

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİLEBİLİR MANTAR TÜRLERİNDEN POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURCAN DEDEOĞLU

Balıkesir, 2009

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

YENİLEBİLİR MANTAR TÜRLERİNDEN POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURCAN DEDEOĞLU

Tez Danışmanı : Yrd. Doç.Dr. ÖZEN ÖZENSOY GÜLER

Sınav Tarihi : 17/08/2009

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, Ağustos-2009

`` Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2008 / 02 Kodlu Proje İle Desteklenmiştir. Teşekkür ederiz ``

ÖZET

YENİLEBİLİR MANTAR TÜRLERİNDEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

NURCAN DEDEOĞLU

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanları: Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)

Balıkesir, 2009

Bu çalışmada, enzimatik kararmaya neden olan polifenol oksidaz (PPO) ekstrakte edildi ve amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sepharose 4B-L-tirozin-paraaminobenzoik asid afinite kolonu ile saflaştırıldı.

Enzim kaynağı olarak *Lactarius salmonicolors* ve *Agaricus bisporus* mantarları kullanıldı. Saflaştırılan enzimler için SDS-PAGE de tek bir bant elde edildi. *Lactarius salmonicolor* PPO (LsPPO) enziminin molekül ağırlığı 36 kDa, *Agaricus bisporus* PPO (AbPPO) enziminin molekül ağırlığı 50 kDa civarında gözlemlenmiştir.

Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak, PPO enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. LsPPO enziminin kullanılan üç farklı substrat için optimum pH ve sıcaklıkları sırasıyla pH 6.0-7.5 ve 0-25 °C

arasında değiştiği bulunmuştur. Bu değerler AbPPO enzimi için ise pH 7.5-8.0 ve 20-30 °C arasında değiştiği bulunmuştur.

Lactarius salmonicolor ve *Agaricus bisporus* PPO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için K_M ve V_{max} değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur. V_{max}/K_M değerlerine göre LsPPO enzimi için en uygun substratın 4-metil katekol, AbPPO enzimi için ise pirogallol olduğu bulunmuştur.

Glutasyon, L-sistein, p-aminobenzen sulfanamid, okzalik asit, 2-merkaptto etanol, siyrincis asit ve L-tirozin' in AbPPO ve LsPPO aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi katekol substratı kullanılarak etkisi incelendi.

Kinetik alışmalar 2-merkaptto etanol, L-sistein, siyrincis asit, okzalik asit, glutasyon ve p-aminobenzen slfanamidin LsPPO enziminin unkompetitif inhibir iken, L-tirozin kompetitif inhibir olduğunu göstermiştir.

Kinetik çalışmalara göre 2-merkaptto etanol, L-sistein, siyrincis asit ve L-tirozinn, AbPPO enziminin unkompetitif inhibir iken, p-aminobenzen sülfanamid karışık tipli ve okzalik asit ise kompetitif inhibirdr.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Lactarius salmonicolor*; *Agaricus bisporus*; polifenol oksidaz; afinite kromatografisi; inhibisyon; optimum pH ve sıcaklık.

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM EDIBLE MUSHROOMS

NURCAN DEDEOĞLU

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Chemistry
(MASTER. Thesis / Supervisor: Yrd. Doç.Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)

Balıkesir, 2009

In this study polyphenol oxidase (PPO) which leads to undesirable enzymatic browning was extracted and purified through ammonium sulphate precipitation, dialysis and Sepharose 4B-L-tyrosin-paraaminobenzoic acid affinity column.

Lactarius volemus and *Agaricus bisporus* mushrooms are used as enzyme sources. The purified enzymes were migrated as a single band on SDS-PAGE. The molecular weight of the *Lactarius salmonicolor* PPO (LsPPO) enzyme and *Agaricus bisporus* PPO (AbPPO) enzyme were estimated respectively around 36 kDa and 50 kDa.

Optimum pH and temperature values of PPO enzyme was determined using catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol as substrate. The optimum pH and temperature values of LsPPO for the used three substrates ranged between the pH 6.0-7.5 and 25-0 °C. In the case of AbPPO, pH 7.5-8.0 and 20-30 °C values were obtained.

The K_M and V_{max} values of *Lactarius salmonicolor* and *Agaricus bisporus* PPO towards catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol were determined by Lineweaver Burk method. The values V_{max}/K_M showed that LsPPO has the greatest reactivity towards 4-metil catechol and AbPPO has the greatest reactivity towards pyrogallol among the substrates used.

Effects of some classical PPO inhibitors of glutathione, L-Cysteine, p-aminobenzene sulfonamide, oxalic acid, 2-mercapto ethanol, syringic aci and L-tyrosine were investigated on the activity of AbPPO using as a catechol substrate.

The kinetic analysis showed that 2-mercapto ethanol, L-cystein, syringic asid, oxalic acid, glutathione and p-aminobenzene sulfonamide were uncompetitive inhibitors of LsPPPO while L-tyrosine was acted as a competitive inhibitor of LsPPO enzyme.

According to kinetic results, 2-merkapto etanol, L-cystein, syringic acid and L-tyrosine were uncompetitive inhibitor of AbPPO enzyme while p-aminobenzene sulfanamide was the mixed type of inhibitor and oxalic acid was as a competitive inhibitor of AbPPO enzyme.

KEY WORDS: *Lactarius salmonicolor*; *Agaricus bisporus*; polyphenol oxidase; affinity chromatography; inhibition; optimum pH and temperature.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖNSÖZ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Mantarlar Hakkında Genel Bilgi	2
1.1.1 <i>Lactarius salmonicolor</i> Makromantarının Morfolojik Özellikleri	6
1.1.2 <i>Agaricus bisporus</i> Makromantarının Morfolojik Özellikleri	7
1.1.3 Mantarlar ve Sağlığımız	8
1.2 Enzimatik Kararma	9
1.3 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası	13
1.3.1 PPO'nun Adlandırılması	13
1.3.2 PPO'nun Tabiattaki Dağılımı	14
1.3.3 PPO'nun Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları	14
1.3.4 PPO'nun Substratları	23
1.3.5 PPO'nun Aktivatörleri	27
1.3.6 PPO'nun İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi	28
1.4 PPO'nun Saflaştırılması	31
1.4.1 PPO'nun Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı	34
1.4.2 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
1.5 Polifenol Oksidaz'ın Doğada, Endüstride, Tıpta ve Sentez Reaksiyonlarındaki Rolü	37
1.6 Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi	40
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	43

2.1 MATERYALLER	43
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	43
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	44
2.2 YÖNTEMLER	49
2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması	49
2.2.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme	49
2.2.3 Diyaliz	39
2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	50
2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması	50
2.2.4.1.1 Sepharose-4B'nin CNBr ile Aktifleştirilmesi ve <i>L</i> -Tirozin Bağlanması	51
2.2.4.1.2 <i>L</i> -Tirosinle Modifiye Edilen Sepharose-4B'ye <i>p</i> -aminobenzoik Asidin Bağlanması	52
2.2.4.2 Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	53
2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	54
2.2.6 Protein tayini	55
2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini	55
2.6.1.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	56
2.2.7 PPO Enziminin Aktivite Tayini	56
2.2.8 PPO Enzimi İle İlgili Kinetik Çalışmalar	57
2.2.8.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	57
2.2.8.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	57
2.2.8.3 Farklı Substratlar İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	57
2.2.8.4 İnhibitörler İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması	58
2.2.8.5 İnhibitörler İçin K_i Değerlerinin Bulunması	58
3. BULGULAR	52
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	52
3.2 <i>Lactarius salmonicolor</i> PPO (LsPPO) Enzimi İle İlgili Çalışmaların Sonucu	64

3.2.1 LsPPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	64
3.2.2 LsPPO ve AbPPO Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	67
3.2.3 LsPPO Enziminin Farklı Substratlar İçin Optimum pH Tayini	69
3.2.5 LsPPO Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	72
3.2.6 LsPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	73
3.2.7 LsPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması	79
3.2.8 LsPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması	92
3.3 <i>Agaricus bisporus</i> PPO Enzimi (AbPPO) ile ilgili Çalışmaların Sonuçları	112
3.3.1 AbPPO Enziminin Afinite Kromatografisiyle saflaştırılması	112
3.3.2 AbPPO Enziminin Farklı substratlar için Optimum pH tayini	114
3.3.3 AbPPO Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	116
3.3.4 AbPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	118
3.3.5 AbPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması	124
3.4.8 AbPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması	133
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	153
5. KAYNAKLAR	164

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
PPO	Polifenol oksidaz enzimi
LsPPO	<i>Lactarius salmonicolor</i> polifenol oksidaz enzimi
AbPPO	<i>Agaricus bisporus</i> oksidaz enzimi
E.C.	Enzim kod numarası
U	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N',-tetrametil etilendiamin
I ₅₀	Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
PEG	Polietilen glikol
PVP	Polivinilpirolidin
PABA	p-amino benzoik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Şekil 1.1 Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri	3
Şekil 1.2	Lactarius salmonicolor	6
Şekil 1.3	Agaricus bisporus (Kültür mantarı)	7
Şekil 1.4	Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması	10
Şekil 1.5	Kinonların serbest amino asitlerle polimerizasyonu	13
Şekil 1.6	Monofenollerin <i>o</i> -hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)	15
Şekil 1.7	<i>o</i> -difenollerin <i>o</i> -kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)	15
Şekil 1.8	Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi	16
Şekil 1.9	PPO'nun bakır merkezleri	17
Şekil 1.10	PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	10
Şekil 1.11	PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.	20
Şekil 1.12	Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi	21
Şekil 1.13	PPO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu	22
Şekil 2.1	Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.	53

Şekil 2.2	Kompetetif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 2.3	Nonkompetetif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	61
Şekil 2.4	Unkompetetif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	62
Şekil 3.1	Lowry yöntemine göre protein standart grafiği	63
Şekil 3.1	Na ₂ HPO ₄ Tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan LsPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	65
Şekil 3.3	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LsPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	67
Şekil 3.4	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan AbPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	68
Şekil 3.5	LsPPO enziminin üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	70
Şekil 3.6	LsPPO enziminin inkübasyon süresine bağlı koruduğu aktivite değişimi	72
Şekil 3.7	Şekil 3.7 LsPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	76
Şekil 3.8	LsPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	76
Şekil 3.9	LsPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	77
Şekil 3.10	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı	76

konsantrasyonunda okzalik asid için %aktivite-[I] grafiği

Şekil 3.11	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda syringic asid için %aktivite-[I] grafiği sıcaklığa bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	81
Şekil 3.12	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p- aminbenzen sulfanamid için %aktivite-[I] grafiği	84
Şekil 3.13	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için %aktivite-[I] grafiği	84
Şekil 3.14	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için %aktivite-[I] grafiği	87
Şekil 3.15	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β-merkapt etanol için %aktivite-[I] grafiği	87
Şekil 3.16	LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-tirozin için %aktivite-[I] grafiği	89
Şekil 3.17	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine okzalik asid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]=87 \times 10^{-5}$ M	96
Şekil 3.18	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine syringic asid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 10.0 \times 10^{-5}$	96
Şekil 3.19	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzen sülfanamid'in hibisyon etkisi. $[I_1]= 3.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 15.0 \times 10^{-5}$ M	101

Şekil 3.20	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi. $[I_1]= 3.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 15.0 \times 10^{-5}$ M	101
Şekil 3.21	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 25.0 \times 10^{-5}$ M	106
Şekil 3.22	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkapt etanol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1]= 3.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 10.0 \times 10^{-5}$ M	106
Şekil 3.23	LsPPO enzimi aktivitesi üzerine L-tirozin'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 17.5 \times 10^{-5}$ M	109
Şekil 3.24	Na_2HPO_4 Tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan AbPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	111
Şekil 3.25	AbPPO enziminin üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği	115
Şekil 3.26	AbPPO enziminin inkübasyon süresine bağlı koruduğu aktivite değişimi	117
Şekil 3.27	AbPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	121
Şekil 3.28	AbPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	121
Şekil 3.29	AbPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	122
Şekil 3.30	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda okzalik asid için %aktivite-[I] grafiği	125
Şekil 3.31	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı	125

	konsantrasyonunda syringic asid için %aktivite-[I] grafiği	
Şekil 3.32	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p- aminbenzen sulfanamid için %aktivite-[I] grafiği	127
Şekil 3.33	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için %aktivite-[I] grafiği	127
Şekil 3.34	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için %aktivite-[I] grafiği	129
Şekil 3.35	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β-merkapt etanol için %aktivite-[I] grafiği	129
Şekil 3.36	AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-tirozin için %aktivite-[I] grafiği	131
Şekil 3.37	AbPPO enzimi aktivitesi üzerine okzalik asid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]=15 \times 10^{-5}$ M	137
Şekil 3.38	AbPPO enzimi aktivitesi üzerine syringic asid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 10.0 \times 10^{-4}$ M, $[I_2]= 20.0 \times 10^{-4}$	137
Şekil 3.39	AbPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzen sülfanamid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 20.0 \times 10^{-4}$ M	142
Şekil 3.40	AbPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi. $[I_1]= 3.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]= 15.0 \times 10^{-5}$ M	142
Şekil 3.41	AbPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon	147

etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2]= 17.5 \times 10^{-4} \text{ M}$

Şekil 3.42 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkapt etanol'ün 147
inhibisyon etkisi.

$[I_1]= 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2]= 12.0 \times 10^{-4} \text{ M}$

Şekil 3.43 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine L-tirozin'in inhibisyon 151
etkisi. $[I_1]= 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2]= 15.0 \times 10^{-4} \text{ M}$

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Mantar ve bazı gıda maddelerinin taze ağırlık üzerinden yüzde olarak besin maddeleri içeriği	5
Çizelge 2.1	Çizelge 2.1. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları Çözelti Adı	45
Çizelge 2.2	İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı	46
Çizelge 2.3	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	48
Çizelge 3.1	LsPPO saflaştırma tablosu	66
Çizelge 3.2	LsPPO enzimi için , üç ayrı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	70
Çizelge 3.3	LsPPO enziminin üç ayrı substrat için optimum pH değerleri	71
Çizelge 3.4	LsPPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi çalışmasının sonuçları	72
Çizelge 3.5	LsPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri , U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	74

Çizelge 3.6	LsPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	75
Çizelge 3.7	LsPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değer	76
Çizelge 3.8	LsPPO enziminin üç farklı substrat için K_M ve V_{max} değerleri	78
Çizelge 3.9	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asid'in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	80
Çizelge 3.10	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren syringic asid'in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	81
Çizelge 3.11	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid'in sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	83
Çizelge 3.12	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren	84

	glutasyon'un sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	
Çizelge 3.13	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	86
Çizelge 3.14	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkapt etanol'ün, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	87
Çizelge 3.15	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	89
Çizelge 3.16	LsPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları	91
Çizelge 3.17	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	93-94

Çizelge 3.18	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren syringic asid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	95-96
Çizelge 3.19	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfamid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçları	98-99
Çizelge 3.20	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	100-101
Çizelge 3.21	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	103-104
Çizelge 3.22	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkapt etanol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	105-106
Çizelge 3.23	LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren	108-109

	L-tirozin'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	
Çizelge 3.24	LsPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri.	111
Çizelge 3.25	AbPPO enziminin saflaştırma tablosu	113
Çizelge 3.26	AbPPO enzimi için , üç ayrı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorpsiyon, U , aktivite ve % aktivite değerleri	115
Çizelge 3.27	AbPPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi çalışmasının sonuçları	117
Çizelge 3. 28	AbPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri , U , aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	119
Çizelge 3.29	AbPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U , aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	120
Çizelge 3.30	AbPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U , aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değer	121
Çizelge 3.31	AbPPO enziminin üç farklı substrat için K_M ve	123

V_{max} değerleri

Çizelge 3.32	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asid ve syringic asid'in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	125
Çizelge 3.33	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfamid ve glutatyon'un sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	127
Çizelge 3.34	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein, β -merkapt etanol'ün, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	129
Çizelge 3.35	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	131
Çizelge 3.36	AbPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonlar	132

Çizelge 3.37	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	134-135
Çizelge 3.38	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren syringic asid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	136-137
Çizelge 3.39	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	139-140
Çizelge 3.40	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	141-142
Çizelge 3.41	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	144-145
Çizelge 3.42	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkaptan etanol'ün, katekol substratıyla, K_i	146-147

değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

Çizelge 3.43	AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	149-150
Çizelge 3.44	AbPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri.	152
Çizelge 4.1	LsPPO ve AbPPO enziminin üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin değişimini gösteren grafik.	159

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında beni destekleyen sevgisini ve her türlü yardımlarını esirgemeyen bilimsel azmini örnek aldığım çok kıymetli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Kimya bilimini bana sevdiren, hayatın kimyasal ve biyokimyasal yanlarını en güzel şekilde öğreten; bilgisiyle, insanlara yaklaşımıyla her zaman örnek aldığım hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin minnet ve şükranlarımı sunarım

Yüksek lisansa başlarken biyokimyada devam ederek hayallerimi gerçekleştirmem konusunda bana destek olan, bilgisini, insanlara yaklaşımını örnek aldığım çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Mahir ALKAN'a en derin şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarımda hem deneysel hem de teorik bilgilerini en cömert şekilde paylaşan, en sıkıntılı anımda her zaman yanımda olan, hem abla hem de arkadaşça yaklaşımlarıyla sevgisini ve desteğini esirgemeyen Hocam sayın Dr. Semra Işık'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında her zaman yanımda olan yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Murat Sayın, Ayşegül Şahin, Şeref Karadenizli, Ahmet Karahan ve her zaman ilgisini ve yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Serap Beyaztaş' a çok teşekkür ederim.

Bu tezin en başından beri olmasında çok büyük katkısı olan, sabırlarını ve sevgilerini asla esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Balıkesir, 2009

Nurcan DEDEOĞLU

1. GİRİŞ

Kolay elde edilebilirliği ve yüksek besin değerleriyle mantarlar yıllardan beri önemli bir besin olarak tüketilmektedir. Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanında kaliteli ve ucuz olması nedeniyle potansiyel polifenol oksidaz kaynağı olarak endüstrinin bir çok alanında kullanıldığı bilinmektedir [1]. Özellikle gıda endüstrisinde enzimatik kararmaya sebep olması nedeniyle polifenol oksidaz enzimi gıda teknologlarının dikkatlerini üzerine çekmiş ve enzimatik kararmanın önlenmesi amacıyla üzerinde bir çok çalışma yapılmıştır. Enzimatik kararma, meyve ve sebzelerin depolanması esnasında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu polifenol oksidaz enziminin havadaki oksijen ile teması sonucu meydana gelen, meyve ve sebzelerin renginde pembeden mavimsiyaha kadar farklı tonlarda meydana gelen renk değişimine sebep olarak meyve ve sebzelerin görünümünü, tadını ve besleyici değerini bozan bir oksidasyon reaksiyonudur. Bir çok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişimleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Bu durum ise tüketicinin istemediği bir durum olmakla birlikte üretici için ise büyük bir ekonomik problem olmaktadır. Bu nedenle enzimatik kararmanın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir [2].

Polifenol oksidaz enzimi bir çok meyve ve sebze de bulunan ve bitkinin hastalıklara karşı direncinin artmasına neden olan bir metalo enzimdir. Gıda endüstrisindeki önemi ise, enzimatik kararmaya neden olmasından kaynaklanmaktadır. Kararmadan sorumlu tutulan polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltge ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır [3]. Renk bozulmaları enzimatik ve/veya enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzimatik kararma için PPO, bunun etkilediği

polifenolik substratlar ve oksijenin bir araya gelmeleri gerekir. Enzimatik kararın bu üç maddeden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulabilir veya azaltılabilir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında oksijenin varlığı kaçınılmazdır. Ayrıca bütün bitkilerin belirli oranlarda fenolik madde içerdiği bilinmektedir. Bu bileşikleri uzaklaştırmak kesinlikle pratik değildir. Enzimatik kararın önlenmesinde en geçerli yöntem PPO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

1.1. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi

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

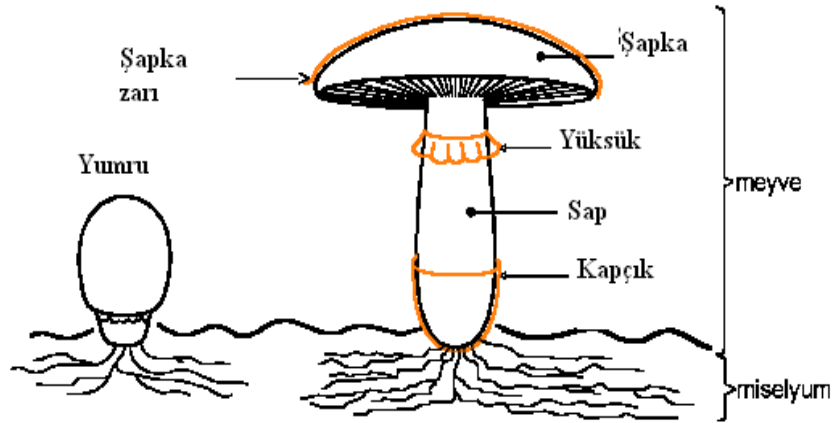
Mantarlar çok eski zamanlardan beri bilinen bir besin olmasına karşın yetiştiriciliğinin ilk kez 16. yüzyılda Fransa'da yapılmaya başlandığı pek çok kaynak tarafından bildirilmektedir. Başlangıçta mevsime bağlı olarak açıkta yetiştirilmeye başlanan mantar 19. yüzyılın başlarında taş ocakları, mağara ve tünel gibi sıcaklık ve nemin oldukça düzenli olduğu kapalı alanlarda ilkel yöntemlerle üretilmiştir. 20. yüzyılın doku kültüründen misel üretiminin gerçekleştirilmesi yeni tekniklerin gelişmesiyle mantar bu amaçla kurulmuş özel işletmelerde yetiştirilmeye başlanmıştır [4,5].

Karbohidrat sentezi bakımından ototrofik ve hetetrofik organizmalar olarak ikiye ayrılan bitkiler aleminde mantarlar hetetrofik organizma grubunda yer alırlar.

Frutifikasyon organı veya mantar meyvesi olarak bilinen şapka *Basidiomycetes* sınıfında Basidiokarp, *Ascomycetes* sınıfında Askokarp adını alır [6].

Şekil 1.1'de bir mantarın ana bölümleri gösterilmektedir. Mantarların toprak altı kısmını miseller, toprak üstü kısmını ise şapka oluşturur. Toprak altı kısmını oluşturan miseller bitkilerdeki kökler gibi ortamdan su ve besin maddelerinin

alınarak başka noktalara nakli görevini üstlenirler. Ancak, yüksek bitkilerde toprak üstü kısmını oluşturan plumula ve toprak altı kısmını oluşturan radikula tohumda hemen hemen aynı anda oluşurken mantarda üretim birimi olan spor çimlenmesi ile önce miseller ve daha sonra misellerden şapka oluşmaktadır. Mantarlarda sap veya şapka yeterince besin maddesi toplayarak belli bir noktada yoğunlaşan sekonder misellerden meydana gelir. Yoğunlaşan sekonder misellere tersiyer misel adı verilir. Basidokarp'ın oluşumu sırasında sap kısmındaki hücrelerin içerdiği nucleus sayısı yirmiye kadar çıkar. Esas olarak Basidokarp'ın yapıtaşı hif adı verilen tüp şeklinde iplikçiklerdir. Hücre çeperinin yapısında başlıca kitin, selüloz, lignin ve diğer bazı organik bileşikler bulunur. 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 [6].



Şekil 1.1 Olgunlaşmış bir mantarın ana bölümleri

Hifler uç kısımdan gelişen ve lateral dallanma yeteneğine sahip olan tek diziden ibaret ipliklerdir. Hif büyümesi, hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hifler, çevre koşullarının sürekli vegetative büyüme için uygun olduğu dönemlerde, dallanmış veya dallanmamış olarak besin ortamında tek tek görülürler. Uygun değişiklikler meydana geldiğinde hifler kümeleşerek daha sonra meyveyi oluşturacak olan misel ipliklerini meydana getirir. Misel iplikleri üzerinde oluşan küçük modüller de gelişerek şapkayı meydana getirir [6].

Mantarların alt kısmında gençken pembe, daha sonra ise üzerinde taşıdığı sporların olgunlaşarak renk değiştirmesi nedeniyle koyu kahve rengi renk alan lamellar bulunur. Mantarın şapka kısmında, lamellar üzerinde bulunan basidiosporlar olgunluğa ulaştınca doğaya yayılırlar. Bu sporlar uygun bir ortam bulunduğu çimlenerek mantarı oluşturmaya başlar [6].

Mantarlar sadece günlük diyetinde değil ayrıca güzel aromaları ve tatları sebebiyle bir lüks olarak çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından tüketilmektedir. Ortalama %92 oranında su içeren taze mantarın esas olarak besin değeri açısından diğer sebzelerden pek bir farkı yoktur. (Çizelge 1). Yenilebilen mantarların protein, yağ, karbohidrat, mineral ve vitamin bakımından değerleri iyi, tadı hoş ve sindirimi kolaydır. Hatta mantarların protein içeriği açısından et kadar değerli olduğuna inanılır. Yapılan analizler sonucunda kültür mantarlarının sahip oldukları protein, et ve balığinkine nazaran çok küçük fakat bir çok sebzeninkine nazaran yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mantarların ihtiva ettikleri yağ, karbohidrat, mineral ve vitamin değerleri de sebzelerle mukayese edilebilecek seviyededir [6].

Mantar proteininin hazmolma değeri %72-83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. İnsan beslenmesi için gerekli tüm 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. [6].

Çizelge 1.1. Mantar ve bazı gıda maddelerinin taze ağırlık üzerinden yüzde olarak besin maddeleri içeriği [6].

Gıda maddesi	Su	Protein	Yağ	Karbohidrat	Mineraller	Cal/100gr
Mantar	92	3.5	0.3	40.5	1.0	25
Ispanak	93	2.2	0.3	1.0	1.9	15
Kuşkonmaz	95	1.8	0.1	2.7	0.6	20
Patates	75	2.0	0.1	21.0	1.1	85
Süt	87	3.5	3.7	4.8	0.7	62
Et	68	18.5	13.3	0.5	0.5	189

Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyet etkili olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre mantar kandaki şeker seviyesini düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler kolesterolü düşürücü özelliği ile kalp ve dammar hastalıklarında da diyet olarak kullanılabilirliğini göstermiştir [6].

Mantarlar geleneksel bir ilaç olarak yan etkilerden uzak olması nedeniyle çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilebilmesi ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Araştırmalar antifungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici olarak kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaştırmalarına sebep olmuştur. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak kullanılmışlardır [5.7].

1.1.1 *Lactarius salmonicolor* Makromantarının Morfolojik Özellikleri

Yenilebilir, şapkalı bir mantar olan *Lactarius salmonicolor*, mantarlar aleminin Homobasidiomycetae sınıfı, Russulales takımının Russulacea ailesine aittir (Şekil 1.2). Çam ağaçlarının asidik topraklarında, çayırlıklarda, Avrupa'da yapraklı ağaç ormanlarında ilkbahar ve sonbaharda yağmurlardan sonra görülür. Şapka büyüklüğü 5-15 cm kadardır. Mantar gençken ortası hafifçe çukur, kenarı içeri kıvrıktır, büyüdükçe ortası daha da çukurlaşarak hemen hemen huni şekline döner. Renk turuncudur, açık sarıdan erik sarısına kadar değişir. Kenarda 1 milimetre genişlikte halka halinde açık parlak sarıdır ve belirgindir. Genel görünüşle turuncu ve sarıdan ibaret halkalıdır. 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 silindir şeklindedir. Renk bakımından portakal sarısı, dip kısmında kırmızımtırak sarı beyaz, yukarı kısmında şarap kırmızısı turuncudur. Sapa etli kısmı kırmızı-pembedir ve koparıldığında turuncu renkte bir sıvı çıkarır. Gençken içi dolguludur daha sonra şapkaya kadar olan alt kısımda boşlukludur. Etli kısım kırmızımtırak sarı beyaz renkli meyve kokulu ve yumuşak sünger gibidir. Spor izi parlak kırmızımtırak sarı tunç rengindedir [8, 9].



Şekil 1.2 *Lactarius salmonicolor* [10]

Ekim ve kasım 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 yabani mantarlar için uygundur [11-12].

Lactarius salmonicolor Kuzey Amerika, Chile, Avustralya, Yeni Zelanda, Kıbrıs ve Avrupa’nın bir çok kısmında yetişmektedir. İtalyan, Polonyalı, Ukraynalılar ve diğer batı Avrupalıların sonbahar yağmurlarından sonra mantar toplamak için seyahat ettikleri bilinmektedir [13].

1.1.2 *Agaricus bisporus* Makromantarının Morfolojik Özellikleri

Agaricus bisporus mantarlar aleminin Homobasidiomycetes sınıfı Agaricales takımının Agaricaceae ailesine aittir (Şekil 1.3). Türkiye’de en çok bilinen ve Kültür mantarı olarak adlandırılan bir mantar türüdür.. Portabello mantarı olarak bilinen büyük mantarlar aslında *Agaricus bisporus*’un erginleşmiş halidir. Ticari olarak pastörizasyon işleminden geçirilmiş kompost üzerinde yetiştirilir. Kompost içerisinde sap-saman artıkları, at gübresi, buğday sapı bulunmaktadır.



Şekil 1.3 *Agaricus bisporus* (Kültür mantarı)[14]

Doğada binlerce çeşit mantar mevcuttur. Bu mantarların her biri tür ve çeşitlerine göre çok farklı özelliklere sahiptir. Mantarlarda görülen farklı özelliklerin kimileri gözle görünür derecede büyük, kimileri gözle görünmeyecek kadar küçüktür; bazı özellikler ise, ancak çeşitli deneyler sonucu ortaya çıkarılabilirler. Bu özelliklerin belirlenmesi "Mikoloji" (Mantar Bilimi) denilen bilim dalının görev alanındadır. Mikologlar (Mantar Bilimciler) her bir mantarın bu özelliklerini belirleyebilmek için bazen yıllarını harcarlar. Doğada zehirli mantarlar ile zehirsiz mantarlar bir arada yetişmektedir. Mantarların yenilebilir olup olmadıkları mikologlar dışındaki kişiler tarafından genellikle görünüm ve basit deneysel sonuçlara dayanır. Bu ise, sonu ölümle bile sonuçlanabilecek durumlar yaratır. Çünkü, mantarların yenilebilirliğini esas belirleyen değerlendirmeler bunların çok daha ötesindeki değerlendirmeler olabilir.

Kültür mantarları ise, çeşitli seleksiyon (seçim) çalışmaları sonucunda elde edilirler. Zehirli olmadığı kesinlikle ortaya çıkarılan türler daha sonra laboratuvar ortamında çoğaltılırlar.

1.1.3 Mantarlar ve İnsan Sağlığı

Mantarların bünyesinde az miktarda şeker ve yağ bulunmaktadır. Bu nedenle diyetik yemekler 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 niteliğine sokmaktadır. Diğer taraftan mantarlar kalp ve damar hastalıkları bulunan kişiler için de tavsiye edilen yiyecektir

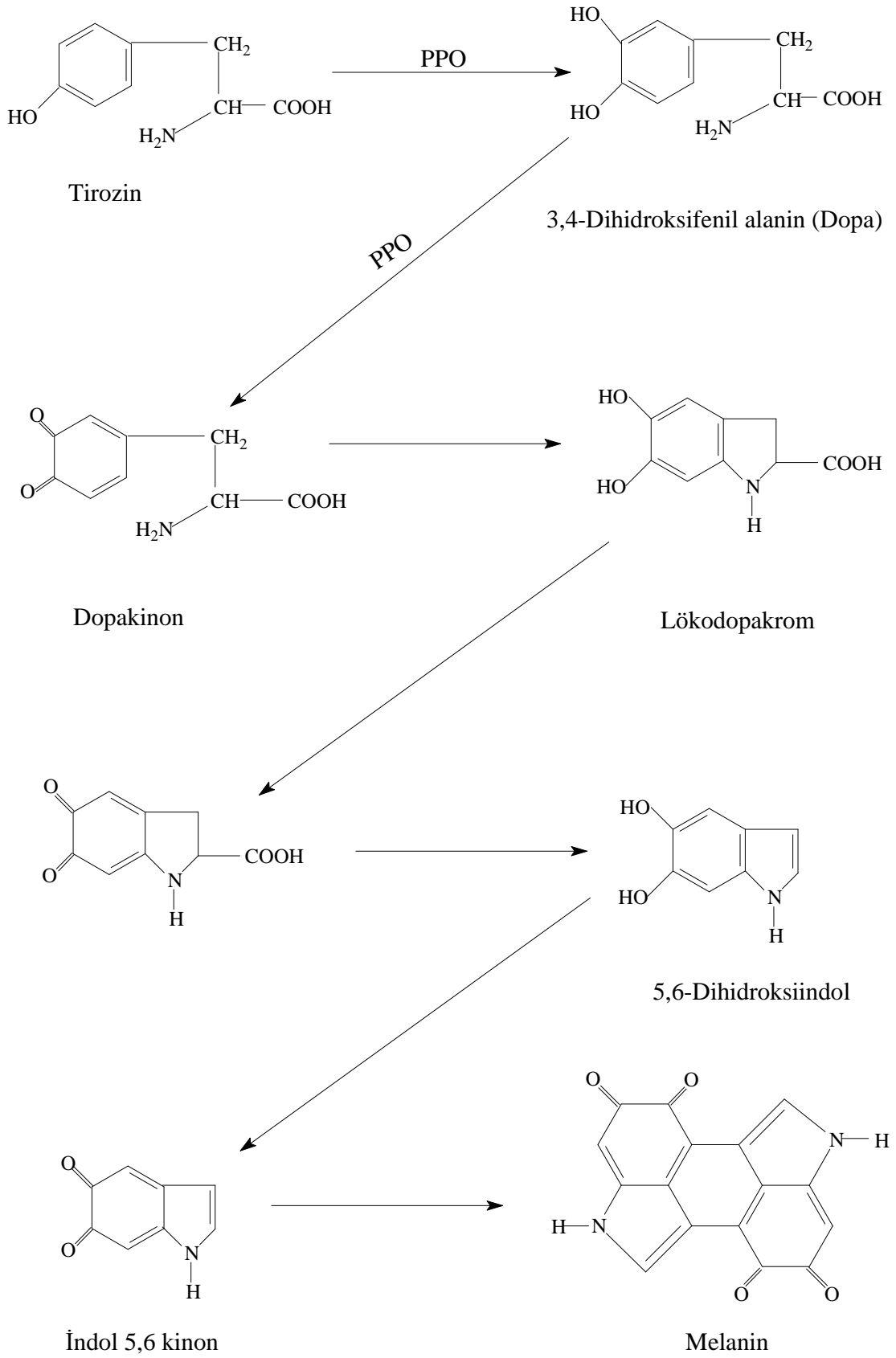
Mantarlarda bulunan protein miktarı tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g'dır. Bu proteinlerin ortalama % 70'i sindirilebilir niteliktedir. Böylece yenilen 100 g mantarın yaklaşık 2-5 g'ı protein

olarak vücuda alınır. Mantarlardan alınan proteinler vücutta depolanmaz, günlük harcanırlar.

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

1.2 Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişimlerine *kararma* denir. Polifenol oksidaz 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 [3] (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması [3]

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, polifenol oksidaz enziminin etkisiyle ortaya çıkan melanozis sonucu oluşan siyah renkli lekeler ürünün değerini düşürür [15]. 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 polifenol oksidaz 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 bileşikler oluşturur [16-17].

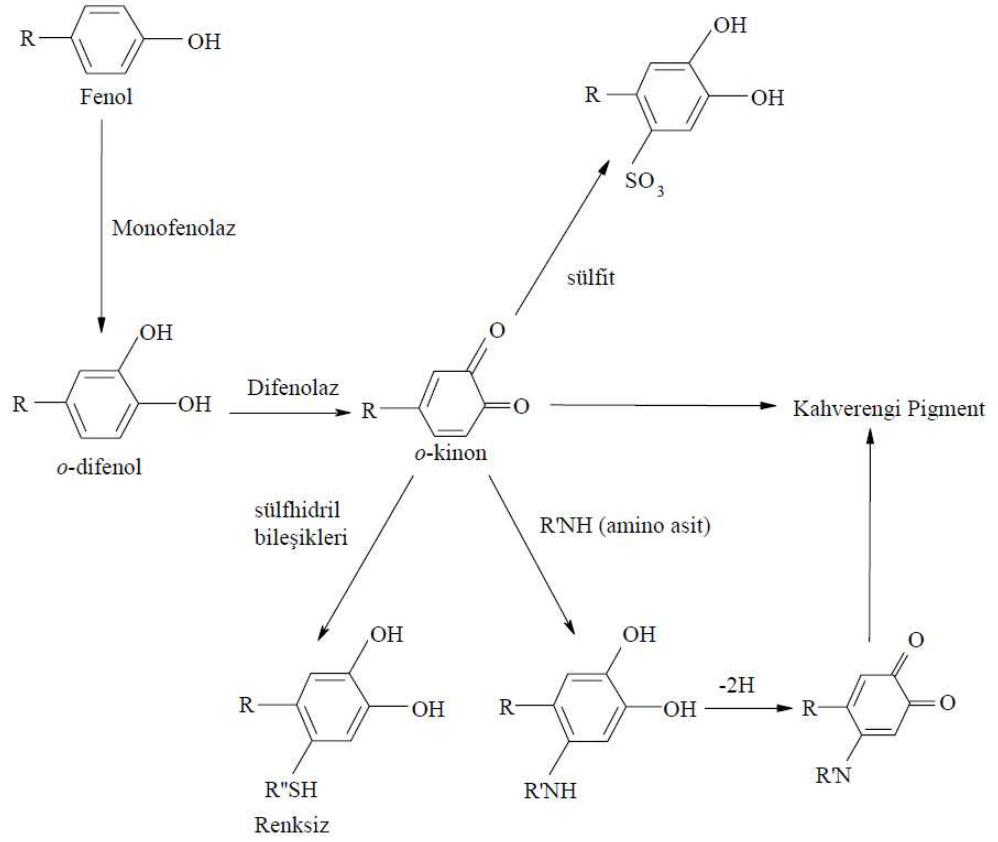
Enzimatik karamanın olabilmesi için polifenol oksidaz enzimi, bunun etkilediği polifenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartların uygun bir seviyede olması gerekir. Enzimatik esmerleşme fenolik madde, moleküler oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfite ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenir [15].

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

iki aşamada *o*-kinona okside olabilmektedirler. Birinci aşamada, monohidroksi fenollere hidroksil grupları bağlanarak *o*-dihidroksifenoller oluşmakta, ikinci aşamada ise bunlar *o*-kinonlara dönüşmektedirler.

Enzimatik kararım reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan *o*-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve nihayet bunlar daha büyük moleküllü bileşiklere polimerize olurlar. İşte, renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir [19-20].

Diğer enzimatik esmerleşme reaksiyon türü ise, fenolik bileşiklerden türemiş kinonların, serbest amino asit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır (Şekil 1.5) [19]. Patatada ve kazein içeren karışık besinlerde, okside olmuş klorojenik asidin kazein ile olan reaksiyonları, bu türden reaksiyonlardır.



Şekil 1.5 Kinonların serbest amino asitlerle polimerizasyonu [19]

1.3 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası

1.3.1 PPO'nun Adlandırılması

Polifenol oksidaz (E.C.1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksido redüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir. Moleküler oksijen varlığında iki reaksiyonu katalizler; monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve o-fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) [3].

Enzimin sistematik adı; monofenol, L-dopa: oksijen oksido redüktaz şeklindedir. Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre az kullanılan adları da vardır. Bunlardan bazıları, tirozinaz, kresolaz, fenolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, *o*-difenolaz, katekol oksidaz, pirokatekol oksidaz, dopa oksidaz, monofenol monooksidaz, *o*-difenol oksido redüktaz, difenol oksidaz ve klorogenik oksidaz'dır [20].

1.3.2 PPO'nun Tabiattaki Dağılımı

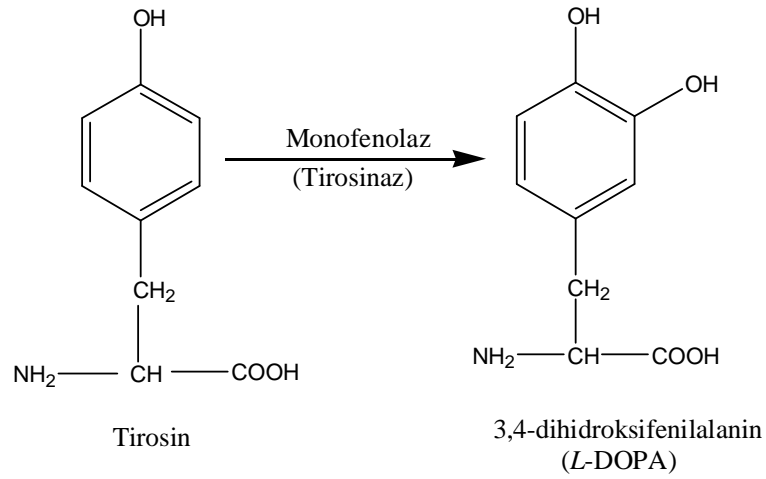
PPO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur [21]. Bundan sonra, bazı turunçgiller hariç, pek çok meyve ve sebze PPO enzimi belirlenmiş ve karakterize edilmiştir [3].

PPO doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı toprak türlerinde glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PPO enziminin varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir [22-24]. Farklı bitkilerin PPO içeriği türe ve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Hatta, aynı organizmanın farklı organlarında bile farklı karakteristik özellik gösterebilmektedir. Bir çok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PPO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [25]. Enzimin bitki hücrelerindeki lokalizasyonu bitkinin türüne, yaşına; meyve ve sebzelerde ise olgunluğa bağlıdır [26-39].

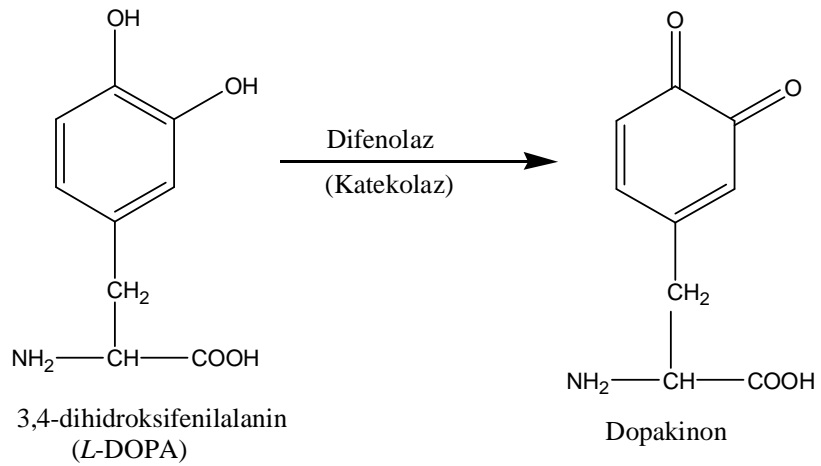
1.3.3 PPO'nun Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizmaları

Uluslararası Biyokimya Derneği'ne bağlı enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmada, bütün PPO'ların, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizledikleri için, birinci sınıf enzim oldukları belirlenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre yapısında bakır içeren PPO 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 (Şekil 1.6 ve şekil1.7) [40-45].



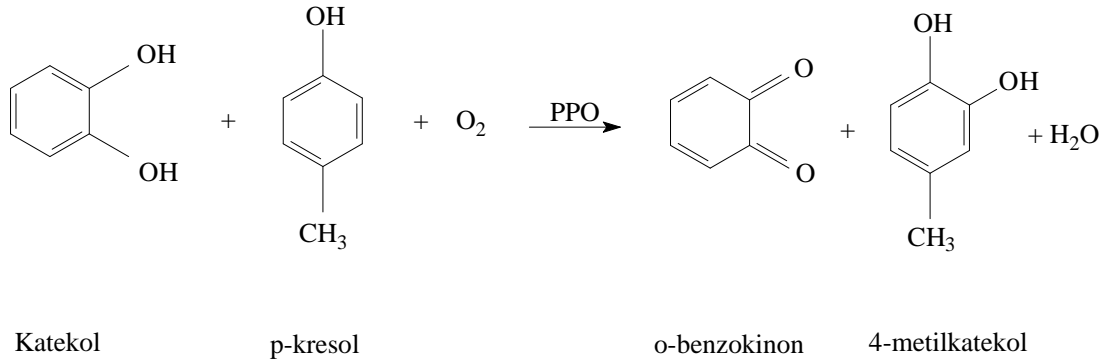
Şekil 1.6 Monofenollerin *o*-hidroksilasyonu (Monofenolaz aktivitesi)



Şekil 1.7. *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Difenolaz aktivitesi)

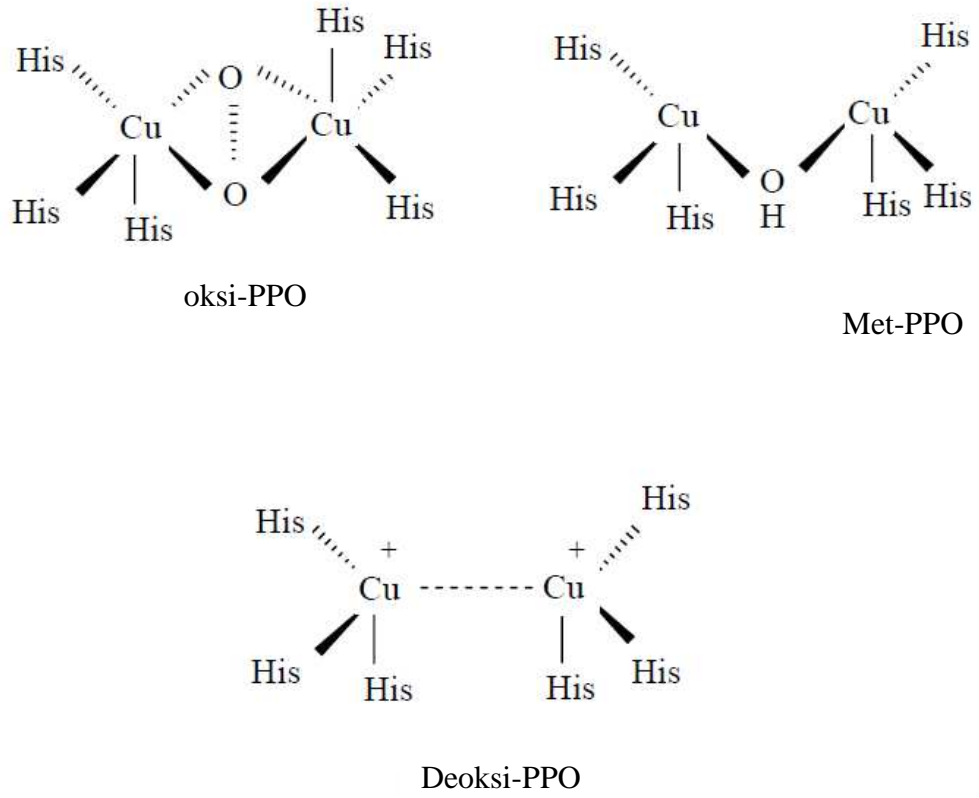
Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip olduğu bildirilmektedir [46]. Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi bir çok PPO ekstraktları her iki aktiviteye de sahip iken, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz PPO enzimlerinin mono hidroksi fenollere etki etmediği bildirilmektedir [31].

PPO enzimi katalizine ilişkin reaksiyon Vamos-Vigyazo tarafından aşağıdaki gibi verilmiştir (Şekil 1.8) [38]. Monofenollerin hidroksilasyonu sonucu oluşan dihidroksi fenoller, yine PPO enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonda o-kinonlara dönüştürülür. Oluşan kinon birimleri kendiliğinden birbirleriyle, protein ve indirgen şeker gibi bitki içerikleriyle kondense olarak kararmaya sebep olan yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluştururlar [31].



Şekil 1.8 Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi [38].

Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar, PPO'nun binükleer bakır kompleksi içeren bir aktif bölgeye sahip olduğunu göstermiştir. PPO'nun merkezi, Tip3 bakır merkezi olarak bilinmektedir. Bakır atomunu merkezde bulunuşları sırasıyla "met" (Em), "deoksi" (Ed), "oksi" (Eo) halleridir [40-44]. E_m; Cu⁺² -Cu⁺² aktif bölgesi *met*polifenol oksidazdır. E_d; Cu⁺¹ - Cu⁺¹ aktif bölgesi PPO'nun indirgenmiş halidir. E_o; Cu⁺² -O₂⁻² - Cu⁺² aktif bölgesi *oksipolifenol* oksidazdır.

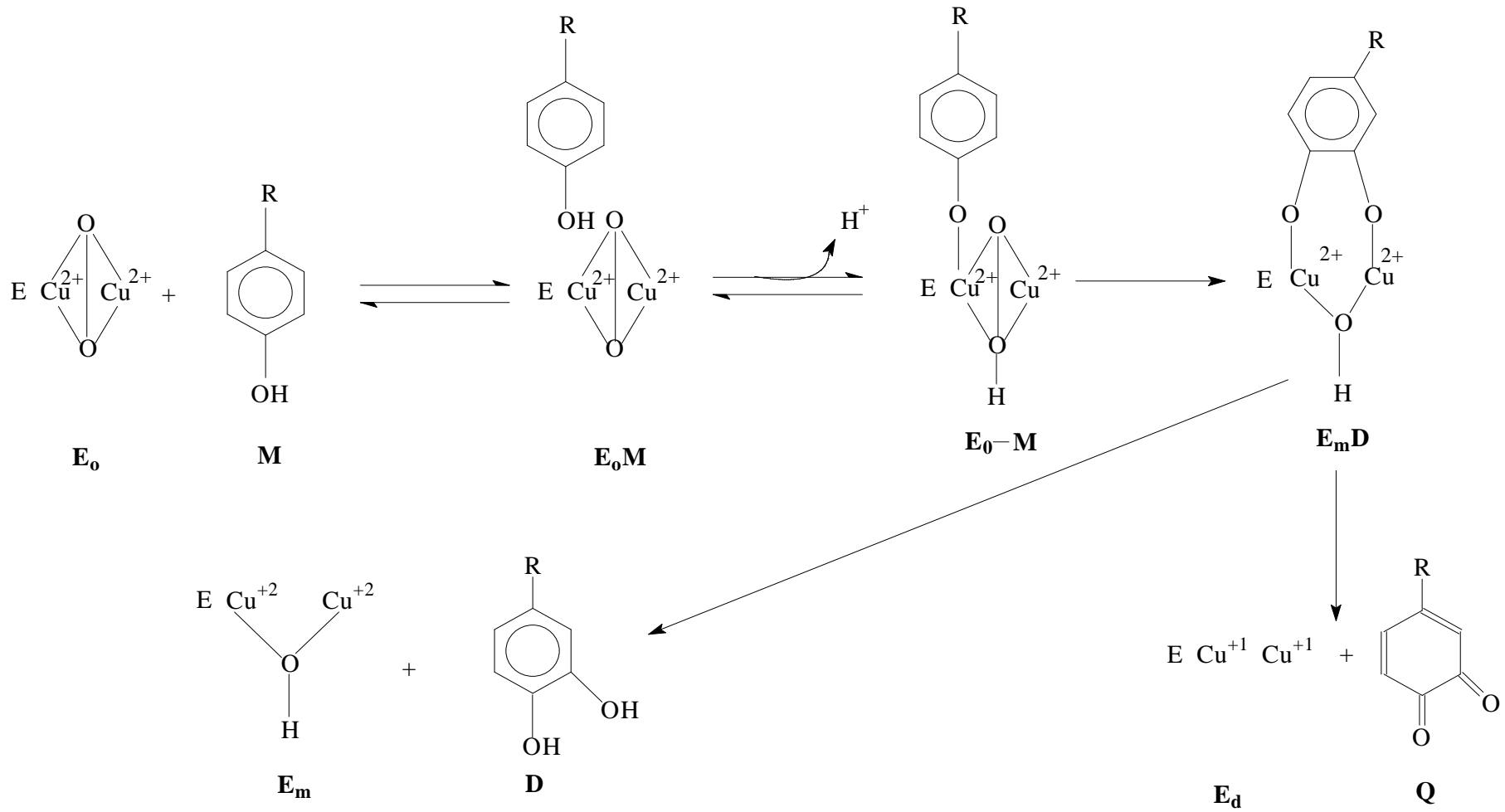


Şekil 1.9 PPO'nun bakır merkezleri

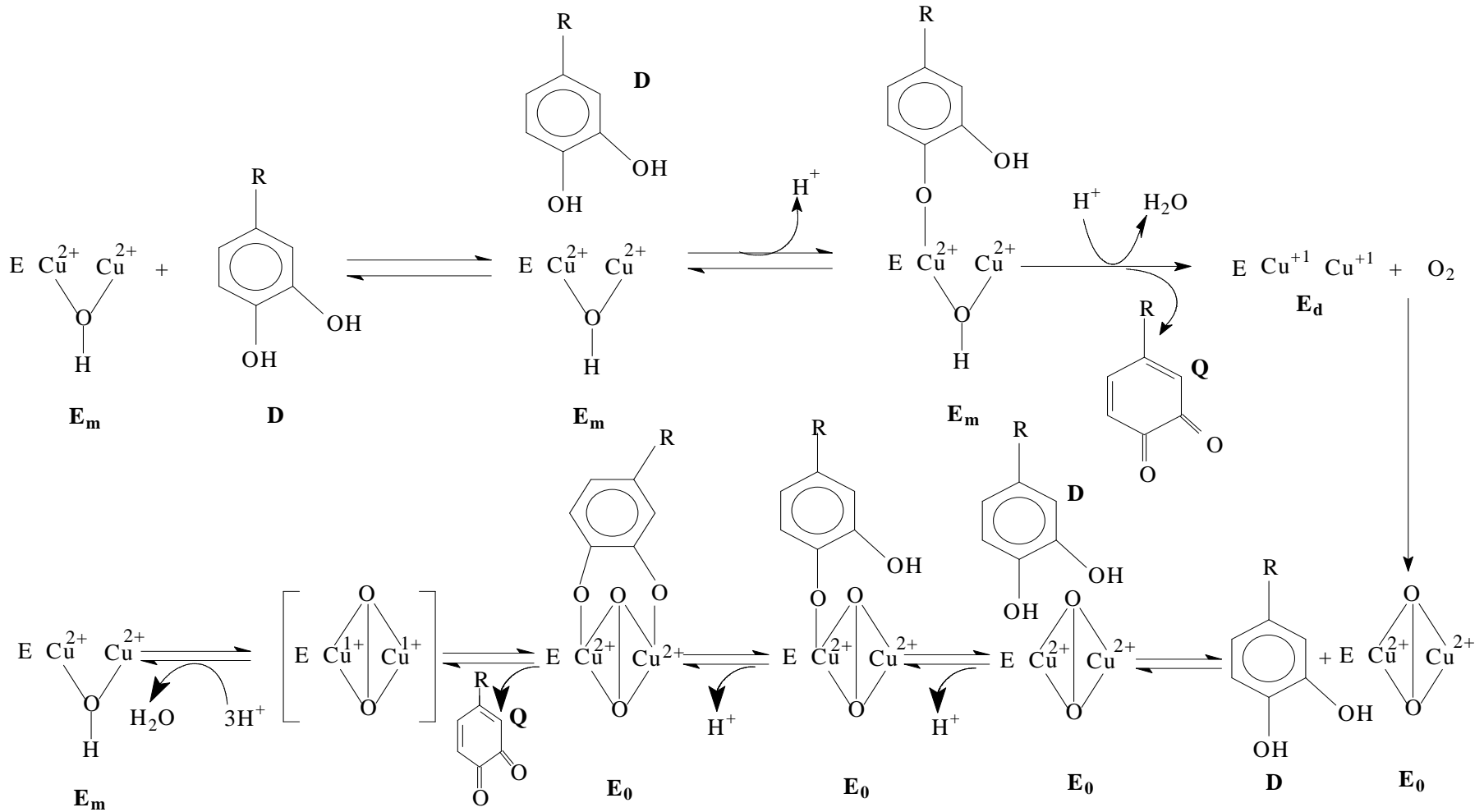
PPO'nun aktif bölgesindeki bakır atomlarının üç halde bulunması monofenollerin hidroksilasyonu ve oluşan o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu içeren reaksiyon mekanizmaları için bir yapısal modele yol açmıştır.

İlk olarak, monofenolik substrat, E_o 'ın aksiyal pozisyonundaki iki bakır atomundan birine koordine olur [47]. Üçgen bipiramid ara bileşiğindeki yeniden düzenleme; peroksit vasıtasıyla monofenolun hidroksilasyonuna su çıkışına ve E_mD kompleksinin oluşumuna yol açar [48-49]. Oluşan E_mD kompleksi ya $E_mD + 2H^+ \rightarrow E_m + D$ dengesini yerine getirerek katekolaz döngüsündeki ilk adım olan serbest difenolu verebilir yada aktif bölgeye bağlı difenolat ara bileşiği oksidasyona uğrayarak bir kinon ve bir indirgenmiş binükleer bakır enzim bölgesi (E_d) verir. E_d 'ye moleküler oksijen bağlandıktan sonra, *oksi* PPO(E_o) tekrar rejenere edilir.

PPO tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 1.10 ve 1.11’de verilmektedir [50].

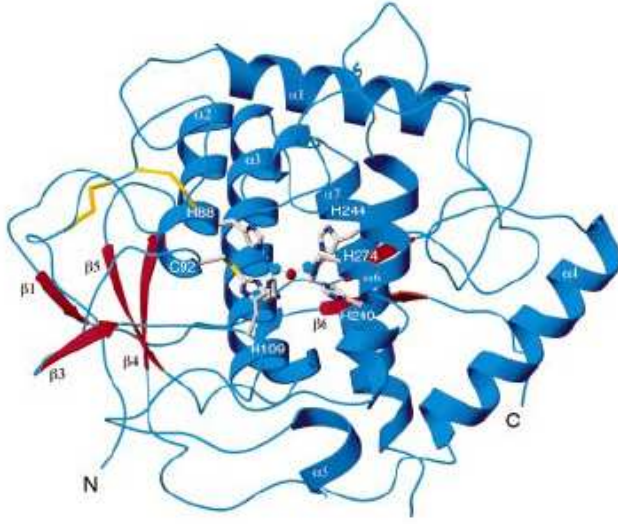


Şekil 1.10 PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması[50].



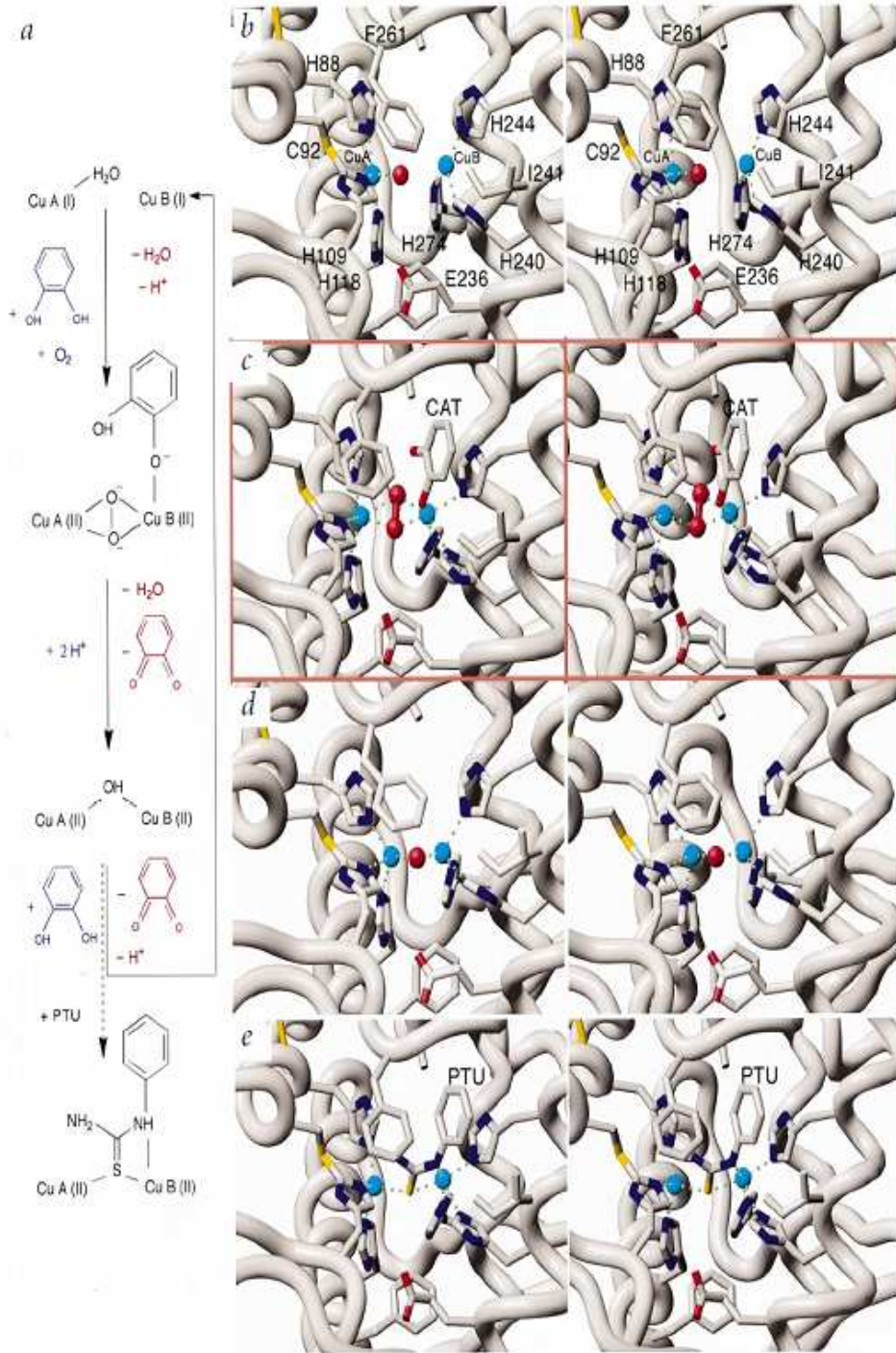
Şekil 1.11 PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması[50].

Thomas Klambunde ve arkadaşları[51] Tip 3 bakır merkezli polifenol oksidaz enziminin katalitik mekanizmasını anlamak amacıyla Cu(II)-Cu(II) yükseltgenme bölgesinde Cu(I)-Cu(I) indirgenmiş form ile feniltiyöre (PTU) inhibitor kompleksiyle patates PPO enziminin üç boyutlu kristal yapısını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada enzimin difenolaz aktivitesini de göstermişlerdir (Şekil 1.12 ve 1.13).



Şekil 1.12 Polifenol oksidaz'ın Ribbon resmi (Karbon atomu gri, nitrojen mavi, sülfür atomları sarı renkle gösterilmiştir.) [51]

PPO'nun(katekol oksidaz, tirozinaz) iki çekirdekli bakır merkezi moleküler oksijenin dört elektronunu suya indirgemesiyle katekolün oksidasyonunu katalizler (Şekil 1.13). Önerilen biyokimyasal yol biyokimyasal [47,49], spektroskopik [52] ve sunulan yapısal verilere dayanır. Buna göre iki oksijen iki bakır içeren metal merkeze bağlanmak için indirgenmiş formdaki enzimde CuA'ya bağlı çözücü molekülüyle yer değiştirir(şekil 1.13b, Şekil1.13a'nın en üstü). PPO'da Phe261 yan zincirinin rotasyonu iki bakır merkezini açar ve katekol substratının bağlanmasına izin verir.



Şekil 1.13 PPO için biyokimyasal, spektroskopik ve yapısal verilere dayanan önerilen reaksiyon yolu. *a*, üç basamakta şematik olarak gösterilen PPO tarafından katalizlenen reaksiyon yolu: yükseltgenmiş iki katekol molekülü suya indirgenmiş iki oksijen molekülüyle çiftleşir. PTU'nun bağlanması en altta gösterilmiştir. *b-d*, kristallografik analizlerden alınan üç reaksiyon basamağının üç boyutlu yapısı. PPO-O₂²⁻-CAT kompleksi *c*'de *e* (inhibitör PTU'nun bağlanması) rehber alınarak gösterilmiştir. [51]

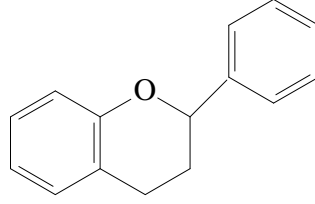
PPO ve feniltiyoüenin(PTU) inhibitör kompleksi için bağlanma modu incelendiğinde(Şekil 1.13e, Şekil 1.13a'nın en alt kısmı) CAT'ün ve oksijenin aynı anda bağlanmasının mümkün olduğu söylenebilir. PPO-PTU inhibitör kompleksine dayanarak, tek-dişlibağlanma modeline göre (Şekil 1.13c, Şekil 1.13a'da üstten ikinci) CAT iki hidroksil grubundan birinin protonunu CuB'ya vererek bağlandığı söylenebilir.

Dimetal merkeze yakın bir çözücü molekülüne hidrojen bağıyla bağlı Glu236 substratın deprotonasyonuna yardımcı olmaktadır. Glu236 ve substratın ikinci koordine olmamış hidroksil grubu bir proton vererek su çıkışına ve *o*-kinon çıkışına sebep olur (Şekil 1.13d, Şekil 1.13a'nın alttan ikincisi)..

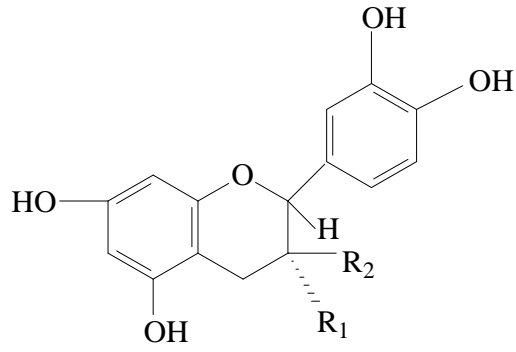
1.3.4 PPO'nun Substratları

Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı PPO 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 [53-61].

PPO'nun meyve ve sebzelerdeki 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 [62].



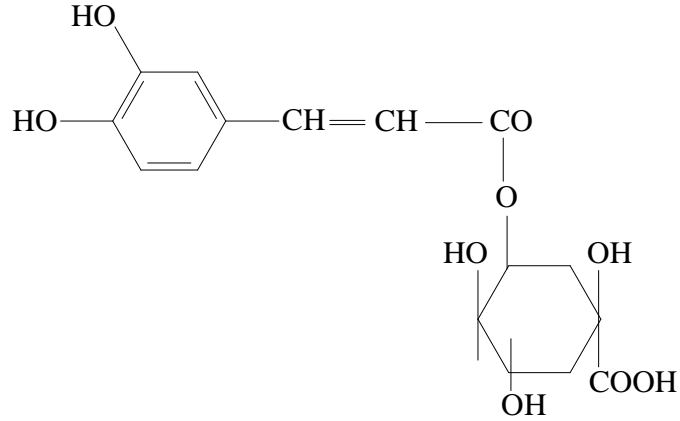
Katekinler flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir. Katekinler doğada (+)-katekin ve onun stereoizomeri olan (-)-epikatekin olarak bulunurlar. (+)-katekin ve (-)-epikatekinin seyreltik sodyum karbonat çözeltisinde ısıtılması ile katekin ve epikatekinlerin diastereoizomerlerinin rasemiği elde edilebilir. Katekinlerin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.



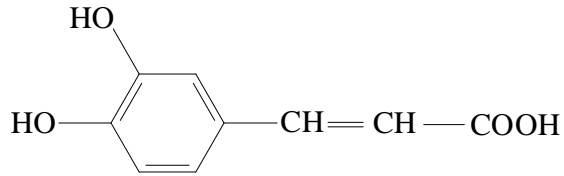
(+) - Katekin (R₁= H, R₂= OH)

(-) - Epikatekin (R₁= OH, R₂= H)

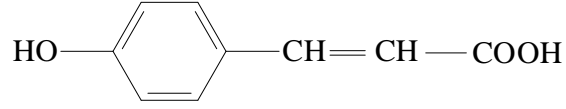
PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorogenik asittir. Klorogenik asidin yapısı aşağıdaki gibidir.



Klorogenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının p-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PPO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir [63].



Kafeik asit
(3,4- dihidroksi sinamik asit)

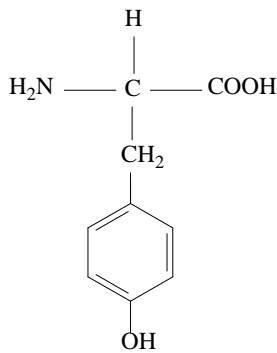


p- kumarik asit
(4- hidroksi sinamik asit)

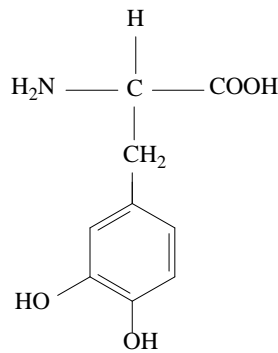
Klorogenik asidin doğada bulunan izo-klorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudoklorogenik asit ve “ Band 510 ” izomerleri de PPO’nun substratlarıdır [64].

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil etil amin) ve tirizonin PPO ile hidroksilasyon sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenil alenin) bitki dokularında mevcuttur.

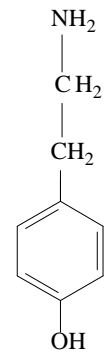
Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PPO, L-DOPA’yı dehidrogenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat p-kresolu hidroksiller [65].



L- tirozin



L- DOPA
(3,4- dihidroksifenil alanin)



Dopamin
(3,4-dihidroksifenil etilam

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 meyve ve sebzelerde PPO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde çoğunlukla bulunmayan fenolik bileşiklerdir [66-77].

Şeker pancarı PPO 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 [47]. Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen "*PPO enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman en iyi PPO substratları bulunmaz*" tezini desteklemektedir [30,67].

Substrat spesifikliğı yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değildir aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiğı kısıma ve yetiştirilişine bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler [78-79].

1.3.5 PPO'nun Aktivatörleri

Enzimatik kararmanın önlenmesi ve PPO'nun inaktivasyonu üzerine çok fazla yayın varken, enzimin aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu durum şüphesiz, çoğu zaman, enzimin aktivasyonunun arzu edilmemesinden kaynaklanmaktadır.

Elma kabuğundan hazırlanan mitokondrial enzim preparasyonu polivinilpirolidin (PVP) ile inaktive edildikten sonra, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlarla tekrar aktive edilmiştir [80]. SDS'nin farklı avakado türlerinden hazırlanan ham ve kısmen saflaştırılmış ekstraktlardaki inaktif PPO'yu da aktive ettiği bildirilmektedir [81]. Üzüm PPO'su kısa bir süre için üreye yada asidik pH'ya maruz bırakıldığında 4-10 kat arasında dönüşümlü olarak aktive olmaktadır. Yüksek iyonik

şiddetlerde, asitlerle aktivasyon daha yüksektir. Bu durum, kloroplastlarda olduğu gibi kısmen saflaştırılmış enzim ekstraktlarında da görülmektedir. Üre inaktif bakla PPO'sunu aktive eder ve aynı zamanda enzimin monofenoller üzerine olan etkisinde artmaya sebep olur [82]. Ortama Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi, turp PPO'sunun aktivitesini arttırırken, benzer muamelenin patates PPO'suna etkisi olmamaktadır [83-84]. L-DOPA, PPO tarafından katalizlenen adrenalinin oksidatif döngüsünü ve renkli ara bileşiklerin oluşumunu aktive eder. Tatlı patates dokularında substratların indüklediği aktivasyona da rastlanmıştır [85].

Farklı kaynaklardan elde edilen PPO'ların aktivasyonu sistematik olarak çalışmamasına ve belki de tam olarak anlaşılmasına rağmen, çalışılan birkaç örneğin büyük kısmı aktivasyon sırasında proteinlerin konformasyonel değişime uğradığını göstermektedir [38].

PPO'nun aktif formu bakır içeren bir enzim monomerinin bir oligomeri gibidir [86]. Aktivatörün rolü, enzimi biyolojik aktiviteyi yerine getirmek için gerekli olan polimerizasyon derecesine getirmektir. Bu durumda, substratların etkisi veya prostetik iyonun eklenmesi daha iyi anlaşılabilir.

Bu etki bitkideki enzim proteininin sentezinin artmasına, doğal bir inhibitörün eliminasyonuna (bu işlem inhibitörün bir metal iyonu ile kompleksleştirilmesi ile gerçekleştirilir), substratın yapısındaki veya hücre duvarının geçirgenliğindeki değişim ile ilişkilendirebilir [87].

1.3.6 PPO'nun İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmannın 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 araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir. PPO 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 önlenabilir. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke edilmesiyle ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumunun engellenmesiyle önlenabilir [88].

PPO'nun bir çok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler, besinlerde enzimatik esmerleşmeyi durdurabilen, yiyecek kalitesine etki etmeyen ve zehirli olmayan maddeler olmalıdır [89].

Sülfidler çok kullanılan bir PPO inhibitörüdür ancak, sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması durumunda kullanımına izin verilmez [88]. Sülfidler, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmeleri önler, mikroorganizmaların büyümelerini kontrol eder, ağartıcı ve oksitlenmeyi önleyici madde olarak rol oynar. Ancak bunların yanında sülfid kullanımının bazı dezavantajları vardır. Sülfidler, besinleri yıkıcı özelliği yanında bitki ve meyvelerde doku yumuşaması ve tatsızlık meydana getirdiği bilinmektedir [90-92]. Yayımlanan bir çok rapora göre, bazı insanların özellikle astım hastalarının sülfid bileşiklerine karşı hassas olabilecekleri belirtilmiş ve bu yüzden dünyada sülfid kullanımına ortak kısıtlama getirilmiş hatta birçok gelişmiş ülkede de yasaklanmıştır [93]. Sülfid katılmış besinlerin sağlığa karşı etkileri ve müşterilerin taze ve doğal besinleri tercih etmelerindeki artış, sülfid ajanlarına alternatif başka etkili ajanların araştırılmasına neden olmuştur. Bir inhibitör olarak üzerinde en çok çalışılan madde askorbik asittir. Ayrıca sitrik asit, sitrik-askorbik asit ve benzoik-sorbik asit karışımlarının uygulanması da minimum düzeyde işlenmiş patateslerde etkili sonuçlar vermiştir. Karides, elma ve patates için 4-heksilrezorsinol iyi bir enzimatik esmerleşme inhibitörüdür [94-97]. PPO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PPO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan *o*-kinonlarla sisteinin tiyol-konjugatlarını oluşturmasından ileri geldiği

düşünülmektedir. Ayrıca sistein, oluşan *o*-kinonları ilgili fenollerine indirgeyerek de inhibisyon sağlamış olur [98-99].

PPO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir [100].

Polifenoller, doğada son derece yaygın olarak bulunan maddelerdir ve bir çok çiçeğin renginden de sorumlu oldukları için bitki tanninleri olarak ta bilinirler. Bunların bazıları kompleks bileşiklerdir ve bitkilerin kök, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Basit yapıda bulunanları ise çoğunlukla taze meyve, sebze ve çayda bulunurlar. Bazı potansiyel PPO inhibitörleri; kempferol, kursetin, kukarinon ve kusnol gibi birçok bitkiden izole edilen flavanoidlerdir [101-104]. Bu çalışmalara göre flavanoidlerin inhibisyon özelliği, aktif bölgedeki bakırla şelat oluşturabilme yeteneğinden ileri gelmektedir.

2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, kumik asit gibi çok sayıda aldehid ve türevlerinin, PPO için inhibitör madde olabilecekleri belirlenmiştir [105-107]. Aldehid grubu, sülfhidril, amino ve hidroksi grupları gibi nükleofilik grup olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Bu sebeple inhibisyon etkisinin, enzimin primer amino gruplarıyla schiff bazı oluşturmasından ileri geldiği söylenmektedir.

Ayrıca, çeşitli sentetik orjinli PPO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları antidepresif ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkaptio-2-metilpropionil)-L-prolin] ve antitroid ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkaptioimidazol)'dür[108-109]. Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tioller ve aromatik karboksilik asitler gibi bir çok kimyasalın da inhibitör olarak PPO aktivitesini kısıtlayıcı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [105].

Mantar PPO'sunun 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 [110-111].

Verilen bir inhibitör için, aynı orijinli izoenzimlerin K_i değerleri farklı olabilir. Polivinilpirolidin (PVP) gibi çözünebilir polimerler PPO'nun yarışmalı inhibitörüdür [112-113]. İnhibisyon etkisi anyonik deterjanlarla ortadan kaldırılabilir. Şeker kamışı PPO'sunun güçlü bir inhibitörü olan tiyoglikolat hem enzim hem de substratlarla reaksiyona girer [114-117].

1.4 PPO'nun Saflaştırılması

PPO'nun en önemli özelliklerinden biri, bitki dokularında aktif olmayan bir halde bulunabilme yeteneğidir. Ancak, asit-bazlar, üre, poliaminler, anyonik deterjanlar, proteazlar ve yağ asitleri tarafından aktive edilebileceği bildirilmiştir [113-118]. 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 [119]. Bazı bitkisel özütlerden PPO 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 [119-120].

Aseton ile enzimin bitkisel özütlerden çöktürülmesi de oldukça tercih edilen bir yöntemdir ve böyle bir işlemle genellikle oldukça yüksek PPO aktivitesi elde edilmiştir. Homojenizasyon çözeltilsinin pH değerinden enzimin aktivitesi etkilenebileceğinden, tampon çözeltinin 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, ditiyotreitol, sistein, sodyum metabisülfid veya tiyoüre gibi çeşitli bileşikler bu amaçla kullanılmıştır [121]. PPO'nun bitki dokularından izolasyonu sırasında, fenolik bileşiklerin oksidasyonunun ve dolayısıyla polimerleşmelerinin engellenmesi amacıyla, genellikle ortama, bu fenolik bileşikler bağlayıp ortamdan uzaklaştırabilecek ve genelde polimerik yapıda olan polivinilpirrolidin, poliamit ve polikaprolaktam gibi bir madde ilave edilir. Daha sonra bu polimerik yapı, ortamdan uygun tamponlarla yıkama yoluyla uzaklaştırılarak, fenolik oksidasyon engellenmiş olur. Bazı durumlarda da polietilen glikol bu tür oksidasyon işlemlerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır [122].

Homojenize edilen enzim özütlerinden PPO'nun saflaştırılması, genellikle amonyum sülfat veya aseton ile çöktürmeyi takiben, kromatografik basamakları içerir. Bu kromatografik işlemlerde santrifüjlenip hazırlanan berrak çözelti, dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex veya DEAE-selüloz gibi anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 veya Sephadex G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemlerine tabi tutulur [31]. Kromatografi sonrasında, PPO içeren elüatlar birleştirilir ve bazı durumda asetonla veya amonyum sülfatla çöktürülerek PPO konsantre edilir. Bazı dokulardan PFO'nun saflaştırılması için bu kromatografik tekniklerden biri yeterli olurken, genellikle kombinasyonları şeklinde kullanıldığında, daha yüksek saflıkta enzim saflaştırılması gerçekleştirilebilir. Örneğin, fasulye PPO'su, DEAE-Sephacel iyon değişim

kromatografisi, onu takiben fenil agaroz matriksi üzerine hidrofobik etkileşim kromatografisi ve son olarak da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile, üç basamaklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır [123]. Gawlik-Dziki ve arkadaşları (2007) tarafından, iki kromatografik teknik sırasıyla kullanılarak, bir tür marul PPO'su, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi teknikleriyle saflaştırılmıştır[124]. Bir tür mantar PFO'su ise, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve onu takiben de hidroksiapatit kromatografisi ile saflaştırılmıştır [125]. Ayrıca, daha önce fenil Sepharose-CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisiyle PPO, tek basamakta çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır [126-129]. Çok kullanılan bir teknik olan jel filtrasyon kromatografisi ile de tek adımda PPO saflaştırma işlemi, Chazarra ve arkadaşları (2001) tarafından bir tür maruldan, Xu ve arkadaşları (2004) tarafından bir tür kestaneden ve Erat ve arkadaşları (2006) tarafından *Ferula sp.*'den gerçekleştirilmiştir[130-132].

Afinite kromatografisinin, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve izolasyonunda güçlü bir teknik olduğu ispatlanmıştır. 1953 yılının başlarında Lerman, selüloza bağlanmış mantar PPO'sunun fenolik ve substitue benzoik asit türevi inhibitörlerinin etkili bir afinite absorbanları olabileceğini göstermiştir[133]. Daha sonra, Gutteridge ve Robb (1973), mantar PPO'sunun, yarışmalı bir inhibitör olan 4-amino benzoat'ı Sepharose-4B'ye bağlayarak, bu afinite adsorbantının enzimin saflaştırılmasında kullanışlı olduğunu göstermiştir [134]. Aynı dönemlerde, O'Neill ve arkadaşları (1973), Sepharose-4B'ye, aminofenol taşıyan camlara ve p-amino benzil selüloza fenolik, katekolik ve benzoil gruplarını bağlayarak, hangi adsorbantın mantar PPO'suna spesiflik gösterdiğini araştırmışlardır. Bu adsorbantlardan dopamin afinite kolonları ham enzim özütünden enzimi bağlamayı başarmıştır. Ancak bu kolonlar, kendiliğinden oksidasyona uğradığından dolayı, tekrar tekrar kullanılamamıştır[135].

Katı desteklere bağlanmış inhibitörler, fenolikler alkil grupları ve antibadiler ile mantar PPO'sunun saflaştırılması, bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir[136-138].

Pathak ve arkadaşları (1992) yaptıkları bir çalışmada, afinite kromatografisi üzerine aktivasyon metotlarının etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, patates PPO'sunun afinite kromatografisinde kullanılmak üzere, CNBr veya divinilsülfon (DVS) ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye değişik uzantı kolları ve uzantı kollarına da ligand olarak p-aminobenzoik asit'in bağlanmasıyla çeşitli afinite jelleri hazırlanmıştır. Bu çalışma neticesinde, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye p-aminobenzoik asit'in bağlanmasıyla oluşturulan afinite jelinin, PPO adsorpsiyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir [139].

Arslan ve çalışma ekibi (2004) tarafından yapılan çalışmada, Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildikten sonra, uzantı kolu olarak L-tirosin ve uzantı koluna da ligand olarak p-aminobenzoik asit bağlanmıştır. Böylece, Sepharose-4B-L-tirosin-p-aminobenzoik asit senteziyle hazırlanan afinite jeli kullanılarak yapılan afinite kromatografisi ile PPO, dut meyvelerinden, tek adımda ve 74 kat saflaştırılmıştır [140].

1.4.1 PPO'nun Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı

Bir çok kaynaktan elde edilen PPO enziminin farklı moleküler yapılarda olduğu bildirilmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonuna da ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara bağlıdır. Molekül yapılarının farklı oluşu;

- benzer alt birimlerin değişik polimerizasyon derecelerinde birleşmelerine,
- farklı alt birimlerin değişik kombinasyonuna,
- tek bir proteinin konformasyonel değişimlerine, veya
- bahsedilen bu üç ihtimalin kombinasyonuna atfedilir [38].

Muz ve şeker kamışı kloroplastlarından elde edilen PPO'lar oldukça düşük molekül kütlelerine (12000 ve 10000) sahip iken, genelde PPO monomerinin 30000 dalton civarında molekül kütlelerine sahip olduğu ve bir bakır atomu ihtiva ettiği kabul edilir [35].

Farklı moleküler yapıdaki enzimler substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık ve inhibitörlere karşı olan davranışları bakımından farklılıklar gösterebilirler. Dehidrogenasyon ve hidroksilasyon aktivitelerinin (katekolaz:kresolaz) oranları üzerinde çok detaylı çalışmalar vardır. Genel olarak, çeşitli yapıların yalnız bir kısmı monofenollere etki eder. Hidroksilasyon aktivitesinin dehidrogenasyon aktivitesine oranla daha kararsız olduğu alkali pH şartlarında, büyük molekül ağırlıklı yapılar hidroksilasyon aktivitelerinin çoğunu kaybederler [66].

1.4.2 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

PPO aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Enzimin reaksiyon inaktivasyonu kısa zamanda o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu yavaşlattığından dolayı her iki metotda da, reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesine dikkat edilmelidir.

Substratın tükenme hızı, genel olarak, O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresi ile manometrik olarak ya da bir oksijen elektrodu ile polarografik olarak ölçülür. Bu iki metotda aynı sonuçları vermez. Aynı şartlar altında elde edilen O₂ absorpsiyon değerleri polarografik metotda daha yüksek çıkmaktadır [141].

Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik densitesinin ölçümüyle spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metot oldukça basittir ve rutin analizlerde kullanılır.

Katekol, pirogallol veya klorojenik asit gibi doğal substratlar spektrofotometrik metotlarda kullanılabilir [142]. Çeşitli fenollerin oksidasyon ürünlerinden oluşan renkli bileşiklerin değişik dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermeleri, özellikle alkali pH'larda substratların otooksidasyona uğrayabileceği ve klorojenik asit gibi bazı inhibitörlerin fazla miktarlarının enzimin güçlü bir inhibisyonuna sebep olabileceği göz önünde tutulmalıdır [142].

Aktivite ölçümleri esnasında PPO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen hidrokinon ve askorbik asit gibi daha negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir. Bundan dolayı, bu reaktiflerin konsantrasyonları sabit kaldığı sürece, substratın katalitik miktarı yeterlidir. Sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bu prensibe dayanan diğer uygulamalarda, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorpsiyon verdiği 265 nm'deki konsantrasyonundaki azalma ölçülür [143]. Askorbik asidin tükenme hızı enzim aktivitesi ile direkt olarak orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon \leftrightarrow substrat transformasyonudur. Askorbik asit oksidaz elde edilen sonuçlara tesir eder. Bu metodun diğer bir uygulamasına göre, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki askorbik asidin tamamının tükenmesi için gereken zaman yerine, renkli kinon ürünlerinin oluşumu ölçülür. Bu kronometrik metot olarak isimlendirilir.

Askorbik asit yerine 420 nm'de absorbans veren $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm'de absorbans veren bitki materyalleri sonuca tesir etmez. Bu metodun diğer avantajları ise, ferrosiyanürün özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre daha az hassas olması ve çözültide de daha kararlı olmasıdır. Aynı substrat konsantrasyonu kullanıldığı zaman, ferrosiyanür metodu askorbik asit prosedürüne oranla yarıya daha az hassastır [38].

Fenolik substratların ve reaksiyon ürünlerinin üzerine yapılan gaz kromatografisi çalışmaları, kolayca okside olabilen materyaller kullanılmadığında katekol substratı ile yüksek K_M değerlerinin elde edildiğini göstermiştir [144]. Bu çalışmalar, reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu ve reaksiyon esnasında enzimin inaktivasyona uğradığını göstermiştir.

Reaksiyon inaktivasyonunu önlemek için çeşitli prosedürler tasarlanmıştır. Bu prosedürler reaksiyon karışımından kinonların uzaklaştırılmasına dayanır. 3-metil-2-benzotiyazolon hidrazon hidroklorik kinonlarla kondansasyon ürünleri oluşturur. Bu ürünler daha sonra kloroform ile reaksiyon karışımından ekstrakte edilir ve organik fazın absorpsiyonu 500 nm'de okunur. Kondansasyon ürünlerinin ekstraksiyonu yerine asetonda çözülmesi daha hassas sonuçlar vermektedir [145]. Diğer bir metotda ise her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz bileşikler oluşturan sarı bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit anyonu kullanılır. Enzim aktivitesi sarı bileşiğin 412 nm'deki absorbansındaki azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle takip edilir [142].

1.5 Polifenol Oksidaz'ın Doğada, Endüstride, Tıpta ve Sentez Reaksiyonlarındaki Rolü

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

Bitkilerin enfeksiyonlara karşı olan dirençlerinde PPO'nun görevi basitçe şöyle açıklanabilir: Enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek, suda çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular, enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi görürler. Bu olay, bazı araştırmacılar tarafından PPO'nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir [38]. Membranların lipid içeriğinin azalması bu açıdan önemlidir. Çünkü, bu durum membranların geçirgenliğini etkileyebilir ve enzimin substratıyla temasını kolaylaştırarak bariyerlerin oluşumunu artırabilir. Diğer bir teoriye göre de, polifenollerin oksidatif polimerizasyonunun ara ürünleri, enzimi inaktif edebilir veya bazı kararsız bitki enzimlerine ve virüslere bağlanabilir [38]. PPO'nun *o*-

dihidroksifenollerini oksidasyonu ile oluşan kinonlar, triptofan ile reaksiyona girerek, indolpirüvik asit üzerinden, indol asetik asidi oluştururlar. Bundan dolayı PPO, bitki büyüme regülasyonunda rol alabilir [147].

PPO etkisi ile oluşan kinonlar, humuslaşma ve enzimatik olmayan kararmaya yol ačan benzer reaksiyonlara katılabilir ve bundan dolayı toprağın organik maddelerinin üretimine katkıda bulunabilir [22].

Fermente içeceklerin koku ve tadına PPO etkisi, istenen bir durum olabilir. Elma suyu ve fermente armut suyu üretiminde, doğal olarak bulunan fenollerin polimerizasyon ve kondanse olmuş oksidasyon ürünleri çöker ve filtrasyonla uzaklaştırılır [103]. Üzüm fenollerinden, başlıca kateşinler, enzim ile oluşturulan kinonlar, amino asitlerle reaksiyona girebilir ve son ürün olarak uçucu aldehidleri verirler.

Bazı un türlerinde bulunan yüksek PPO aktivitesi, ekmek veya makarna ürünlerinde kararmayı meydana getirir. Enzimatik olarak oluşan kinonların, kazein gibi proteinlerle reaksiyonu, makarna ürünlerinin sindirimini ve lizin içeriğini azaltır [148]. Bu durum, besinlerin besleyici değerlerini etkileyebilir. Enzimatik renk değişimi, pancar ve şeker kamışının işlenmesi esnasında son ürünün rengine etki edebileceği gibi oluşan polimerler, şekerin kristalizasyonunu da zorlaştıracadığından ve verimi düşüreceğinden dolayı da istenmeyen bir durumdur [66]. En istenmeyen durum ise, PPO tarafından oluşturulan kinonların, düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikleri okside etmesidir ki bu bileşikler dihidroksifenollere indirgenmektedir. Bundan dolayı kinonlar, enzimin oksidatif etkisine yeni substrat sağlamayı, reaksiyon ürünleriyle inaktive oluncaya kadar veya indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler tükeninceye kadar devam ederler. Bu olay, askorbik asidin kinonlar üzerinde nasıl bir etki yaptığını ve bu bileşiğin renk değişimini nasıl önlediğini göstermektedir. Askorbik asidin tamamı tükeninceye kadar, kinonlar sürekli olarak indirgenir ve böylece, kinonlar birbirleriyle veya dönüşümsüz renkli polimerler oluşturabildikleri amino asit veya proteinlerle reaksiyon veremez. Bundan dolayı, enzimatik kararmanın oluşumu

dokulardaki vitamin C'nin tamamının bittiğini gösterir. Patlıcan, vişne ve kirazda görüldüğü gibi, antosiyaninler, PPO tarafından oluşturulan kinonlar ile benzer şekilde bozundurulurlar. Askorbik asit, antosiyanin oksidasyonunu düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeli ile engeller [38].

Tıp ve endüstri alanlarında kullanılmak üzere, PPO tarafından sentezlenen maddeler bilinmektedir ve özellikle, PPO, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından, güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç tutuklamada miyopolimer olarak da bu melaninlerden yararlanılmaktadır. Bundan başka, bazı kanser türlerinde, kanserli hücrede tirosinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde, enzimin melanin sentezleme özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir [149]. Memelilerde tirosinazın aktif biçimi, melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunmaktadır. Tirosinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün, farelerde Harding-Passey melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir [150].

Yapılan bir çalışmada, PPO'nun biyosentetik bir reaksiyonda, enantiyomer seçici bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, PPO, sadece (+)-larreatrisini (+)-3-hidroksilarreatrisine hidroksillerken, enantiyomeri olan (-)-3-hidroksilarreatrisine hidroksilleyememiştir. Bu da PPO'nun yüksek substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermektedir [151].

PPO'nun kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan *L*-DOPA'nın üretimidir [152].

1.6. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılacak organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim katalizli polimerleşme reaksiyonları ile elde edilen polimerler, özel kimyasal maddelerin üretiminde, enzimlerin ne derece spesifik olduğunu göstermektedir. Bazı fenol türevlerinin, polifenollerin, polianilinlerin, polifenol oksidazlar [153] kullanılarak ılımlı reaksiyon şartları altında yükseltgenme yoluyla polimerleştirildikleri belirtilmiştir.

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

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

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip kültür mantarı (*Agaricus bisporus*) ve yenilebilir yabancı mantar (*Lactarius volemus.*) mantarlarından PPO enzimlerinin

sefaro4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asid afinite kolonu ile saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen saf PPO enzimlerinin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir;

- Afinite jelinin sentezi,
- *Agaricus bisporus* ve *Lactarius salmonicolor* mantarlarından bu afinite jeli ile PPO enzimlerinin saflaştırılması,
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile PPO enzimlerinin 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 ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla inhibisyon türünün tespiti ve K_i sabitlerinin ve I_{50} değerlerinin bulunması.

Böylece endüstrinin farklı alanlarında enzimin stabilitesi ve kullanımını arttırmak için yenilebilir mantarlardan polifenol oksidaz enzimi afinite kromatografisiyle ilk defa saflaştırmış olacaktır.

Besinlerdeki enzimatik esmerleşme olaylarının ortaya konması, hem insan beslenmesi hem de sağlık açısından besinlerdeki esmerleşmenin etkilerini anlamak ve çözümler bulmak açısından oldukça önemlidir. Buna göre, yöremizde yetişen ve tüketilebilen bu mantar, tüketilmenin yanında bir endüstriyel öneme de sahip olabilecektir. Bu kaynaklardan sağlanan özütten PPO enziminin saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bunun sonucunda elde edilen PPO aktivitesinin inhibisyonu verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel PPO 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 PPO'ların 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 YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, p- aminobenzoik asit, L-tirozin, standart serum albümin, N,N,N,N' tetrametiletilediamin (TEMED), β -merkaptoetanol, akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, sülfanilamid, trisma base, trisma hidroklorik asit, pirogallol, 4-metil katekol, katekol, siyanojen bromür, diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den; sodyum hidroksit, sodyum klorür, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum azotür, sodyum bikarbonat, sodyum bifosfat, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), L-sistein, glutatyon, okzalik asit, syringic asit, sülfosalisilik asit, etilen glikol, Merck A.G'den ;, amonyum persülfat, SDS, bromtimol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250 Fine Chemical'dan sağlandı.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj: Hettich zentrifugen, EBA-12R

pH metre: Orion- model 920A

UV-Spektrofotometre: CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN

Manyetik karıştırıcı: IKA Combimag RCO

Peristaltik Pompa: Pharmacia Fine Chemicals

Kronometre: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr

Terazi: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Otomatik pipetler: Fischer
Homojenize Edici: Ev tipi blender
Elektroforez tankı: Hoefler, HSI
Kromatografi Kolonu: Pharmacia Fine Chemicals
Derin dondurucu: Sanio Medical Freezer
Etüv: Elektromag
Çalkalayıcı: Clifton
Sabit sıcaklık sirkülatörü: Techne-Tempette Junior TE-8J
Vortex: Fisons Whirli Mixer

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

1) **Ekstraksiyon tamponu:** %0.5 PEG, 10 mM askorbik asit, pH: 7.3, 0.5 M fosfat tamponu; 8.7 gr (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 gr polietilen glikol(PEG), 0.176 gr (0.001 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH. 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi. Çözelti daha sonra saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

2) **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözeltiye alındığı ve diyaliz yapıldığı tampon:** 5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3; 0.87 gr (0.005 mol) K_2HPO_4 950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.3'e kadar titre edildi ve saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

3) **Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:** 0.1 M $NaHCO_3$, pH: 10.0 tamponu; 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M $NaHCO_3$, pH: 8.8 tamponu; 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 450 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Na_2HPO_4 , pH: 6.0 tamponu; 1.42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 Lt'ye tamamlandı.

4) **Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar:** 0.05 M fosfat tamponu, pH: 5.00; 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

5) **Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elusyonu için kullanılan çözelti:** 0.05 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl, pH: 7.00 fosfat tamponu; 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 7.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

6) **Substrat Çözeltileri:** Her bir substrat çözeltisi 10 mL, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 gr (1×10^{-3} mol) katekol, 0.124 gr (1×10^{-3} mol) 4-metil katekol ve 0.126 gr (1×10^{-3} mol) pirogallol alınarak her biri ayrı ayrı son hacim 10 mL olacak şekilde destile su ile çözündürüldüler.

7) **Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL):** 25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözüldü.

9) **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:**

Çizelge 2.1. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti Adı	İçerik / Hazırlanış
Lowry Protein Tayini	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3
Tablo 3'ün devamı Lowry B	% 1 (w/v) bakır sülfat ve % 2 (w/v) sodyum potasyum tartarat (1:1)
Lowry C	50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B
Lowry D	1 hacim folin belirteci : 2 hacim saf su

10) **Stok inhibitör çözeltileri:** İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltileri Çizelge 2.1’de belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı.

Çizelge 2.2 İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı (Son hacim 10mL).

İnhibitör	Miktar(gr)	Mol sayısı(mol)	Stok çözeltilinin konsantrasyonu(M)	İnhibitörün çözündüğü ortam
Okzalik asit		1×10^{-4}	0.01	Su
Siyringis asit	0.19817	1×10^{-4}	0.01	aseton
L-tirozin	0.090	1×10^{-4}	0.01	pH: 10 0.1 M NaHCO ₃ tamponu
L-sistein	0.121	1×10^{-4}	0.01	pH:8.5, 1 M Tris tamponu
Glutatyon	0.1536	1×10^{-4}	0.01	Su
B-merkaptöetanol	70 µL	1×10^{-4}	0.01	Su
Sülfanamid	0.172	1×10^{-4}	0.01	pH:8.5, 1 M Tris tamponu

11) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Destile su	0.5 mL

12) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Tris-HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır.

13) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.2'de verilmektedir.

14) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:

0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

15) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Çizelge 2.3 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u> Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> Tris-HCl 11.82 gr pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 gr pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 gr Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Araştırmada kullanılan mantarlardan *Lactarius salmonicolor* Balıkesir'in çevre köylerinden, *Agaricus bisporus* ise Balıkesir Kartopu Kültür Mantarı Yetiştiriciliği'nden üedildi. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g mantar 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M, pH: 7.30, fosfat tamponu içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzöldü. Süzöntü 20000xg'de +4°C'de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme, işlemleri %0-80 arasında doygunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formülle tespit edildi.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : süpernatant hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Çöktürme işleminde kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı yukarıdaki formüle göre tespit edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı (NH)₂SO₄ yavaş yavaş azar azar katıldı, her ilave sonrasında daha önce katılan (NH)₂SO₄'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Katı amonyum sülfat katılmasından

sonra %80 doygunluğa getirilen suspansiyon 20000xg'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Tüm ekstrakt bu şekilde santrifüj edildikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı kısımlar atıldı. Oluşan çökelek ise, 5 mM fosfat tamponunun (pH: 6.3) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

2.2.3 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) yerleştirildi. Enzimin içinde bulunduğu tampona (5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi.

2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

PPO enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan biriside afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede, çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemleri kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [154].

2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Arslan ve çalışma ekibinin sentezlediği yöntemle göre sentezlendi. Bu yöntemle göre afinite jeli, çözünmeyen bir kolon maddesi olan Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı[140]. Sepharose-4B'nin serbest -OH gruplarının modifikasyonu için genel olarak CNBr kullanıldığı için bu çalışmada da, Sepharose-4B CNBr ile aktifleştirildikten sonra, matriksin uzantı kolunu oluşturmak üzere tirozinle kovalent olarak modifiye edildi. *p*-aminobenzoik asit, Polifenol oksidaz (PPO) enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda

saflaştırılmasında başarıyla kullanıldığı için, ligand olarak seçildi. Bu bağlamda, uzantı kolu olan tiroisine, enzimi spesifik olarak bağlayan ligand kısmını oluşturmak üzere, diazolanmış *p*-aminobenzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Böylece elde edilen jel, afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak kullanılarak, *Lactarius salmonicolor* ve *Agaricus bisporus*'tan PPO'nun saflaştırılması işleminde kullanıldı.

2.2.4.1.1 Sepharose-4B'nin CNBr ile Aktifleştirilmesi ve L-Tirosin Bağlanması

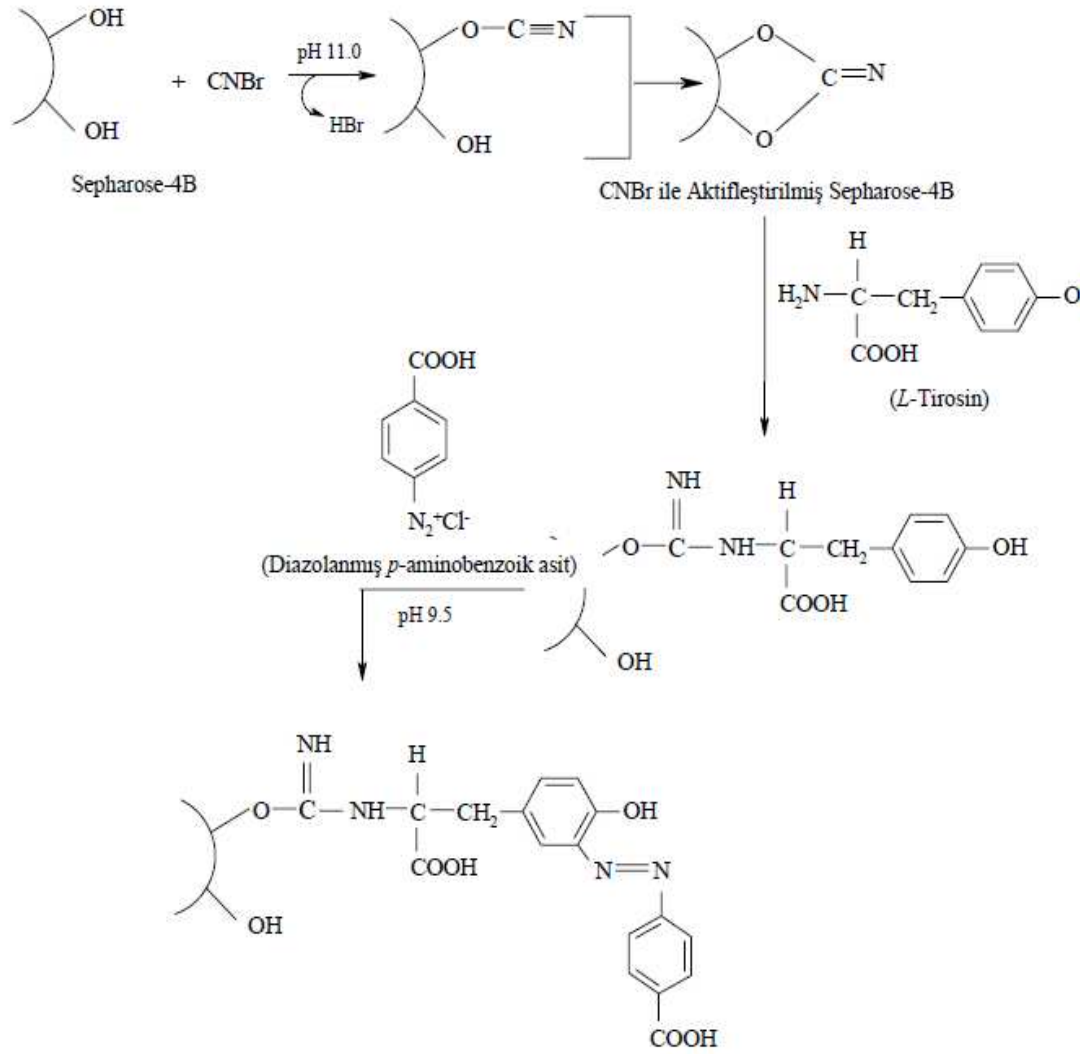
Bir beher içerisinde 10 mL Sepharose-4B'ye saf su ilave edilerek iyice yıkandı ve çökmesi için bekletildi. Çöktükten sonra üstteki sıvı kısım dekante edildi. Sepharose-4B süspansiyonuna eşit hacimde saf su ilave edildi. Bir çeker ocak içinde, karışmakta olan bu süspansiyona, 4 g CNBr katı olarak ilave edildi ve bir pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11.0'a çıkarıldı. CNBr tamamen reaksiyona girene kadar (yaklaşık 30 dakika) pH 11.0'da tutuldu ve reaksiyon tamamlandığında pH'nın 11.0'da sabit kaldığı görüldü. Çok miktarda küçük buz parçaları süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine yerleştirilen mavi banttı süzüldü. Mavi bant üzerinde kalan kalıntı, 250 mL 0.1 M pH 10.0 olan soğuk NaHCO₃ tamponuyla yıkanarak süzüldükten sonra bir beher içerisine alındı. 20 mL'sinde 10 mg *L*-tirosin içeren 0.1 M konsantrasyonda ve pH'sı 10.0 olan soğuk NaHCO₃ tamponundan ilave edilerek, yavaşça karıştırılan bu süspansiyondan, bağlanma verimliliğini belirlemek amacıyla, her 15 dakikada bir, içinde jel bulunmayan üstteki sıvı kısımdan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimi izlendi. 90. dakikadan sonra absorbansta önemli bir farklılık olmadığı için, bağlanma reaksiyonu 90 dakika olarak belirlendi. Böylece *L*-tirosinin, CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B matriksine bağlanmış olduğu belirlendi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyon bir buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, süzüntüsü 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen *L*-tirosin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Mavi bant üzerinde kalan katı kısım, 100 mL 0.2 M NaHCO₃

tamponuyla da yıkanarak aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Böylece, sentezlenen sepharose-4B-*L*-tirosin, ligandın bağlanması için hazır hale getirildi [140]

2.2.4.1.2 *L*-Tirozinle Modifiye Edilen Sepharose-4B'ye *p*-aminobenzoik Asidin Bağlanması

25 mg *p*-aminobenzoik asit, bir buz banyosunda soğutulan 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü ve buz banyosunda bırakıldı. 75 mg NaNO₂, yine buz banyosunda soğutulan 5 mL saf su içerisinde çözülerek *p*-aminobenzoik asit çözeltisi üzerine damla damla ilave edildi. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen reaksiyon sonunda, diazolanmış halde bulunan *p*-aminobenzoik asit, 40 mL sepharose-4B-*L*-tirosin süspansiyonuna ilave edildi. 4 M NaOH ile pH 9.5'e çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alınarak, önce 1 L saf su ile ve ardından 200 mL 0.01 M pH 6.0 Na₂HPO₄ tamponuyla yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi [140].

Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi, *L*-tirosin ile modifiye edilmesi ve *p*-aminobenzoik asitin bağlanması ile ilgili reaksiyonlar Şekil 2.1'de verilmiştir:



Şekil 2.1 Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.

2.2.4.2 Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1×10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat tamponu ($\text{pH}: 5.0$) ile, üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun pH

değerleri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M fosfat tamponu (pH: 5.0) ile yıkandı ve 2'er mL halinde tüplere alındı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Toplanan tüplerde 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Daha sonra 0,05 M pH=7,00 Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve 3'er mL halinde tüplerde fraksiyonlandı. Elüatlarda Lowry metoduyla kantitatif, 280 nm'de kalitatif protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı.

2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Lactarius salmonicolor ve *Agaricus bisporus* PPO enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [155].

Bu amaçla elektroferez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Çizelge 2.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi. (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank

tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Lizozim (14.3 kDA), β-laktoglobulin (18.4 kDA), REaz-Bsp 981 (25 kDA), laktat dehidrogenaz (35.0 kDA), ovalbumin (45 kDA) ve sığır serum albumin (66.2 kDA, β-galaktozidaz (116.0) içeren standart protein çözeltisi, içerisinde her birinden 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulmuş enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma jel kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 3.3-3.4).

2.2.6 Protein tayini

2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen eluatlar eşit hacimde alınıp, bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodla

yapılan kalitatif protein tayininin temel prensibi, proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip olan amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'de UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır [122]. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak alındı.

2.6.1.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein tayini, Lowry yöntemiyle yapıldı [156]. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albumin çözeltisi kalibrasyon grafiği için hazırlandı. Protein tayini için aşağıdaki işlemler yapıldı:

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

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

2.2.7 PPO Enziminin Aktivite Tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.4 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 0.830 mL tampon + substrat (0.130 M katekol, 0.130 M 4-metil katekol veya 0.130 M pirogallol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de köre karşı bir

1 dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (U) reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0,001'lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak "1 mL enzim çözeltilisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişme" kullanıldı.

2.2.8 PPO Enzimi İle İlgili Kinetik Çalışmalar

PPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için üç farklı substrat için, optimum pH ve sıcaklık belirlendi. Kullanılan her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri tayin edildi. Ayrıca farklı inhibitörler için, optimum şartlarda, I_{50} ve K_i değerlerini bulundu.

2.2.8.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.5, 5.5, 6, 6.8, 7.5, 8, 9, 10, 11) üç farklı substrat (katekol, 4-metil katekol, pirogallol) kullanılarak reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen değerlerden yararlanılarak aktiviteler bölüm 2.2.7'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum pH değerleri tespit edildi.

2.2.8.2. Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

PPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla katekol substratı kullanılarak 5, 10, 20,30 , 40 , 50°C' deki reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak aktiviteler bölüm 2.2.7' de anlatıldığı gibi hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum sıcaklık değeri belirlenmiş oldu. Elde edilen sonuçlar grafik (Şekil 3.6 ve 3.27) ve tablo (Çizelge 3.4 ve 3.26) halinde verildi.

2.2.8.3 Farklı Substratlar İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının beş farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 3.5-3.7 ve 3.28-3.30) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.7-3.9 ve 3.27-3.29). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 3.8 ve 3.31' de verildi.

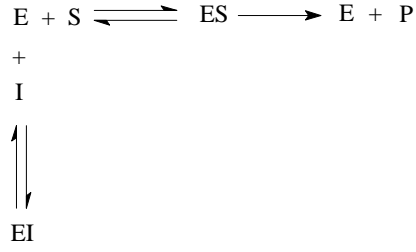
2.2.8.4 İnhibitörler İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı (Çizelge 3.9-3.15 ve 3.32-3.36). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.10-3.16 ve 3.30-3.36). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.25 ve 3.31'de verildi.

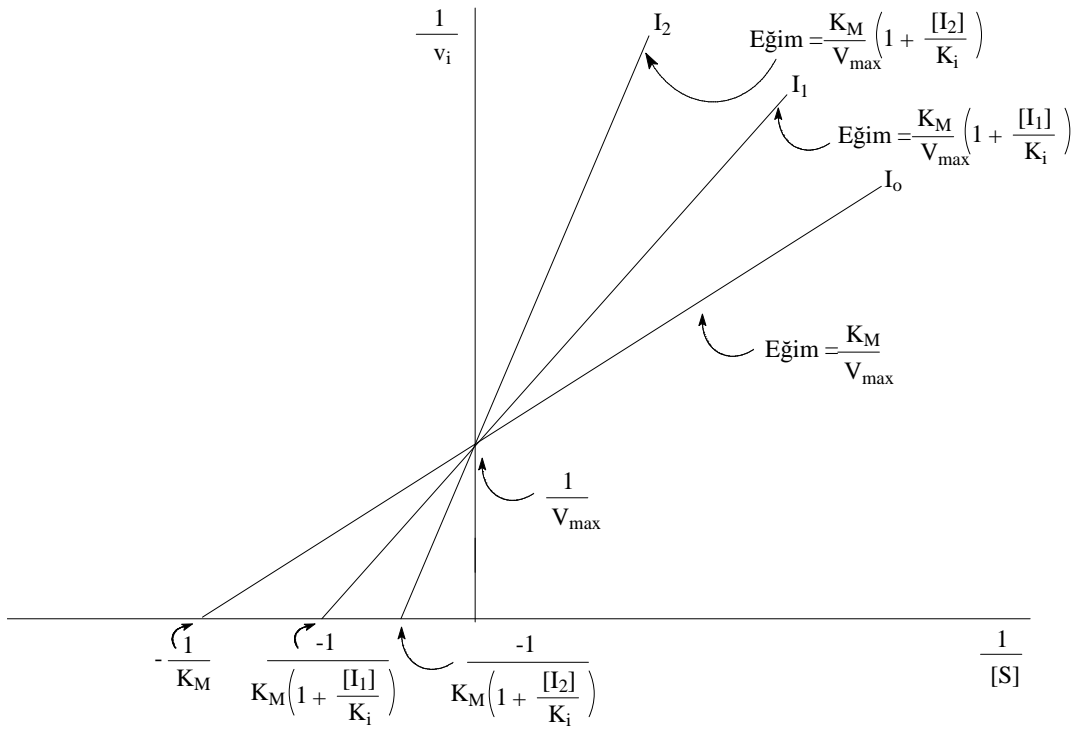
2.2.8.5 İnhibitörler İçin K_i Değerlerinin Bulunması

Farklı inhibitörler için K_i değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonu kullanarak aktivite bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda optimum şartlarda aktivite katekol substratı kullanılarak tespit edildi (Çizelge 3.17-

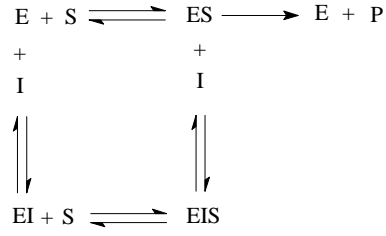
3.23 ve 3.37-3.43) $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.17-3.23 ve 3.37-3.43). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri tespit edildi (izelge 3.24 ve 3.44). K_i değerleri yarışmalı (kompetetif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarı yarışmalı (unkompetetif) inhibisyon için eğrinin $1/V$ eksenini kestiği noktayı veren $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetetif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak hesaplandı (Şekil 2.2-2.4.). Denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.



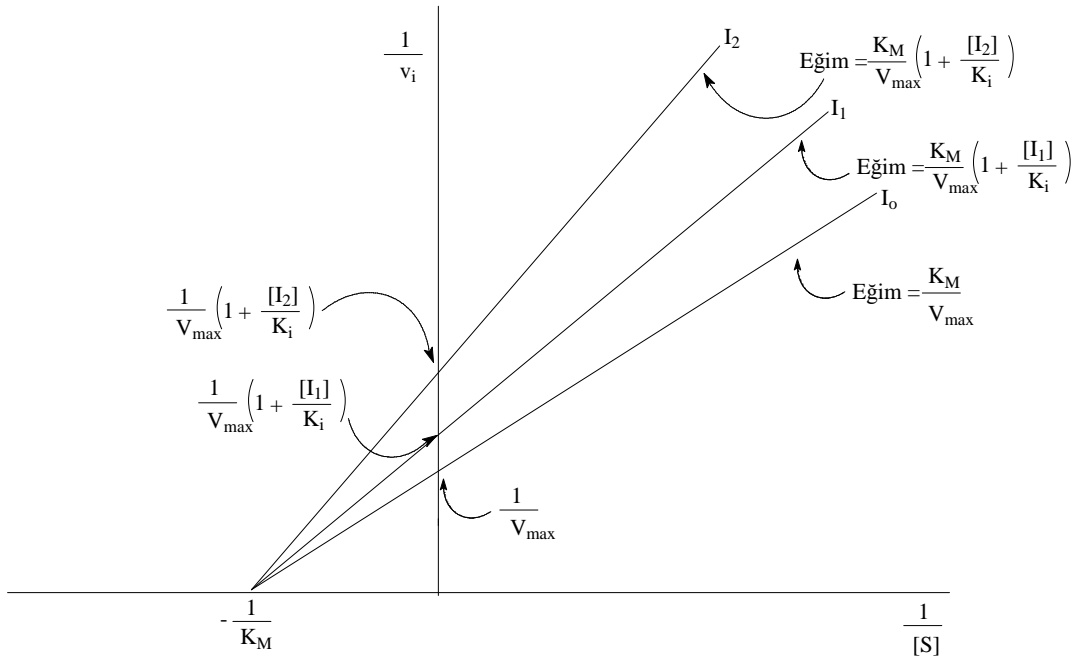
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



Şekil 2.2 Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.



$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

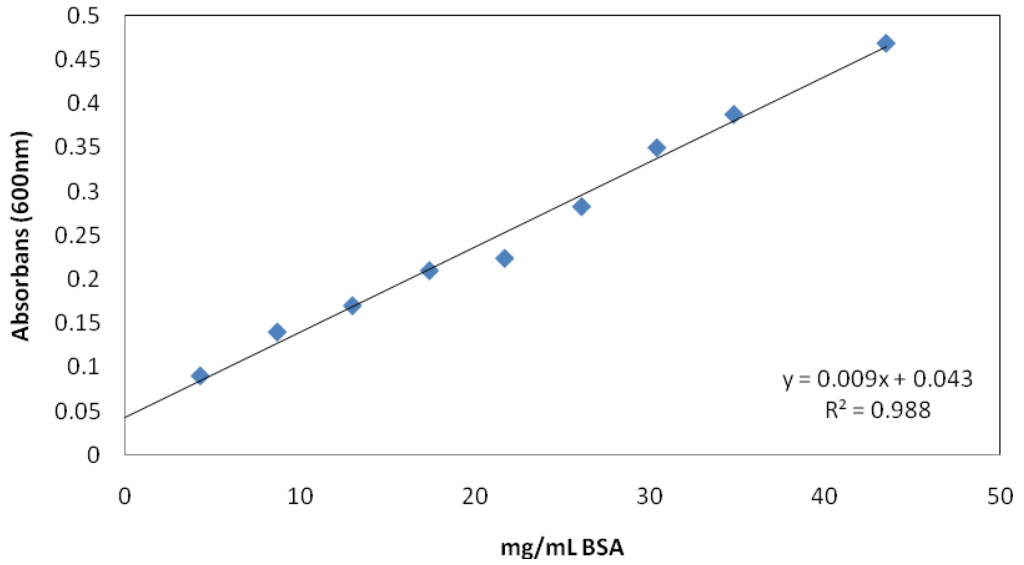


Şekil 2.3 Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.

3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Lowry yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.6.1 de açıklandığı gibi hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg protein karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.1' de gösterilmiştir.



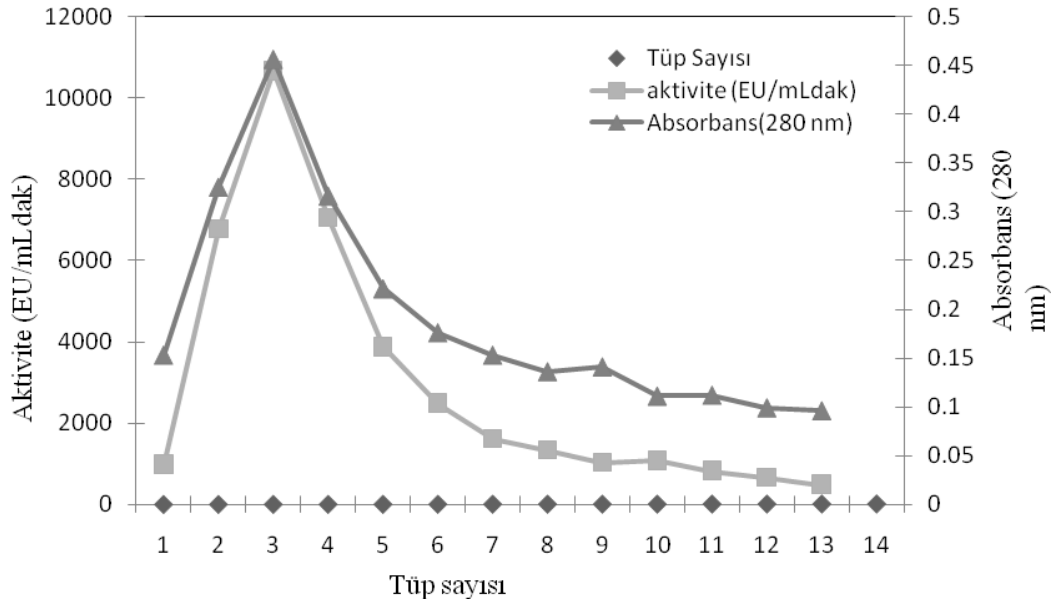
Şekil 3.1 Lowry yöntemine göre protein standart grafiği

3.2 Lactarius salmonicolor PPO (LsPPO)

3.2.1 LsPPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4' de belirtildiği şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 0.05 M Na_2HPO_4 Tamponu (pH 5.00) ile dengelendi. Kolonun dengelenme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon seviyesi jel seviyesine kadar indirildi. Diyaliz işleminden sonra elde edilen melki mantarı enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon Na_2HPO_4 Tamponu (pH 5.00) ile yıkandı. Altan gelen yıkama çözeltisi 2'şer mililitre halinde tüplere fraksiyonlandı. Yıkama işlemine 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elusyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elusyon 0.05 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl tampon (pH 7.00) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 2'şer mL halinde tüplere alındı. Elusyon işlemine 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elusyon tampon kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafiği çizildi. (Şekil 3.2) afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve elüat çözeltileri için lowry metodu ile kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Çizelge 3.1 de verildi.



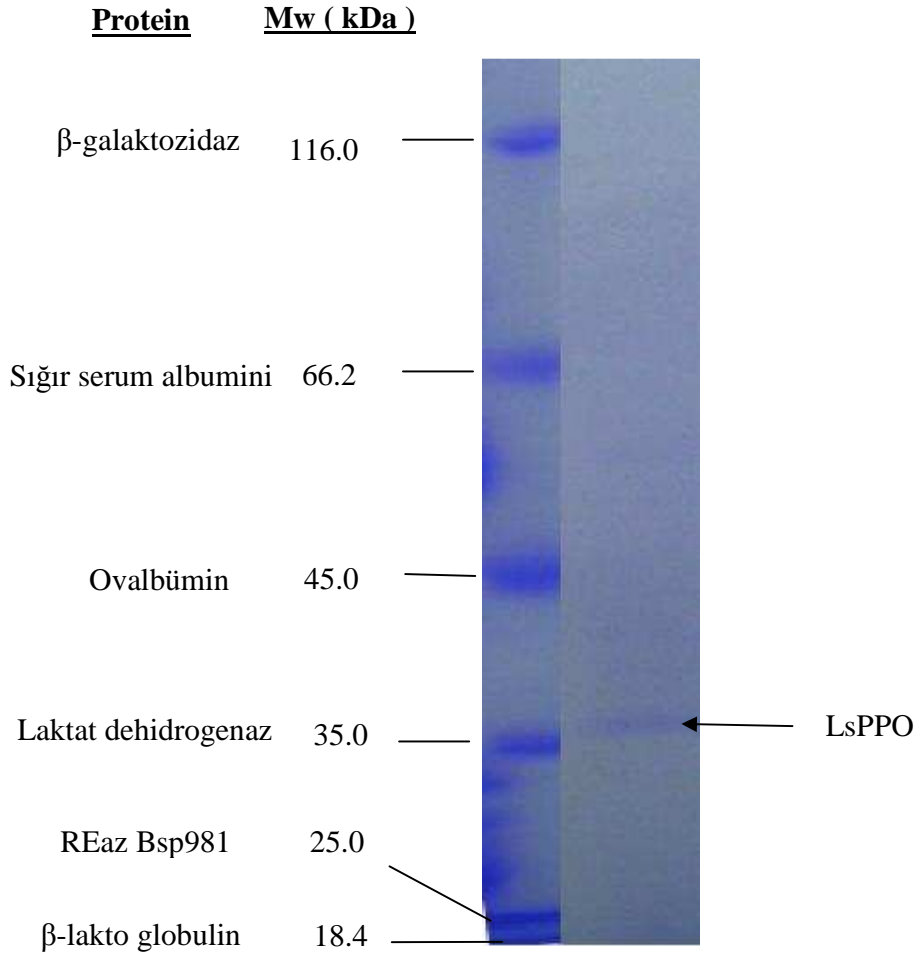
Şekil 3.2 Na₂HPO₄ Tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan LsPPO'nun absorbans-aktivite grafiği

Çizelge 3.1 LsPPO saflaştırma tablosu

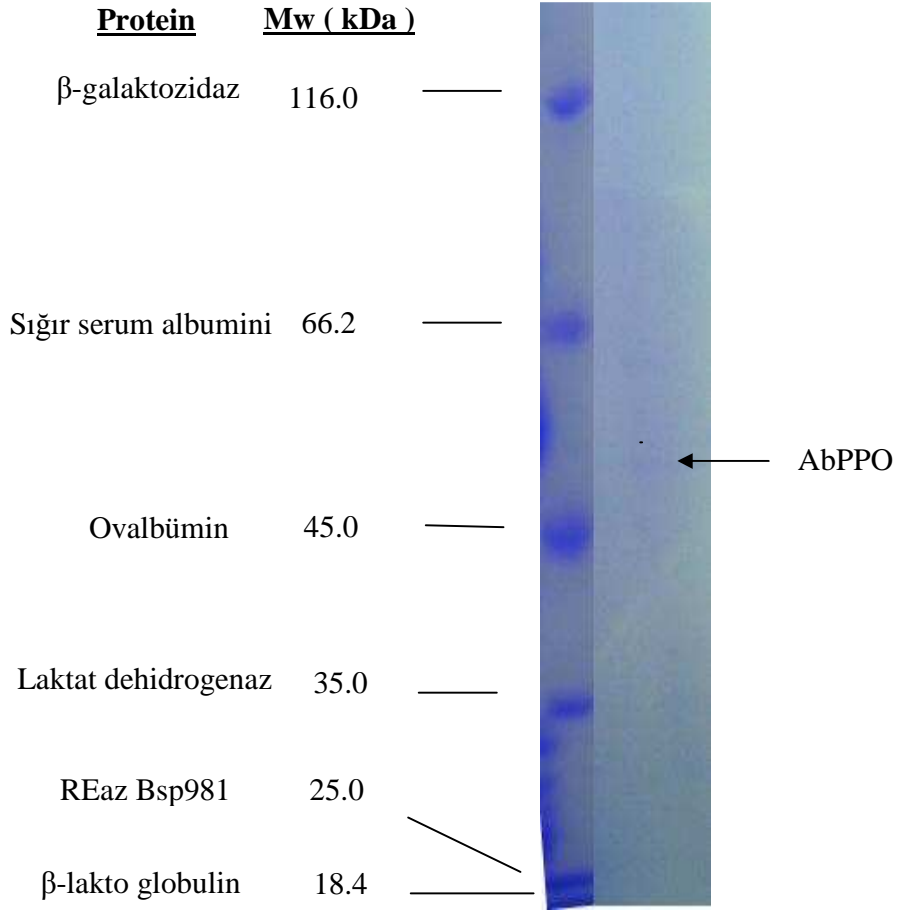
Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg prot)	Verim (%)	Saflaştırma derecesi
Ekstrakt	87	6425	558975	1.38	120.1	4654.2	100	—
Amonyum sülfat çöktürmesi	60	4975	298500	0.27	16.2	18425.9	34.2	3.96
diyaliz	10.8	9450	102060	1.74	18.8	5428.7	18.3	1.17
Afinite kromatografisi	25	13000	39000	0.105	0.315	1238095	7	26.6

3.2.2 LsPPO ve AbPPO Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Afinite kolonundan saflaştırılan LsPPO ve AbPPO enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5’ de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine *lactarius salmonicolor* ve *agaricus bisporus* mantarlarından saflaştırılan PPO enzim numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin fotoğrafları çekildi. (Şekil 3.3-3.4)



Şekil 3.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan LsPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi.



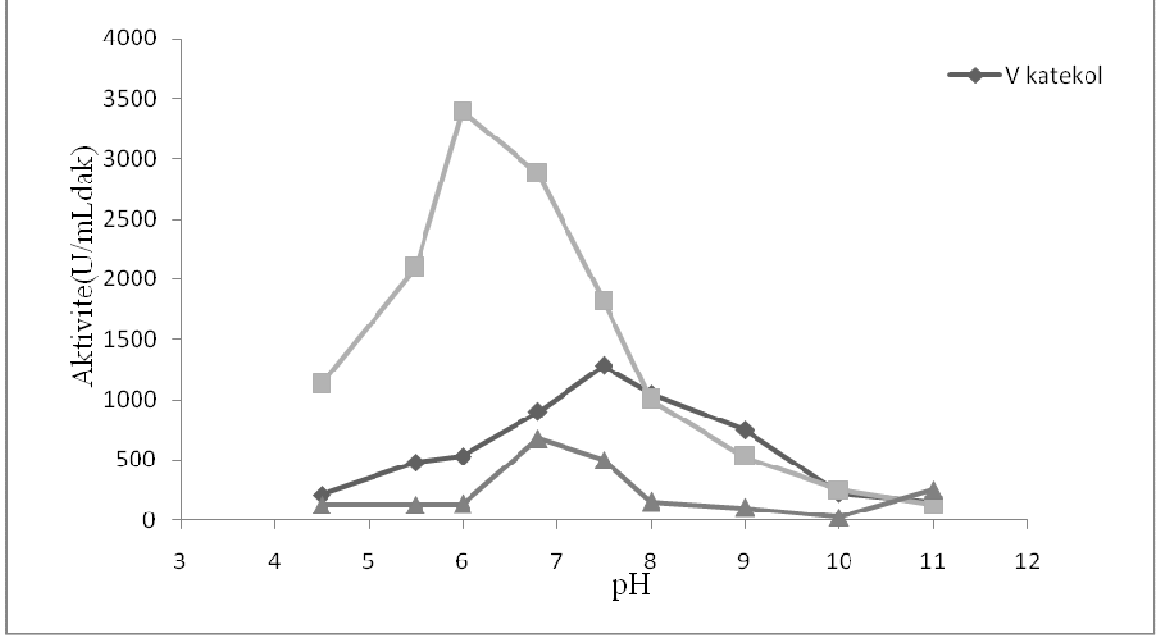
Şekil 3.4 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan AbPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi

3.2.3 LsPPO Enziminin Farklı Substratlar İçin Optimum pH Tayini

LsPPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.5, 5.5, 6, 6.8, 7.5, 8, 9, 10, 11) farklı substratlar (katekol, 4-metil katekol, pirogallol) kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.8.1’de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar izelge 3.2-3.3 ve Şekil 3.5 ‘ de verildi.

Çizelge 3.2 LsPPO enzimi için, üç ayrı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbands, U, aktivite ve % aktivite değerleri

pH	Katekol				4-metil katekol				Pirogallol			
	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.084	8.4	210	16.4	0.045	4.5	1125	33.1	0.005	0.5	125	3.7
5.5	0.0192	1.92	480	37.5	0.084	8.4	2100	61.76	0.005	0.5	125	3.7
6	0.0212	2.12	530	41.4	0.136	13.6	3400	100	0.0053	0.53	133	26.6
6.8	0.036	3.6	900	70.31	0.115	11.5	2875	84.6	0.019	1.9	475	95
7.5	0.0512	5.12	1280	100	0.073	7.3	1825	53.7	0.020	2.0	500	100
8	0.042	4.2	1050	82.03	0.040	4.0	1000	29.4	0.006	0.6	150	30
9	0.003	0.3	750	58.6	0.021	2.1	525	15.44	0.004	0.4	100	20
10	0.009	0.9	225	17.6	0.010	1.0	250	7.35	0.001	0.1	25	5
11	0.006	0.6	150	11.72	0.005	0.5	125	3.7	0.010	1.0	250	50



Şekil 3.5 LsPPO enziminin üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.3 LsPPO enziminin üç ayrı substrat için optimum pH değerleri

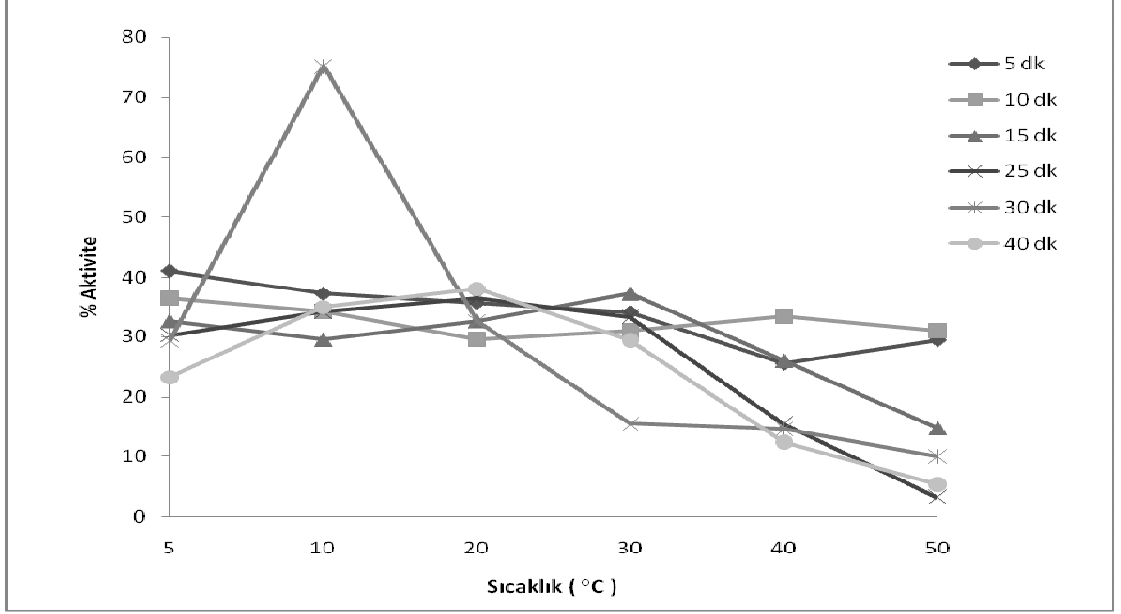
Substrat	Optimum pH	Aktivite(U/mLdak)
Katekol	7.5	1280
4-metil katekol	6.0	3400
Pirogallol	7.5	675

3.2.5 LsPPO Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

LsPPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla; 5⁰, 10⁰, 20⁰,30⁰, 40⁰, 50⁰ ve 60⁰C'lerde 5, 10, 15, 25, 30 ve 40 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler saptandı. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.3). Zamana karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 3.6).

Çizelge 3.4 LsPPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi çalışmasının sonuçları

Sıcaklık (°C)		Bekleme süresi (dak)					
		5	10	15	25	30	40
5	Δ OD	0.053	0.047	0.042	0.039	0.038	0.030
	%Aktivite	41.1	36.4	32.6	30.2	29.4	23.3
10	Δ OD	0.048	0.044	0.038	0.044	0.097	0.045
	%Aktivite	37.2	34.1	29.5	34.1	75.2	34.9
20	Δ OD	0.046	0.038	0.042	0.047	0.042	0.049
	%Aktivite	35.7	29.5	32.6	36.4	32.6	38
30	Δ OD	0.044	0.040	0.048	0.043	0.020	0.038
	%Aktivite	34.1	31	37.2	33.3	15.5	29.4
40	Δ OD	0.033	0.043	0.026	0.020	0.019	0.016
	%Aktivite	25.6	33.3	2.6	15.5	14.7	12.4
50	Δ OD	0.038	0.040	0.019	0.017	0.013	0.007
	%Aktivite	29.5	31	14.7	3.2	10.01	5.4



Şekil 3.6 LsPPO enziminin inkübasyon süresine bağlı koruduğu aktivite değişimi

3.2.6 LsPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 3.5-3.7) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.7-3.9). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 3.8’de verildi.

Çizelge 3.5 LsPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

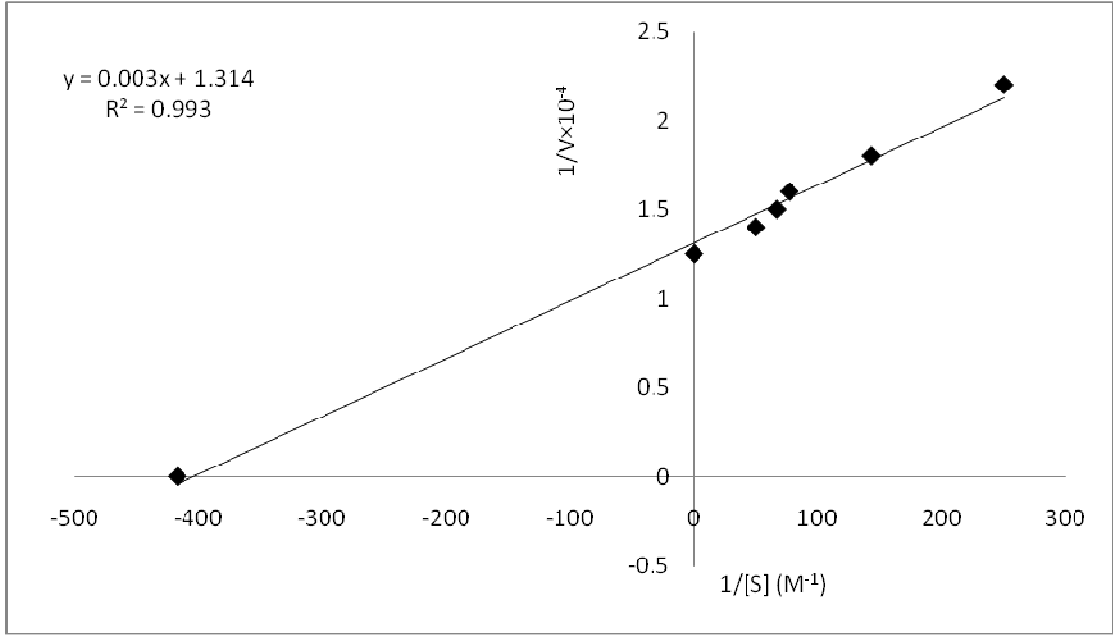
0.2 M Na-fosfat tampon (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.182	182	4550	2.2	250
0.890		0.070		0.7	0.218	218	5450	1.8	142.9
0.830		0.130		13	0.250	250	6250	1.6	76.9
0.810		0.150		15	0.258	258	6450	1.55	66.7
0.760		0.200		15	0.261	261	6525	1.53	50

Çizelge 3.6 LsPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

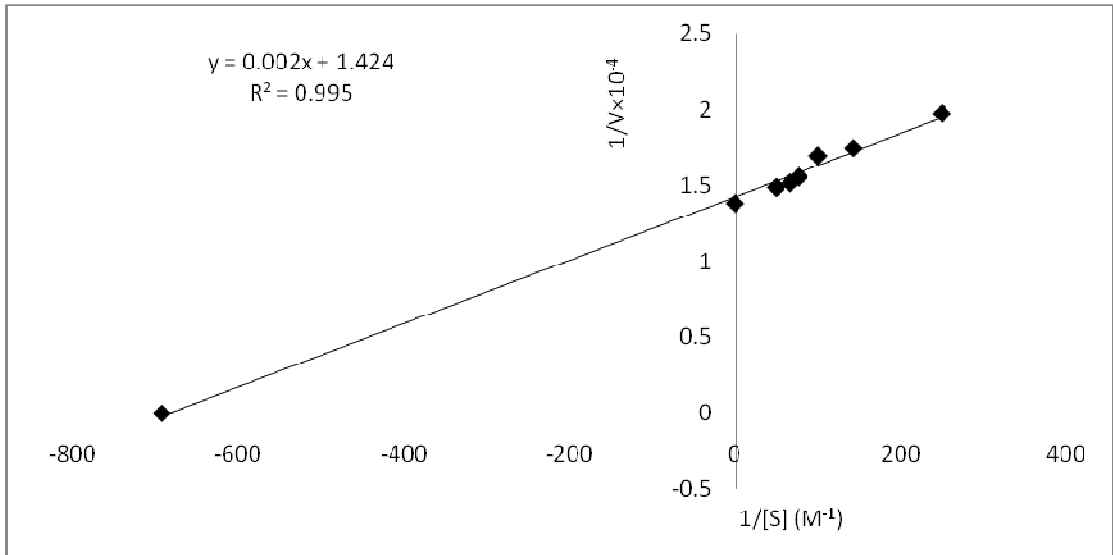
0.2 M Na-fosfat tampon (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.202	202	5050	1.98	250
0.890		0.070		0.7	0.228	228	5700	1.75	142.9
0.830		0.130		13	0.256	256	5875	1.7	76.9
0.810		0.150		15	0.263	263	6400	1.56	66.7
0.760		0.200		15	0.269	269	6725	1.52	50

Çizelge 3.7 LsPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değer

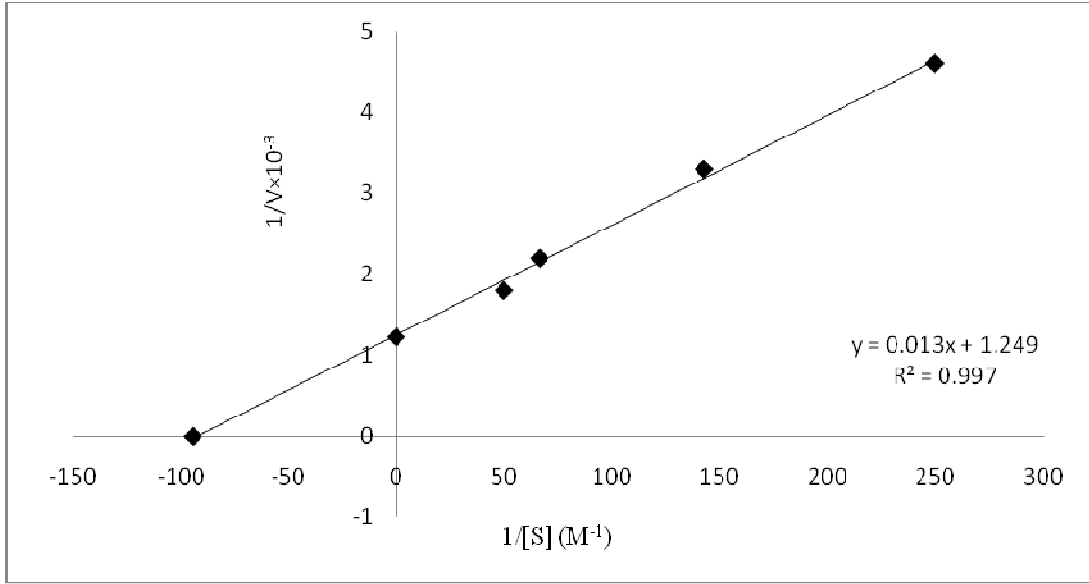
0.2 M Na-fosfat tampon (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.0087	8.7	217.5	4.6	250
0.890		0.070		0.7	0.012	12	300	3.3	142.9
0.830		0.130		13	0.015	15	375	2.7	76.9
0.810		0.150		15	0.018	18	450	2.2	66.7
0.760		0.200		15	0.022	22	550	1.8	50



Şekil 3.7 LsPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.8 LsPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.9 LsPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.8 LsPPO enziminin üç farklı substrat için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	$K_M(\text{mM}) \times 10^{-3}$	$V_{max}(\text{U/mLdak})$	V_{max}/K_M
Katekol	25	18702.5	748.1×10^3
4-metil katekol	1.81	18075	9986.2×10^3
Pirogallol	9.5	18050	1900×10^3

3.2.7 LsPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I₅₀ Değerlerinin Bulunması

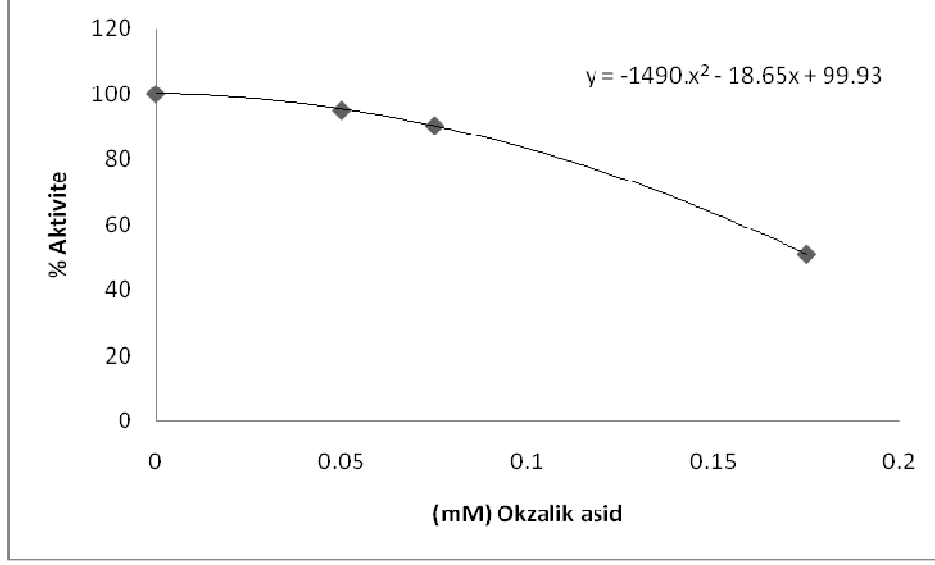
Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin I₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0,1 M katekol hazırlandı ve her ölçümde 0,130 mL alındı. İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 1 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,040 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 0.830 mL tampon + substrat + inhibitör çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 3.9-3.15). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.10-3.16). (I= küvetteki 1 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I₅₀ değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.16'de verildi.

Çizelge 3.9 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asid'in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I₅₀değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

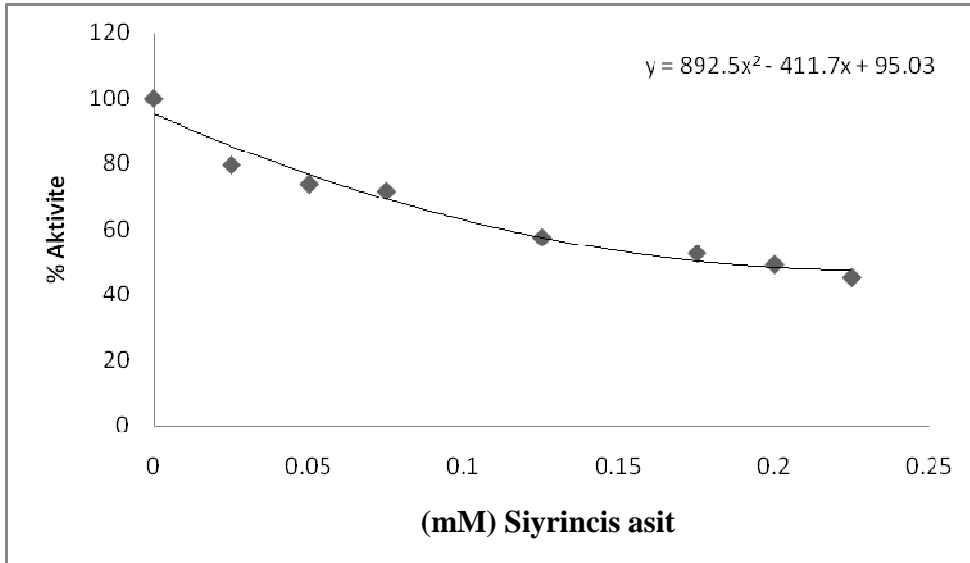
0.2 M Na-fosfat tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	Okzalik asid	40	130	-	-	0.156	156	3900	100
825				5	0.05	0.149	149	3275	95
822.5				7.5	0.075	0.141	141	3225	90.38
820				10	0.10	0.139	139	3475	89.10
817.5				12.5	0.125	0.138	138	3450	88.46
815				15	0.150	0.117	117	2925	75
812.5				17.5	0.175	0.080	80	2000	51
810				20	0.200	0.077	77	1925	49.36

Çizelge 3.10 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siyrincis asid'in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I₅₀değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	Siyrincis asid	40	130	-	-	0.226	226	5650	100
827.5				2.5	0.025	0.181	181	4525	79.6
825				5	0.050	0.168	168	4200	73.89
822.5				7.5	0.075	0.161	161	4025	71.68
820				10	0.10	0.155	155	3875	57.52
817.5				12.5	0.125	0.130	130	3250	52.65
815				15	0.150	0.049	49	1225	49.3
812.5				17.5	0.175	0.019	19	475	45.4



Şekil 3.10 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda okzalik asid için %aktivite-[I] grafiği



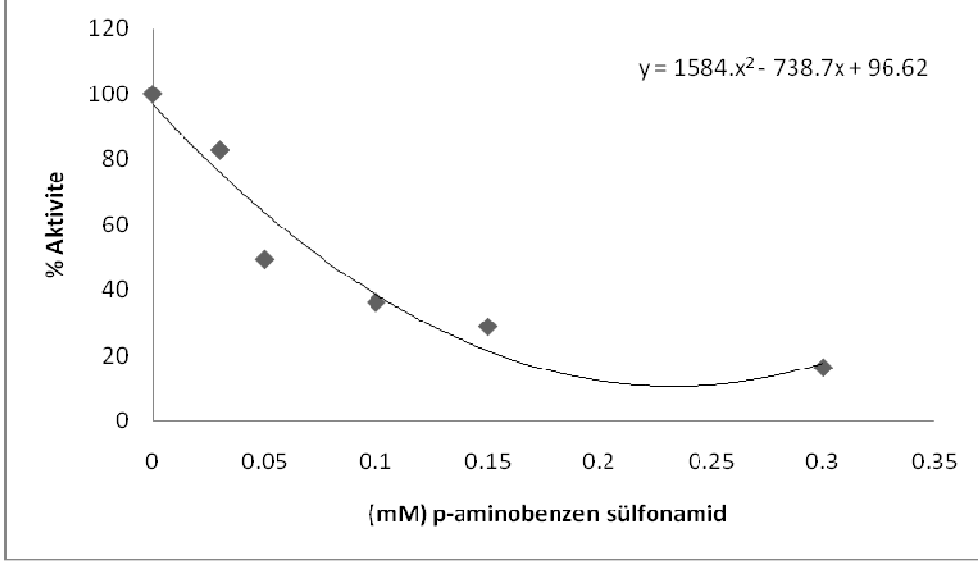
Şekil 3.11 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda siyrincis asid için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.11 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid'in sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

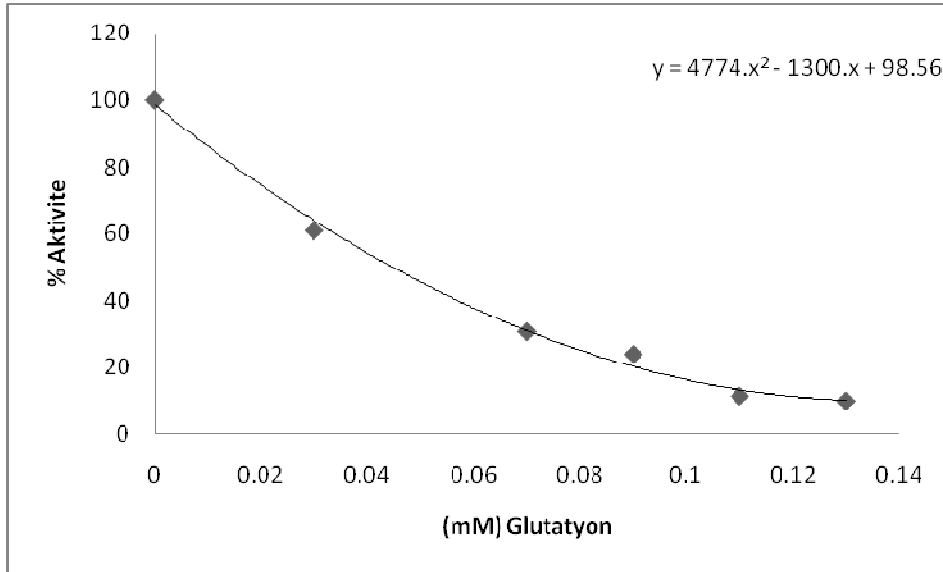
0.2 M Na-fosfat tamponu (μL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat Çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	p-aminobenzen sülfanamid	40	30	-	-	0.520	520	13000	100
827				3	0.03	0.311	311	3275	59.81
825				5	0.05	0.252	252	6305	48.7
820				10	0.1	0.213	213	5325	40.96
815				15	0.15	0.189	189	4725	36.34
810				20	0.2	0.175	175	4375	33.65
805				25	0.25	0.085	85	2125	16.34
800				30	0.3	0.067	67	1675	12.9

Çizelge 3.12 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un sabit 10 mM katekol substratıyla, I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	Glutatyon	40	130	-	-	0.226	226	5650	100
827				3	0.03	0.161	161	4025	71.23
825				5	0.05	0.158	158	4200	74.33
820				1	0.1	0.156	156	3900	69.02
815				15	0.15	0.155	155	3875	30.77
810				2	0.2	0.130	130	3250	23.96
805				25	0.25	0.049	49	1225	11.46
800				3	0.3	0.019	19	475	9.96



3.12 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p- aminbenzen sulfonamid için %aktivite-[I] grafiği



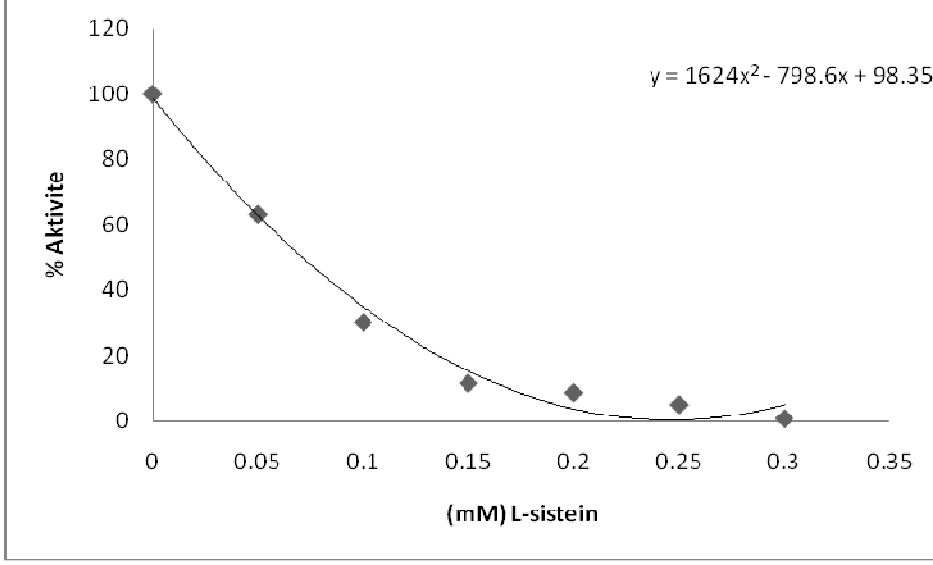
Şekil 3.13 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutasyon için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.13 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein' in, sabit 10 mM katekol substratıyla I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

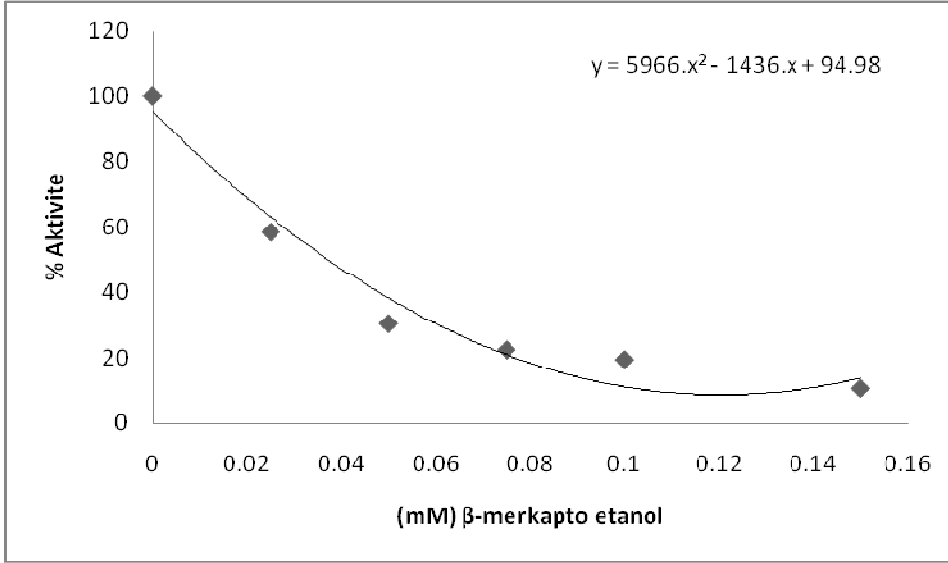
0.2 M Na-fosfat tampon (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	L-sistein	40	130	-	-	0.156	156	3900	100
825				5	0.05	0.149	149	3275	63.3
822.5				10	0.1	0.141	141	3225	30.21
820				15	0.15	0.139	139	3475	11.51
817.5				20	0.2	0.138	138	3450	8.63
815				25	0.25	0.117	117	2925	5.03
812.5				30	0.3	0.080	80	2000	0.72

Çizelge 3.14 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkaptto etanol'ün, sabit 10 mM katekol substratıyla I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tampon (μL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat Çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	β -merkaptto etanol	40	130	-	-	0.226	226	5650	100
827.5				2.5	0.025	0.132	132	3305	58.5
825				5	0.05	0.068	68	1723	30.5
822.5				7.5	0.075	0.051	51	1271	22.5
820				10	0.1	0.043	43	1099	19.45
815				15	0.15	0.024	24	600	10.62



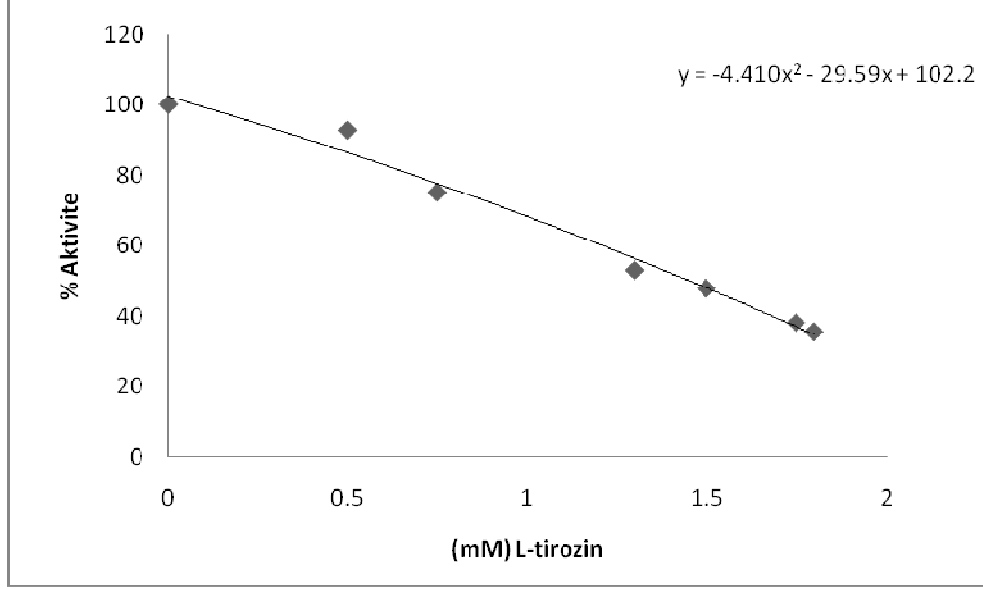
Şekil 3.14 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için %aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.15 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β-merkaptó etanol için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.15 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, sabit 10 mM katekol substratıyla I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tampon (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	L-tirozin	40	130	-	-	0.226	226	5650	100
825				5	0.05	0.209	209	5238	92.71
817.5				7.5	0.75	0.169	169	4238	75
817				13	0.13	0.120	120	2989	52.91
815				15	0.15	0.108	108	2697	47.73
812.5				17.5	0.175	0.086	86	2149	38.03
813				17	0.18	0.080	80	2000	35.4



Şekil 3.16 LsPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-tirozin için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.16 LsPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

İnhibitör	I₅₀(mM)
β-merkapt etanol	0.204
Okzalik asid	0.18
L-sistein	0.42
L-tirozin	1.45
Glutasyon	0.23
Siyrincis asid	0.231
p- aminobenzen sulfanamid	0.39

3.2.8 LsPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, optimum şartlarda, katekol substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi (Çizelge 3.17–3.23). $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.17–3.23). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi (Çizelge 3.24). K_i değerleri bölüm 2.2.8.5’de anlatıldığı gibi bulundu.

Çizelge 3.17 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asit' in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.118	2959	3.38	0.91
860		100	-		1	-	0.128	3200	3.125	1
850		110	-		0.91	-	0.144	3597	2.78	1.1
840		120	-		0.83	-	0.156	3906	2.56	1.2
830		130	-		0.77	-	0.170	4255	2.35	1.3
865		90	5		1.1	0.01	0.078	1953	5.12	0.91
855		100	5		1	0.01	0.088	2202	4.54	1
845		110	5		0.91	0.01	0.089	2217	4.51	1.1

Çizelge 3.17'nin devamı

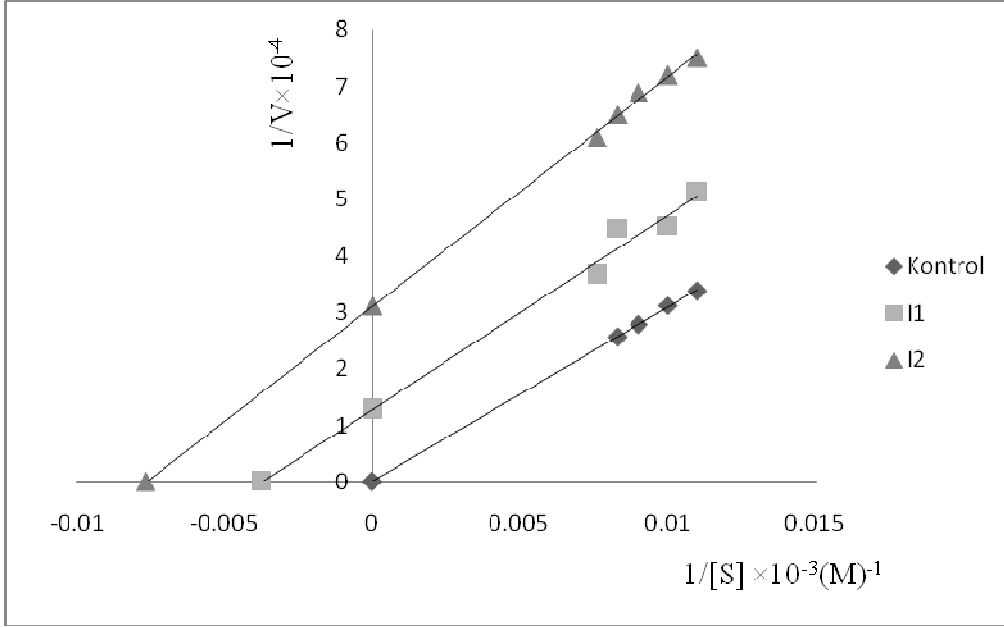
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.01	0.090	2227	4.49	1.2
825		130	5		0.77	0.01	0.108	2724	3.67	1.3
865		90	5		1.1	0.87	0.053	1333	7.5	0.91
855		100	5		1	0.87	0.056	1389	7.2	1
845		110	5		0.91	0.87	0.057	1449	6.9	1.1
835		120	5		0.83	0.87	0.061	1538	6.5	1.2
825		130	5		0.77	0.87	0.066	1639	6.1	1.3

Çizelge 3.18 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siyircis asit' in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

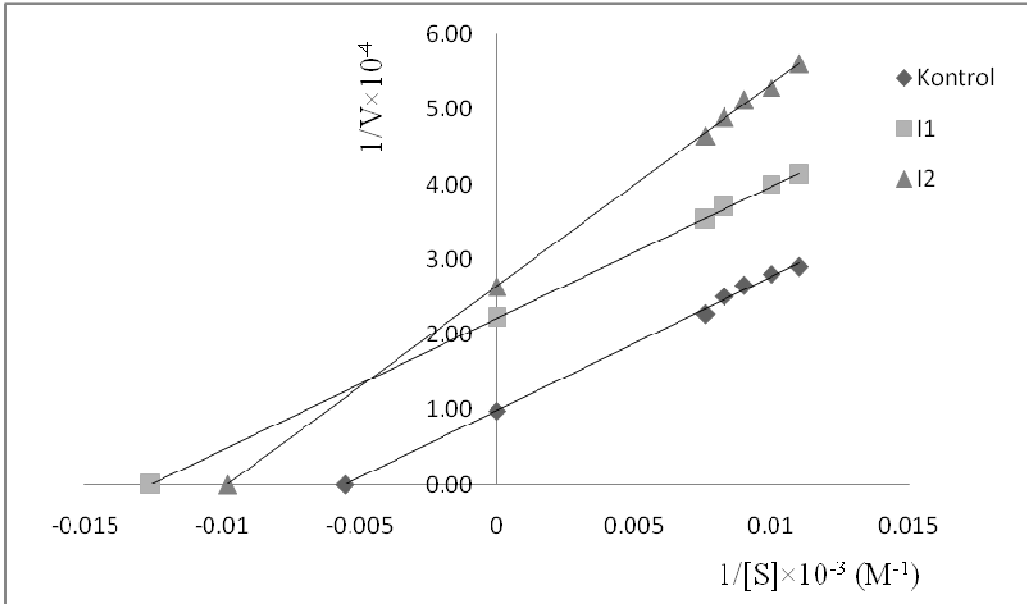
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.137	3448	2.90	0.91
860		100	-		1	-	0.142	3571	2.8	1
850		110	-		0.91	-	0.150	3774	2.65	1.1
840		120	-		0.83	-	0.159	3983	2.51	1.2
830		130	-		0.77	-	0.176	4405	2.27	1.3
865		90	5		1.1	0.01	0.097	2421	4.13	0.91
855		100	5		1	0.01	0.1	2500	4	1
845		110	5		0.91	0.01	0.105	2631	3.8	1.1

Çizelge 3.18' in devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.01	0.108	2707	3.7	1.2
825		130	5		0.77	0.01	0.113	2833	3.53	1.3
865		90	5		1.1	0.87	0.071	1785	5.6	0.91
855		100	5		1	0.87	0.075	1887	5.3	1
845		110	5		0.91	0.87	0.078	1953	5.12	1.1
835		120	5		0.83	0.87	0.082	2045	4.89	1.2
825		130	5		0.77	0.87	0.086	2150	4.65	1.3



Şekil 3.17 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine okzalik asit' in inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2]=87 \times 10^{-5} M$



Şekil 3.18 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine siyrcis asit' in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2]= 10.0 \times 10^{-5} M$

Çizelge 3.19 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.100	2500	4	0.91
860		100	-		1	-	0.105	2632	3.8	1
850		110	-		0.91	-	0.118	2951	3.4	1.1
840		120	-		0.83	-	0.129	3226	3.1	1.2
830		130	-		0.77	-	0.137	3448	2.9	1.3
865		90	5		1.1	0.01	0.049	1219	8.2	0.91
855		100	5		1	0.01	0.051	1265	7.9	1
845		110	5		0.91	0.01	0.52	1316	7.6	1.1

Çizelge 3.19'un devamı

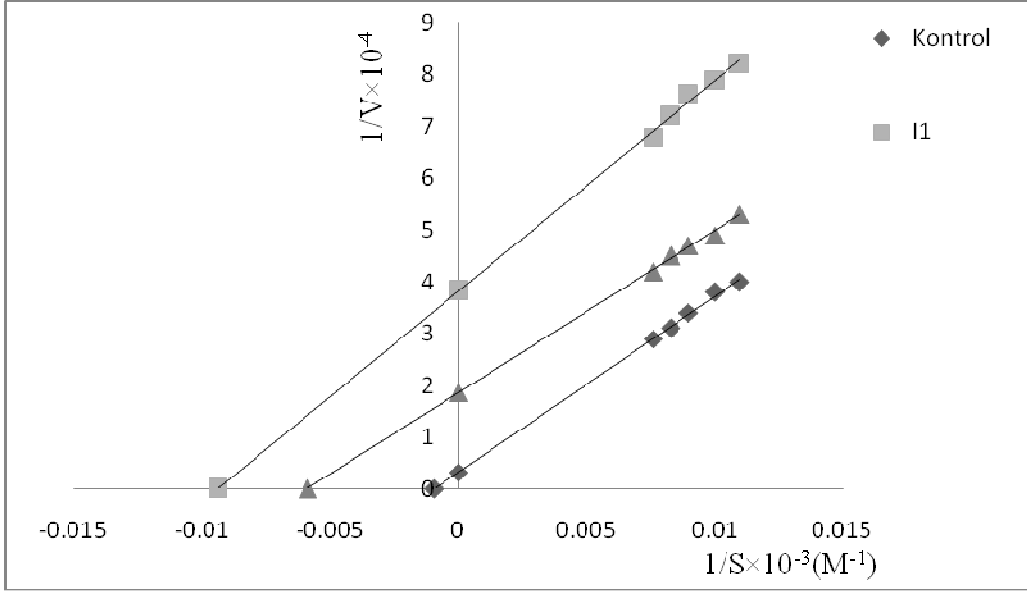
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.01	0.056	1389	7.2	1.2
825		130	5		0.77	0.01	0.059	1471	6.8	1.3
865		90	5		1.1	0.87	0.075	1887	5.3	0.91
855		100	5		1	0.87	0.081	2040	4.9	1
845		110	5		0.91	0.87	0.085	2128	4.7	1.1
835		120	5		0.83	0.87	0.089	2222	4.5	1.2
825		130	5		0.77	0.87	0.095	2381	4.2	1.3

Çizelge 3.20 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

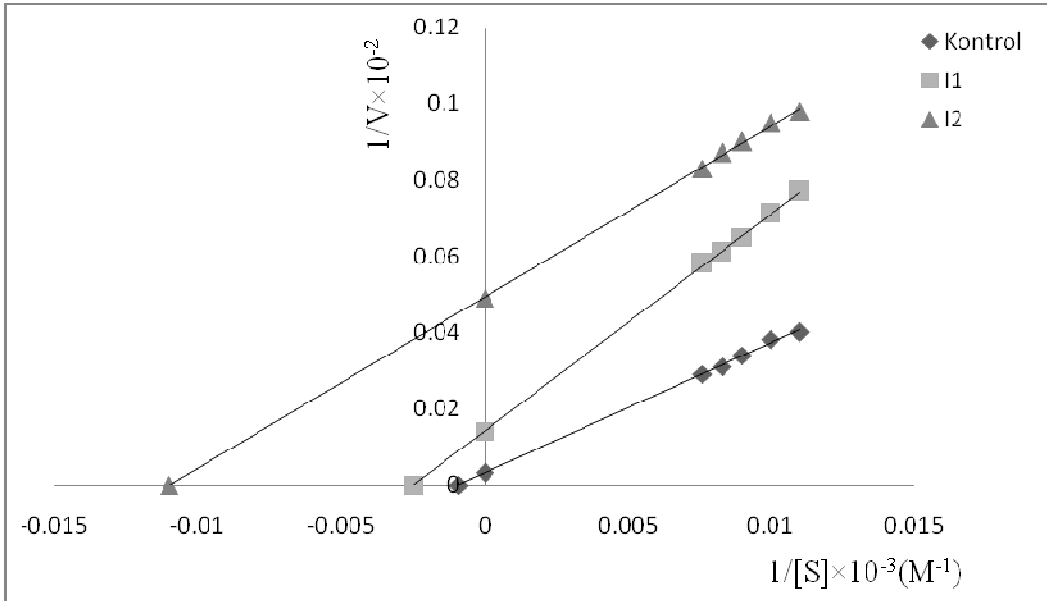
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.100	2500	0.04	0.91
860		100	-		1	-	0.105	2632	0.038	1
850		110	-		0.91	-	0.118	2951	0.034	1.1
840		120	-		0.83	-	0.129	3226	0.031	1.2
830		130	-		0.77	-	0.137	3448	0.029	1.3
865		90	5		1.1	0.03	0.052	1299	0.077	0.91
855		100	5		1	0.03	0.056	1408	0.071	1
845		110	5		0.91	0.03	0.061	1538	0.065	1.1

Çizelge 3.20'nin devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻²	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.03	0.066	1639	0.061	1.2
825		130	5		0.77	0.03	0.069	1724	0.058	1.3
865		90	5		1.1	0.12	0.077	1923	5.2	0.91
855		100	5		1	0.12	0.082	2040	4.9	1
845		110	5		0.91	0.12	0.087	2173	4.6	1.1
835		120	5		0.83	0.12	0.091	2272	4.4	1.2
825		130	5		0.77	0.12	0.096	2439	4.1	1.3



Şekil 3.19 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzen sülfanamid'in hibisyon etkisi.
 $[I_1] = 3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2] = 15.0 \times 10^{-5} \text{ M}$



Şekil 3.20 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi. $[I_1] = 3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$,
 $[I_2] = 15.0 \times 10^{-5} \text{ M}$

Çizelge 3.21 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.080	2000	5	0.91
860		100	-		1	-	0.087	2174	4.6	1
850		110	-		0.91	-	0.093	2326	4.3	1.1
840		120	-		0.83	-	0.100	2506	3.99	1.2
830		130	-		0.77	-	0.114	2857	3.5	1.3
865		90	5		1.1	0.05	0.049	1225	8.16	0.91
855		100	5		1	0.05	0.053	1326	7.54	1
845		110	5		0.91	0.05	0.058	1449	6.9	1.1

Çizelge 3.21'in devamı

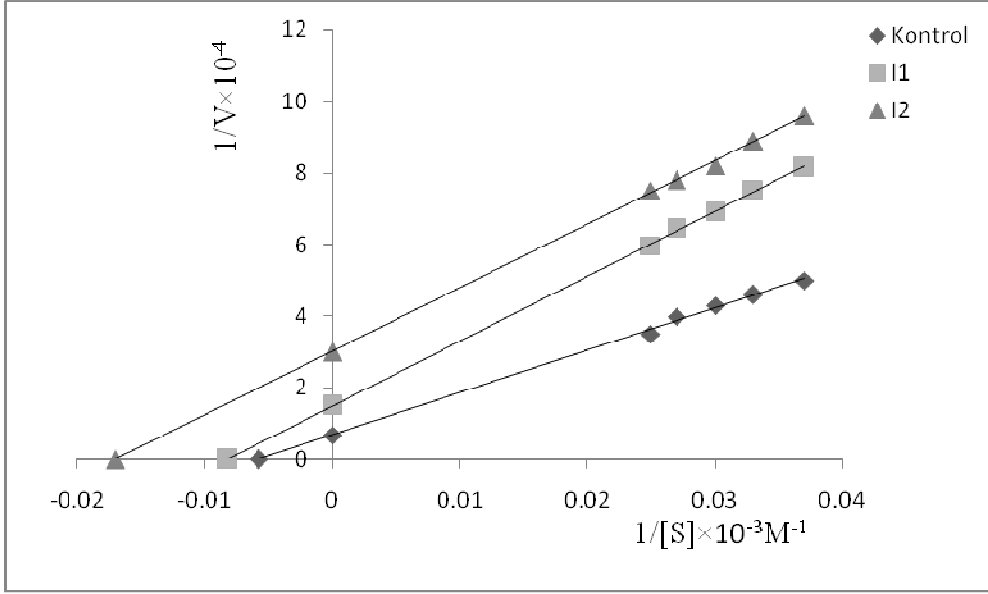
0.2M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10⁻²	1/[S]
835		120	5		0.83	0.05	0.062	1550	6.45	1.2
825		130	5		0.77	0.05	0.067	1675	5.97	1.3
865		90	5		1.1	0.25	0.042	1042	9.6	0.91
855		100	5		1	0.25	0.045	1124	8.9	1
845		110	5		0.91	0.25	0.049	1219	8.2	1.1
835		120	5		0.83	0.25	0.051	1282	7.8	1.2
825		130	5		0.77	0.25	0.053	1333	7.5	1.3

Çizelge 3.22 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkpto etanol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

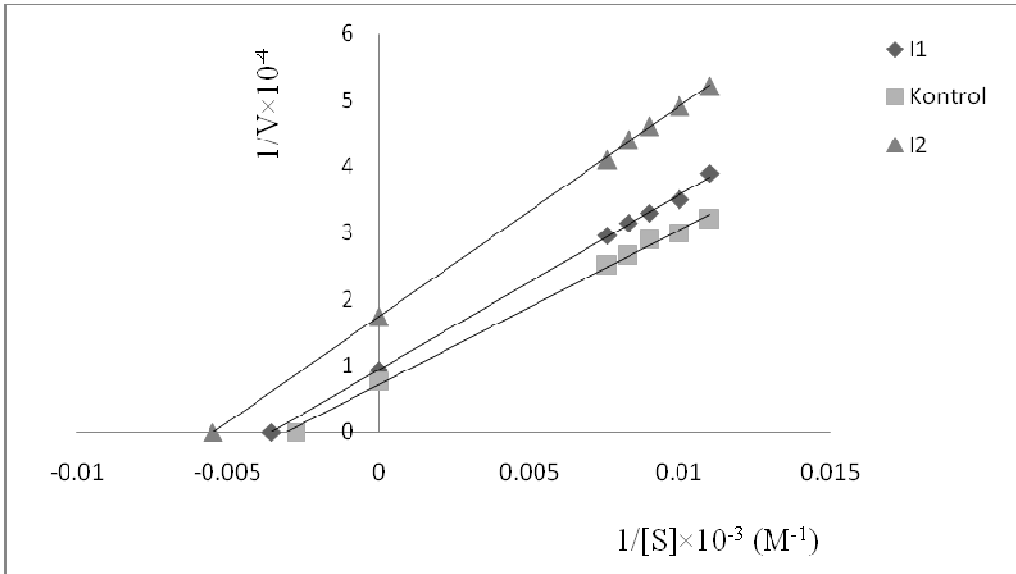
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.103	2564	3.9	0.91
860		100	-		1	-	0.114	2857	3.5	1
850		110	-		0.91	-	0.121	3030	3.3	1.1
840		120	-		0.83	-	0.127	3174	3.15	1.2
830		130	-		0.77	-	0.135	3378	2.96	1.3
865		90	5		1.1	0.03	0.125	3125	3.2	0.91
855		100	5		1	0.03	0.133	3333	3	1
845		110	5		0.91	0.03	0.138	3460	2.89	1.1

Çizelge 3.22'nin devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözültüsü hacmi (µL)	Substrat çözültüsü hacmi (µL)	İnhibitör çözültüsü hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻²	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.03	0.151	3773	2.65	1.2
825		130	5		0.77	0.03	0.160	4000	2.5	1.3
865		90	5		1.1	0.10	0.077	1923	5.2	0.91
855		100	5		1	0.10	0.082	2041	4.9	1
845		110	5		0.91	0.10	0.087	2174	4.6	1.1
835		120	5		0.83	0.10	0.091	2272	4.4	1.2
825		130	5		0.77	0.10	0.098	2439	4.1	1.3



Şekil 3.21 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi.
 $[I_1] = 5.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2] = 25.0 \times 10^{-5} M$



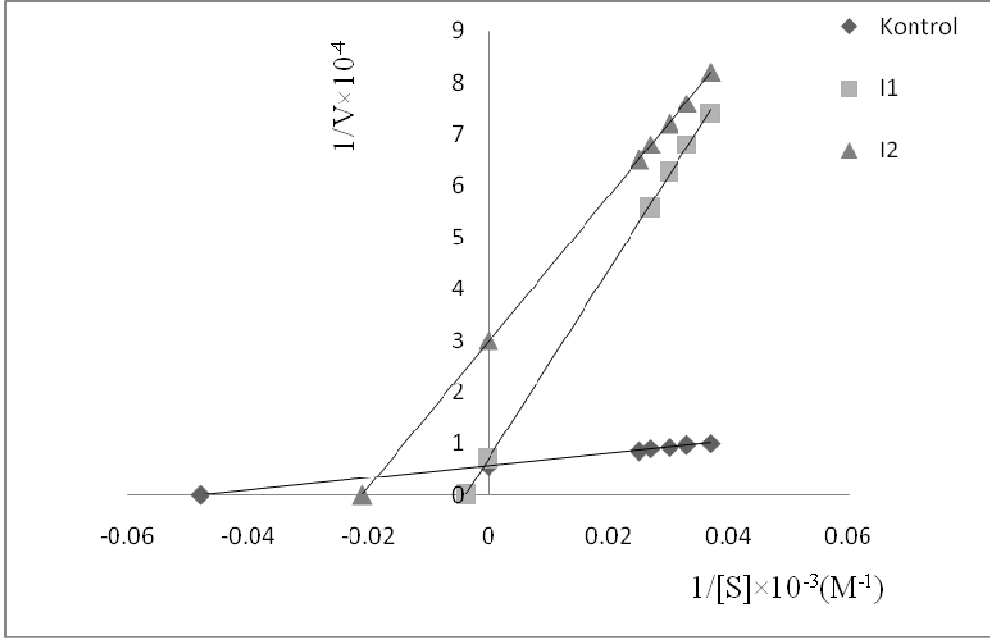
Şekil 3.22 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkпто etanol'ün inhibisyon etkisi.
 $[I_1] = 3.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2] = 10.0 \times 10^{-5} M$

Çizelge 3.23 LsPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.400	10000	1	0.91
860		100	-		1	-	0.412	10417	0.96	1
850		110	-		0.91	-	0.430	10753	0.93	1.1
840		120	-		0.83	-	0.444	11111	0.9	1.2
830		130	-		0.77	-	0.471	11764	0.85	1.3
865		90	5		1.1	0.05	0.054	1351	7.4	0.91
855		100	5		1	0.05	0.059	1471	6.8	1
845		110	5		0.91	0.05	0.064	1600	6.25	1.1

Çizelge 3.23'ün devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.05	0.072	1799	5.56	1.2
825		130	5		0.77	0.05	0.075	1873	5.34	1.3
865		90	5		1.1	0.175	0.049	1219	8.2	0.91
855		100	5		1	0.175	0.052	1316	7.6	1
845		110	5		0.91	0.175	0.056	1389	7.2	1.1
835		120	5		0.83	0.175	0.059	1471	6.8	1.2
825		130	5		0.77	0.175	0.061	1538	6.5	1.3



Şekil 3.23 LsPPO enzimi aktivitesi üzerine L-tirozin'in inhibisyon etkisi. $[I_1] = 5.0 \times 10^{-5} M$,
 $[I_2] = 17.5 \times 10^{-5} M$

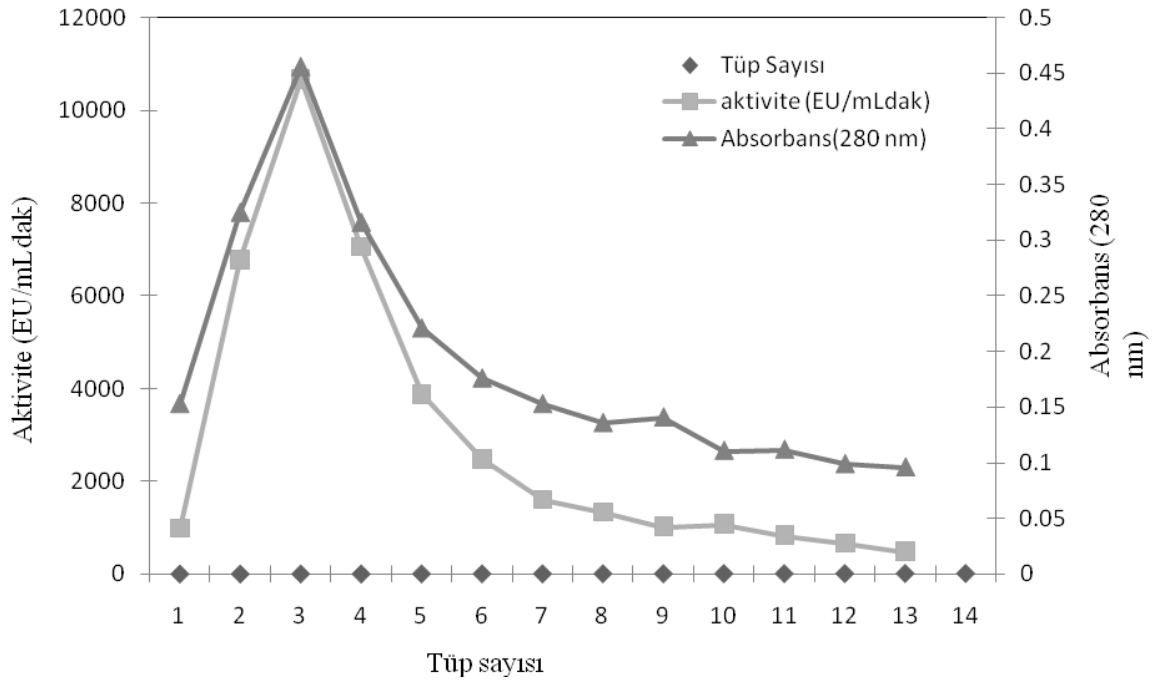
Çizelge 3.24 LsPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri.

İnhibitör	I [M]	K_i [M]	Ortalama K_i değerleri	İnhibisyon Türü
β -merkaptan etanol	3×10^{-5} 1×10^{-4}	0.176 0.120	0.148	unkompetitif
Okzalik asid	1×10^{-5} 8.7×10^{-4}	1.34×10^{-4} 5.57×10^{-3}	2.9×10^{-3}	unkompetitif
Syringic asid	5×10^{-5} 20×10^{-5}	0.04 0.26	0.15	unkompetitif
L-tirozin	5×10^{-5} 17.5×10^{-5}	0.05 0.31	0.18	kompetitif
p-amino benzen sulfon amid	0.03×10^{-5} 15×10^{-5}	5.72 0.17	2.45	unkompetitif
L-sistein	3×10^{-5} 25×10^{-5}	0.073 0.13	0.53	unkompetitif
Glutasyon	3×10^{-5} 15×10^{-5}	0.030 0.030	0.030	unkompetitif

3.3 *Agaricus bisporus* PPO Enzimi (AbPPO) ile ilgili Çalışmaların Sonuçları

3.3.1 AbPPO Enziminin Afinite Kromatografiyle saflaştırılması

Bölüm 2.2.4' de yapılan işlemlerin aynısı AbPPO enzimi üzerine uygulandı ve bulunan sonuçlar Şekil 3.24 ve Çizelge 3.25' de verildi.



Şekil 3.24 Na₂HPO₄ Tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan AbPPO'nun absorbans-aktivite grafiği

Çizelge 3.25 AbPPO enziminin saflaştırma tablosu

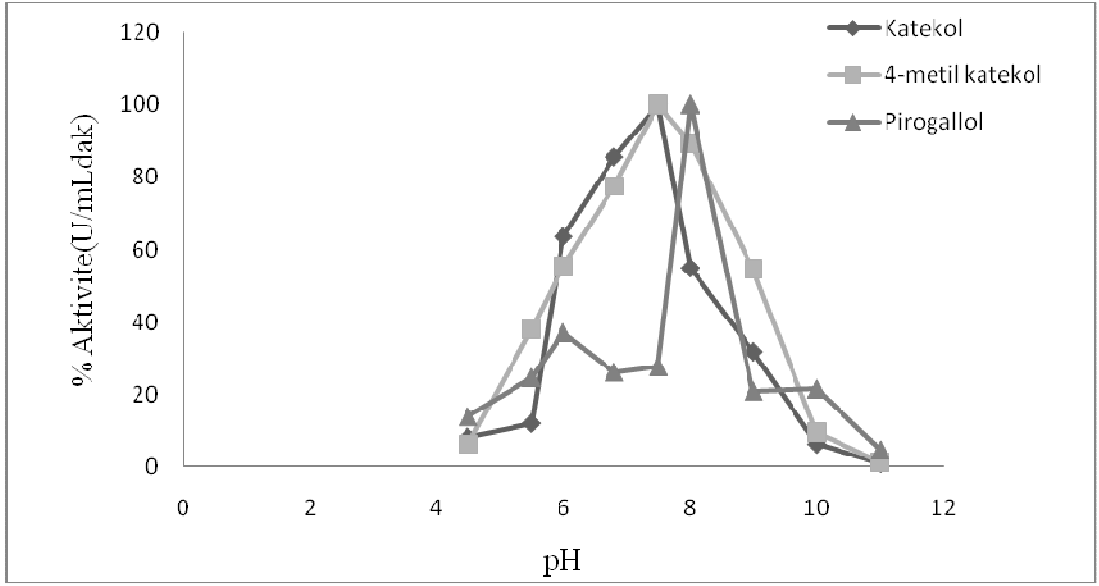
Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg prot)	Verim (%)	Saflaştırma derecesi
Ekstrakt	85	16950	1440750	38.33	3258	442.2	100	—
Amonyum sülfat çöktürmesi	8585	14400	1224000	16.9	1436.5	825.1	85	1.927
diyaliz	38	17750	674500	15.8	600	1123.4	55.1	1.36
Afinite kromatografisi	25	21400	556400	26	650	856	39	1.93

3.3.2 AbPPO Enziminin Farklı substratlar için Optimum pH tayini

AbPPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.5, 5.5, 6, 6.8, 7.5, 8, 9, 10, 11) farklı substratlar (katekol, 4-metil katekol, pirogallol) kullanılarak reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.8.1’ de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.26 ve şekil 3.25 ‘ de verildi.

Çizelge 26 AbPPO enzimi için , üç ayrı substrat için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

pH	Katekol				4-metil katekol				Pirogallol			
	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.046	46	1150	8.2	0.037	37	925	6.4	0.009	9	225	13.8
5.5	0.067	67	1675	12	0.218	218	5450	38.24	0.016	16	400	24.6
6	0.355	35 5	8875	63.5	0.316	316	7900	55.4	0.024	24	600	37
6.8	0.478	47 8	11950	85.5	0.442	442	11050	77.5	0.017	17	425	26.1
7.5	0.559	55 9	13975	100	0.570	570	14250	100	0.018	18	450	27.7
8	0.307	30 7	7675	54.9	0.509	509	12725	89.3	0.065	65	1625	100
9	0.178	17 8	4450	31.8	0.312	312	7800	54.7	0.055	55	1375	2085
10	0.035	35	875	6.3	0.056	56	1400	9.8	0.014	14	350	21.5
11	0.005	5	125	0.9	0.008	8	200	1.4	0.003	3	75	4.6



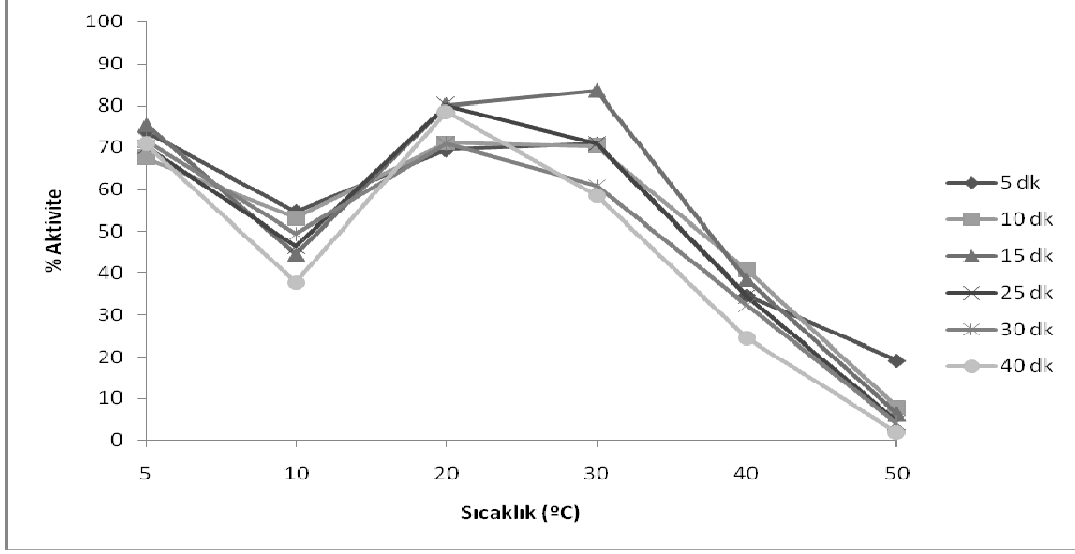
Şekil 3.25 AbPPO enziminin üç farklı substrat için pH-aktivite grafiği

3.3.3 AbPPO Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

AbPPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla; 5^o, 10^o, 20^o, 30^o, 40^o, 50^o ve 60^oC'lerde 5, 10, 15, 25, 30 ve 40 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler saptandı. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.27). Zamana karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 3.26).

Çizelge 3.27 AbPPO enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi çalışmasının sonuçları

Sıcaklık (°C)		Bekleme süresi (dak)					
		5	10	15	25	30	40
5	ΔOD	0.412	0.377	0.4222	0.392	0.400	0.395
	%Aktivite	73.7	67.44	75.49	70.12	71.6	70.66
10	ΔOD	0.305	0.297	0.249	0.259	0.276	0.211
	%Aktivite	54.6	53.13	44.54	46.3	49.4	37.7
20	ΔOD	0.388	0.398	0.448	0.448	0.396	0.439
	%Aktivite	69.4	71.1	80.1	80.1	70.81	78.5
30	ΔOD	0.446	0.393	0.467	0.396	0.340	0.327
	%Aktivite	79.8	70.3	83.54	70.84	60.8	58.5
40	ΔOD	0.194	0.228	0.215	0.193	0.181	0.137
	%Aktivite	34.7	40.8	38.5	34.5	32.4	24.5
50	ΔOD	0.107	0.044	0.036	0.025	0.023	0.010
	%Aktivite	19.1	7.8	6.4	4.5	4.11	1.78



Şekil 3.26 AbPPO enziminin inkübasyon süresine bağlı koruduğu aktivite değişimi

3.3.4 AbPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 28-30) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 27-29). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 31’de verildi.

Çizelge 3.28 AbPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri , U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

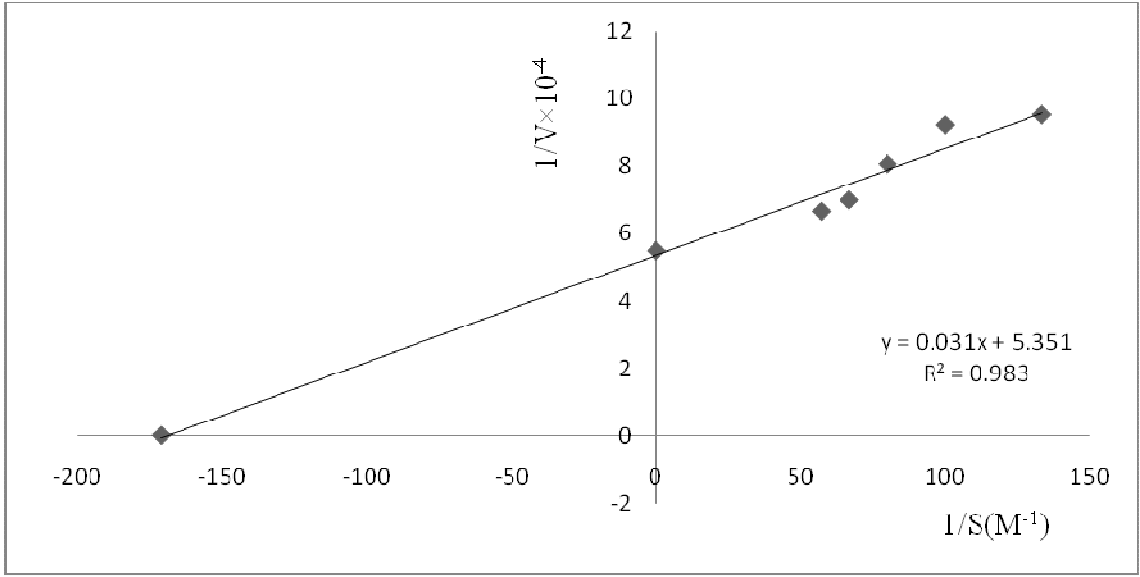
0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-5}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.420	420	10504	9.52	250
0.890		0.070		0.7	0.497	497	12422	9.22	142.9
0.830		0.130		13	0.567	567	14184	8.05	76.9
0.810		0.150		15	0.611	611	15267	6.98	66.7
0.760		0.200		15	0.656	656	16393	6.65	50

Çizelge 3.29 AbPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

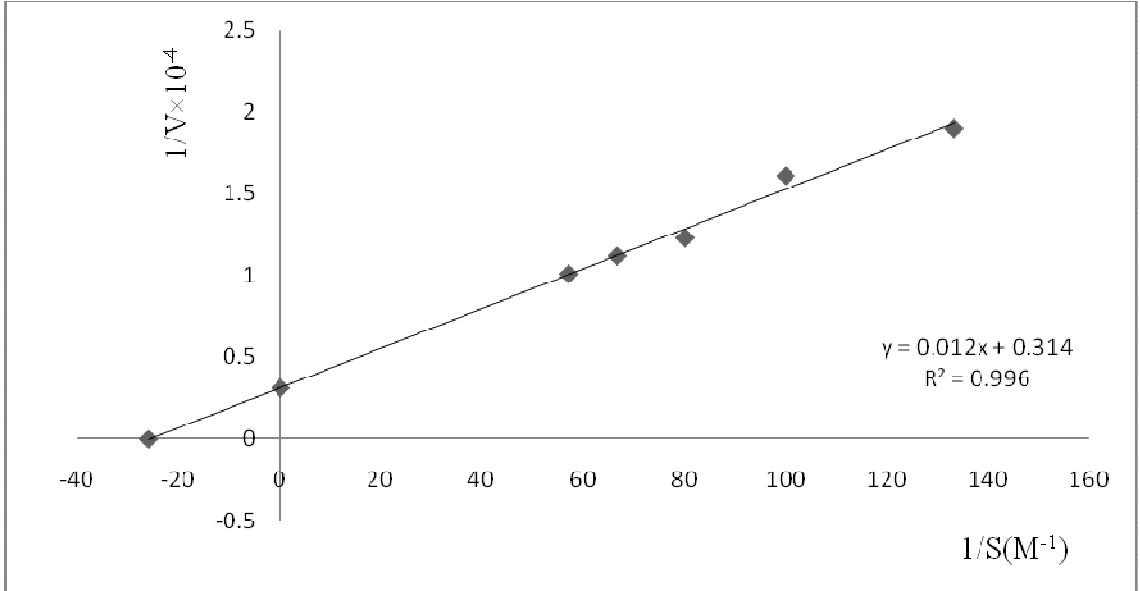
0.2 M Na-fosfat tampon (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.172	172	4292	2.33	250
0.890		0.070		0.7	0.221	221	5525	1.81	142.9
0.830		0.130		13	0.325	325	8130	1.23	76.9
0.810		0.150		15	0.357	357	8929	1.12	66.7
0.760		0.200		15	0.396	396	9901	1.01	50

Çizelge 3.30 AbPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değer

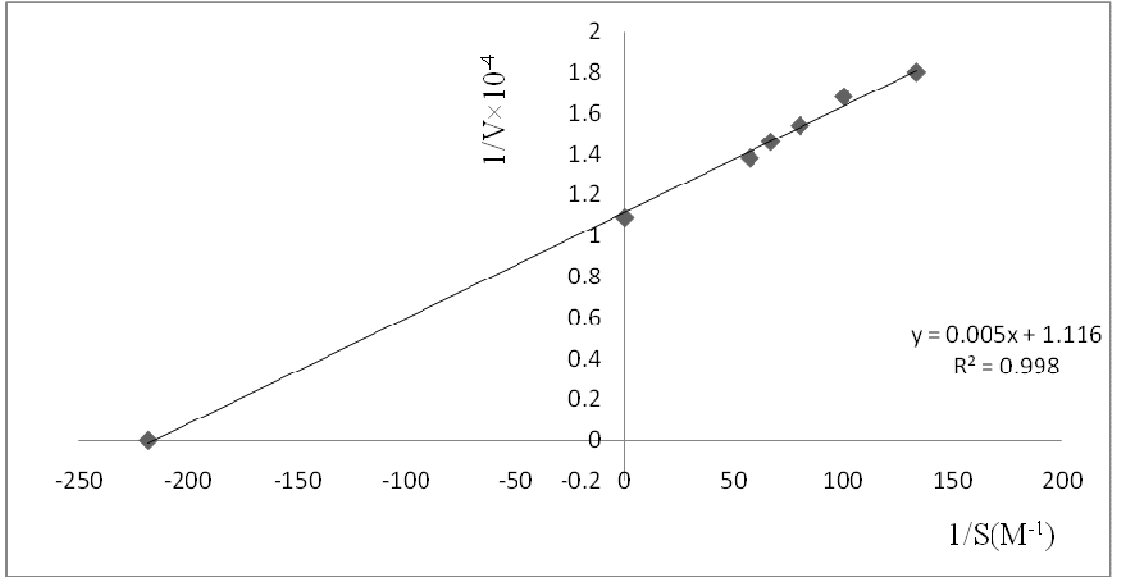
0.2 M Na-fosfat tampon (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. $[S] \times 10^{-3}$ (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
0.920	0.040	0.040	1	0.4	0.022	22	556	1.8	250
0.890		0.070		0.7	0.023	23	588	1.7	142.9
0.830		0.130		13	0.025	25	650	1.6	76.9
0.810		0.150		15	0.029	29	714	1.4	66.7
0.760		0.200		15	0.031	31	769	1.3	50



Şekil 3.27 AbPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.28 AbPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.29 AbPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.31 AbPPO enziminin üç farklı substrat için K_M ve V_{max} değerleri

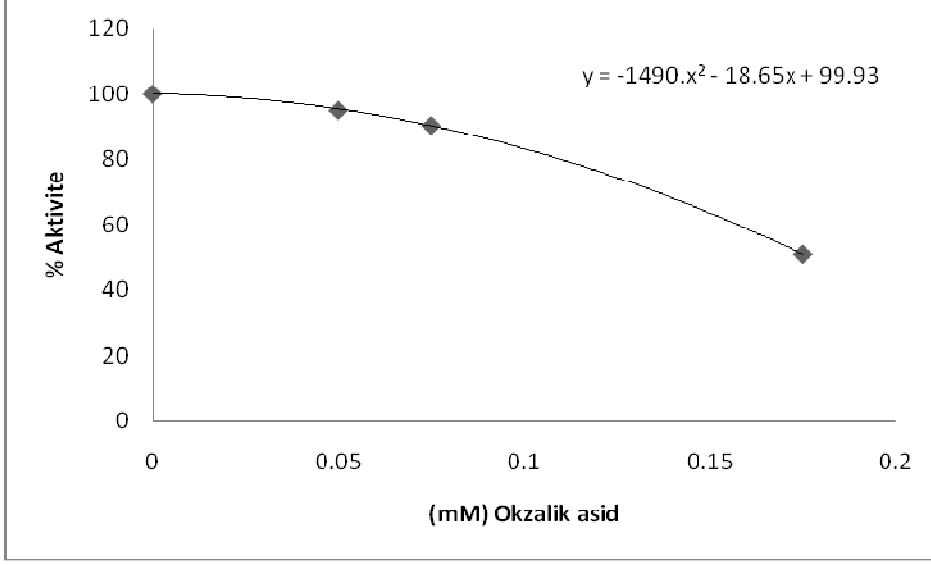
Substrat	$K_M(mM) \times 10^{-3}$	$V_{max}(U/mLdak)$	V_{max}/K_M
Katekol	5.611	4525	806451
4-metil katekol	38.2	79500	2081151
Pirogallol	4.48	22400	5000000

3.3.5 AbPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I₅₀ Değerlerinin Bulunması

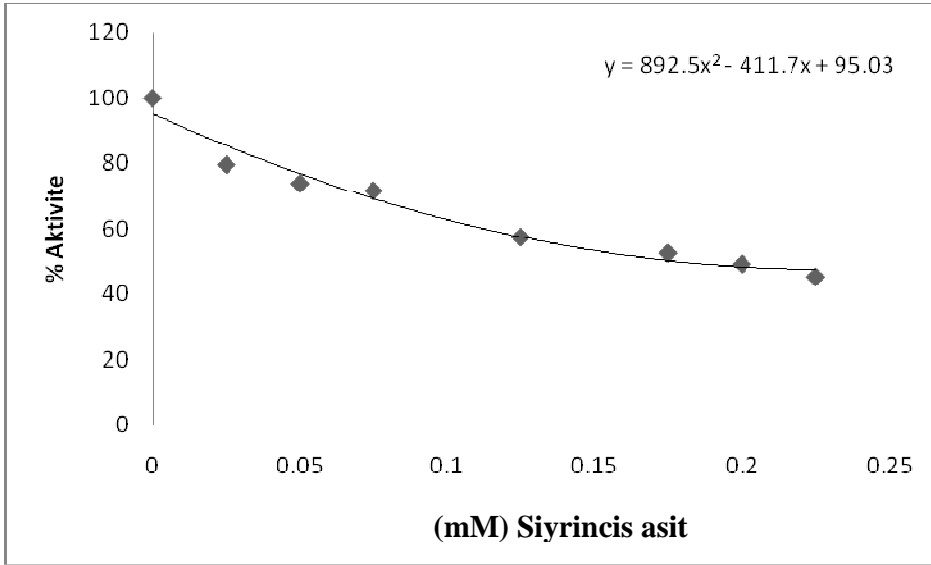
Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin I₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0,1 M katekol hazırlandı ve her ölçümde 0,130 mL alındı. İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 1 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,040 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 0,830 mL tampon + substrat + inhibitör çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı (Çizelge 3.32-3.36). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.30-3.36). (I= küvetteki 1 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I₅₀ değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.37'de verildi.

Çizelge 3.32 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asit ve siyrincis asit' in , sabit 10 mM katekol substratıyla, I₅₀değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	Okzalik asit	40	130	-	-	0.091	91	2275	100
825				5	0.05	0.082	82	1875	90
822.5				7.5	0.075	0.75	75	1875	72.4
820				10	0.10	0.054	54	1350	59.3
817.5				12.5	0.125	0.044	44	1100	48.3
815				15	0.150	0.036	36	900	39.56
812.5				17.5	0.175	0.026	26	659	29
810				20	0.200	0.017	17	416	18.3
830				Siyircis asit	40	130	-	-	0.487
827.5	2.5	0.025	0.477				477	11931	98
825	5	0.050	0.410				410	10259	84.27
822.5	7.5	0.075	0.379				379	9488	77.93
820	10	0.10	0.288				288	7208	59.2
817.5	12.5	0.125	0.227				227	5686	46.7
815	15	0.150	0.189				189	4748	39
812.5	17.5	0.175	0.161				161	4018	33



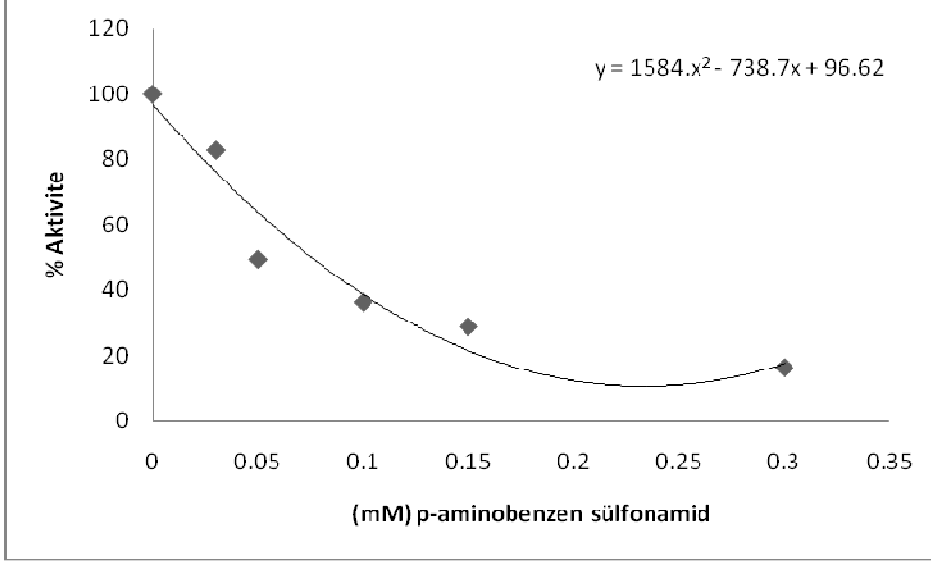
Şekil 3.30 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda okzalik asit için %aktivite-[I] grafiği



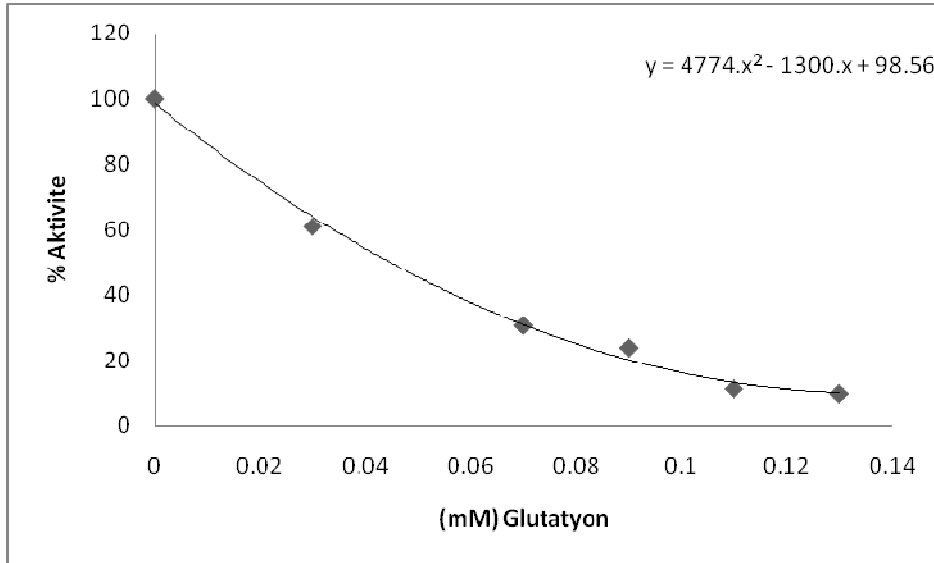
Şekil 3.31 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda siyrincis asid için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.33 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid ve glutatyon'un sabit 10 mM katekol substratıyla, I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	p-aminobenzen sülfanamid	40	30	-	-	0.252	252	6300	100
827				3	0.03	0.199	199	4964	78.8
825				5	0.05	0.111	111	2785	44.2
820				10	0.1	0.098	98	2457	39
815				15	0.15	0.073	73	1827	29
810				20	0.2	0.63	63	1588	25.2
805				25	0.25	0.040	40	1008	16
800				30	0.3	0.030	30	756	12
830				Glutatyon	40	130	-	-	0.252
827	3	0.03	0.222				222	5550	88
825	5	0.05	0.193				193	4824	76.5
820	1	0.1	0.168				168	4207	66.7
815	15	0.15	0.131				131	3279	52
810	2	0.2	0.101				101	2523	40
805	25	0.25	0.091				91	2270	36
800	3	0.3	0.071				71	1765	28



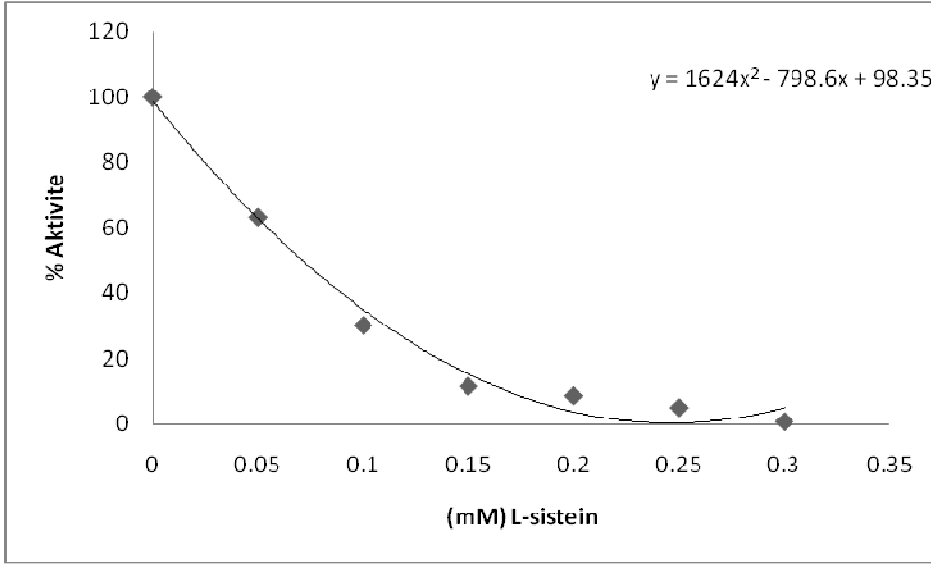
3.32 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p- aminbenzen sulfanamid için %aktivite-[I] grafiği



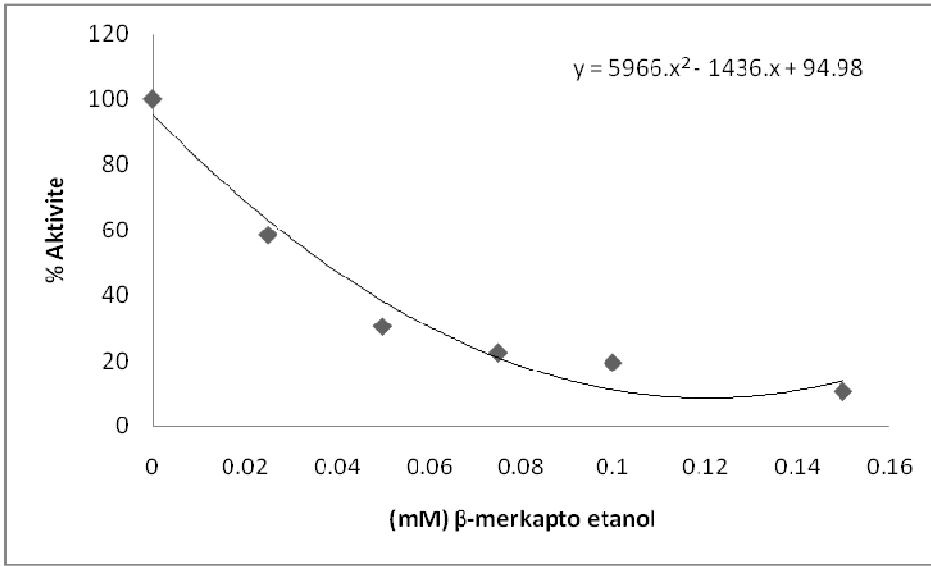
Şekil 3.33 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.34 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein, β -merkaptto etanol'ün, sabit 10 mM katekol substratıyla I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tampon (μ L)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat Çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitor çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	L-sistein	40	130	-	-	0.648	648	16200	100
825				5	0.05	0.513	513	12943	79.9
822.5				10	0.1	0.347	347	8672	53.53
820				15	0.15	0.336	336	8408	51.9
817.5				20	0.2	0.272	272	6823	42.12
815				25	0.25	0.213	213	5338	32.95
812.5				30	0.3	0.165	165	4128	25.48
830	β -merkaptto etanol	40	130	-	-	0.175	175	4375	100
827.5				2.5	0.025	0.131	131	3075	70.3
825				5	0.05	0.098	98	2450	56
822.5				7.5	0.075	0.098	98	1750	40
820				10	0.1	0.065	65	1625	37.1
815				15	0.15	0.015	15	375	8.57



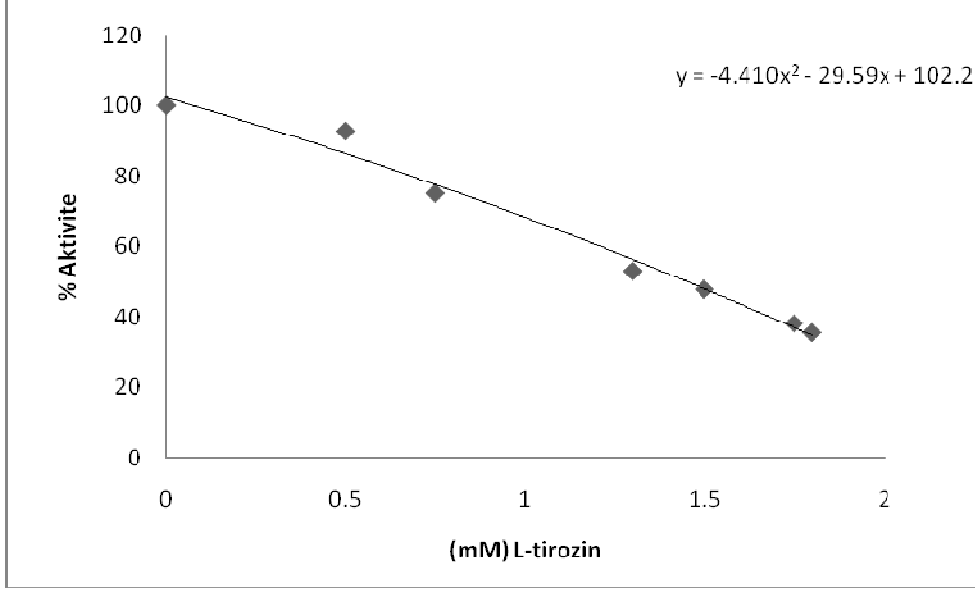
Şekil 3.34 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için %aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.35 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β-merkaptan etanol için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.35 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin'in, sabit 10 mM katekol substratıyla I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tampon (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat Çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitor çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
830	L-tirozin	40	130	-	-	0.226	226	5650	100
825				5	0.05	0.169	169	4232	74.9
817.5				7.5	0.75	0.136	136	3390	60
817				13	0.13	0.113	113	2825	50
815				15	0.15	0.094	94	2373	42
812.5				17.5	0.175	0.074	74	1865	33
813				17	0.18	0.066	66	1638	29



Şekil 3.36 AbPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-tirozin için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.36 AbPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

İnhibitör	I ₅₀ (mM)
β-merkapt etanol	6.09
Okzalik asit	11.997
L-sistein	10.34
L-tirozin	10.08
Glutasyon	1.03
Siyrincis asit	23.75
p- aminobenzen sulfanamid	4.40

3.4.8 AbPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, optimum şartlarda, katekol substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi (Çizelge 3.37 – 3.43). $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.37 –3.43). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi (Çizelge 3.44). K_i değerleri bölüm 2.2.8.5’da anlatıldığı gibi bulundu.

Çizelge 3.37 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren okzalik asit' in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.118	2959	3.38	0.91
860		100	-		1	-	0.128	3200	3.125	1
850		110	-		0.91	-	0.144	3597	2.78	1.1
840		120	-		0.83	-	0.156	3906	2.56	1.2
830		130	-		0.77	-	0.170	4255	2.35	1.3
865		90	5		1.1	0.05	0.078	1953	5.12	0.91
855		100	5		1	0.05	0.088	2202	4.54	1

Çizelge 3.37'nin devamı

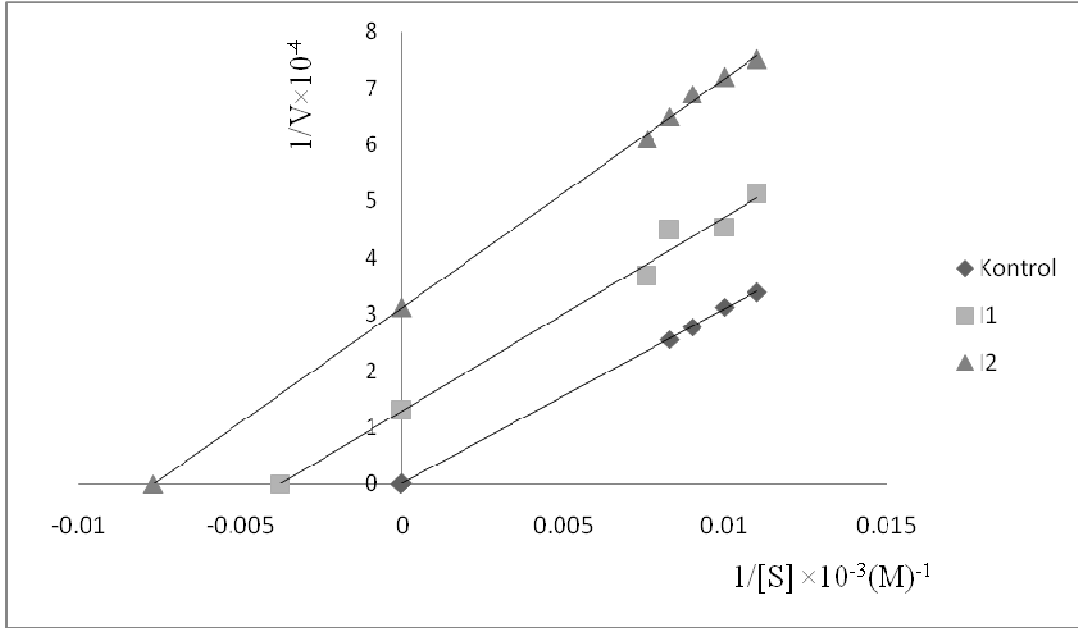
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
845	40	110	5	1	0.91	0.05	0.089	2217	4.51	1.1
835		120	5		0.83	0.05	0.090	2227	4.49	1.2
825		130	5		0.77	0.05	0.108	2724	3.67	1.3
865		90	5		1.1	0.15	0.053	1333	7.5	0.91
855		100	5		1	0.15	0.056	1389	7.2	1
845		110	5		0.91	0.15	0.057	1449	6.9	1.1
835		120	5		0.83	0.15	0.061	1538	6.5	1.2
825		130	5		0.77	0.15	0.066	1639	6.1	1.3

Çizelge 3.38 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siyircis asit' in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

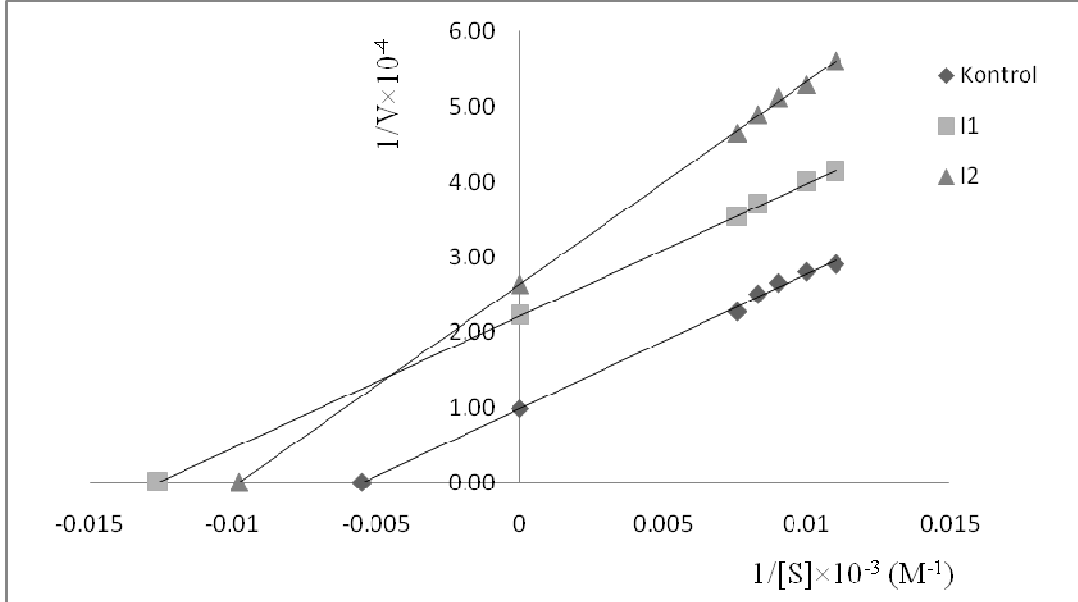
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-5}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.457	11425	8.75	0.91
860		100	-		1	-	0.482	12050	8.2	1
850		110	-		0.91	-	0.515	12875	7.7	1.1
840		120	-		0.83	-	0.588	14705	6.8	1.2
830		130	-		0.77	-	0.627	15675	6.5	1.3
865		90	5		1.1	0.10	0.345	8621	11.6	0.91
855		100	5		1	0.10	0.385	9615	10.4	1
845		110	5		0.91	0.10	0.402	10070	9.93	1.1

Çizelge 3.38'in devamı

0.2M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10⁻⁵	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.10	0.456	11415	8.76	1.2
825		130	5		0.77	0.10	0.500	12500	8	1.3
865		90	5		1.1	0.20	0.404	10101	9.9	0.91
855		100	5		1	0.20	0.421	10526	9.5	1
845		110	5		0.91	0.20	0.459	11494	8.7	1.1
835		120	5		0.83	0.20	0.512	12821	7.8	1.2
825		130	5		0.77	0.20	0.571	14286	7	1.3



Şekil 3.37 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine okzalik asit'in inhibisyon etkisi.
 $[I_1]=5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2]=15 \times 10^{-5} \text{ M}$



Şekil 3.38 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine siyrincis asit' in inhibisyon etkisi. $[I_1]=10.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[I_2]=20.0 \times 10^{-4}$

Çizelge 3.39 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-aminobenzen sülfanamid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.308	7692	1.3	0.91
860		100	-		1	-	0.347	8675	1.2	1
850		110	-		0.91	-	0.358	8950	1.1	1.1
840		120	-		0.83	-	0.385	9625	1.03	1.2
830		130	-		0.77	-	0.463	10417	0.96	1.3
865		90	5		1.1	0.05	0.231	5775	1.7	0.91
855		100	5		1	0.05	0.258	6450	1.6	1
845		110	5		0.91	0.05	0.279	6975	1.4	1.1

Çizelge 3.39'un devamı

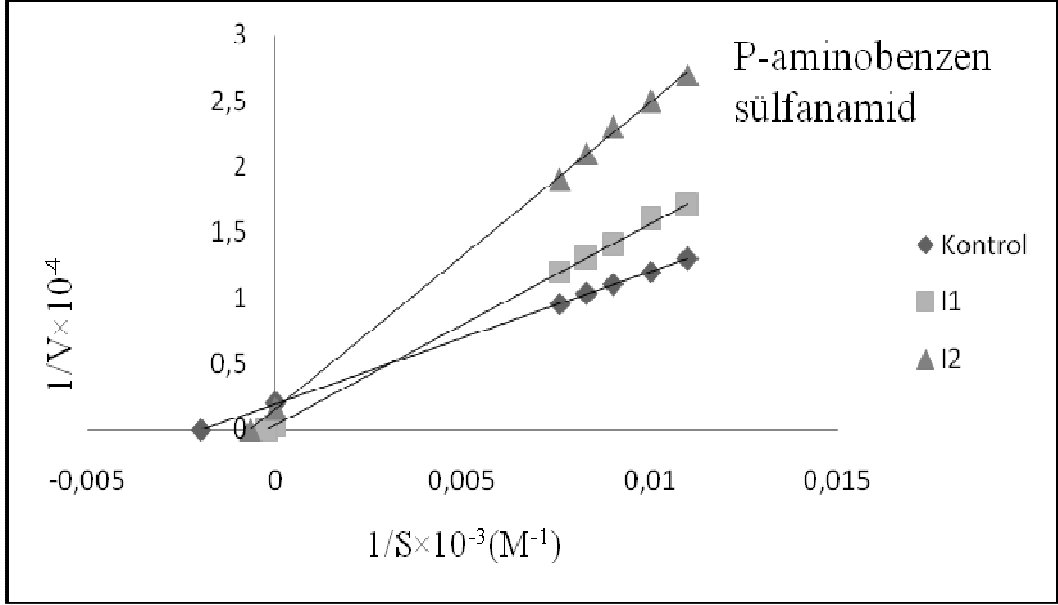
0.2M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.05	0.301	7525	1.3	1.2
825		130	5		0.77	0.05	0.321	8025	1.2	1.3
865		90	5		1.1	0.15	0.148	3704	2.7	0.91
855		100	5		1	0.15	0.162	4050	2.5	1
845		110	5		0.91	0.15	0.174	4347	2.3	1.1
835		120	5		0.83	0.15	0.190	4762	2.1	1.2
825		130	5		0.77	0.15	0.210	5263	1.9	1.3

Çizelge 3.40 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

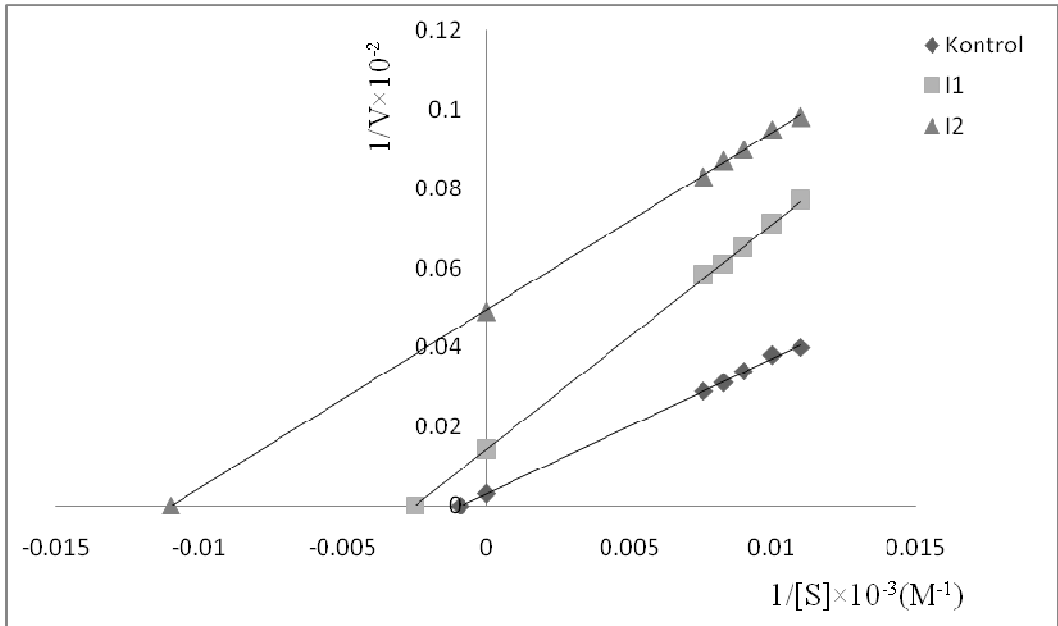
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.205	5128	1.95	0.91
860		100	-		1	-	0.215	5376	1.86	1
850		110	-		0.91	-	0.231	5780	1.73	1.1
840		120	-		0.83	-	0.242	6061	1.65	1.2
830		130	-		0.77	-	0.250	6250	1.6	1.3
865		90	5		1.1	0.03	0.129	3226	3.1	0.91
855		100	5		1	0.03	0.135	3378	2.96	1
845		110	5		0.91	0.03	0.140	3509	2.85	1.1

Çizelge 3.40' in devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻²	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.03	0.144	3597	2.78	1.2
825		130	5		0.77	0.03	0.151	3774	2.65	1.3
865		90	5		1.1	0.15	0.156	3906	2.56	0.91
855		100	5		1	0.15	0.167	4167	2.4	1
845		110	5		0.91	0.15	0.167	4167	2.3	1.1
835		120	5		0.83	0.15	0.182	4545	2.2	1.2
825		130	5		0.77	0.15	0.190	4762	2.1	1.3



Şekil 3.39 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzen sulfanamid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]= 5.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2]= 20.0 \times 10^{-4} M$



Şekil 3.40 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi. $[I_1]= 3.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2]= 15.0 \times 10^{-5} M$

Çizelge 3.41 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.146	3649	2.74	0.91
860		100	-		1	-	0.155	3876	2.58	1
850		110	-		0.91	-	0.162	4049	2.47	1.1
840		120	-		0.83	-	0.168	4202	2.38	1.2
830		130	-		0.77	-	0.190	4762	2.1	1.3
865		90	5		1.1	0.05	0.156	3906	2.56	0.91
855		100	5		1	0.05	0.168	4202	2.38	1
845		110	5		0.91	0.05	0.174	4348	2.3	1.1

Çizelge 3.41' in devamı

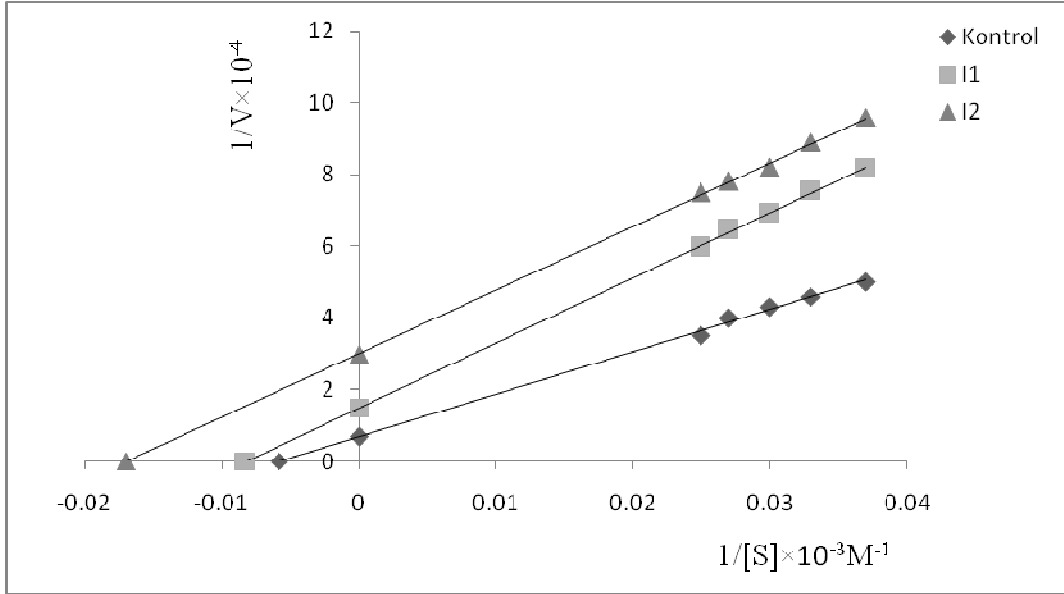
0.2M Na₂HPO₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10⁻²	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.05	0.182	4545	2.2	1.2
825		130	5		0.77	0.05	0.190	4762	2.1	1.3
865		90	5		1.1	0.175	0.200	5000	2	0.91
855		100	5		1	0.175	0.212	5291	1.89	1
845		110	5		0.91	0.175	0.227	5682	1.76	1.1
835		120	5		0.83	0.175	0.243	6098	1.64	1.2
825		130	5		0.77	0.175	0.267	6667	1.5	1.3

Çizelge 3.42 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkaptto etanol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

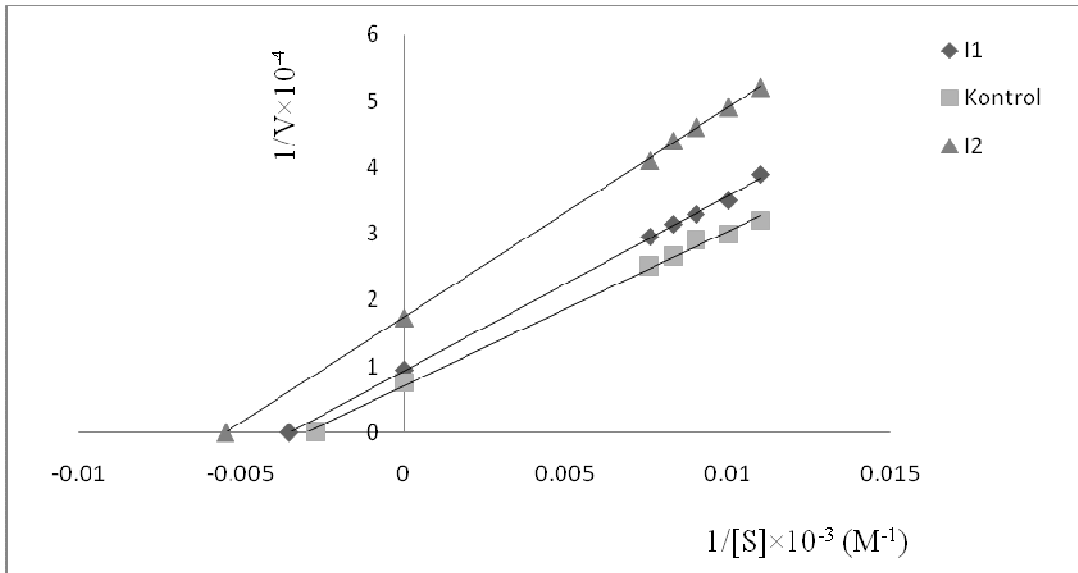
0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.193	4825	2.07	0.91
860		100	-		1	-	0.205	5125	1.95	1
850		110	-		0.91	-	0.217	5425	1.84	1.1
840		120	-		0.83	-	0.227	5675	1.76	1.2
830		130	-		0.77	-	0.241	6024	1.66	1.3
865		90	5		1.1	0.04	0.180	4504	2.22	0.91
855		100	5		1	0.04	0.191	4775	2.094	1
845		110	5		0.91	0.04	0.202	5050	1.98	1.1

Çizelge 3.42' nin devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.04	0.211	5275	1.9	1.2
825		130	5		0.77	0.04	0.217	5425	1.84	1.3
865		90	5		1.1	0.12	0.208	5103	1.91	0.91
855		100	5		1	0.12	0.222	5556	1.8	1
845		110	5		0.91	0.12	0.239	5988	1.67	1.1
835		120	5		0.83	0.12	0.254	6365	1.571	1.2
825		130	5		0.77	0.12	0.286	7143	1.4	1.3



Şekil 3.41 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi. $[I_1] = 5.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2] = 17.5 \times 10^{-4}$ M



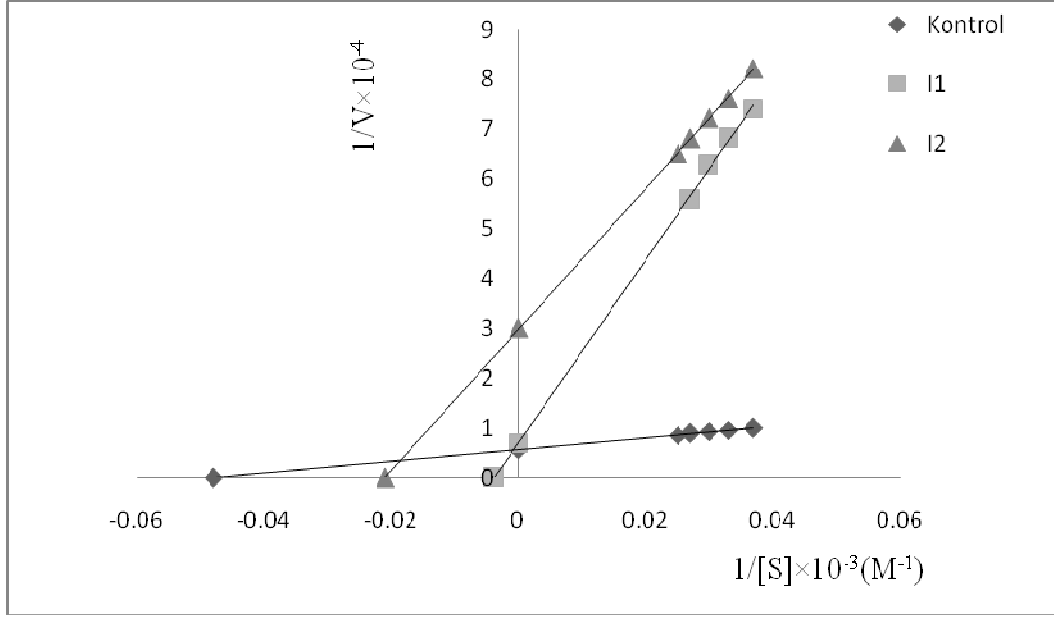
Şekil 3.42 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkпто etanol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1] = 4.0 \times 10^{-5}$ M, $[I_2] = 12.0 \times 10^{-4}$ M

Çizelge 3.43 AbPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-tirozin' in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	Δ OD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
870	40	90	-	1	1.1	-	0.202	5050	1.98	0.91
860		100	-		1	-	0.219	5426	1.86	1
850		110	-		0.91	-	0.224	5670	1.75	1.1
840		120	-		0.83	-	0.238	5952	1.68	1.2
830		130	-		0.77	-	0.261	6536	1.53	1.3
865		90	5		1.1	0.01	0.167	4167	2.4	0.91
855		100	5		1	0.01	0.171	4273	2.34	1
845		110	5		0.91	0.01	0.177	4425	2.26	1.1

Çizelge 3.43' ün devamı

0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Enzim çözeltilisi hacmi (µL)	Substrat çözeltilisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltilisi hacmi (µL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (M)	ΔOD (420nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V×10 ⁻⁴	1/[S]
835	40	120	5	1	0.83	0.01	0.184	4608	2.17	1.2
825		130	5		0.77	0.01	0.193	4831	2.07	1.3
865		90	5		1.1	0.15	0.182	4545	2.2	0.91
855		100	5		1	0.15	0.190	4762	2.1	1
845		110	5		0.91	0.15	0.200	5000	2	1.1
835		120	5		0.83	0.15	0.210	5263	1.9	1.2
825		130	5		0.77	0.15	0.222	5556	1.8	1.3



Şekil 3.43 AbPPO enzimi aktivitesi üzerine L-tirozin'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.0 \times 10^{-5} M$, $[I_2]=15.0 \times 10^{-4} M$

Çizelge 3.44 AbPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri.

İnhibitör	I [M]	K_i [M]	Ortalama K_i değerleri	İnhibisyon Türü
β -merkaptolanol	4×10^{-5} 12×10^{-4}	0.602 0.146	0.374	unkompetitif
Okzalik asit	5×10^{-5} 15×10^{-4}	0.213 13.3	6.56	kompetitif
Siyirincis asit	10×10^{-4} 20×10^{-4}	0.271 0.112	0.192	unkompetitif
L-tirozin	1×10^{-5} 15×10^{-4}	0.0239 0.078	0.051	unkompetitif
p-amino benzen sulfon amid	5×10^{-5} 20×10^{-4}	0.0945 0.150	0.122	Karışık
L-sistein	5×10^{-5} 17.5×10^{-4}	0.039 0.116	0.078	unkompetitif
Glutasyon	3×10^{-5} 15×10^{-4}	0.18 0.174	0.177	unkompetitif

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde, Polifenol oksidaz (PPO) hücrelerin sağlam kısımlarında baskın olarak plastit ve kloroplastlarda bulunur. Ham meyve hücrelerinde membran bağımlı olarak plastitlerde, olgunlaşma ve depolama sürecinde çözünmüş veya parçalanmış olarak bulunabilir. Bu sebeple PPO bitki hücrelerinde aynı anda her iki formda da bulunabilir [157]. Oksidoredüktaz sınıfı enzimler, protein yapılarının ve katalizledikleri reaksiyonların karmaşıklığı nedeniyle çok fazla çalışılmamış ancak PPO enzimi son 30 yıl içerisinde birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir [158]. 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 [159]

Yapılan bu çalışmada, *Lactarius salmonicolor* ve *Agaricus bisporus* mantarlarında bazı fenolik bileşiklerin yükseltgenmesinden sorumlu, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olan PPO'nun varlığı ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Bu amaçla; söz konusu mantarlardan hazırlanan enzim özütünden PPO, 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 PPO'lar ile karşılaştırılmıştır.

Meyve dokularından PPO ekstraksiyonu 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 0.5 M, pH: 7.3 sodyum fosfat tamponu kullanıldı [160-161].

PPO'nun saflaştırılmasında karşılaşılan en büyük problem bitki materyalinin ekstraksiyonu esnasında pigment oluşumunun ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler enzimin üzerine çökebilir ve çözünürlüğün azalmasına neden olur. Ayrıca söz konusu pigmentlerin neden olduğu en önemli problemlerden biriside enzimin inaktivasyonudur. Bu sorunları azaltmak için ekstraksiyon işlemi mümkün olduğunca düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sistemini enzimatik polifenol oksidasyonundan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler ya da kinon bağlayıcıları da katılır. Enzimatik kararma inhibitörlerinden en fazla kullanılanlarından birisi askorbik asittir. PPO-polifenol sistemi üzerine etkisi komplekstir, bir yandan kinonların indirgeyicisidir diğer yandan ise bakırı şelatlama reaktifi olarak görev yaptığı bilinmektedir [162]. Askorbik asit, oluşan o-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir ve sonuçta kendisi oksitlenir. Askorbik asidin tamamı oksitlendikten sonra esmerleşme reaksiyonu devam eder. Bu nedenle askorbik asidin kinonları indirgeme kapasitesi, kullanıldığı konsantrasyona bağlıdır. Bu inhibitör düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında indirgenme işleminde çabucak tükenebilir ve bundan dolayı renkli polimerlerin oluşumunu sınırlı bir süre için engeller. Eğer askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda kullanılırsa oluşan kinonları indirgeyerek enzimin substratlarına dönüştürebilir ve enzimatik kararmaya karşı kalıcı koruma sağlayabilir [163]. Çalışmamızda bu amaçla kinonları indirgeyici reaktif olarak ekstraksiyon tamponuna 10 mM askorbik asit ilave edilmiştir.

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili yollarından biriside substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlamada en yaygın olarak kullanılan madde polivinil pirolidin (PVP)'dir. PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH'da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVP, PPO'nun kısmi yarışmalı inhibitörüdür. Fakat PVP'nin inhibitör etkisi enzim ekstraktının yıkanması ile elimine edilebilir. Bundan dolayı fenollerin bağlanmasında polietilen glikol (PEG) daha çok tercih edilir [164]. Araştırmamızda da bu amaçla fenolleri bağlayıcı olarak PEG kullanılmıştır.

Afinite kromatografisi ile PPO enziminin saflaştırılması sırasında elüatların protein miktarları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayinin proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır [145]. Kantitatif protein tayinleri Lowry yöntemiyle belirlendi [156].

PPO aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçülmesiyle belirlenebilir. Substratın tükenme hızı O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresi ile manometrik olarak yada bir oksijen elektrotuyla polarografik olarak ölçülür. Bu iki metotla aynı sonuçları elde etmek oldukça zordur. Aynı şartlar altında elde edilen O₂ absorpsiyon değerleri polarografik metotta daha yüksek çıkmaktadır [161]. Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik dansitelerinin 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 PPO aktivitesi 420 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Elektroforeze dayalı teknikler, proteinlerin büyüklük, net yük ve hidrofobik özelliklerinin birisi ya da daha fazlasına göre ayrılmalarını sağlar. Proteinler kendi izoelektrik noktalarından (pI) başka bir pH'da yüklü olduklarından, bir elektrik alanı içinde kendi yük yoğunluklarına bağlı olarak hareket ederler. Elektroforez, protein karışımlarının bağımsız bileşenlerini çözmek ve birbirinden ayırmak için ideal bir analitik yöntemdir. Doğal koşullar altında yapılan elektroforezler daha çok, çözünebilen proteinlerin enzimatik ve biyolojik özelliklerini de koruyarak incelenmesi için kullanılır. Daha az çözünen proteinlerin denatüre edici koşullar altında incelendiği yöntem, doğal koşullardaki elektroforeze göre daha etkindir, ancak proteinin biyolojik ve biyokimyasal aktivitesinin kaybedilmesine neden olur. Anyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında yapılan poliakrilamit jel elektroforezi, proteinlerin kendilerini meydana getiren polipeptitlerin moleküler büyüklüğüne bağlı olarak nitelendirilebildiği önemli bir tekniktir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezinde proteinler, normal elektroforez işlemine tabi tutulurlar. Farklı olarak elektroforez tamponu SDS ihtiva ederken , molekül ağırlığı tayin edilecek protein ve molekül ağırlıkları bilinen

standart proteinler SDS'de çözülür. Anyonik deterjan SDS, proteinlerin büyük kısmı için çok etkin bir çözücüdür ve proteinlere kuvvetle bağlanır. Proteinlerin büyük çoğunluğu 1gr protein başına 1.4gr SDS bağladığından, polipeptit zincirlerin içsel yükü etkin şekilde maskelenir ve ünite kütle başına net yük yaklaşık olarak sabit bir hale gelir. Bundan dolayı, jel matriksi üzerindeki ayırım yalnızca moleküler eksenin bir sonucu olarak gerçekleşir. Standart proteinler ve bilinmeyen protein poliakrilamid jelin tepesine konur ve elektrik akımına maruz bırakılır. Proteinlerin hareket hızı normal elektroforezde olduğu gibi yük ve kütle yerine yalnız kütlelerine bağlıdır. Çünkü proteine yapışmış SDS üzerindeki negatif yük proteinin kendi yükünden kat kat fazladır. Elektroforez sonrası oluşan bantlar Coomassie-blue boyasıyla boyanır. Standart proteinlere göre başlangıç noktasından aldıkları yollar karşılaştırılarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı bulunur.

Saflaştırılan enzimler için SDS-PAGE uygulanarak her bir enzim için tek bir bant gözlenmiştir. LsPPO enziminin molekül ağırlığı 36 kDa, AbPPO enziminin molekül ağırlığı 50 kDa civarında gözlemlenmiştir. Ancak elde edilen bu bulgular sonucunda, saflaştırılan PPO'nun moleküler ağırlığının 36 ve 50 kDa olduğunu söyleyemeyiz. Enzimin aynı moleküler ağırlığa sahip birden fazla alt birim içerebileceği mümkündür. Dolayısıyla, enzimin alt birim içerip içermediğine dair denemeler yapılmadığından, toplam alt birim sayısı, dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı hakkında kesin bir şey söylenemez. Nitekim, fasulye tohumlarından saflaştırılan PPO'nun moleküler ağırlığı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile 120 kDa olarak belirlenmiştir. Oysa ki, yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 30 kDa civarında tek bir bant gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak, fasulye tohumu PPO'sunun bir tetramer olduğu ortaya konulmuştur, fasulye yaprağı PPO'sunun, moleküler ağırlıkları 61.5 ve 60 kDa ile 44.5 ve 43 kDa olan dublet altbirimlerden oluşan bir protein olduğunu 74 bildirmiştir[165-166]. Ayrıca, yenidoğuş meyvesinden saflaştırılan PPO için yapılan SDS poliakrilamid jelde, 59.2 kDa'luk moleküler ağırlığa karşılık gelen tek bir bant gözlenmiş ve yapılan jel filtrasyon kromatografisiyle, enzimin moleküler ağırlığı 61.2 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, enzimin bir monomer olduğu ortaya konulmuştur [167]. PPO enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmektedir. Örneğin çay yaprağı 72 kDa, ayçiçeğı tohumu 42 kDa, elma 65 kDa, muz 62 kDa, lahana 39 kDa,

çin lahanası 65 kDa, ananas 104 kDa, salatalık 56 kDa, hurma ağacı 51 kDa, yenilebilir dul avrat otu 31 kDa, fasulye 30 kDa, fasulye tohumu 110 kDa ve hint fasulyesi 120 kDa molekül ağırlığına sahip PPO enzimi içermektedir [153-15156]; [168-169]; [160-164].

Enzimlerde, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ham enzim özütü hazırlama yöntemine ve kullanılan substrata göre farklılıklar gösterir [170-171]. Bu yüzden, pH, enzim aktivitesinin ifadesinde önemli bir faktördür. *L. Salmonicolor* ve *A. Bisporus* PPO'sunun pH'ya bağımlılığı, 4.5-11.0 pH değerleri arasında incelendiğinde, grafiğin tek pik verdiği ve optimum pH'nın katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak sırasıyla 7.5, 6.0, 7.5 ve 7.5, 7.5, 8.0 olarak tespit edilmiştir. Değişik organizmalardaki difenolazların, 4-metilkatekol varlığında karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, PPO için optimum pH, dutta 5.0 [139], fasulye tohumlarında ve yaban mersininde 4.0 [172-173], ahududunda 8.0 [174] ve kuşburnunda 8.5 [62] olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *L. salmoicolor* ve *A. bisporus* difenolazlarının, önceden bildirilen difenolazlarla, pH optimumu açısından uygunluk gösterdiği görülmektedir.

L. salmonicolor ve *A. Bisporus* PPO'larının aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 5-50 °C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki kaynaktan elde edilen enzimin optimum sıcaklığı 20 °C olarak belirlenmiştir. Farklı kaynaklarda PPO'nun optimum sıcaklıkları LsPPO ve AbPPO enzimleri ile benzerlik göstermekle beraber, dutun *Morus nigra* L. türünde 20 °C ve *Morus alba* L. türünde ise 40 °C [175], şeftalide 20 °C [176], taro ve patatesten 25-30 °C [177], patlıcanda 30 °C [157] olarak bildirilmiştir.

Genel olarak her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimlerinin pH 6.0 ile 8 arasında değişen yüksek aktivitelere sahip olduğu görülmektedir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH'sının bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceğini söyleyebiliriz

LsPPO ve AbPPO enzimlerinin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta katekol, 4-metil katekol ve pirogallol, substratları kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktiviteleri belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. (Şekil 3.7-3.9 ve 3.27 ve 3.29). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

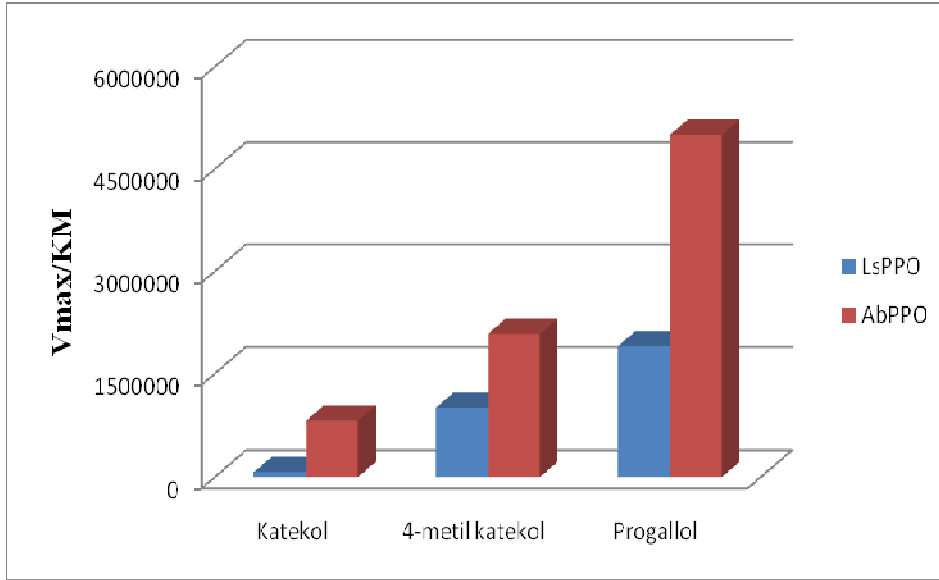
Her iki kaynaktan elde edilen PPO enzimi katekol, 4-metil katekol ve pirogallol karşı aktivite gösterirken, monofenollere karşı (L-tirozin) hiçbir aktivite göstermemiştir. Bu durum LsPPO ve AbPPO enzimlerinin hidroksilasyon (kresolaz) aktivitesine sahip olmadığını göstermektedir. Ancak bazı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin her iki aktiviteyede sahip olduğu literatürden anlaşılmaktadır [62, 161,178].

LsPPO enziminin katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için K_M değerleri sırasıyla 25×10^{-3} M, 1.81×10^{-3} M , 9.5×10^{-3} M ve V_{max} değerleri de sırasıyla 18702.5 U/mL dak 18075 U/mL dak, 18050 U/mL dak olarak bulunmuştur. Aynı substratlar için katalitik gücün bir ölçüsü olan V_{max} / K_M değerleri sırasıyla 748.1×10^3 , 9986.2×10^3 ve 1900×10^3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre LsPPO enzimi için 4-metil katekol'ün en iyi substrat olduğu bunu da pirogallol ve katekol'ün takip ettiği görülmektedir (Şekil 4.1). Ancak bu sıralamanın farklı türlerden elde edilen PPO enzimleri için değiştiği literatürde görülmektedir. [153-156, 165].

AbPPO enziminin katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için K_M değerleri sırasıyla 5.611×10^{-3} M, 38.2×10^{-3} M, 4.48×10^{-3} M ve V_{max} değerleri de 4525 U/mL dak, 79500U/mL dak, 22400 U/mL dak olarak bulunmuştur. Aynı substratlar için V_{max}/K_M değerleri sırasıyla 806451, 2081151 ve 5000000 olarak bulunmuştur. Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi, pirogallolün AbPPO için en iyi substrat olduğu bunu da 4-metil katekol ve katekolün takip ettiği anlaşılmaktadır.

Katekol ve 4-metil katekol substratları, AbPPO enzimi tarafından oksidasyona uğrarlar fakat 4-metil katekolün oksidasyonu daha hızlı bir şekilde

gerçekleşir(daha yüksek V_{max}/K_M değerine sahiptir). Bu durum, 4-metil katekol substratının para pozisyonunda bulunan elektron verici metil grubunun katalitik verimi büyük oranda arttırdığı şeklinde açıklanmaktadır [160].



Şekil 4.1 LsPPO ve AbPPO enziminin üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin değişimini gösteren grafik.

Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin katekol substratı için 1.1×10^{-5} M'dan 84.2×10^{-3} M'a kadar değişen K_M değerleri bildirilmektedir. Katekol substratı için; ananas, malatya kayısı, amasya elması, hurma ağacı, yali armutu, fasulye, fasulye tohumu, çin lahanası, ahududu ve hint fasulyesinden elde edilen PPO enzimleri için K_M değerleri sırasıyla 1.1×10^{-5} M, 6.6×10^{-3} M, 34×10^{-3} M, 1.1×10^{-3} M, 5.5×10^{-3} M, 11×10^{-3} M, 5.71×10^{-3} M, 68.2×10^{-3} M, 84.2×10^{-3} M ve 10.5×10^{-3} M olduğu bildirilmiştir [160-161,163,166-167, 178-181].

Amasya elması, hurma ağacı, fasulye, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden izole edilen PPO enzimlerinin 4-metil katekol substratı için elde edilen K_M değerleri sırasıyla 3.1×10^{-3} M, 2.0×10^{-3} M, 1.6×10^{-3} M, 1.7×10^{-3} M ve 4.0×10^{-3} M olarak tespit edilmiştir [159, 160, 166-167, 163]. Progallol substratının ise çin lahanası,

amasya elması, yali armutu, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden elde edilen enzimler için sırasıyla 15.4×10^{-3} M, 27×10^{-3} M, 2.6×10^{-3} M, 3.4×10^{-3} M ve 12.5×10^{-3} M K_M değerlerine sahip olduğu bildirilmektedir [160,167, 178-179].

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin farklı substratları için farklı V_{max} değerleri bildirilmektedir. Çin lahanası, malatya kayısı, hurma ağacı, yali armudu ve fasulyeden izole edilen PPO enzimleri için katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 67.6, 833, 91, 766 ve 3846 U/mL'dir; hurma ağacı ve fasulye PPO'su için 4-metil katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 750 ve 2577 U/mL'dir; Çin lahanası ve yali armutu PPO'su için pirogallol substratı ile bulunan V_{max} değerleri 14.1 ve 423 U/mL'dir olarak verilmiştir [164,167,166,180,181].

Araştırmamızda her iki kaynaktan elde edilen PPO enzimi üzerine β -merkaptan etanol, oksalik asit, glutatyon, L-sistein, L-tirozin, siyricis asit ve p-aminobenzen sülfanamid inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir. İnhibisyon etkisi, K_i ve I_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre K_i sabitleridir. Çünkü materyal ve yöntemlerde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için I_{50} değerlerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem, K_i sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alınarak, hem K_i değerleri, hem de beş farklı inhibitör konsantrasyonu için sabit substrat konsantrasyonunda I_{50} değerleri her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimleri için tespit edilmiştir.

Farklı inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için optimum şartlarda katekol substratını 10mM sabit konsantrasyonda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.10-3.16ve 3.30-3.36ve Çizelge 3.9-3.15ve 3.32-3.36'de verildi.

LsPPO ve AbPPO enzimlerinin β -merkaptol etanol inhibitörü kullanılarak bulunan I_{50} değerleri sırasıyla 0.204 mM ve 6.09 mM'dır. Aynı inhibitörün çin lahanası, malatya kayısı ve fasulye tohumundan izole edilen PPO enzimleri için bildirilen I_{50} değerleri sırasıyla 1.2×10^{-3} mM, 3.62×10^{-8} mM ve 24×10^{-6} mM'dır [160, 167,180]. L-sistein inhibitörü kullanılarak LsPPO ve AbPPO enzimleri için bulunan I_{50} değerleri 0.42 mM ve 10.34 mM'dır. Aynı inhibitörün çin lahanası PPO enzimi için I_{50} değerinin 9.4×10^{-3} mM olduğu bildirilmektedir [160]. Syringic asit kullanılarak LsPPO ve AbPPO enzimleri için I_{50} değerleri 23.75 mM ve 0.231 mM'dır. [161]. LsPPO ve AbPPO enzimleri üzerine p-amino benzen sülfanamidin I_{50} değerleri sırasıyla 0.39 mM ve 4.40 mM olarak bulunmuştur. Aynı inhibitörün dut ve yer elması PPO enzimi için I_{50} değerleri sırasıyla 407.5 ve 5.43 mM olduğu bilinmektedir[182]. Okzalik asit inhibitör olarak kullanılarak LsPPO ve AbPPO enzimleri için bulunan I_{50} değerleri 0.18 mM ve 11.997 mM'dır. L-tirozin inhibitör olarak kullanıldığında ise LsPPO ve AbPPO enzimleri için bulunan I_{50} değerleri 1.45mM ve 10.08 mM'dır. Glutasyon inhibitör olarak kullanıldığında LsPPO ve AbPPO enzimleri için bulunan I_{50} değerleri 0.23 mM ve 1.03 mM'dır.

Farklı inhibitörlerin K_i değerlerinin bulunması amacıyla önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonlarında aktiviteler ölçüldü. Daha sonra üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi.

LsPPO enzimi için 2-merkaptol etanol, L-sistein, siyrincis asit, L-tirozin, okzalik asit, glutasyon ve p-aminobenzen sülfanamid inhibitörlerinin K_i değerleri sırasıyla 0.148 M, 0.53 M, 0.15 M, 0.18 M, 2.9×10^{-3} M, 0.030 M ve 2.45 M olarak tespit edilmiştir. 2-merkaptol etanol, L-sistein, siyrincis asit, okzalik asit, glutasyon

ve p-aminobenzen sülfanamid inhibitörlerinin LsPPO enzimi üzerindeki inhibisyon türü unkompetitif, L-tirozin için ise kompetitif olduğu bulunmuştur.

AbPPO enzimi için 2-merkaptto etanol, L-sistein, siyricis asit, L-tirozin, okzalik asit, glutatyon ve p-aminobenzen sülfanamid inhibitörleri için K_i değerleri sırasıyla 0.374 M, 0.53 M, 0.192 M, 0.18 M, 6.56 M, 0.030 M, ve 2.54 M, olarak tespit edilmiştir. β -merkaptto etanol, L-sistein, siyricis acid ve L-tirozin, inhibitörlerinin AbPPO enzimi üzerindeki inhibisyon türü unkompetitif; p-aminobenzen sülfanamid karışık tipli ve okzalik asit ise kompetitif olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- PPO enziminin saflaştırılması için *Sepharose 4B- L- tirozin- p-aminobenzoik asit* kimyasal yapısına sahip yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir.
- *Sepharose 4B- L- tirozin- p-aminobenzoik asit* kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak yenilebilir *Agaricus bisporus* ve *Lactarius salmonicolor* mantarlarında PPO enzimi saflaştırılmıştır.
- Afinite kromatografisi ile saflaştırılan *Agaricus bisporus* ve *Lactarius salmonicolor* PPO enzimleri SDS-PAGE elektroforezinde tek bant elde edilmiş ve LsPPO enziminin moleköl ağırlığı 36 kDa, AbPPO enziminin moleköl ağırlığı 50 kDa civarında gözlemlenmiştir..
- Saflaştırılan enzimlerin optimum pH' si katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak optimum sıcaklığı ise sadece katekol substratı kullanılarak belirlenmiştir ve optimum pH katekol, 4-metil katekol, pirogallol substratları kullanılarak L. Salmonicolor PPO enzimi için sırasıyla 7.5, 6, 7.5 olarak; A. Bisporus PPO enzimi için ise sırasıyla 7.5, 7.5 ve 8 olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın PPO enzimi üzerine etkisinin araştırılması çalışmasında elde edilen sonuçlara göre L. Salmonicolor PPO enzimi için 5-20°C' de ; A.

Bisporus PPO enziminin ise 20-30 °C' de aktivitesini büyük ölçüde koruduğu tespit edilmiştir.

- Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu *L. volenus* PPO enziminin en çok 4-metil katekol substratına karşı, *A. bisporus* PPO enziminin ise pirogallol substratı üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.
- Genel olarak her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimleri pH 6 ile 8 arasında değişen yüksek aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH'sının bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceğini söylenebilir.
- Saflaştırılan *L. salmonicolor* PPO enzimi üzerine en kuvvetli inhibitör okzalik asit iken *A. Bisporus* enzimi üzerine en kuvvetli inhibisyon etkisini L-tirozin göstermiştir. En zayıf inhibitörler ise yapılan çalışmalara göre LsPPO enzimi için p-amino benzen sulfon amid iken AbPPO enzimi için okzalik asid olarak belirlenmiştir.

-

KAYNAKLAR

- [1] Marusek, CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK. "Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species". J Inorg Biochem;100:108. 2006
- [2] Önez, Z., " Üzümden (*vitis vinifera l.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2006
- [3] Laurila, E., Kervinen R., and Ahvenainen, R., " The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits ", *Postharvest News and Information*, 9(4), , 53-66, 1998.
- [4] Erkel, İ., " Dünyada ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi", 2-4 Kasım, İstanbul, Bildiriler Kitabı, Cilt 1,2-8, 1992.
- [5] Sesli, E. "Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma", Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1994.
- [6] Boztok, K., "Mantar Üretim Tekniği", Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları, İzmir, 1990.
- [7] Blackwell, W. H., "Paisinous and Medicinal Plant, Prentice Hall", New Jersey, 1998.
- [8] Ramsbottom J., "Mushrooms & Toadstools". Collins. ISBN, 1953.

- [9] Linnaeus, C., "Species Plantarum: Tomus II. Holmiae. (Laurentii Salvii)", (1753) p. 1172.
- [10] http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8b/Lactarius_salmonicolor.jpg/260px-Lactarius_salmonicolor.jpg&imgrefurl=http://tr.wikipedia.org/wiki/Lactarius_salmonicolor&usq=__8bn2ypDaqZITetWBUpuQTMEIRG0=&h=195&w=260&sz=16&hl=tr&start=8&um=1&tbnid=60q4o2N6n7WuJM:&tbnh=84&tbnw=112&prev=/images%3Fq%3DLactarius%2Bsalmonicolor%26hl%3Dtr%26sa%3DN%26um%3D1
- [11] Solak M.,H., Işıloğlu M., Gücin F., Gökler I.. "Macrofungi of Izmir Province" Tr. J. of Botany 23: 383–90. (1999). Retrieved on 2008-02-16.
- [12] Gezer, K.. "Contributions to the Macrofungi Flora of Antalya Province". Tr. J. of Botany 24: 293–98, 2000.
- [13] Pekyardımcı, Ş., "Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları", *Gıda*, 17(3), (1992), 181-186.
- [14] <http://www.tarimsal.net/?p=4292>
- [15] Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., and Hayashi, N., "Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel", *J. Agric. Food Chem.*,49, (2001), 1446-1449.
- [16] Mathewson, P..R., "Enzymes, Eagen Press Handbook Series", (2000), 37-38.
- [17] Mcweeny, D.J., "The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites", *J. Sci. Food Agric.* 25, (1974), 735.
- [18] O'brein, J., Morrissey, P. A., "Nutritional and toxicological aspects of the

Maillard browning reaction in food”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 3 (1989) , (211-237).

- [19] Labuza, T. P., Lillemo, J. H. Ve Taoukis, P. S., “Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic anzymes, Fruit Processing. (1992) 2, 9-13
- [20] White, J.S., and White, D.C., “Source Book of Enzymes”, CRC Press LLC, Florida, (1997), 33431.
- [21] Whitaker. J. R., “Principles of Enzymology for the Food Sciences”, Marcel Dekker. New York, (1972), Chapters 22 and 24.
- [22] Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog. J. M., “ Immobilization of enzymes on clays and soils”, *Soil Biol. Biochem*, 21 (2), (1989), 223-230.
- [23] Gul’ko, A. Y. and Khaziyev, F. K., “Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity”, *Eurasian Soil Science*, 25 (4), (1993), 101-113.
- [24] Mos’ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, and N. A., Klenitskaya, I. A., “Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus”, *Eurasion Science*, 5, (1992), 60-65.
- [25] Ragazzi, E. and Veronese, G., “Ricerche sulle fenolossidasi esul contenato in o-difenolli delle olive”, *Ann. Chim.*, 57, (1967), 1476.
- [26] Tolbert, N. E., “Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts”, *Plant Phatol.* , 51, (1973), 234.
- [27] Craft, C. C., “Localization and activity of phenolase in the potato tuber”, *Ant. Potato J.*, 43, (1966), 112.
- [28] Stephens, G. J. And Wood, R. K. S., “Release of enzymes from cell walls by

an endopectate-trans-eliminase”, *Nature*, 251, (1974), 358.

- [29] Parish, R. W., “The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (*Beta vulgaris* L.)”, *Z. Pflanzenphysiol.*, 66, (1972), 176.
- [30] Harel, E., Mayer. A. M., and Shain. Y., “Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition”, *Physiol Plant.*, 17, (1964), 921.
- [31] Mayer, A. M., “Polyphenol oxidases in plants-Recent progress”, *Phytochemistry*, 26, (1987), 11-20
- [32] Dang. F., “Localization and solubility of polyphenoloxidase in stone fruits”, *Nauchni Tr. Vissh. Inst. Khranit Vkuvosa Promst.*, 18, (1971), 241.
- [33] Voight. J., and Noske, R., “Zur Bestmmung der Polyphenoloxidase aktivitat. H. Orientierende Versuche zur Anwendbarken der Methode mit Besthorns Reagens in Apfeln”, *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, 130, (1986), 9.
- [34] Hiescu-Moruju. E., “Activitiy of oxidases in sweet cherries during growth and maturation”, *Stud. Cer. Biochem.*, 12, (1969), 47,
- [35] Palmer. J. K., “Banana polyphenoxidase. Prepatation and properties”, *Plants Phys.*, 38, (1963), 508.
- [36] Padron. M. P., Lorano. J. A., and Gonsales. A. G., “Properties of o-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*”, *Phytochemistry*, 14, (1975), 1959.
- [37] Yankon. S. J., “Activite et localisation da ferment polyphenoloxidase dans cetlans fruits”, *C. R., Acad Bul. Soct.*, 14, (1961), 455.
- [38] Vamos-Vigyazo, L., “Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and

vegetables”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14, (1981), 44-129.

- [39] Brooks, D. W. and Dawson, Ch. R., “Aspects of tyrosinase chemistry, in *The Biochemistry of Copper*”. Peicash. J., Aisen. P., and Blumberg. W. E. Eds., Academic Press, New York, (1966), 343.
- [40] Cabanes, J., Garcia-Canovas, F. ve Garcia-Carmona, F.,. “Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 917 (1994), 190-197.
- [41] Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J. ve. A., Garcia-Canovas, F.,. “A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone”. *Analytical Biochemistry*. 216, (1994) 205-212.
- [42] Espin, J. C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F.,. “Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities for mushroom polyphenol oksidase”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, (1997) 1187-1193.
- [43] Fenoll, L. G., Rodriguez-Lopez, J. N., Varon, Garcia-Ruiz, P. A., Garcia-Canovas, F. ve Tudela, J.,. “Action mechanism of tyrosinase on *meta*- and *para*-hydroxylated monophenols”. *Biological Chemistry*. 381, (2000)313-320
- [44] Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A., ve Wichers, H. J.,. “Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalys”t. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49,(2001), 1187-1193

- [45] Brooks, S. J., Doyle, E. M., Hewage, C., Malthouse, J. P. G., Duetz, W. ve O'Conner, K. E.,. "Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, (2004), 486-492.
- [46] Pendharkar, M. B. and Nair. P. M., "Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation", *Phytochemistry*, 13, (1964), 1373.
- [47] Wilcox, D.E., Porras, A. G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., and Solomon, E.I., "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase", *J. Am. Chem. Soc.*, 107, (1985), 4015-4027.
- [48] Solomon, E. I., and Lowery, M.D., "Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry", *Science*, 259, (1996), 1575-1581.
- [49] Solomon, E.I., Sundaram, U. M., Machonkin, T.E., "Multi copper-per oxidaes and oxygenases", *Chem. Rev.*, 96, (1996), 2563-2605.
- [50] Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P.A., Varon R., and Garcia-Canovas, F., "Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), 2968-2975.
- [51] Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., and Krebs, B., "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center", *Nature Structural Biology*. 12 (1998) 1084-1090.
- [52] Eicken, C., Zippel, F., Büldt-Karentzopoulos, K. & Krebs, B. "Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center". *FEBS Lett.* **436**, 293-299 (1998).
- [53] Matheis, G. and Belitz, H. D. "Studies on enzymatic browning of potatoes

- (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1,14,18,1 monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163, (1977), 191.
- [54] Schill, L., and Grisebach. H., *Z. Physiol. Chem.*, 354,1555,1973, as cited in Zaprometov, M. N., “Metabolism of phenolic compounds in plants”, *Biokhimiya.*, 42, (1977), 3.
- [55] Bendall, D. S. And Gregory, R. P. F., “Purification of phenol oxidases”, in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. B. Ed., Pergamon Press, Oxford, (1966), 7.
- [56] Czerkaskij, A., “Pink discoloration in canned Williams Bon Chretien pears”, *J. Food Sci.*,35, (1970), 608.
- [57] Hughes, J. C. And Swain, T., “After-cooking blackening in potatoes. Examination of the interaction of factors by in vitro experiments”, *J. Sci. Food Agric.*, 13, (1962), 358.
- [58] Erdüss, T. and Fodor, L., “Removal of phenolic substances from wine”, *Kerteszeti Egyetem Kozl.*, 40, (1976), 283.
- [59] Negoro, H., “Effect of polyphenolic compounds on pectinase action”, *Eiyo To Shokuryo.*, 25, (1972), 1.
- [60] Burckhardt, R. “Verlust des fruchtigen Wohlgeschmackes bei verarbeiteten Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, der im Zusammenhang mit der Spaltung von Hydroxyzimtsaurcesteren (Depsiden) steht”, *Disch. Lebensm. Rdsch.*, 74, (1978), 205.
- [61] Herrmann, K., “Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydantein”, *Fete. Scifen. Anstrichm.*, 75, (1973), 499.

- [62] Şakiroğlu, H., “Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi”, Doktora Tezi Atatürk Üniv., Fen Bilimleri Ens., Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [63] Sato, M., “The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid”, *Phytochemistry*, 8, (1962), 353.
- [64] Sondheimer. E., “Chlorogenic acids and related depsides”, *Bot. Rev.*, 30, (1964), 667.
- [65] Stelzig, D. A., Akhtar, S. and Riberio, S., “Catechol oxidase of Red Delicious apple peel”, *Phytochemistry*, 11, (1972), 535.
- [66] Gross. D.and Coombs. J., “Enzymatic colour formation in beet and cane juices”. Paper presented at the 15th General Assembly of C. I. T. S., (1975), Vienna.
- [67] Jen, J. J., and Kahler K. R., “Characterization of polyphenoloxidase in peaches grown in the Southcast”, *Hort Science*, 9, (1974), 590.
- [68] Herrmann, K., “Flavonols and flavones in food plants: a review”, *J. Food Technol.*, 11, (1976) , 433,
- [69] Espin, J.C., Garcia, P, G., Varon, J.R., and Canovas, F.G., “Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidases”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1988), 2968-2975.
- [70] Espin, J.C., Garcia, P, G., Tudela, J., and Canovas, F.G., “Study of Stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases ”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1988), 2469-2473.

- [71] Wildanger, W. and Herrmann, K., “Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. H. Die Flavonole des Obstes”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, (1973), 103.
- [72] Herrmann, K., “Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. I. Bisherige Kenntnisse über Vorkommen. Gehalte sowie Veränderungen während des Fruchtwachstums”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, (1973), 41.
- [73] Hanefeld, M. and Herrmann, K., “Über das Vorkommen von Proanthocyanidinen, Leukoanthocyaniden und Catechinen in Gemüse”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 161, (1976), 243.
- [74] Herrmann, K., “Über das Nichtvorkommen der in höheren Pflanzen verbreiteten phenolischen Inhaltsstoffe im Champignon”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 155, (1974), 295,
- [75] Herrmann, K., “Über Verfärbungen des Gemüses durch phenolische Inhaltsstoffe”, *Disch. Lebensm. Rdsch.*, 72, (1976), 90.
- [76] Matheis, G. and Belitz, H. D., “Untersuchungen zur enzymatischen Bräunung bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) I. Phenoloxidasen und phenolische Inhaltsstoffe verschiedener Sorten” *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 163, (1997), 92.
- [77] Martin, W. and Ruberte, R., “The polyphenol of *Dioscorea alata* (yam) tubers associated with oxidative browning”, *J. Agric. Food. Chem.*, 24, (1976), 67.
- [78] Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre, G., and Neumann, J. “Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase”, in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham, J. E. Ed. Pergamon Press., Oxford, (1963), 33.
- [79] Vamos-Vigvazo, L. and Gejzago, L. “Substrate specificity of the enzymatic

browning of apples”, *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 7, (1978), 79.

- [80] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., and Tumer, N., “Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenoloxidase”, *J. Agric. Food Chem.* 49, (2001), 652- 657.
- [81] Kahn, V., “Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning”, *J. Food Agric.*, 28, (1977), 233.
- [82] Lerner, H.R., Mayer. A.H.,and Harel. E., “Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase”, *Phytochemistry*, 11, (1972), 2415.
- [83] Ishiguro, R., and Aoyama. Y., “Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in Radish (*Raphanus sativus* L.)” *Eiyo To Shakuryo.* 23, 13, 1970.
- [84] Weaver, M.L., Bron. R. C., and Steen. H. A., “The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes.”, *Am. Potato J.*, 45, (1968), 132.
- [85] Schaller, K., “Zur Bestimmung der Polyphenoloxidaseaktivität in Kartoffelknollen”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 150,(1972), 211.
- [86] Arnaud, Y., “Etude par ultracentrifugation analytique d’un système enzymatique monomère-polymère (polyphénol oxydase)”, *J. Polym .Sci. Part C.* , 167, (1965), 4103.
- [87] Palmer, J. K. and Roberts. J. B., “Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzthiazole”, *Science*, 157, (1967), 200.
- [88] FDA. “Chemical preservatives”, Food and Drug Administration, The Office

of Federal Register, Washington DC, USA, 1996.

- [89] Ferrar, P. H. ve Walker, J. R. L.. “Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study”, *Journal of Food Biochemistry*, 20,(1996) 15-30.
- [90] Langdon, T. T.. “Prevention of browning in prepared potatoes without the use of sulfiting agents”, *Food Technology*, 41, (1987) 64-67.
- [91] Anonymous. “Sulphites banned”. *Food Ingredients Processing International*, 11, (1991) 11.
- [92] McEvily, A. J., Iyengar, R. ve Otwell, S.. “Sulfite alternative prevents shrimp melanosis”, *Food Technology*, 45, (1991), 80-86.
- [93] Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. ve Wang, C. Y.,. “Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds”, *Food Chemistry*, 76, (2002), 213-218.
- [94] Monsalve-Gonzalez, A., Barbaso-Canovas, G. V., Cavalieri, R. P., McEvily, A. J. ve Iyengar, R.. “Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods, 4-hexylresorcinol as anti-browning agent”, *Journal of Food Science*, 58, (1993), 797-800.
- [95] Lou, Y. ve Barbaso-Canovase, G. V. “Enzymatic browning and its prevention”, Lee, C. Y., Whitaker, J. R., American Chemical Society, Washington DC, USA, 1995.
- [96] Whitaker, J. R.. “Principles of enzymology for the food sciences”, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York, 1972.
- [97] Castaner, M., Gil, M. I., Artes, F. ve Tomas-Barberan, F. A.. “Inhibition of browning of harvested head lettuce”, *Journal of Food Science*, 61, (1996), 314-316.

- [98] Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C. “Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods”. 2000
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>
- [99] Cilliers, J. J. L. ve Singleton, V. L.. “Caffeic acid autooxidation and the effects of thiols”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, (1990), 1789-1796.
- [100] Laurila, E., Kervinen, R. ve Ahvenainen, R.. “The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits”, Postharvest News and Information, 9, (1998), 53.
- [101] Kubo, I. ve Yokokava, Y.. “Two tyrosinase inhibiting flavanol glycosides from *Buddleria coriacea*”, Phytochemistry, 31, (1992), 1075-1077.
- [102] Kubo, I. ve Kinst-Hori, I.. “Flavanols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, (1999), 4121-4125.
- [103] Ha, T. J., Yang, M. S., Jang, D. S., Choi, S. U. ve Park, K. H.. “Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophore flarescens* for melanogenesis”, Bulletin of the Korean Chemical Society, 22, (2001) 97-99.
- [104] Chen, Q. X. ve Kubo, I.. “Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, (2002), 4108-4112.
- [105] Kubo, I. ve Kinst-Hori, I.. “Tyrosinase inhibitors from cumin”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, (1998), 5338-5341.
- [106] Lee, S. E., Kim, M. K., Lee, S. G., Ahn, Y. J. ve Lee, H. S.. “Inhibitory

effects of *Linnamomen cassia* bark-derived materials on mushroom tyrosinase, *Food Science and Biotechnology*, 9, (2000), 330-333.

- [107] Lee, H. S.. “Tyrosinase inhibitors from *Pulsatilla cernua* root-derived materials”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (2002), 1400-1403.
- [108] Andrawis, A. ve Kahn, V.. “Effect of methimazole in the activity of mushroom tyrosinase”, *Biochemical Journal*, 235, (1996), 91-96.
- [109] Espin, J. C. ve Wichers, H. J.. “Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, (2001), 289-300.
- [110] Walker, J. R. L., “Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*”, *Phytochemistry*, 8, (1969), 561.
- [111] Duckworth, H. W. and Coleman, J. E., “Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase”, *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 1613.
- [112] Pruidse, G. N. and Grigorashvili, G. Z., “Extraction and some properties of the o-diphenoloxidase and peroxidase inhibitor from the tea plant”, *Prik. Biokhim. Mikrobiol.*, 13, (1977), 104.
- [113] Jones, J. D., Hulme, A. C., and Woollorton, L. S. C., “Use of poly(vinyl) pyrrolidone in the isolation of enzymes from chloroplasts”, *Phytochemistry*, 4, (1965), 659.
- [114] Kenten, R. H.. “Latent phenolase in extracts of broad bean. Activation by acid and alkali”, *Biochemical Journal*, 67, (1957), 300-307.
- [115] Swain, T., Mapson, L. W. ve Robb, D. A.. “Activation of *Vicia faba* tyrosinase as effected by denaturing agents”, *Phytochemistry*, 5, (1966), 469-482.

- [116] Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J. ve Garcia-Carmona, F., 1989. "Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase", *Phytochemistry*, 91, (1989), 1321-1325.
- [117] Jimenez-Atienzar, M., Pedreno, M. A. ve Garcia-Carmona, F. "Activation of polyphenol oxidase by polyamines, *Biochemistry International*, 25, (1991), 861-868.
- [118] Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. ve Garcia-Carmona, F. "Substrate dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactans", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, (1993), 1583-1586.
- [119] Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. ve Garcia-Carmona, F. "Partial purification of a thylakoid bound enzyme using temperature-induced phase partitioning", *Analytical Biochemistry*, 184, (1990), 279-282.
- [120] Jimenez-Atienzar, M. ve Garcia-Carmona, F.. "Kinetics of the slow pH-mediated transition of polyphenol oxidase", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331, (1996), 15-22.
- [121] Friedman, M. "Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, (1997), 1523-1540.
- [122] Dinçer, B. "Döngel Bitkisi (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) Meyvelerindeki Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1999.
- [123] Paul, B. ve Gowda, L. R. "Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (2000), 3839-3846

- [124] Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U. ve Swieca, M. “Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), Food Chemistry, 107, (2007), 129-135.
- [125] Fan, Y. ve Flurkey, W. H. “Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portebella mushrooms, Phytochemistry, 65, (2004), 671-678.
- [126] Wisseman, K. W. ve Lee, C. Y. “Purification of grape polyphenol oxidase with hydrophobic chromatography”, Journal of Chromatography, 192, (1980), 232-235.
- [127] Janovitz-Klapp, A., Richard, F. ve Nicholas, J. “Polyphenol oxidase from apple-purification and some properties”, Phytochemistry, 28, (1989), 2903-2907.
- [128] Zhou, P., Smith, N. L. ve Lee, C. Y. “Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, (1993), 532-536.
- [129] Das, J. R., Bhat, S. G. ve Gowda, L. R. “Characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, (1997), 2031-2035.
- [130] Chazarra, S., Garcia-Carmona, F. ve Cabanes, J. “Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: Purification and characterization”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, (2001), 4870-4875.
- [131] Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. ve Kawachi, S. “Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*)”. The Japan Wood Research Society, 50, (2004), 260-265.

- [132] Erat, M., Sakiroglu, H. ve Kufrevioglu, O. I. “Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp*’”, Food Chemistry, 95, (2006), 503-508.
- [133] Lerman, L.S., *Proc. Nat.Acad. Sci.* 39, (1953), 232.
- [134] Gutteridge, S. ve Robb, D. “Purification of Mushroom Tyrosinase by Affinity Chromatography’”, Biochemical Society Transactions, 1, (1973), 519.
- [135] O’Neill, S. P., Graves, D. J. ve Ferguson, J. E. “Affinity chromatography of mushroom tyrosinase’”, Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry, 7, (1973), 1159-1166.
- [136] Flurkey, W. H. ve Jen, J. J. “Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors’”, Journal of Food Biochemistry, 4, (1980), 29-41.
- [137] Yonekura, M., Shimoda, T. ve Funatsu, M. “Reinvestigation of Purification of Phenoloxidase from Larvae of Housefly’”, Agricultural and Biological Chemistry, 45, (1981), 101-104.
- [138] Wissemann, K. W. ve Montgomery, M. W. “Purification of d’Anjou Pear (*Pyrus communis L.*) Polyphenol Oxidase’”, Plant Physiology, 78, (1985), 256-262.
- [139] Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S. ve Hegade, M. V. J. “Effect of activation methods on affinity chromatography of potato polyphenol oxidase’”, Phytochemistry, 31, (1992), 1481.
- [140] Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. ve Ozensoy, O. Purification of mulberry (*Morus alba L.*) polyphenol oxidase by affinity chromatography and

investigation of its kinetic and electrophoretic properties, Food Chemistry, 88, (2004), 479-484.

- [141] Weber, D.J. and Stahmann. M. A., “Ceratomyces infection in sweet potato; its effect on proteins, isozymes and acquired immunity”, *Science.*, 146, (1964), 929.
- [142] Bugber, M., “Peroxidase, polyphenol oxidase and endopolygalacturonate trans-eliminase activity in different tissues of sugar beet infected with *phoma betae*”, *Can. J. Bot.*, 53, (1975), 1347.
- [143] Walker, J. R. L., “Phenolase inhibitor from cultures of *Penicillium expansum* which may play a part in fruit rotting”, *Nature*, 227, (1970), 298.
- [144] Ndubizu, T. O. C., “Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot”, *J. Hort. Sci.* , 51, (1976), 311.
- [145] Molchanova, Z. Ya., “The role of oxidases in the resistance of grapevines to unfavorable conditions of Wintering”, *Vinodel. Vinograd.*, 26(1), (1966), 21.
- [146] Esterbauer, H., Schwarzl, E., and Hayn, M., “A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid”, *Anal. Biochem.*, 77, (1977), 486.
- [147] Mazzocco, F. and Pifferi, P. G., “An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn’s hydrazone” *Anal. Biochem.* , 72, (1976), 643.
- [148] Szabo, M. T., “Effect of polyphenols on digestion of proteins”, *Proc. 19th Hung. Annu. Meet. Biochem.*, (1999), 223.
- [149] Çiçek, H. “Beyaz-çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu” (Bilim Uzmanlık Tezi), Hacettepe

Üniversitesi, Ankara, 2000.

- [150] Dewey, D. L., Butcher, F. W. ve Galpine, A. R. “Hydroxyanisole-induced regression of the Harding-Passey melanoma in mice”, *The Journal of Pathology*, 122, (1977), 117-128.
- [151] Cho, M. H., Moinuddin, S. G. S., Helms, G. L., Hishiyama, S., Eichinger, D. ve Davin, L. B., 2003. “ (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantiospecific polyphenol oxidase from creosote bush (*Larrea tridentata*)”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10641-10646.
- [152] Whitaker, J. R. “Polyphenol oxidase, Food enzymes: Structure and Mechanism”, Dominic W. S. Wong, Chapman and Hall, New York, (1995), 271-307.
- [153] Ikeda, R., Uyama, H. ve Kobayashi, S. “Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide) Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid”, *Macromolecules*, 29, (1996), 3053-3054.
- [154] Cuatrecasas, P., “Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”, *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 3059.
- [155] Laemelli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, (1970), London, 227-680.
- [156] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J. “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 193, (1951), 265-275.
- [157] Concellon, A., Anon, M. C. ve Chaves, A. R. “Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during

storage at low temperature'', Food Chemistry, 88, (2004), 17-24.

- [158] Seo, S. Y., Sharma, V. K. ve Sharma, N.. "Mushroom tyrosinase: Recent prospects, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51,(2003), 2837-2853.
- [159] Duangmal, K. ve Owusu-Apenten, R. K. "A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano)", Food Chemistry, 64, (1999), 351-359.
- [160] Nagai, T., and Suzuki, N., "Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage", *J.Agric. Food Chem.*, 49, (2001), 3922-3926.
- [161] Jharna, R.D., Santhoor, G.B., and Lalitha, R.G., "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Kew Cultivar of Indian Pineapple Fruit", *J.Agric. Food Chem.*, 45, (1997), 2031-2035.
- [162] Fujita, S., Tono, T., and Kawahara, H., "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce", *J. Sci. Food Agric.* 55, (1991), 643-651.
- [163] Euclides, J.L., Souza, L.J., and Valdir, A.N., "Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenol Oxidase from Palmito", *J. Sci. Food Agric.* 52, (1990), 249-259.
- [164] Murao, S., Oyamo, H., Namura, Y., Tono, T., and Shin, T., "Purification and Characterization of Edible Burdock Polyphenol Oxidase", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(2), (1993), 177-180.
- [165] Paul, B. ve Gowda, L. R. "Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (200), 3839-3846.

- [166] Flurkey, W. H.. “Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenol oxidase”, *Plant Physiology*, 91, (1989), 481-483.
- [167] Selles-Marchart, S., Casado-Vela, J. ve Bru-Martinez, R.. “Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 446, (2006), 175-185.
- [168] Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S. ve Ayaz, A. F.. “Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation”, *Food Chemistry*, 90, (2005), 801-807.
- [169] Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Güner, S. “Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae)”, *Food Chemistry*, 77, (2002), 1-7.
- [170] Aylward, F. ve Haisman, D. R. “Oxidation systems in fruits and vegetables- Their relation to the quality of pressured products”, *Advances Food and Nutrition Research*, 17, (1969), 1-76.
- [171] Jiang, Y. M.. “Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit., *Food Chemistry*, 66, (1999), 75-79.
- [172] Paul, B. ve Gowda, L. R.. “Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seed of Field Bean (*Dolichos lablab*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (2000), 3839-3846.
- [173] Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. ve Metche, M.. “Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase”, *Journal of Science of the Food and Agriculture*, 73, (1997), 513-516.
- [174] Gonzales, E. M., Ancos, B. ve Cano, M. P.. “Partial characterization of

polyphenol oxidase activity in raspberry fruits’’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, (1999), 4068.

- [175] Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A. ve Dincer, B.. “Comparative Characterization of Diphenolases from Two Mulberry Fruits (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.)’’, *Asian Journal of Chemistry*, 19, (2007), 2961-2972.
- [176] Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo, L., Kiss-Kutz, N. ve Babos-Szcbenly, E.. “The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature’’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7, (1978), 57.
- [177] Duangmal, K. ve Owusu-Apenten, R. K.. “A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano)’’, *Food Chemistry*, 64, (1999), 351-359.
- [178] Arslan, O., Temur, A., and Tozlu, İ., “Polifenol Oxidase From Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.)’’, *J. Agric. And Food Chemistry*, 45, (1998), 2861-2863.
- [179] Oktay, M., Küfrevioğlu, İ., Kocaçalışkan, İ., and Şakiroğlu, H.,”Polyphenol Oxidase From Amasya Apple’’, *Journal of Food Science*, 60, (1995), 1-3.
- [180] Zhou, H., and Feng, X., “”Polyphenol Oxidase From Yali Pear’’, *J. Sci.Food Agric.* 57, (1991), 307-313.
- [181] Gonzales, E.M., Ancos, B., and Cano, M. P.,”Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits’’, *J. Agric. and Food Chemistry*, 47, (1999), 4068-4072.
- [182] Ndubizu, T. O. C., “Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot’’, *J. Hortic. Sci.* , 51, (1976), 311.