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. E. Ed. Pergamon Press., Oxford, 33.
49. Vamos-Vigvazo, L.Gejzago. L. 1978. Substrate Specificity of the Enzymatic Browning of Apples, *Acta Aliment Academia Scientarium Hungaricae*,7:227-235.
50. Yang, C.P., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., Hayashi, N. 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 1446-1449.
51. Mathewson, P.R. 2000. Enzymes, *Eagen Press Handbook Series*, 37-38.
52. Mcweeny, D.J. 1974. The Chemistry of Non-enzymatic Browning in Foods and its Control by Sulphites, *Journal of Science Food Agriculture*, 25 86): 735-746.
53. Espin, C.E., Garcia-Ruiz, P.A., Varon R., and Garcia-Canovas, F. 1998. Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases, *Journal of Agricultural Food Chemistry* , 46: 2968-2975.

54. Labuza, T.P., Lillemo, J. H., Taoukis, P. S. 1992. Inhibition of Polyphenol Oxidase by Proteolytic Anzymes, *Fruit Processing*, 2: 9-13.
55. White, J.S., White, D.C. 1997. Source Book of Enzymes, Florida. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 11651-11653.
56. FDA. 1996. Chemical preservatives, *Food and Drug Administration*, the Office of Federal Register, Washington DC, USA.
57. Ferrar, P. H., Walker, J. R. L. 1996. Inhibition of Diphenol Oxidases: A Comperative Study, *Journal of Food Biochemistry*, 20: 15-30.
58. Kubo, I., Yokokava, Y. 1992. Two Tyrosinase Inhibiting Flavanol Glycosides From *Buddleria coriacea*, *Phytochemistry*, 31: 1075-1077.
59. Chen, Q. X., Kubo, I. 2002. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4108- 4112.
60. Walker, J.R.L. 1969. Inhibition of the Apple Phenolase System Through Infection by *Penicillium Expansum*, *Phytochemistry*, 8(3): 561-566.
61. Duckworth, H.W., Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 245(7): 1613-25.
62. Jones, J. D., Hulme. A. C., Woollorton. L.S.C. 1965. Use of Poly(vinyl) Pyrrolidinone in The Isolation of Enzymes From Chloroplasts, *Phytochemistry*, 4: 659-760.
63. Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., Garcia-Carmona, F. 1993. Substrate Dependent Activation of Latent Potato Leaf Polyphenol Oxidase by Anionic Surfactans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1583-1586.

64. Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F. 1990. Partial Purification of a Thylakoid Bound Enzyme Using Temperature-induced Phase Partitioning, *Analytical Biochemistry*, 184: 279-282.
65. Jimenez-Atienzar, M., Garcia-Carmona, F. 1996. Kinetics of The Slow pHMediated Transition of Polyphenol Oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331: 15-22.
66. Friedman, M. 1997. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1523- 1540.
67. Dinçer, B. 1999. Döngel Bitkisi (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) Meyvelerindeki Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
68. Mayer, A. M. 1987. Polyphenol Oxidases in Plants-Recent Progress.*Phytochemistry*, 26: 11-20.
69. Paul, B.,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.
70. Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., Swieca, M. 2007. Characterization of Polyphenol Oxidase from Butter Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), *Food Chemistry*, 107: 129-135.
71. Fan, Y.,Flurkey, W.H. 2004. Purification and Characterization of Tyrosinase from Gill Tissue of Portebella Mushrooms, *Phytochemistry*, 65: 671- 678.
72. Wisseman, K. W., Lee, C. Y. 1980. Purification of Grape Polyphenol Oxidase with Hydrophobic Chromatography, *Journal of Chromatography*, 192: 232-235.

73. Das, J. R., Bhat, S. G., Gowda, L. R. 1997. Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Kew Cultivar of Indian Pineapple Fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2031-2035.
74. Chazarra, S., Garcia-Carmona, F., Cabanes, J. 2001. Evidence For a Tetrameric Form of Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Polyphenol Oxidase: Purification and Characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4870-4875.
75. Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O.I. 2006. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Ferula* sp., *Food Chemistry*, 95: 503-508.
76. Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables, *CRC Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 14: 49-123.
77. Chen, J.S., Cheng-i, W., Marshall, M.R. 1991. Inhibition Mechanism of Kojic Acid on Polyphenol Oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11): 1897-1901.
78. Walker, J.R.L. 1977. Enzymic Browning in Foods: Its Chemistry and Control, *Food Technology New Zealand*, 12: 19-25.
79. Ruijsenaars, H.J., Hartmans, S. 2004. A Cloned *Bacillus Halodruans* Multicopper Oxidase Exhibiting Alkaline Laccase Activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 177-182. doi:10.1007/s00253-004-1571-0.
80. Claus, H., Decker, H. 2006. Bacterial Tyrosinases, *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 3-14.

81. Rodriguez Couto S., Toca Herrera 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccases : A review. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513.
82. Şimşek Ş., Yemenicioğlu A. 2007. Partial Purification and Kinetic Characterization of Mushroom Stem Polyphenoloxidase and Determination of its Storage Stability in Different Lyophilized Forms. *Process Biochemistry*, 42: 943-950.
83. Polaina, J., MacCabe, A. P. 2007. Industrial Enzymes: Structure, *Applications of Quadratic Functions*, 17: 250–255.
84. Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. 1997. Heat Inactivation Kinetics of Apple Polyphenoloxidase and Activation of its Latent Form, *Journal of Food Science*, 62: 508-510.
85. Şener, A., Ünal, M. Ü. 2011. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Akko XIII Loquat (*Eriobotrya japonica* cv Akko XIII). *Food Biotechnology*, 25: 30-42.
86. Min-Kyung L. 2007. Inhibitory Effect of Banana Polyphenol Oxidase During Ripening of Banana by Onion Extract and Maillard Reaction Products. *Food Chemistry*, 102: 146–149.
87. Ünal, M.Ü., Şener, A. 2006. Determination of Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Emir). *Journal of Science Food Agriculture*, 86: 2374-2379.
88. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
89. Ünal, M.U. 2007. Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913.

90. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
91. Warburg, O., Christian, W. 1941. Isolierung und Kristallinsation Des Garungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310: 384-421.
92. Erlanson, C. 1970. P-Nitrophenyl Acetate as a Substrate for a Carboxyl-ester Hydrolase in Pancreatic Juice and Intestinal Content. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 5: 333-336.
93. Sobek, H. Gorich, H. 1988. Purification and Characterization of a Heat-stable Esterase from the Thermoacidophilic Archaeobacterium Sulfolobus Acidocaldarius. *Biochemical Journal*, 250: 453-458.
94. Torossian, K. Bell, A.W. 1991. Purification and Characterization of an Acid-Aesistant Triacylglycerol Lipase from *Aspergillus Niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13: 205-211.
95. Ikeda, R., Uyama, H., Kobayashi, S. 1996. Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide) Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid, *Macromolecules*, 29: 3053-3054.
96. Concellon, A., Anon, M.C., Chaves, A.R. 2004. Characterization and Changesin Polyphenol Oxidase from Eggplant Fruit (*Solanum melongena* L.) DuringStorage at Low Temperature, *Food Chemistry*, 88: 17-24.
97. Seo,S.Y., Sharma,V.K., Sharma,N. 2003. Mushroom Tyrosinase: RecentProspects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2837-2853.

98. Duangmal, K., Owusu-Apenten, R.K. 1999. A Comparative Study of Polyphenol Oxidases from Taro (*Colocasia esculenta*) and Potato (*Solanumtuberosum*), *Food Chemistry*, 64: 351-359.
99. Aylward, F., Haisman, D.R. 1969. Oxidation Systems in Fruits and Vegetables-Their Relation to the Quality of Pressured Products, *AdvancesFoodandNutritionResearch*, 17: 1-76.
100. Jiang, Y.M. 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit, *Food Chemistry*, 66: 75-79.
101. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.

ÖZGEÇMİŞ

1989 Yılında Kastamonu/İnebolu'da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini İnebolu İsmet Paşa İlköğretim okulunda tamamladı. Lise öğrenimini 2004-2008 yılları arasında İnebolu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesinde tamamladı. 2009 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünden 2013 yılında mezun oldu. 2013 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans programına halen devam etmektedir.

