

Pleurotus ostreatus Mantarından Afinite Kromatografisi ile Tirozinaz Enziminin
Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Organofosfat Pestisitlerinin Tirozinaz Enzimi Üzerine
Etkilerinin İncelenmesi

Kübra Kurt

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ocak 2024

Purification and Characterization of Tyrosinase Enzyme from *Pleurotus ostreatus*
mushroom by Affinity Chromatography and Investigation The Effects of Organophosphate
Pesticides on Tyrosinase Enzyme

Kübra Kurt

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

January 2024

Pleurotus ostreatus Mantarından Afinite Kromatografisi ile Tirozinaz Enziminin
Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Organofosfat Pestisitlerinin Tirozinaz Enzimi Üzerine
Etkilerinin İncelenmesi

Kübra Kurt

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmelięi Uyarınca

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZŞEN BATUR

İkinci Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

“ESOGÜ-BAP tarafından FBA-2022-2574 numaralı proje kapsamında
desteklenmiştir.”

Ocak 2024

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Kübra Kurt'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Pleurotus ostreatus* Mantarından Afinite Kromatografisi ile Tirozinaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Organofosfat Pestisitlerinin Tirozinaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZŞEN BATUR

İkinci Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZŞEN BATUR

Üye: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye: Prof. Dr. Tamer AKAR

Üye: Doç. Dr. Mesut IŞIK

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLGİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma TÜMSEK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZŞEN BATUR ve Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Pleurotus ostreatus* Mantarından Afinite Kromatografisi ile Tirozinaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Organofosfat Pestisitlerinin Tirozinaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 08.01.2024

Kübra Kurt

İmza

ÖZET

Tirozinaz (E.C. 1.14.18.1) aktif bölgesinde bakır bulunan, oksidoredüktazların üyesi olan, melanin sentezindeki hız sınırlayıcı adımı katalize eden enzimdir. Melanin, güneşten gelen ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerinden korunmamızı sağlayan, hayvanlarda saç, göz ve cilt pigmentasyonundan birincil derecede sorumlu olan indolik yapıdaki bir heteropolimerdir. Tirozinaz, melanin sentezindeki öneminin yanında, kozmetik, tekstil, çevre, gıda ve tıp gibi çeşitli endüstriyel uygulamaları olan önemli bir enzimdir.

Tez çalışması kapsamında tirozinaz enzimi yabani ve yenilebilir bir mantar olan *Pleurotus ostreatus*'tan sırasıyla homojenizasyon, çöktürme, diyaliz ve son olarak Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak %18,23 verimle saflaştırıldı. Enzim saflığının kontrolü, SDS ve doğal jel elektroforezleri kullanılarak yapıldı. Tirozinaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık 97 kDA olarak tespit edildi.

Tirozinaz enzimini karakterize etmek için, optimum pH ve stabil pH değerleri pH 5,5 ve pH 5,25, optimum sıcaklık değeri ise 20°C olarak belirlendi. Glifosat pestisitinin enzimin aktivitesi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisi incelendi. Aktivite (%) – [I] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafikler ile inhibisyon tipi yarı yarışmalı olarak belirlenerek; eğri denkleminde enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri 0,807 mM ve Lineweaver-Burk grafiğinden inhibitörün enzime olan ilgisini gösteren K_i değeri 2,97 µM olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Enzim saflaştırma, Glifosat, Paration metil, *Pleurotus ostreatus*, Polifenol oksidaz, Tirozinaz

SUMMARY

Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) is a copper-containing enzyme in the active site, a member of oxidoreductases, catalysing the rate-limiting step in melanin synthesis. Melanin is an indolic heteropolymer that provides protection from the harmful effects of ultraviolet rays from the sun and is primarily responsible for hair, eye and skin pigmentation in animals. Tyrosinase, besides its importance in melanin synthesis, is an important enzyme with various industrial applications such as cosmetics, textiles, environment, food and medicine.

Within the scope of the thesis study, tyrosinase enzyme was purified from *Pleurotus ostreatus*, a wild and edible mushroom, by following the steps of homogenisation, precipitation, dialysis and finally Sepharose-4B-*L*-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity gel with a yield of 18,23%. Enzyme purity was controlled by SDS and native gel electrophoresis. The molecular mass of tyrosinase enzyme was determined to be approximately 97 kDa.

Tyrosinase enzyme, the optimum pH and stable pH values were pH 5,5 and pH 5,25 and the optimum temperature value was determined as 20°C, respectively. The *in vitro* inhibition effect of glyphosate pesticide on the activity of the enzyme was also investigated. Activity (%)-[I] and Lineweaver-Burk graphs were plotted. The type of inhibition was determined uncompetitive with the graphs drawn; IC₅₀ value, which is the inhibitor concentration that halves the enzyme activity from the curve equation, was calculated as 0,807 mM and K_i value, which shows the interest of the inhibitor to the enzyme from the Lineweaver-Burk graph, was calculated as 2,97 µM.

Keywords: Enzyme purification, Glyphosate, Parathion methyl, *Pleurotus ostreatus*, Polyphenol oxidase, Tyrosinase

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın deney aşamaları Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Lisans, Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgisini, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZŞEN BATUR'a,

İmkânlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi, fikirleri ile bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Çalışmalarımın her safhasında yardımlarını, desteğini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mesut IŞIK'a

Çalışmalarımın sırasında, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, Iğdır Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA'ya ve Uzm. Kimyager Oya BÜYÜKEMİR'e

Çalışmalarıma katkılarını sunan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ ve Dr. Tuncay SÖYLEMEZ'e

Tez çalışmalarım süresince FBA-2022-2574 no'lu proje kapsamında destek aldığım ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Tez çalışmalarım süresince mantar teminini sağladığım Özlem Mantarcılık Tesisi Özlem ÇINAR'a,

Bana her konuda destek veren, bilgi birikiminden faydalandığım değerli arkadaşım Uzm. Kimyager Uğur ŞAHİN'e ve bu süreçte her zaman yanımda olan arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında bana destek olan canım aileme; annem Kevser KURT, babam İhsan KURT'a ve kardeşlerime en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Enzimler.....	4
2.1.1. Enzim kinetiği	5
2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması.....	6
2.1.2.1. Oksidoredüktazlar	7
2.1.2.2. Polifenol oksidazlar (PFO)	8
2.1.3. Enzim aktivitesi ve aktiviteyi etkileyen faktörler	8
2.1.4. Enzim inhibisyonu	10
2.2. Mantarlar.....	12
2.2.1. İstiridye mantarı ve özellikleri	14
2.3. Tirozinaz Enzimi.....	15
2.3.1. Tirozinaz enzimi tabiattaki dağılımı	17
2.3.2. Tirozinaz enziminin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamaları	18
2.3.3. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve substratları	19
2.3.4. Tirozinaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	22
2.3.5. Tirozinaz enziminin inhibisyonu.....	22
2.4. Pestisitler.....	24
2.4.1. Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	25
2.4.2. Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri	26
2.4.3. Çalışmada kullanılan pestisitler	27

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.4.3.1. Glifosat	27
2.4.3.2. Paration metil	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	30
3.1.2. Çalışmada kullanılan maddeler	31
3.2. Yöntem	37
3.2.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> yetiştirilmesi	37
3.2.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> ham homojenatın hazırlanması	38
3.2.3. <i>Pleurotus ostreatus</i> tirozinaz enziminin çöktürülmesi	39
3.2.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	39
3.2.3.2. Aseton çöktürmesi	41
3.2.4. Ham ekstrede diyaliz işlemi	41
3.2.5. Optimum ve stabil pH belirlenmesi	42
3.2.6. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	43
3.2.7. Tirozinaz enzimi aktivite tayini	43
3.2.8. Kantitatif protein tayini (Bradford Yöntemi ile)	45
3.2.9. Kalitatif protein tayini	46
3.2.10. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi	46
3.2.11. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi	48
3.2.12. Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kromatografisi	50
3.2.13. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile tirozinaz enzimi saflığının kontrolü	54
3.2.14. Doğal elektroforez ile tirozinaz enziminin saflığının kontrolü	55
3.2.15. Tirozinaz enziminin inhibisyon çalışmaları	56
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.1. Optimum ve Stabil pH Belirlenmesine Ait Bulgular	57
4.2. Optimum Sıcaklık Belirlenmesine Ait Bulgular	58
4.2. Kantitatif Protein Tayini	59
4.3. 4-Metil Katekol Substratı için K_m ve V_{max} Değerinin Hesaplanması	60
4.4. Tirozinaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları	61
4.5. SDS-PAGE ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	64
4.6. Tirozinaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi	65

İÇİNDEKİLER

Sayfa

4.6.1. Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine glifosat pestisitinin IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait bulgular	66
4.6.2. Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine glifosat pestisitinin K _i sabitlerinin belirlenmesine ait bulgular	66
4.6.3. Tirozinaz enzimi ile paration metil pestisitinin çalışılması	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Michaelis-Menten grafiği.....	5
2.2. Lineweaver-Burk grafiği.....	6
2.3. Yarışmalı inhibisyon grafiği	11
2.4. Yarışmasız inhibisyon grafiği	11
2.5. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği	12
2.6. Olgunlaşmış bir istiridye mantarının yapısı	13
2.7. Kompostta yetiştirilen <i>P. ostreatus</i> (İstiridye mantarı).....	15
2.8. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi	16
2.9. Melanin sentezi basamakları.....	18
2.10. Tirozinazın Monofenolaz aktivitesi	20
2.11. Tirozinazın Difenolaz aktivitesi.....	20
2.12. Çalışmada kullanılan substratların yapıları.....	21
2.13. Katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile o-kinona dönüşümü.....	22
2.14. Tirozinaz enziminin inhibitörleri	23
2.15. Glifosatın kimyasal yapısı.....	28
2.16. Paration metil kimyasal yapısı	29
3.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> üretim aşamaları.....	38
3.2. Homojenatın hazırlanması deney görselleri.....	39
3.3. Diyaliz işlemi görselleri	41
3.4. Saflaştırma basamakları şematik gösterimi.....	42
3.5. <i>L-Dopa</i> substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi	43
3.6. Katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi.....	44
3.7. 4-metil katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi	44
3.8. Tirozinaz enzimi aktivite tayini şematik gösterimi.....	45
3.9. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonu	48
3.10. Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu	50
3.11. Afinite jeli sentezi basamakları.....	52
3.12. Sepharose-4B modifikasyon basamakları.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.13. CNBr ile aktifleştirilmiş <i>L</i> - tirozin Sepharose-4B Afinite kolonu görselleri.....	54
3.14. SDS-PAGE şematik gösterimi	55
4.1. Tirozinaz enzimi optimum pH grafiği	57
4.2. Tirozinaz enzimi stabil pH grafiği	58
4.3. Tirozinaz enzimi optimum sıcaklık grafiği	59
4.4. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği.....	60
4.5. 4-Metil katekol K_m ve V_{max} grafiği	61
4.6. Afinite kolonu 280 nm’de absorbans grafiği	62
4.7. Afinite kolonu 595 nm’de protein tayini grafiği.....	62
4.8. Tirozinaz enzimi afinite kromatografisi aktivite grafiği	63
4.9. Tirozinaz enziminin SDS-PAGE görseli	64
4.10. Tirozinaz enziminin doğal elektroforez görselleri	64
4.11. Glifosat pestisitinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, IC_{50} grafiği.....	66
4.12. Glifosat pestisitinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, K_i grafiği	67
4.13. Farklı çözeltilerde hazırlanan paration metil	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Tirozinazın substratları	21
2.2. Pestisitlerin hedef organizmaya göre sınıflandırılması	24
3.1. Kullanılan cihazlar	30
3.2. Kullanılan maddeler	31
3.3. SDS jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli değerleri	35
3.4. SDS jel elektroforezi için kullanılan yığma jeli değerleri	35
3.5. Doğal jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli değerleri	36
3.6. Doğal jel elektroforezi için kullanılan yığma jeli değerleri	36
4.1. <i>P. ostreatus</i> tirozinaz enziminin saflaştırma çizelgesi	63
4.2. Tirozinaz enzimi için IC ₅₀ değeri, K _i sabiti ve inhibisyon türü	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μL	mikrolitre
μM	mikromolar
g	gram
l	litre
M	molar
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
$^{\circ}\text{C}$	santigrat

Kisaltmalar

Açıklama

ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albumin
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
E	Enzim
Ea	Aktivasyon enerjisi
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-substrat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EÜ	Enzim Ünitesi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDA	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızı yarıya düşüren substrat konsantrasyonu
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
PFO	Polifenol oksidaz
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Tris	Tris(hidroksimetil)amino metan
Tyr	Tirozin
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren biyolojik katalizörler olarak tanımlanır. Yan ürün oluşturmamaları, katalitik etkileri ve seçici davranışlarından dolayı kimyasal katalizörlerden farklıdırlar. Enzimler, protein yapısı ve bu yapı içerisinde bulunan substratları, varsa kofaktörleri bağlayan, bağ yapımı ve yıkımında görev yapan aminoasitleri kapsayan aktif bölgeyi bünyelerinde bulundurlar. Enzimler kendilerine özgü yapıları ile farklılaşmaktadırlar. Bazı enzimler kataliz fonksiyonlarını sadece protein yapıları ile yürütürlerken bir kısmı protein yapısında olmayan kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktörler, koenzim veya metal iyonu olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzim teknolojisi sürekli bir gelişim içindedir ve enzim teknolojisinin keşfi 19. yüzyılın son çeyreğine denk gelmektedir. Enzim, teknolojiye petrokimyaya, aşı ve ilaçtan otomobil ve savunma sanayi gibi farklı alanlarda yürütülen sürecin önemli aktörlerinden biridir. Gıda, deri, tekstil, kozmetik, kâğıt, yem tatlandırıcı ve kimya alanlarında kullanılan endüstriyel enzim, pandemiyle birlikte daha çok gündeme gelen sürdürülebilirlik ve dünyanın geleceği için de büyük bir önem taşımaktadır. Öyle ki sürdürülebilir ve çevre dostu ekonomiler üretimde artık kimyasalların yerine enzimleri tercih ederken, bu durum endüstriyel enzim pazarının hızlı bir ivmeyle büyümesinin öncelikli sebebidir (Valverde vd., 2015).

Enzimin en önemli uygulamalarından birisini oluşturduğu endüstriyel biyoteknoloji son yıllarda genetik ve nanoteknoloji bilimleriyle birlikte onlarca farklı alanda etki yaratarak, dünyanın geleceğini etkileyecek endüstrilerin başında gelmektedir. Özellikle günümüzde yapılan çalışmalarda çok sayıda bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimler izole edilmiş ve kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimler, spesifik etki göstermeleri ve düşük konsantrasyonlarda bile substrat reaksiyonlarını katalizlemeleri sebebiyle endüstride önemli kullanım alanına sahiptirler (Valverde vd., 2015).

Antik çağlardan beri farklı lezzetleri ile gıda tüketiminin bir parçası olan mantarlar, sahip oldukları diyet lifi, vitaminler ve özellikle D Vitamini ile önemli besin değerlerine sahiptirler (Ren vd., 2012). Doğada 2000'den fazla mantar türü olmasına rağmen bunlardan yaklaşık olarak 25'i yaygın bir şekilde gıda olarak kabul edilmektedir ve bunların çok az bir kısmı ticari olarak yetiştirilmektedir. Günümüzde pek çok mantar türü besleyici değerinin yanında enzim kaynağı yönünden de değerlendirilmekte ayrıca bir kısmı fonksiyonel gıda olarak da kabul edilmektedir. Doğada kendiliğinden yetişen bir bitki olarak mantarlar çok eski devirlerden beri zehir, ilaç ve besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Dünyada en yaygın olarak yetiştirilen mantarlar, sırasıyla *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* ve *Lentinula edodes*'tir (Valverde vd., 2015).

P. ostreatus biyoteknolojik ve çevresel uygulamalarının yanısıra terapötik değeri oldukça yüksek olan bir mantar grubudur. Son yıllarda *Pleurotus* spp., ile ilgili patent, araştırma ve çalışmalar katlanarak artmaktadır. Biyoteknolojide kullanılabilirliği ile enzim üretimindeki yetenekleri, sahip olduğu bileşikler tanıma ve izolasyon çalışmaları, tıbbi potansiyeline bağlı olarak derinleşen çalışmalar her geçen gün *P. ostreatus*'un da önemini artırmaktadır (Carvalho vd., 2010; Atri vd., 2013; Inacio vd., 2015).

Tirozinaz, melanin biyosentezinde yer alan anahtar bir enzimdir. Meyve ve sebzelerin istenmeyen enzimatik esmerleşmesinden sorumludur, bu da yeni tirozinaz inhibitörlerinin tanımlanmasını son derece önemli kılmaktadır (Parvez vd., 2017). Atık su ve kirlenmiş toprakta bulunan fenolik bileşiklerin detoksifikasyonunda, parkinson hastalarının tedavisi için kullanılan bir ilaç olan *L-Dopa*'nın (*L*-3,4-dihidroksifenilalanin) biyosentezinde, bitkilerde savunma mekanizmasında yer alan lignin, tanenler, flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin üretiminde yer almaktadır. Bu gibi pek çok endüstride kullanılmasının yanı sıra pestisitlerle mücadele için geliştirilen çoğu üründe önemli rol oynamaktadır. Özellikle bazı toksik bileşiklerin tespiti için biyosensör geliştirilmesi çalışmalarında enzim inhibisyonuna dayalı çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Nawaz vd., 2017).

Tirozinaz, afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir ve oksijeni organik bir molekülün (fenol) yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk

tanımlanan enzimdir. Tirozinazlar, doğada funguslarda ve bakterilerde, yüksek bitkilerde ve hayvanlarda (organlarında) bulunur (Nawaz vd., 2017).

Bu tez çalışmasında *P. ostreatus* mantarının ülkemizde üretimin ve ulaşımının kolay olması aynı zamanda polifenol oksidaz enzimleri açısından en zengin doğal kaynaklardan birisi olması sebebiyle tercih edilmiştir.

Enzimlerin kinetik davranışlarını anlamak ve tespit edebilmek için inhibisyon kinetiklerinin bilinmesi önemlidir. Bu tez çalışması ile *P. ostreatus*'tan tirozinaz enziminin öncelikle saflaştırılması ve karakterizasyonu, sonrasında enzimin difenolaz aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin inhibitör etkisinin *in vitro* incelenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Canlıların hücrelerinde sentezlenen enzimler, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan, yan ürün vermeksizin %100 verimle ürün oluşturan katalizörlerdir. Ribozimler dışındaki bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttıırırlar. Enzimler, substrat adı verilen reaksiyona katılacak molekülleri tanıyarak, onlarla spesifik etkileşimler kurarak, kimyasal bağları kırıp, yeni bağlar oluşturarak, reaksiyonun gerçekleşme hızını arttıırırlar.

Enzimler, hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyerek metabolizmayı kontrol ederler:

1. Sindirimi sağlarlar: Sindirim enzimleri, gıdaların sindirimi için gereklidir. Bu enzimler, proteinlerin, karbohidratların ve yağların parçalanmasına yardımcı olurlar.
2. Savunma mekanizmalarında rol alırlar: Enzimler, bağışıklık sistemi tarafından salgılanan proteinlerin bir parçasıdır ve patojenleri yok etmeye yardımcıdırlar.
3. Genetik materyalin işlenmesinde önemlidirler: DNA replikasyonu, RNA sentezi ve protein sentezi gibi genetik materyal işleme süreçleri, enzimlerin varlığı olmadan gerçekleşemez.
4. Endüstriyel uygulamalarda kullanılırlar: Tekstil, gıda, ilaç, tıp, kâğıt, biyoyakıt üretimi vb. alanlarda kullanılırlar.
5. Tıp alanında önemli bir rol oynarlar: Enzimler, hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde kullanılan biyobelirteçlerdir.

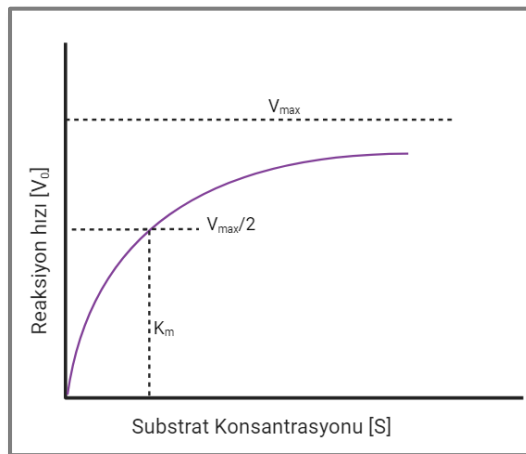
2.1.1. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen biyokimyasal reaksiyonların bilimidir. Kinetik analizin esas amacı, substratların ürüne dönüşümünde izlenen yolun ve hızın nasıl ve hangi hızla oluştuğunu anlamaktır.

Enzim kinetiği, deneysel parametrelerin reaksiyon hızlarını etkilemesi ile ilgilenir. Parametreler arasında enzimlerin konsantrasyonları, substratlar, oluşan ürünler, inhibitörler, aktivatörler, sıcaklık, pH ve iyonik şiddet bulunur (Segel, 2013).

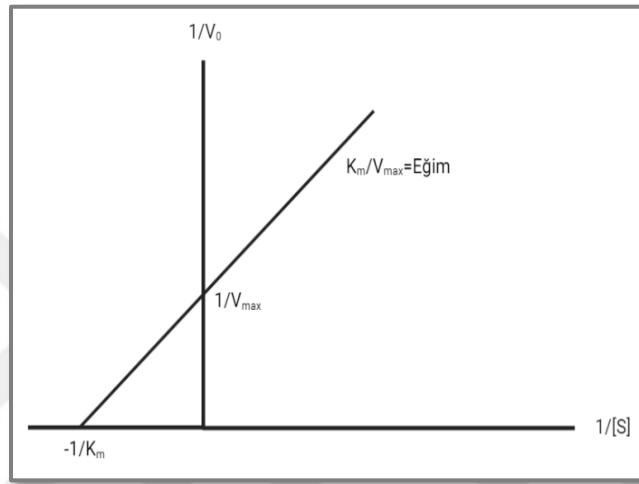
Enzimatik reaksiyonların kinetikleri üzerine yapılan ilk çalışmalar 1913 yılında Michaelis ve Menten adlı araştırmacılar tarafından yapılmış olup, günümüzde kendi isimleri ile anılan kuramları ortaya atmışlardır. Bu araştırmacıların oluşturdukları Michaelis-Menten kuralına göre enzim önce substrat ile birleşerek ES kompleksini oluşturur. İkinci aşamada enzim substratını ürüne dönüştürür, serbest enzim ve ürün ortaya çıkar. Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızının nasıl değiştiğini Michaelis-Menten grafiği göstermektedir (Şekil 2.1.).

K_m enzimin substrata olan ilgisini yansıtır ve belli bir substrata özeldir. (Roskoski, 2015).



Şekil 2.1. Michaelis-Menten grafiği

Reaksiyon hızı (V_0), substrat konsantrasyonu $[S]$ 'ye karşı çizildiğinde hiperbolik eğrinin yüksek substrat konsantrasyonlarındaki yukarı doğru eğimi nedeniyle, V_{max} 'ı belirlemek her zaman mümkün olmayacağı için Lineweaver-Burk grafiği tercih edilmektedir. Sonuç olarak, $1/[S]$ 'ye karşı $1/V$ grafiği oluşturulduğunda lineer bir doğru elde edilir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Lineweaver-Burk grafiği

2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Katalize edilen kimyasal reaksiyon, bir enzimi diğerinden ayıran spesifik özelliktir ve enzimler katalizledikleri reaksiyona göre ayrılırlar:

1. Oksidoredüktazlar: Hem anaerobik hem de aerobik metabolizmalarda yer alan, redoks (oksidasyon-redüksiyon) tepkimelerini katalizleyen geniş bir enzim grubudur. Bu enzimler melanin sentezi, lignin oluşumu/bozulması ve protein katlanması gibi farklı biyolojik rollere sahip olsalar da belirgin substrat spesifikliği, biyopolimerler (proteinler ve karbohidratlar gibi) arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonlarını katalize etmelerini sağlar (Ercili-Cura, 2015).

2. Transferazlar: Belirli işlevsel grupların, bir molekülden diğer moleküllere transferini katalize eden enzimlerdir. Bu gruplar, genellikle bir amino asit, karboksilik asit veya fosfat grupları olabilir.
3. Hidrolazlar: Bir bağın hidrolozini su molekülü ile katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Çeşitli kimyasal bağları kırabilen çoğunlukla bunu yeni bir çift bağ veya halka yapısı oluşturarak gerçekleştiren bir enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Bu enzimler, bir molekülün yapısal izomerizasyonunu (izomer oluşturarak veya mevcut izomerler arasında değişim yaparak) katalizler.
6. Ligazlar: Bu enzimler, iki molekülü birleştirerek katalize eder. Çoğunlukla ATP'nin ADP'ye dönüşmesi ile açığa çıkan yüksek enerji kullanılır.

2.1.2.1. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, elektronların bir molekülden, aynı zamanda elektron verici olarak adlandırılan indirgeyiciden, elektron alıcısı olarak adlandırılan oksidana transferini katalize eden enzimdir. 1856 yılında Schoenbein, oksijenin bazı bitkilerde aerobik oksidasyonu tetikleyen bir oksitleyici madde olarak işlev gördüğüne dikkat çekerek, oksidazlarla ilgili ilk çalışmaların temellerini atmıştır. (Whitaker, 1995)

Oksidoredüktazlar, dehidrogenazlar veya oksidazlar olarak ikiye ayrılır. Oksidazlar genellikle moleküler oksijen, hidrojen veya elektron alıcısı olarak işlev gördüğünde devreye girer. Dehidrogenazlar ise, hidrojeni NAD/NADP veya bir flavin enzimi olan bir akseptöre aktararak bir substratı oksitleyerek çalışır. Hidroksilazlar, oksijenazlar, redüktazlar ve peroksidazlar da oksidoredüktazlara aittir. Yaygın olarak kullanılan pestisitler, herbisitler gibi tarım kimyasallarının biyolojik olarak parçalanması için peroksidaz enzimleri önemli kullanım alanına sahiptir (May, 1999).

Hidroksilazlar, substratlarına hidroksil grupları verir. Oksijenazlar, oksijeni moleküler oksijenden organik substratlara dahil eder. Redüktazlar oksidazlar gibi

davranabilir ve indirgemeleri katalize eder. Peroksidazlar peroksizomlara yerleştirilir ve hidrojen peroksitin indirgenmesini katalize eder (West, 1980).

2.1.2.2. Polifenol oksidazlar (PFO)

1856 yılında Schoenbein, yemeklik mantarda bulunan PFO'yu ilk kez tespit etmiştir (Whitaker, 1995). Bazı hayvansal organlarda, mikroorganizmalarda, özellikle funguslarda ve bazı bitkilerde bulunan polifenol oksidazlar aktif bölgesinde kofaktör olarak bakır bulunduran oksidoredüktaz grubuna ait metalloenzimdir. Enzimin bitki hücrelerindeki dağılımı, meyve ve sebzelerde olgunluğa, bitkilerde tür ve yaş gibi faktörlere bağlıdır. Polifenol oksidazlar, fenolik bileşikleri substrat olarak kullanarak, substratlarını oksijen varlığında kahve renkli tonlarda bileşiklere oksitlemektedirler (Harel vd., 1964).

Polifenol oksidazlar; Tirozinazlar (E.C. 1.14.18.1), lakkazlar (E.C. 1.10.3.2) ve katekol oksidazlar (E.C. 1.10.3.1) olmak üzere üç gruba ayrılır. Bu enzim grupları, aktif hale gelmek için moleküler oksijene gereksinim duyar ve faaliyetleri için koenzim kullanmazlar (Sheptovitsky ve Brudvig, 1996).

Tirozinazlar (E.C. 1.14.18.1), monohidroksi fenollerin O₂ varlığında o-kinonlara; lakkaz enzimi (E.C. 1.10.3.2), p-dihidroksi fenollerin O₂ varlığında p-kinonlara, katekol oksidaz enzimi (E.C. 1.10.3.1) ise o-difenol yapısının o-kinonlara oksidasyonunu katalizleyen enzimlerdir (Sanchez-Amat ve Solano 1997).

2.1.3. Enzim aktivitesi ve aktiviteyi etkileyen faktörler

Enzim aktivitesi, dakikada dönüştürülen substratın veya oluşan ürünün mikro molları olarak ifade edilen, enzim tarafından katalize edilen reaksiyon hızını gösteren birimler cinsinden ölçülür. Protein yapılı olan enzimler, biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran yapısal bileşenlerdir ve faaliyetleri, pH, sıcaklık, substrat doygunluğu, iyonik ortamın gücü, inhibitörler ve aktivatörler gibi çeşitli etmenlerden etkilenebilir. Bunlar:

pH: Enzimler, belirli bir pH aralığında optimum aktivite gösterir, bu pH aralığının dışındaki aralıklarda enzim aktivitesi azalabilir veya tamamen durabilir. Enzimler, asidik ve bazik amino asitler içeren protein yapısındadır. Bu asidik ve bazik amino asitler enzimlerin katalitik aktivitelerini sağlayan aktif bölgededir. Farklı pH değerlerinde bu amino asitler protonları kabul edebilir veya salabilir. pH, enzimlerin üç boyutlu yapısını şekillendirir, aktif bölgelerinin korunmasını ve şekillendirilmesini sağlar. Her enzim, etkinliğini gösterdiği belirli bir pH aralığına sahiptir. pH, enzimin aktif bölgesini, yük dağılımını değiştiren enzim-substrat etkileşimini etkiler. Bazı enzimler asidik pH'ta optimum aktivite gösterirken, bazıları bazik pH'ta optimum aktivite gösterir. Örneğin, mide enzimi olan pepsin asidik pH'ta (pH 2-3), pankreas enzimi olan tripsin bazik pH'ta (pH 8-9) optimum aktivite gösterir.

Sıcaklık: Enzimatik tepkimenin hızı, sıcaklığın artmasıyla birlikte enerji engelini aşarak ürün moleküllerinin oluşum hızını artırır. Fakat belli bir sıcaklıkta, enzimlerin yapısı bozulur ve denatüre olurlar, bu da etkinliklerini kaybederek tepkime hızının azalmasına yol açar. Optimum sıcaklık, her enzim için değişkenlik gösterir ve insan vücudundaki birçok enzim için bu optimum değer genellikle 37°C civarında, vücut sıcaklığına yakındır. (Nelson ve Cox, 2005).

Substrat Konsantrasyonu: Substrat konsantrasyonu, enzim aktivitesini önemli ölçüde etkileyebilen faktörlerden biridir. Genel olarak, enzim aktivitesi, maksimum noktaya ulaşana kadar belirli bir modeli izleyerek artan substrat konsantrasyonu ile artar. Düşük substrat konsantrasyonlarında, enzim molekülleri, substrat molekülleri tarafından tamamen işgal edilmez. Enzim-substrat kompleksi oluşum hızı, substratın mevcudiyeti ile sınırlıdır. Substrat konsantrasyonu arttıkça, enzimatik reaksiyon hızında bir artışa yol açan daha fazla enzim-substrat kompleksi oluşur.

Substrat konsantrasyonu artmaya devam ettikçe, enzim molekülleri substrat ile doymuş hale gelir, bu da mevcut tüm enzim aktif bölgelerinin dolu olduğu anlamına gelir. Bu noktada, enzimin maksimum hızına (V_{max}) ulaştığı söylenir. Substrat konsantrasyonunun bu noktadan daha fazla artırılması, enzim maksimum kapasitesinde çalıştığı için reaksiyon hızını önemli ölçüde artırmaz.

İnhibitörler ve aktivatörler: Biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinler olan enzimlerin aktivitesini etkileyebilen maddelerdir. Enzim inhibitörleri, bir enzimin aktivitesini azaltan veya tamamen engelleyen moleküllerdir. Enzim aktivatörleri, bir enzimin katalitik aktivitesini artıran moleküllerdir. İnhibitörlerin ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerindeki spesifik etkisi, bunların etki mekanizmasına ve ilgili enzime bağlıdır.

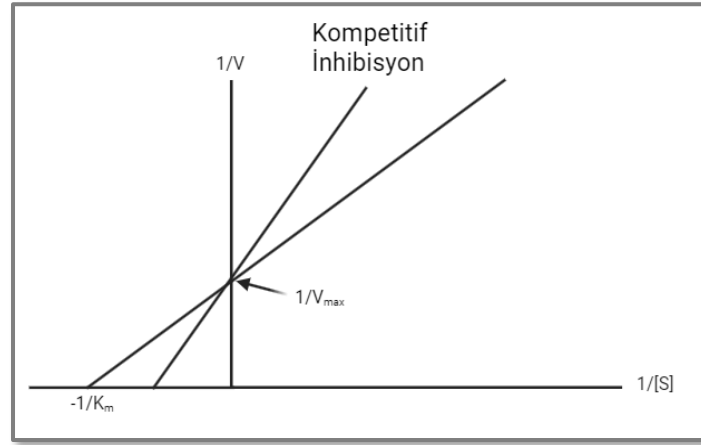
2.1.4. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibitörleri, enzimin substrata olan afinitesini düşürerek, kataliz için mevcut olan enzimin aktivitesini azaltan ya da tamamen durduran maddelerdir. İnhibitör etkisiyle enzimatik tepkimelerin hızının azalması veya enzimlerin kataliz görevini yerine getirmelerini tamamen engellenmesi durumuna “inhibisyon” denir.

Enzim inhibisyonu, geri dönüştürülebilir veya geri dönüştürülemez olmak üzere iki türlü gerçekleşebilir. Geri dönüşümsüz inhibisyon türünde, inhibitör molekülü enzimin aktif bölgesine (kovalent) bağlanarak reaksiyonun katalizini engeller. Sonuç olarak, enzim kalıcı olarak inaktif hale gelir. Geri dönüşümlü inhibitörler, enzime kovalent olmayan bağlarla bağlanır. Enzim-inhibitör kompleksinin oluşumu, geri dönüşebilen inhibitörün ayrışması ve enzim aktivitesinin tekrar kazanılması olarak üç aşamalı bir süreç izler. Dönüşümlü inhibisyon türleri; yarışmasız (nonkompetitif), yarışmalı (kompetitif), ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonlar olmak üzere incelenir (Roberts ve Gibb, 2013).

Yarışmalı inhibisyon:

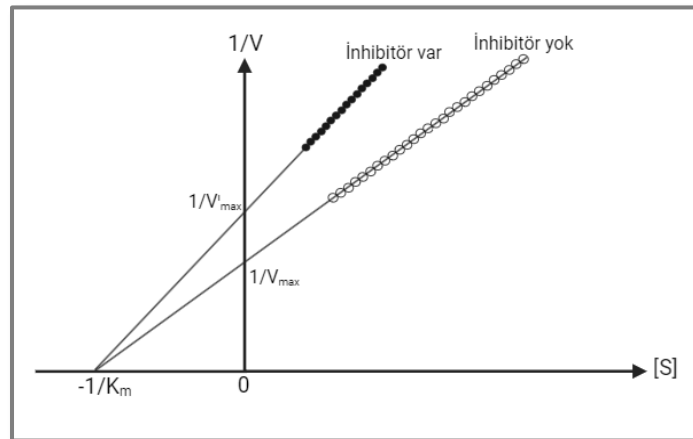
Yarışmalı inhibitörler, substrata benzer bir yapıya sahiptir ve enzimin aktif bölgesiyle substrat arasında bir yarışma yaratarak bu bölgeye bağlanır. Enzimin inhibitör ile bağlanması reversibldir, substrat konsantrasyonu arttırılarak inhibitör bağlanma bölgesinden uzaklaştırılabilir. Kompetitif enzim inhibisyonunda enzimin substratına olan ilgisi inhibitör madde etkisiyle azalır; K_m değeri artar, V_{max} değerinde değişim olmaz (Şekil 2.3.) (Ferrier, 2014).



Şekil 2.3. Yarışmalı inhibisyon grafiği

Yarışmasız inhibisyon:

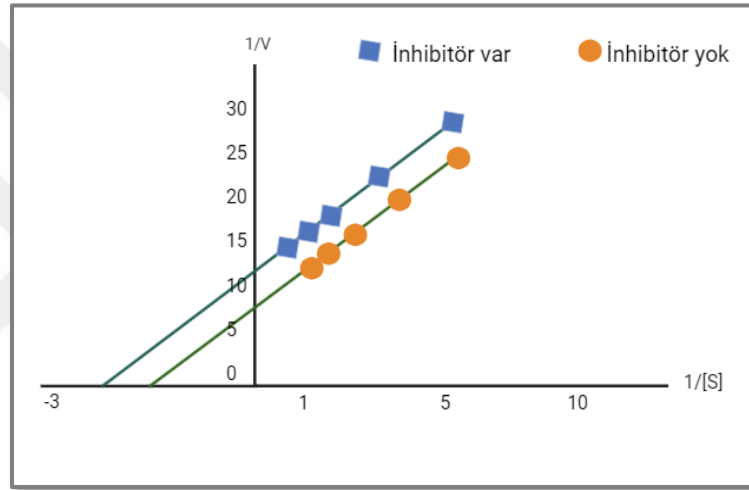
Yarışmasız inhibitörler yapısal olarak substrata benzemez ve enzimin aktif bölgesi dışındaki bölgelere geri dönüşümlü olarak bağlanır. Bu inhibitörler, serbest enzimlere veya ES kompleksine bağlanarak reaksiyonun gerçekleşmesini engelleyebilir. (Lehninger, 2005). Katalitik bölge inhibitörün varlığından etkilendiği için reaksiyon hızı azalır. Böylece $V_{\max}$ azalır, ancak yarışmasız inhibitörler substratın bağlanma bölgesini etkilemediği için enzimin substrata olan afinitesini etkilemez dolayısıyla K_m değişmeden kalır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Yarışmasız inhibisyon grafiği

Yarı yarışmalı inhibisyon:

Unkompetitif inhibisyon, inhibitörün enzimin aktif bölgesi dışındaki bir bölgeden ve yalnızca enzim-substrat kompleksine bağlanarak gerçekleşir. İnhibitör, enzim yerine enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanabilir. Bu bağlanma sonucunda ES kompleksi ortamdan uzaklaşır, bu da enzimin substrata olan ilgisinin azalmasına ve K_m değerinin artmasına yol açar. Ortamda sürekli olarak ESI kompleksi bulunacağından V_{max} değeri azalır (Şekil 2.5.) (Waldrop, 2020).

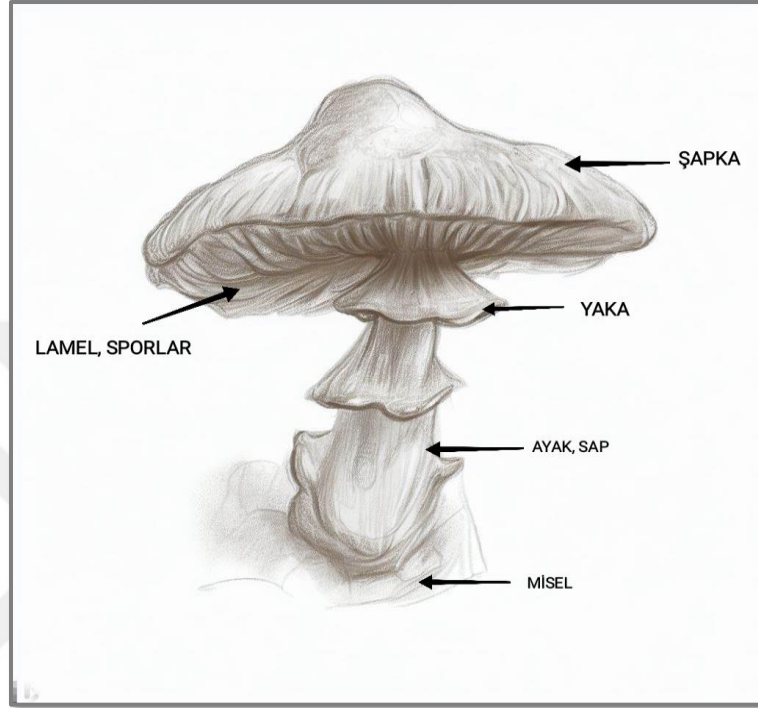


Şekil 2.5. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği

2.2. Mantarlar

Günümüzde pek çok mantar türü besleyici değerinin yanında enzim kaynağı yönünden de değerlendirilmekte ayrıca bir kısmı fonksiyonel gıda olarak da kabul edilmektedir. Besin kaynağı olarak tüketilmesinin yanında birçok farklı kullanım alanı bulunan organizmalardır. Ekosistemlerin döngülerinde önemli rol oynayan mantarlar özellikle çürüten organik maddeleri parçalayarak bölme işlevlerini görürler. Bu sayede, geri dönüşüm süreçlerine katkıda bulunurlar. Ekolojik öneminin yanında antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antikanser gibi biyoaktif özellikler göstermesi sebebiyle tıp ve farmakoloji alanında da büyük ilgi uyandıran kaynaklardır (Venturella vd., 2021).

Mantarlar çok çeşitli şekillerde, boyutlarda ve renklerde olabilir. Mantarların 5 ana yapısı vardır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Olgunlaşmış bir istiridye mantarının yapısı

Kap; Mantar başlığı, mantarın en görünür kısmıdır. Genellikle şapkaya benzer kavisli bir şekle sahiptir ve mantarın sapının üstüne oturur. Kapak bir şemsiyedir ve altındaki spor üreten yüzeyi korur.

Kapak Alt Tarafı; Mantar solungaçları, mantarın üreme sürecinde spor üretmesine ve onları havaya dağıtmasına yardımcı olmaktan sorumludur.

Yaka; Tüm mantar saplarında halka yoktur. Halka, sapın tabanının etrafında bulunur ve bir etek gibi dışarı doğru açılır. Mantar başlığı genişleyip büyüdükçe koruyucu örtü formunu aşar ve örtü kırılarak mantar sapının etrafında bir halka oluşturmak üzere ayrılır.

Kök; Miselyum, çok sayıda mantar meyve gövdesini bir ağda birbirine bağlayarak toprağın yüzeyinin altında büyür. Miselyum, ağaç kabuğu ve bitki kökleri gibi substratlardan besinleri taşıyarak ve emerek mantarın beslenmesine yardımcı olur (Dorr, 2022).

2.2.1. İstiridye mantarı ve özellikleri

P. ostreatus, *Polyporaceae* familyasına ait olan ve yetiştirilen *Pleurotus* cinsine mensup bir mantar türüdür. Dünya genelinde, *Agaricus bisporus*'tan sonra en yaygın şekilde yetiştirilen ikinci yenilebilir mantar olarak bilinir. (Sanchez, 2010).

Pleurotus mantarı istiridye şekline benzediği için dünyada çoğunlukla “oyster mushroom” olarak adlandırılmakta ve halk arasında istiridye, kayın, kavak, yaprak gibi isimlerle bilinmektedir. Üretimi ilk olarak 1917 yılında Almanya’da Flanck tarafından kavak kütükleri üzerinde yetiştirilmeye başlanmasıyla yapılmıştır (Kibar, 2019).

İstiridye mantarının yetiştiriciliği ve tüketimi, önemli bir potansiyele sahiptir. *Pleurotus* türleri, *A. bisporus*'a kıyasla daha kolay yetiştirilebilir, düşük maliyetlerle ve düşük teknoloji gerektiren yöntemlerle üretilebilir. Ayrıca, iklimsel gereksinimleri daha az seçicidir, çevreye daha uyumlu, hastalıklara ve zararlılara karşı daha dayanıklıdır. Yüksek verim potansiyeline ve kısa yetiştirme sürelerine sahip olmaları da bu türleri tercih edilir kılmaktadır. *Pleurotus* türleri, çürükçül mantarlar olarak bilinir ve talaş, buğday, mısır koçanı ve sapı, pamuk artığı, atık kâğıt, çay ve kahve posaları, fındık kabukları gibi tarımsal ve endüstriyel atıkların yanı sıra ikinci bir kullanım potansiyeli olmayan pek çok atık üzerinde başarılı bir şekilde yetiştirilebilmektedirler (Şekil 2.7.) (Kibar, 2019).

P. ostreatus biyoteknolojik ve çevresel uygulamalarının yanı sıra besin değeri ve terapötik değeri oldukça yüksek olan bir mantar grubudur. Son yıllarda *P. ostreatus* ile ilgili patent, araştırma ve çalışmalar katlanarak artmaktadır. Kültür teknikleri, kimyasal kompozisyonu ve besinsel değerinin profili, biyoteknolojide kullanılabilirliği ile enzim üretimindeki yetenekleri, sahip olduğu bileşikler tanıma ve izolasyon çalışmaları, tıbbi potansiyeline bağlı olarak derinleşen çalışmalar her geçen gün *P. ostreatus* ’un önemini artırmaktadır (Carvalho vd., 2010; Atri vd., 2013; Inacio vd., 2015).



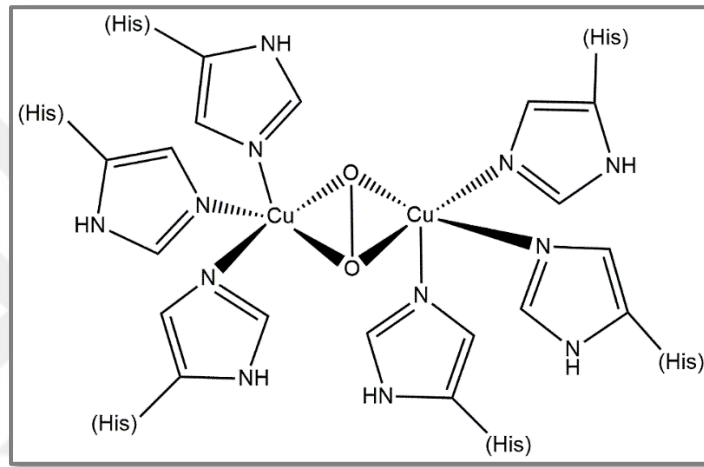
Şekil 2.7. Kompostta yetiştirilen *P. ostreatus* (İstiridye mantarı)

2.3. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz, aktif bölgesinde altı tane nitrojen atomu içeren histidin aminoasidi bulunduran, moleküler oksijen ile etkileşim halinde olan bir metalloenzimdir. Tirozinaz enziminin aktif bölgesinde iki bakır (kofaktör) atomu (Şekil 2.8.) bulunmaktadır (Polatoğlu, 2016). Tirozinaz, değişen sayıda alt birimlerle oligomerik bir yapı oluşturur ve bu alt birimlerin sayısı, kaynaklarına bağlı olarak değişmektedir. Bazı çalışmalar, tirozinazın, her biri dört özdeş alt birimden oluşan ve her biri bir bakır atomu içeren bir yapıya sahip olduğunu öne sürmektedir. Bu hipotez, Jolley vd. tarafından yapılan deneylerle desteklenmiştir. *Streptomyces nigrifaciens*'ten saflaştırılan tirozinaz molekülleri, her biri bir

bakır atomu içeren 18 kDa'lık bir kütleye sahipken, *Streptomyces glaucescens*'ten elde edilen tirozinazın molekül kütlesi ise 29 kDa olarak rapor edilmiştir (Çörtenlioğlu, 2006).

Tirozinaz (E.C. 1.14.18.1), farklı isimlerle de anılan bir polifenol oksidazdır: monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak anılır. Tirozinaz adı, enzimin özellikle monohidroksifenilalanin ve dihidroksifenilalanine karşı belirgin bir spesiflik göstermesinden gelmektedir (Whitaker, 1994).



Şekil 2.8. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi (Polatoğlu, 2016)

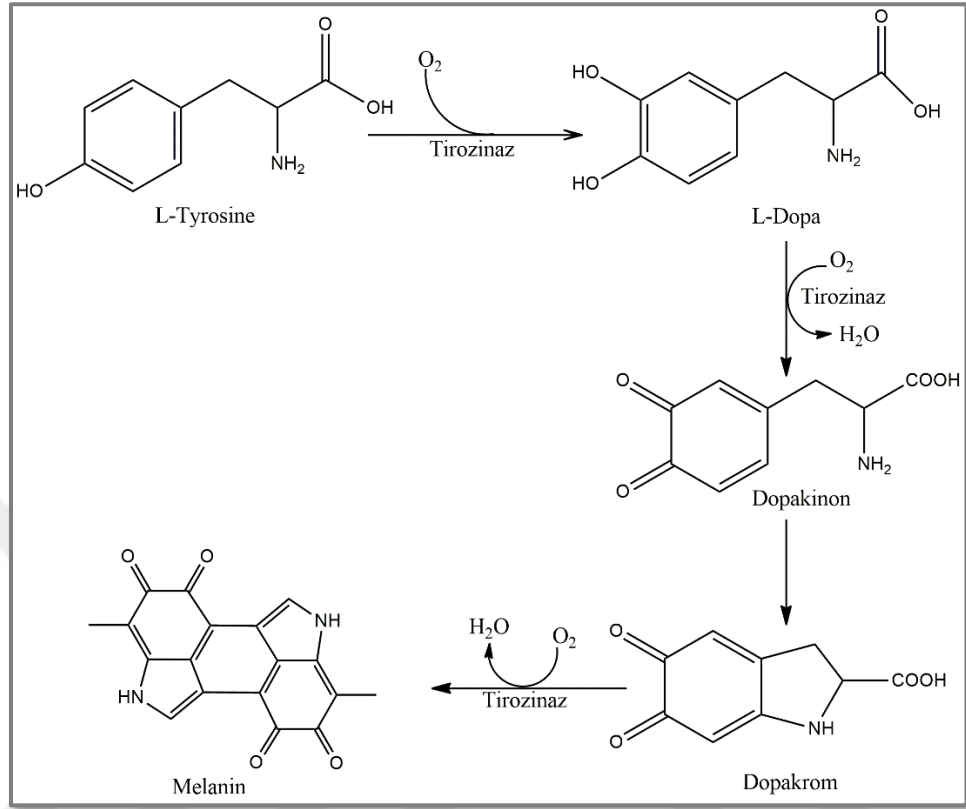
Afinite kromatografi ile saflaştırılan ilk enzim olan tirozinaz, oksijeni organik bir molekül olan fenolün yapısına doğrudan ekleyebilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir. Duckworth vd. tarafından 1970 yılında mantardan saflaştırılan tirozinaz enziminin amino asit analizi yapılmış ve özellikle aspartik asit ve glutamik asit açısından zengin olduğu tespit edilmiştir (Duckworth, 1970). Tirozinazlar, doğada funguslarda, bakterilerde, bitkilerde ve hayvan organlarında bulunur. Bir bitki veya dokuda belli bir protein homojen şekilde dağılmış olmaz, proteinin konsantrasyonu farklı dokularda daha az veya daha çok olabilir. Örneğin; yeşil yapraklarda, enzimin büyük kısmı kloroplastlarda bulunurken, patates yumrusunun hücresel fraksiyonlarında protein miktarıyla orantılı bir değerde tirozinaz enzimi saptanmıştır. Taze elma örneğinde ise bu enzim, kloroplast ve mitokondrilerde yoğunlaşmıştır (Whitaker, 1995).

2.3.1. Tirozinaz enzimi tabiattaki dağılımı

Tirozinaz, memeliler, kuşlar, sürüngenler, amfibiler, balıklar, böcekler, bazı bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda bulunur. Memelilerin derisinde, kıl köklerinde ve gözlerinde, çeşitli türlerde kürk, deri ve göz renginin belirlenmesinden sorumlu olan enzimdir. Kuşlarda gözlenen renk çeşitliliğine katkıda bulunan koyu siyah, kahverengi veya gri görünüm veren eumelanin ve açık sarı ile kırmızı görünüm veren sistein veya glutatyonun konjugasyonu ile oluşan feomelanin üretiminde yer alır (Galván ve Solano, 2016; Pillaiyar vd., 2017).

Bitkilerde tirozinaz, bitki büyümesi, konaklama direnci, savunma mekanizması gibi önemli işlevleri olan ligninin sentezinde yer alır. Tirozinaz aktivitesi, UV radyasyonu ve ağır metal maruziyeti gibi çeşitli çevresel stresler tarafından indüklenebilir. Artan tirozinaz aktivitesi, antioksidan görevi gören ve bitkileri bu çevresel faktörlerin neden olduğu oksidatif strese koruyan flavonoidlerin ve diğer fenolik bileşiklerin sentezi ile ilişkilidir. Bitkilerde enzimatik esmerleşmeye neden olan yine bu enzimdir (Liu, 2018).

Sadece bitkilerdeki enzimatik esmerleşmeden değil aynı zamanda memelilerdeki melanogenezden de sorumludur (Şekil 2.9.). Melanogenez süreci, ciltte farklı tonlar sağlayan ve güneşten gelen zararlı ultraviyole (UV) ışınlarına karşı korunmaya yardımcı olan indolik yapıdaki bir heteropolimer olan melanin oluşumudur. Tirozinazın etkisiyle ortaya çıkan aşırı melanin üretimi ise yaşlılık lekeleri, çiller, melazma ve malign melanom gibi cilt bozukluklarına yol açar (Casanola-Martin vd., 2014).



Şekil 2.9. Melanin sentezi basamakları

2.3.2. Tirozinaz enziminin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamaları

Enzim teknolojisi sürekli bir gelişim içindedir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlerin izolasyon ve saflaştırılması üzerinde durulmaktadır. Tirozinaz enzimi bifonksiyonelliği ve geniş substrat spektrumu nedeniyle gıda, sağlık, kozmetik, tekstil, tarım gibi pek çok uygulama alanına sahip bir enzimdir. Özellikle pek çok meyve ve sebze bulunması sebebiyle gıda sektöründe önemli bir alana sahiptir.

Fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederek meyve, sebze ve işlenmiş gıda ürünlerinde renk değişimlerinden sorumlu pigmentlerin oluşumuna yol açar. Gıda endüstrisinde olumsuz görüntü ve tat değişiklikleri, meyve suyu, şarap gibi içeceklerde bulanıklık ve çökelme oluşturarak zarara sebep olmaktadır. Gıda sektöründe bu gibi

istenmeyen durumların ortadan kaldırılması için tirozinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu durumun yanı sıra kurutulmuş meyveler, kahve, çay, kakao gibi gıda maddelerinin renklerini ve lezzetlerini arttırmak için tirozinaz enziminin aktivitesi önemlidir (Özel, 2008).

Melanin oluşumunda rol aldığı için, tıbbi ve kozmetik alanlarda, tirozinaz enzimi önemli bir ilgi odağı haline gelmiştir. Kozmetik sanayiinde güneşin zararlı ışınlarından korunmak amacıyla üretilirken, tirozinaz inhibitörleri melazma ve yaşlılık lekeleri gibi cilt hiperpigmentasyon bozukluklarını önlemek ve tedavi etmek için kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler, tirozinazın aktivitesini inhibe ederek melanin üretimini azaltır ve ciltte aydınlatma etkisine yol açar (Yapar, 2017).

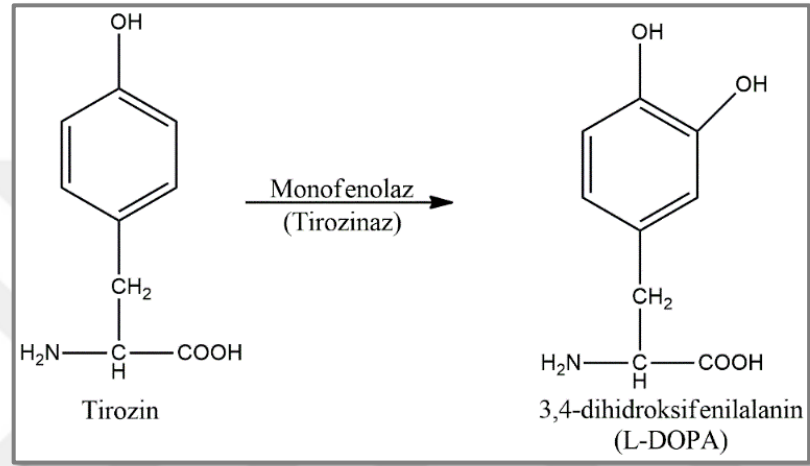
Tirozinazın atık sudan fenolik kirleticilerin uzaklaştırılması gibi çevresel uygulamalardaki potansiyeli, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederek onları daha az toksik ve daha kolay parçalanabilir formlara dönüştürebildiği araştırılmıştır.

L-Dopa, dopaminin öncüsüdür, bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla dopamine dönüştürülür. Beyinde dopamin eksikliği ile karakterize nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. *L-Dopa*'nın kimyasal sentezi çeşitli toksik ara ürünler, sınırlı ekonomik faydanın yanı sıra inaktif rasemik *D-L*-karişımıyla sonuçlanan çok adımlı prosedürler ve zorlu reaksiyon koşulları gerektirir. Bunun yanında biyotransformasyon ile *L-tirozinden L-Dopa*'ya dönüşüm tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Tirozinaz aktivitesi ile *L-Dopa* üretimi kimyasal senteze kıyasla, avantajları sebebiyle tercih edilmektedir (Patil, 2013).

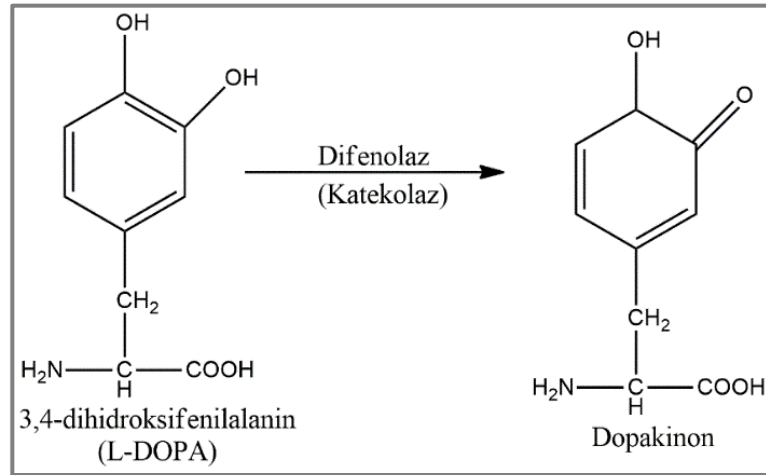
2.3.3. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve substratları

Tirozinaz, melanogenezin hız sınırlayıcı reaksiyonunu katalize eden oksidoredüktaz grubuna ait bir enzimdir. Melanogenez, tirozin amino asitinin tirozinaz enzimi tarafından oksitlenmesiyle başlar. Bu oksidasyon reaksiyonu, tirozinazın katalizlediği tirozin molekülünün 3,4-dihidroksifenilalanin bileşiğine dönüşümünü içerir. Bu ilk adım, melanin sentezindeki hız sınırlayıcı adımdır, çünkü reaksiyon dizisinin geri kalanı fizyolojik bir pH değerinde kendiliğinden ilerleyebilir (Chang, 2009).

Bakır içeren tirozinaz enzimi moleküler oksijen varlığında, katekolaz ve krezolaz olmak üzere iki aktivite göstermektedir. Birincisi, monofenolaz veya krezolaz aktivitesi olarak bilinen, monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonudur (Şekil 2.10.). Diğeri ise difenolaz veya katekolaz aktivitesi olarak bilinen difenollerin *o*-kinonlara yükseltgenmesidir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.10. Tirozinazın Monofenolaz aktivitesi

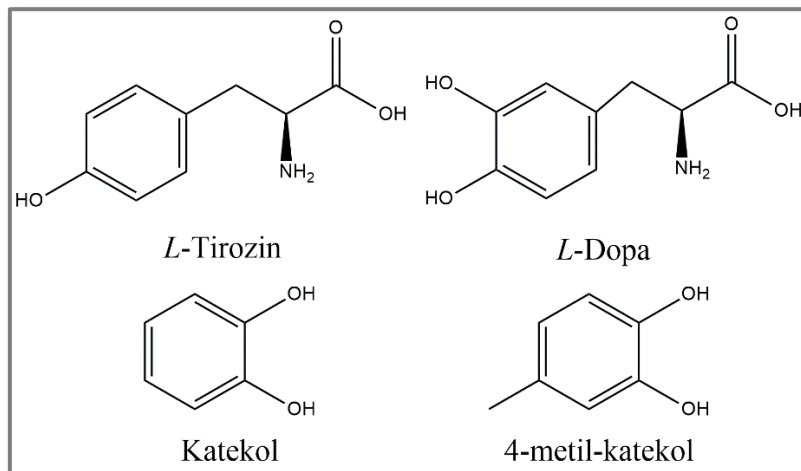


Şekil 2.11. Tirozinazın Difenolaz aktivitesi

Tirozinazın substratı tirozin, enzim tarafından DOPA'ya (3,4-dihidroksifenilalanin) dönüştürülen amino asittir. Tirozini dopa'ya dönüştürdükten sonra, tirozinaz enzimatik aktivitesini sürdürür ve ayrıca *L*-Dopa'nın dopakinona dönüşümünü katalize eder.

Çizelge 2.1. Tirozinazın substratları (Abdulazeez, 2022)

Substrat	Aktivite	λ (nm)
Fenol	Monofenolik	410
<i>p</i> -Krezol	Monofenolik	400
<i>L</i> -tirozin	Monofenolik	475
Katekol	Difenolik	500
4-metilkatekol	Difenolik	410
4-terseyerbütilkatekol	Difenolik	410
<i>L</i> -Dopa	Difenolik	475
Gallik Asit	Trifenolik	380
Pirogallol	Trifenolik	334

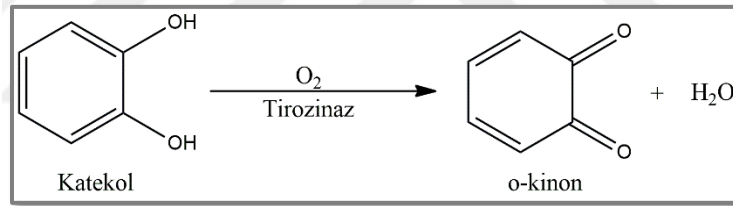


Şekil 2.12. Çalışmada kullanılan substratların yapıları

2.3.4. Tirozinaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Tirozinaz aktivitelerinin *in vitro* analizi çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur. Bu amaçla kronometrik, manometrik, radyometrik, oksimetrik, elektrokimyasal ve spektrofotometrik tekniklere dayalı farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerde spektrofotometrik teknik; uygun, hassas, ucuz ve reaksiyonun sürekli olarak çalışılmasına izin vermesi sebebiyle, diğer yöntemler ile kıyaslandığında daha fazla kullanılan tekniklerden biri olmuştur.

Spektrofotometrik analizlerde genellikle substratların oksidasyonu gözlenir veya bir ürünün oluşma hızı izlenerek enzim aktivitesi belirlenir (Şekil 2.13.). Yaygın olarak kullanılan substratlar *L*-tirozin, *L*-Dopa ve katekol bu türün iyi örnekleridir (Şekil 2.12.) (Haghteen ve Tan, 2003).



Şekil 2.13. Katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile o-kinona dönüşümü

2.3.5. Tirozinaz enziminin inhibisyonu

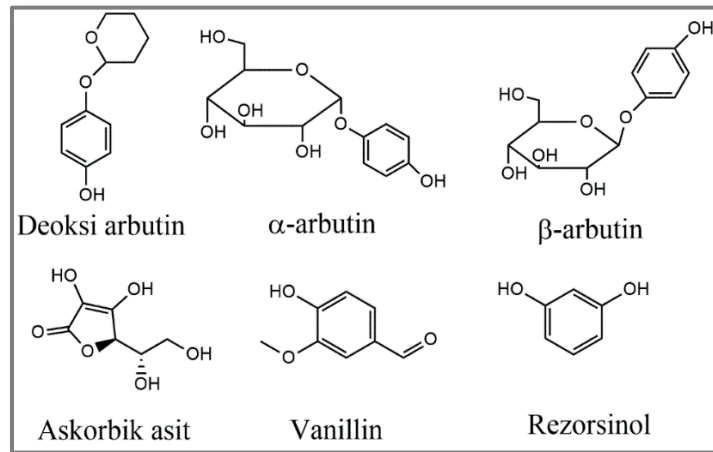
Tirozinaz aktivitesinin inhibisyonu hiperpigmentasyon bozukluklarının tedavisi, cilt rengini açan ajanların geliştirilmesi, gıda endüstrisinde tirozinaz enziminin neden olduğu enzimatik esmerleşmenin önlenmesi ve melanogenezdeki büyük önemi nedeniyle, potansiyel inhibitör bileşikler üzerine çalışmalar devam etmektedir. Hem doğal hem de sentetik kaynaklardan bir dizi tirozinaz inhibitörü tanımlanmıştır (Şekil 2.14.) (Mayer, 2006).

Yaygın olarak kullanılan inhibitörlerden bazıları şunlardır:

Hidrokinonlar, kozmetik hiperpigmentasyon tedavisinde, cilt aydınlatma ürünlerinde klinik olarak kullanılan hidrokinon, iyi bilinen bir tirozinaz inhibitörüdür. Ciltte melanin üretimini azaltarak çalıştığı için kalıcı melanosit kaybına ve lipidlerin oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen türleri üreterek ciddi sorunlara neden olduğu tespit edilmiştir. Kojik asit, enzimin aktivitesi için gerekli olan bakır iyonlarını şelatlayarak tirozinazı inhibe eder. Kozmetikte bir cilt beyazlatma maddesi ve enzimatik esmerleşmeyi önlemek için bir gıda katkı maddesi olarak kullanılan tirozinaz inhibitörüdür (Deri vd., 2016).

Flavonoidler, tirozinaz inhibitörleri olarak işlev gören doğal fenolik bileşikler arasındaki temsili sınıftır. Polifenolik bileşikler arasında, çoğunlukla bitkilerde, meyvelerde ve sentetik kaynaklarda bulunan bazı flavonoid türevlerinin, güçlü tirozinaz inhibitörleri olduğu tespit edilmiştir (Ergün, 2016; İstanbulluoğlu vd., 2019).

Mantar tirozinaz inhibitörlerinin bir başka ana sınıfı, hidroksistilbenlerdir. En aktif bileşikler arasında oksiresveratrol ve özellikle di-hidroksi resveratrol ile ana resveratrolün çeşitli türevleri potansiyel pigment giderici ajanlar olarak tanımlanmıştır. (Panzella ve Napolitano, 2019) Askorbik asit, üzerinde en çok çalışılan tirozinaz inhibitörüdür. Dopakinonun melanine dönüşümünü önleyen bir indirgeyici ajan görevi görür. Retinoidler, genellikle cilt aydınlatma ve yaşlanma karşıtı amaçlar için diğer tirozinaz inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılırlar. Arbutin, üzüm ve dut gibi bazı bitkilerde bulunan doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Melanin sentezinde önemli bir adım olan *L*-tirozinin *L*-Dopa'ya dönüşümünü engelleyerek tirozinaz inhibitörü olarak görev görür (Şenol vd., 2014).



Şekil 2.14. Tirozinaz inhibitörleri (Zolghadri vd., 2019)

2.4. Pestisitler

Pestisitler, tarım ürünlerinin, hayvansal gıdaların üretimi, hasatı, depolanması ve taşınması sırasında zararlı veya istenmeyen böcekler, kemirgenler, yabani otlar, mantarlar ve diğer organizmaları kontrol etmek veya ortadan kaldırmak amacıyla kullanılan kimyasal veya biyolojik bileşenlerdir. Tarımda, halk sağlığında ve çeşitli endüstrilerde mahsulleri korumak, hastalıkların yayılmasını önlemek ve haşere popülasyonlarını yönetmek için yaygın olarak kullanılırlar (Michael ve Alavanja, 2009). Pestisitler, görünümlerinden fiziksel yapılarına, etki alanlarından zararlı organizmaların biyolojik döngülerine, içerdikleri etken maddelerden toksisitelerine ve uygulama metotlarına kadar bir dizi faktöre göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulurlar. Hedef alınan organizmaya göre;

Çizelge 2.2. Pestisitlerin hedef organizmaya göre sınıflandırılması (Kurutaş ve Kılınç, 2003)

İnsektisit: Böcek ve haşeratı yok etmek veya kontrol altında tutmak için kullanılan ilaçlardır.
Herbisit: İstenmeyen bitki türlerini yok etmek veya kontrol altında tutmak için kullanılan ilaçlardır.
Mollusisit: Yumuşakçaları kontrol etmek veya öldürmek için kullanılan ilaçlardır.
Fungusit: Mantarların büyümesini engelleyen veya onları öldüren ilaçlardır.
Rodentisit: Kemirgenlerin (örneğin, farelerin ve sıçanların) kontrolü için kullanılan ilaçlardır.
Akarisit: Akarlara akarları kontrol etmek veya öldürmek için kullanılan ilaçlardır.
Nematosit: Nematod kontrolü için kullanılan ilaçlardır.

Pestisitler, haşere popülasyonlarını yönetmede ve ekinleri korumada etkili olmasına rağmen, çevre ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri konusunda endişeleri de artırmaktadır. Pestisit kalıntıları gıda ve su kaynaklarında birikerek potansiyel sağlık risklerine yol açmaktadır. Ek olarak böcek ilaçları; faydalı böcekler, kuşlar ve diğer yaban

hayatı dahil olmak üzere hedef olmayan organizmalar üzerinde istenmeyen etkilere sahip olmaktadır (Akdoğan vd., 2012).

2.4.1. Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

Zirai kimyasallar eylem hedeflerine, etki şekline, kimyasal yapılarına ve toksisitelerine göre sınıflandırılabilir. Kimyasal yapılarına göre pestisitler organoklorlar, organofosfatlar, piretroidler ve karbamatlar olarak dört ana sınıfa ayrılırlar (Castagna, 2019).

Organoklorlu pestisitler (OCP), moleküllerinde klor atomları bulunan, siklik bir yapıya sahip, düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiklerdir. Çok çeşitli zararlılara ve hastalık vektörlerine karşı etkinlikleri nedeniyle geçmişte tarımsal, endüstriyel ve halk sağlığı amaçları için yaygın olarak kullanılmıştır. Apolar yapılarından dolayı uygulandıkları bölgede uzun süre parçalanmadan kalmaları dolayısıyla çevredeki kalıcılıkları, besin zincirindeki biyolojik birikimleri, insan sağlığı ve vahşi yaşam üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri hakkındaki endişeler nedeniyle kullanımları önemli ölçüde azalmıştır. Etkinliğiyle bilinen organoklorlu pestisitler arasında DDT (Diklorodifeniltrikloroetan), aldrin, dieldrin, chlordane, metasiklor, endosülfan, heksaklorosikloheksan yer alır (Bhat, 2022).

Karbamatlar, karbamik asitten (NH_2COOH) türetilerek elde edilen organik bileşiklerdir. Suda çözünürlükleri genel olarak yüksek ve düşük buhar basıncına sahiptirler. Organoklorlu ve organofosfatlı pestisit sınıflarına kıyasla nispeten daha düşük çevresel kalıcılıkları nedeniyle tarımda ve haşere kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. En çok bilinen karbamatlı pestisitlerden bazıları; karbaril, karbofuran, aldicarb, pirimicarb'tır (Silberman ve Taylor, 2023).

Piretroidler, *Piretrum* bitkisinin (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) çiçeklerinde bulunan, piretrinlerin doğal türevli bileşiklerin sentetik analoglarıdır. Piretroidler, böceklerin sinir sistemini hedef alarak felce ve ölüme neden olur. Geniş bir böcek yelpazesine karşı etkinlikleri ve canlılar için nispeten düşük toksisiteleri nedeniyle tarımda, ev tipi böcek ilaçlarında ve tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca evcil hayvan

şampuanları, insan baş biti tedavileri, evcil hayvan spreyleri, topikal sivrisinek kovucular, evler ve çiftlikler için böcek ilacı spreyleri gibi birçok ticari üründe aktif madde olarak kullanılmaktadırlar (Hassan ve Nemr, 2020).

Organofosfatlar, fosforik asit ve alkol arasındaki esterleşme reaksiyonu ile üretilen kimyasal maddelerdir. Herbisitlerin, pestisitlerin, insektisitlerin, sinir gazının ana bileşenidir. Ayrıca plastik ve solvent üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Adeyinka vd., 2023).

Organofosfatlı pestisitler birçoğu oldukça toksik olan böcek ilacı olmak üzere tarım ve ev zararlılarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. En çok bilinen organofosfat pestisitleri arasında fenitrothion, parathion, klorpirifos, malathion, diazinon, glifosat ve fosfamidon bulunur (Asem vd., 2023).

2.4.2. Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri

Pestisitler tarımsal verimi artırması sebebiyle kontrolsüz bir şekilde kullanılmaktadır. Kullanımları tarımla sınırlı değildir, aynı zamanda evcil zararlıları, hastalıklı böcek vektörlerini kontrol etmek için de kullanılırlar. Günümüzde dünya nüfusunun artmasıyla beslenme ihtiyacı da artmaktadır. Ancak bitkisel ürünlerin üretiminde hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlar gibi faktörler ürün kayıplarına yol açmaktadır. Bu durum üreticileri, tarımsal verimi artırmak ve gıda maddelerinin dayanıklılığını arttırmak için çeşitli yöntemlere yöneltmektedir. Kimyasal mücadele yöntemleri arasında, tarımsal alandaki ürün verimliliğini artırmaya yönelik olarak kullanılan pestisitlerin uygulandığı tarımsal mücadele de bulunmaktadır (Akdoğan, 2012).

Bilinçsiz ve yoğun pestisit kullanımı, gıdalarda ve bunun yanı sıra toprak, su ve havada pestisitlerin kendisi ya da parçalanma ürünlerinin kalmasına sebep olabilmektedir. Bu durum, istenmeyen türler üzerinde de etkiler göstererek biyolojik çeşitliliğe zarar verirken, insanlar üzerinde de olumsuz etkilere yol açabilmektedir.

Tarım sektöründeki en önemli sorunlardan biri gıda ürünlerinin pestisit ve herbisitlerden korunmasıdır. Dünyada kullanılan pestisitlerin %38'i etkili böcek öldürücü aktiviteleri nedeniyle organofosfatlı olanlardır (Bao vd., 2015).

2.4.3. Çalışmada kullanılan pestisitler

Çalışmada organofosfat pestisit grubuna ait, yaygın bir şekilde kullanılan iki farklı pestisit ile çalışılmıştır.

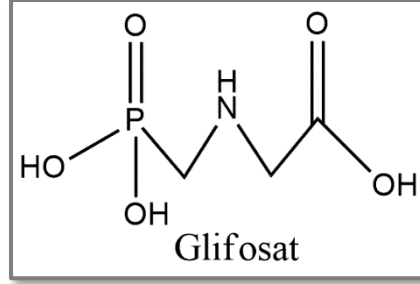
2.4.3.1. Glifosat

Dünyada çok yaygın bir şekilde kullanılan glifosat (IUPAC: N-(fosfonometil) glisin), seçici olmayan yabancı ot kontrolü için çeşitli ticari herbisitlerin aktif bileşenidir (Şekil 2.15.). Yüksek etkinliği, düşük maliyeti ve yan etkilerin minimal olduğu varsayımıyla son 40 yılda yaygın olarak kullanılmıştır. Sudaki zayıf çözünürlüğünü artırmak için, bazı ticari ürünlerde izopropil amin tuzu veya amonyum tuzu gibi tuzlar olarak sentezlenir (Bruggen vd., 2017).

Bir organofosfat bileşiği olan glifosat, şikimat-3-fosfat (S3P) ve fosfoenolpiruvat reaksiyonunu katalize ederek bir anahtar enzim olan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentazı (EPSP) inhibe ederek etki gösterir. EPSP üç aromatik amino asidin tirozin, triptofan ve fenilalanin sentezinde yer alan enzimdir. Bu enzimler büyüyen bitkide yer aldığı için, glifosat yapraklardan ve minimum düzeyde köklerden emilir, yani yalnızca aktif olarak büyüyen bitkiler üzerinde etkilidir (Mertens vd., 2018).

Bazı araştırmalar, glifosata maruz kalma ile kanser gibi belirli sağlık sorunları arasında olası bağlantılar olduğunu öne sürmüştür. 2015 yılında, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC), glifosatu "insanlar için muhtemelen kanserojen" olarak sınıflandırmıştır. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) gibi diğer düzenleyici kurumlar tarafından yapılan değerlendirmeler, glifosatin belirtildiği şekilde kullanıldığında, insanlarda kansere neden

olma ihtimalinin düşük olduğu belirtilerek farklı sonuçlara ulaşılmıştır (EPA, 2015; Guyton vd., 2015).



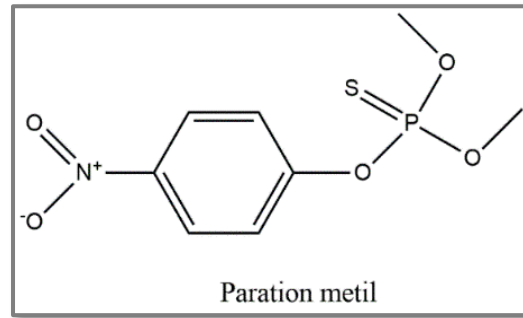
Şekil 2.15. Glifosatın kimyasal yapısı

2.4.3.2. Paration metil

Metil paration, paration metil, metaphos veya O, O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotiyoat isimleriyle bilinen organofosfatlı (OP) insektisittir (Şekil 2.16.). Moleküler formülü $C_8H_{10}NO_5PS$ olup molekül ağırlığı 263,21 g/mol 'dür. Saf hali ile oda sıcaklığında renksiz kristaller halinde bulunan paration metilin sudaki çözünürlüğü 20°C'de litrede yalnızca 11 mg'dır (Anzecc ve Armcazz, 2000). Sudaki çözünürlüğü çok düşük olmakla beraber, birçok organik çözücüde hızla çözünme özelliğine sahiptir (Kalipci vd., 2010).

Sudaki bu düşük çözünürlük, çevredeki hareketliliğini sınırlar ancak yine de parçacıklar tarafından taşınabileceği veya suda yaşayan organizmalar tarafından alınabileceği için kirlenme riskini ortadan kaldırmaz. Parathion metilin kullanımı belirli tarımsal ürünlerle sınırlı olmasına rağmen, bu pestisit düşük maliyeti ve yüksek etkinliği, evlerde ve iş yerlerinde yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır.

Özellikle aktif metabolit metil paraokson'a metabolize edildiğinde başta merkezi sinir sistemi (CNS) olmak üzere birçok hedef organ için toksik olan bir insektisittir (Garcia vd., 2003).



Şekil 2.16. Paration metil kimyasal yapısı

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar ve maddeler aşağıdaki çizelgelerde özetlenmiştir (Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.).

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Firma
Buz makinesi	Genbiotek H-IMS-50
Homojenizatör	MIULAB MT- 30K
Çalkalayıcı	Shaker Jeiotech OS-3000
Elektroforez	Thermo Scientific Owl- P82
Gradient mikseri	Sigma-Aldrich
Hassas terazi	Precisa XB 220A
Magnetik karıştırıcı	DLAB MS-H-Pro ⁺
Peristaltik pompa	Ismatec Reglo ICC
pH metre	Mettler Toledo S220-K
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z326-K
Su banyosu	JSR JSEB- 22T
UV-VIS spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Otoklav	N-Biotek N1060
Vakum pompası	Millipore WP6222050

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar (devam)

Cihaz adı	Firma
Vorteks	Vortex-Genie 2
Görüntüleme cihazı	SYNGENE G. Box Chemi XRQ

3.1.2. Çalışmada kullanılan maddeler**Çizelge 3.3.** Kullanılan maddeler

Kimyasal madde	Firma
Akrilamid-Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich
Amonyum sülfat	Merck
Asetik asit	VWR Chemicals
Aseton	Carlo Erba
Bromtimol mavisi	Sigma-Aldrich
Coomassie brilliant blue (G-250)	Merck
Coomassie brilliant blue (R-250)	Merck
DEAE Sephadex (A-50)	GE Healthcare
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma-Aldrich
Disodyum karbonat	Sigma-Aldrich
Diyaliz torbası	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Fosforik asit	Merck
Gliserin	Sigma-Aldrich
Glisin	Sigma-Aldrich
Glifosat	Tokyo Chemical Industry
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.2. Kullanılan maddeler (devam)

Kimyasal madde	Firma
İzopropanol	Sigma-Aldrich
Katekol	Tokyo Chemical Industry
<i>L</i> -Dopa	Tokyo Chemical Industry
<i>L</i> - tirozin	Tokyo Chemical Industry
4-metil katekol	Thermo Scientific
Metanol	Sigma-Aldrich
Moleküler ağırlık marker	Sigma-Aldrich
Monosodyum fosfat	Acros Organics
NaOH	Sigma-Aldrich
Sepharose-4B	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albumini	Sigma-Aldrich
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	Acros Organics
Paration metil	Sigma-Aldrich
Potasyum fosfat	Acros Organics
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Tirozinaz	Sigma-Aldrich

Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Hazırlanışı**➤ Enzim özütü hazırlama çözeltisi:**

6,8045 gram tartılan potasyum fosfat, 450 ml distile su ile çözüldü. pH değeri 0,1 N NaOH ile 5,25'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

➤ Substrat çözeltileri:

L-Dopa (3,4-dihidroksifenil alanin): 0,02 g *L*-Dopa bir miktar distile suda 30 °C su banyosunda bekletilerek hazırlandı. Son hacim distile su ile 5 ml'ye tamamlandı.

Katekol: 0,20 g katekol bir miktar distile suda çözülerek hazırlandı. Son hacim distile su ile 5 ml'ye tamamlandı.

4-metil katekol: 0,20 g 4-metil katekol bir miktar distile suda çözülerek hazırlandı. Son hacim distile su ile 5 ml'ye tamamlandı.

L-tirozine: 4,5 mg *L*-tirozine bir miktar distile suda 30 °C su banyosunda bekletilerek hazırlandı. Son hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

➤ **Afinite jeli sentezinde kullanılan çözeltiler:**

0,1 M pH 10,0 NaHCO₃ Tamponu: 8,40 g NaHCO₃ 450 ml distile suda çözüldü. pH 10,0'a 1 M NaOH ilavesiyle getirildi. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

0,2 M pH 8,8 NaHCO₃ Tamponu: 4,20 g NaHCO₃ 450 ml distile suda çözüldü. pH 8.8'e 1 M NaOH ilavesiyle getirildi. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

0,01 M pH 6,0 Na₂HPO₄ Tamponu: 0,71 g Na₂HPO₄ 450 ml distile suda çözüldü. pH 6.0'a 1 M NaOH ilavesiyle getirildi. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

50 mM pH 5,0 Asetat Tamponu: 3,40 g sodyum asetat 450 ml distile suda çözüldü. pH 5.0'a 1 M asetik asit ilavesiyle getirildi. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

50 mM pH 8,0 Fosfat Tamponu / 1 M NaCl: 3,10 g K₂HPO₄ ve 29,25 g NaCl 450 ml distile suda çözüldü. pH 8.0'a 1 M HCl ilavesiyle getirildi. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

➤ **Bradford metodu ile kantitatif protein tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması:**

Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: 12,5 ml etanolde (%96) çözünen 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 üzerine 25 ml fosforik asit (%86) eklendi. Son hacim 250 ml olacak şekilde distile su ilave edildi.

Standart albümin çözeltisi: 1 mg/ml standart serum albümini distile su ile çözülerek stok hazırlandı.

➤ **SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin ve jellerin hazırlanması:**

1 M pH 8,8 Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması: Tris (12,114 g), distile su (80 ml) ile çözülerek pH ayarlandıktan sonra hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

1 M pH 6,8 Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması: Tris (12,114 g), distile su (80 ml) ile çözülerek, pH ayarlandıktan sonra hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

%30 Akrilamid- %0,8 Bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: Akrilamid (14,5 g) ile bisakrilamid (0,5 g) tartıldı. Bir miktar distile su ile çözümleri sağlandı. Sonrasında distile su eklenerek hacim 50 ml'ye tamamlandı.

APS çözeltisinin hazırlanması (%1,5): 0,30 gram APS tartıldı ve bir miktar distile su ile çözünmesi sağlandı. Son hacim distile su eklenerek hacim 20 ml'ye tamamlandı.

APS çözeltisinin hazırlanması (%10): 1 gram APS tartıldı ve bir miktar distile su ile çözünmesi sağlandı. Son hacim distile su eklenerek hacim 10 ml'ye tamamlandı.

TEMED çözeltisi (%5): 0,5 g TEMED tartılarak bir miktar distile su ile çözünmesi sağlandı. Son hacim distile su ilavesiyle 10 ml'ye tamamlandı.

SDS çözeltisinin hazırlanması (%10): 1 g SDS tartıldıktan sonra 9 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

SDS yürütme tamponunun hazırlanması: 7,20 g glisin ile 1,51 g tris tartılarak 450 ml distile suda çözüldü. 5 ml %10'luk SDS çözeltisinden eklendi. pH'ı 8,3 olana kadar titre edildi. Son hacim 500 ml olacak şekilde hazırlandı.

Doğal jel yürütme tamponunun hazırlanması: 1,51 g tris ile 7,20 g glisin tartılarak 450 ml distile suda çözüldü. pH'ı 8,3 olana kadar titre edildi. Son hacim 500 ml olacak şekilde hazırlandı.

SDS jel numune tamponunun hazırlanması: 1 M pH'ı 6,8 Tris-HCl tamponundan 0,5 ml, SDS (%10) çözeltisinden 1 ml, gliserinden (%100) 1 ml, brom timol mavisi çözeltisinden (%0,04) 1 ml alındı. Son hacim 6,5 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. Çözelti kullanmadan önce 50 µl β-merkaptotanol alındı. 950 µl numune tamponu ile karıştırıldı.

Doğal jel numune yükleme tamponu: 1 M pH'ı 6,8 Tris-HCl'den 150 µL, bromofenol mavisinden (%0,1) 100 µL, gliserolden (%80) 250 µL ve son olarak 460 µL distile su eklenerek karıştırılmasıyla hazırlandı.

Brom timol mavisi çözeltisi (%0,04): 0,1 gram brom timol mavisi tartıldı. 16 ml 0,01 M'lık NaOH içinde çözüldü. Daha sonra distile su eklenerek son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Sabitleştirme çözeltisi: İzopropanolden (%99,5) 50 ml, TCA'dan (%10) 10 ml, distile sudan 40 ml alınarak 100 ml hacminde hazırlandı.

Çizelge 3.4. SDS jel elektroforezinde kullanılan ayırma jeli değerleri

AYIRMA JELİ (SEPARATION GEL)	Kullanılan çözelti	Miktar
	1 M Tris-HCl (pH:8,8)	3,75 ml
	Distile su	2,35 ml
	Acrylamide %30 / Bis-acrylamide (%0,8)	3,3 ml
	SDS çözeltisi (%10)	0,1 ml
	TEMED (%5)	0,2 ml
	APS (%1,5)	0,15 ml

Çizelge 3.5. SDS jel elektroforezinde kullanılan yığma jeli değerleri

YIĞMA JELİ (STACKING GEL)	Kullanılan çözelti	Miktar
	1 M Tris-HCl (pH:6,8)	0,31 ml
	Distile su	1,84 ml
	Acrylamide %30 / Bis-acrylamide (%0,8)	0,3325 ml
	SDS çözeltisi (%10)	25 µl
	TEMED (%5)	25 µl
	APS (%1,5)	50 µl

Çizelge 3.6. Doğal jel elektroforezinde kullanılan ayırma jeli değerleri

AYIRMA JELİ (SEPARATION GEL)	Kullanılan çözelti	Miktar
	1 M Tris-HCl (pH:8,8)	2,5 ml
	Distile su	1,57 ml
	Acrylamide %30 / Bis-acrylamide (%0,8)	2,2 ml
	TEMED (%5)	0,065 ml
	APS (%10)	0,1 ml

Çizelge 3.7. Doğal jel elektroforezinde kullanılan yığma jeli değerleri

YIĞMA JELİ (STACKING GEL)	Kullanılan çözelti	Miktar
	1 M Tris-HCl (pH:6,8)	0,41 ml
	Distile su	2,45 ml
	Acrylamide %30 / Bis-acrylamide (%0,8)	0,4 ml
	TEMED (%5)	0,3 ml
	APS (%10)	0,1 ml

Jel boyama çözeltisi: 0,2 gram Coomassie Brilliant Blue R-250 tartıldı. Reaktifin çözülmesi için 100 ml metanol (%99,7), 20 ml asetik asit (%100) ve 80 ml distile su kullanılarak boyama çözeltisi hazırlandı.

Jel yıkama çözeltisi: 200 ml hacmindeki bu çözelti, 100 ml CH₃OH (%99,7), 20 ml CH₃COOH (%100) ve 80 ml distile su kullanılarak hazırlandı.

➤ **Tirozinaz enzimi inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitörlerin (pestisitlerin) hazırlanması:**

Stok glifosat çözeltisi: 5 mg glifosat tartıldı. Bir miktar distile su ile çözüldü. Son hacim 5 ml'ye tamamlandı.

Stok paration metil çözeltisi: 0,5-1,0-1,5-2,0-2,5 ve 3,0 mg miktarlarda tartılan paration metil, sırasıyla 3 farklı çözücü kullanılarak (DMSO, etanol ve distile su) 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Pleurotus ostreatus* yetiştirilmesi

Pleurotus türleri çürükçül mantarlardır ve talaş, buğday, saman, mısır koçanı ve sapı, pamuk artığı, atık kâğıt, çay ya da kahve posaları, fındık kabuğu gibi ikinci kez kullanılamayan birçok tarımsal ve endüstriyel atık üzerinde kolaylıkla yetiştirilebilirler (Avcı, 2015). Çalışmada saman ve çay posası olmak üzere iki farklı çeşit kompostta *P. ostreatus* yetiştirilmiştir (Şekil 3.1.).

Atık çay posaları toplanmış ve açık alanda, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. PDA (Patates Dekstroz Agar) besiyerinde *P. ostreatus* aktive edilmiştir. Spawn ortamı olarak %80 oranında buğday, %5 kireç ve %8 alçı içeren karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan spawn otoklavda 15 dakika 121 °C’de sterilize edilmiştir. Sonrasında PDA ortamında aktive edilen *P. ostreatus* sterilizasyonu gerçekleştirilen spawnlara ekilerek 25 °C’de inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Kurutulan çay posaları ve saman ile;

%85 çay posası, %15 buğday kepeği ve %85 saman %15 buğday kepeği olacak şekilde 2 ayrı kompost hazırlanmış ve kompostta son olarak %0,5 kireç ile %1,0 alçı ilave edilmiştir. Bu karışımlar yaklaşık %70 oranında neme sahip olacak şekilde ıslatılmıştır. Hazırlanan kompost otoklavda 1 saat 15 dakika 121°C’de sterilize edilmiştir. Hazırlanan kompostlara spawn ortamında geliştirilen *P. ostreatus* ekimi yapılmıştır. Kompostu misel sarana kadar 15-20 gün 25°C’de karanlık ortamda bekletilmiştir. Misel sarımı gerçekleştikten sonra kompost torbasına çizikler atılarak şapkalanma aşamasında 15°C’de ve nemli ortamda mantarların büyümesi gerçekleştirilmiştir (Bandera ve Bendas, 2020; Pekşen, 2001).



Şekil 3.1. *Pleurotus ostreatus* üretim aşamaları

3.2.2. *Pleurotus ostreatus* ham homojenatın hazırlanması

Eskişehir ili Aşağısöğütönü Mahallesi’nde mevcut olan 39°48’39.9’’N 30°25’55.0’’E konumunda bulunan “Özlem Mantar Eskişehir” tesisinden taze olarak alınan yabani ve yenilebilir bir mantar olan *P. ostreatus* 4°C’de saklanarak 2 gün kullanıldı. 50 g mantar 100 ml 0,1 M potasyum fosfat tamponu içerisinde 30 dakika boyunca homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenat birkaç katlı tülbentten süzülerek kaba atıklar giderildi. Süzüntü, 4°C ve 10000 rpm hızında 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında çökelek atıldı. Çöktürme süreci için süpernatant ayrıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Homojenatın hazırlanması deney görselleri

3.2.3. *Pleurotus ostreatus* Tirozinaz enziminin çöktürülmesi

P. ostreatus tirozinaz enziminin çöktürülmesinde iki farklı çöktürme yöntemi denenmiştir.

3.2.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Her proteinin çöktüğü nötral tuz konsantrasyonu farklı olduğundan bu yolla proteinler birbirlerinden ayrıştırılırlar. Amonyum sülfatın tercih edilmesinin nedenleri arasında yüksek

iyonik şiddet sağlaması, yüksek çözünürlüğü, ekonomik maliyeti ve proteinlerin denatürasyonuna sebep olmaması gibi faktörler yer alır.

Proteinlerin çözünürlüğü düşük nötral tuz konsantrasyonlarında iyonik şiddet arttıkça artar. Bu olaya “*salting-in*” denir. Bunun sebebi, nötral tuzların çözünmesiyle oluşan iyonlar, çözelti ortamında proteinlerin iyonlaşabilir gruplarını etkileyerek iyonlaşmalarını sağlarlar ve çözünürlüğünü arttırırlar.

Proteinlerin çözünürlüğü yüksek nötral tuz konsantrasyonlarında iyonik şiddet arttıkça azalır ve çökerler bu olaya ise “*salting-out*” denir. Bunun sebebi ise, ortamdaki iyonların konsantre halde bulunmasından dolayı protein etrafındaki hidrat kılıfını kendilerine çekmeleri ve böylece çözünürlüğün azalmasıdır (Nelson ve Cox, 2005).

Çöktürme işlemi %0-75 aralığında doygunlukla gerçekleştirildi ve kullanılacak amonyum sülfat miktarı formül ile belirlendi.

$$g (NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim süpernatant hacmi

S1: Mevcut $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu

S2: İstenilen $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu

Belirlenen amonyum sülfat miktarı tartıldı ve buz banyosunda bulunan süpernatanta yavaşça eklenerek, manyetik karıştırıcı ile yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 4°C'de 10000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant ve çökelek için aktivite ölçümleri yapıldı. Ardından süpernatant atıldı. %75-90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi için gereken miktar, formül kullanılarak hesaplandı ve bu miktar buz banyosundaki süpernatanta eklenerek çözünmesi sağlandı. Tekrar 4°C'de 10000 rpm hızında 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ve çökelekte aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Çökeleğe, pH'ı 5,25 olan 0,1 M potasyum fosfat tamponundan az miktarda eklenerek baget yardımıyla karıştırıldı ve böylece çökelek tampon çözelti içerisine alındı. Elde edilen enzim çözeltisinde aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı (Büyükemir, 2018).

3.2.3.2. Aseton çöktürmesi

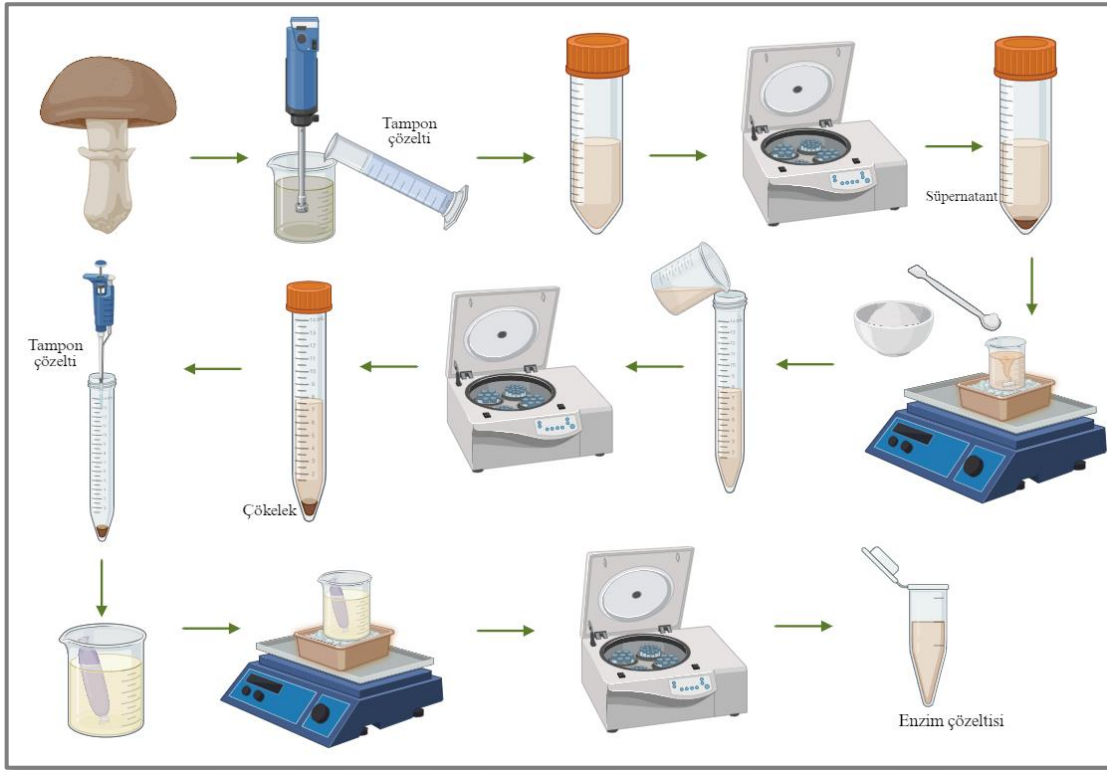
Süpernatant üzerine, buz banyosu içerisinde homojenizasyon sonrası alınan süpernatant hacmi kadar -20°C 'de bekletilen soğuk aseton damla damla eklenerek, manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. 4°C 'de 10000 rpm hızında 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ve çökelekte ayrı ayrı aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Süpernatant atılıp elde edilen çökelek, tamamen çözölebileceği az miktarda pH'ı 5,25 olan 0,1 M potasyum fosfat tamponunda çözüldü. Elde edilen enzim çözeltisinde aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı.

3.2.4. Ham ekstrede diyaliz işlemi

Amonyum sülfat çöktürmesi ve aseton çöktürmesi sonrası numune, pH'ı 5,5 olan 0,1 M potasyum fosfat tamponunun bulunduğu bir behere yerleştirilen diyaliz torbasına konuldu (Şekil 3.3.). Numune, 4°C 'de iki saat süresince diyaliz edildi (Şekil 3.4.). Sonrasında numunenin aktivitesi ve protein miktarının nicel tayini gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Diyaliz işlemi görselleri



Şekil 3.4. Saflaştırma basamakları şematik gösterimi (Görsel BioRender.com’da oluşturulmuştur).

3.2.5. Optimum ve Stabil pH belirlenmesi

pH’ı 7,0-9,0 aralığında 0,1 M Tris-HCl, pH’ı 5,5-7,0 aralığında 0,1 M potasyum fosfat ve pH’ı 4,0-5,5 aralığında 0,1 M sitrat tampon çözeltileri ile elde edilen homojenat ile tirozinaz enziminin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü.

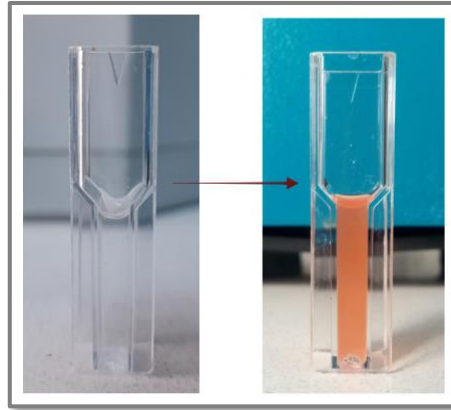
Stabil pH’ı belirlemek için pH değerleri 5,0 ile 7,5 arasında değişen potasyum fosfat tamponları kullanıldı. Bu tampon çözeltilerde bekletilen enzim çözeltileri, 4°C’de saklanarak bir hafta süresince yapılan aktivite ölçümleriyle enzimin stabil olduğu pH değeri belirlendi.

3.2.6. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Enzimin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek amacıyla, 10°C'lik artış ile 0-80°C aralığında değişen sıcaklıklarda aktivite değerleri belirlendi. Aktivite ortamı 0-10°C buz banyosunda, 20-80°C aralığında ise sıcak su banyosunda bekletildi. Sonuçlar grafiğe aktarılarak, optimum sıcaklık tespit edildi.

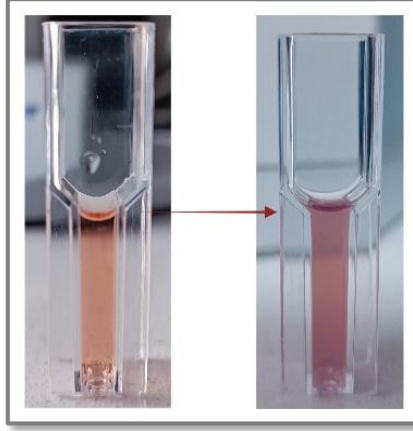
3.2.7. Tirozinaz enzimi aktivite tayini

L-Dopa substratı içeren 100 mM pH'ı 5,5 olan potasyum fosfat tamponu ile tirozinazın difenolaz (katekolaz) aktivitesi belirlendi. Spektrofotometrik olarak (Şekil 3.8.) *L*-Dopa'nın kırmızı renkli oksidasyon ürünü olan dopakroma (Şekil 3.5.) dönüşümü ölçüldü. 5 dakikalık inkübasyon sonunda 25 dakika boyunca dopakromun 475 nm'de verdiği absorbans izlenerek tirozinaz aktivitesi belirlendi.



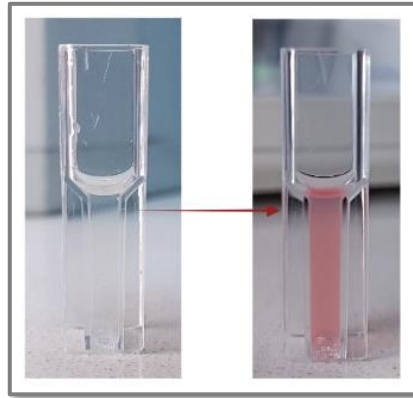
Şekil 3.5. *L*-Dopa substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi

Distile su içerisinde hazırlanan katekol substratı çözeltisinde tirozinaz aktivitesi ölçüldü. Tirozinaz enziminin katekol ile reaksiyonu sonucu oluşan *o*-kinonun (Şekil 3.6.) 500 nm'de verdiği absorbans izlenerek tirozinaz aktivitesi belirlendi.



Şekil 3.6. Katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi

Distile su içerisinde hazırlanan 4-metil katekol substratı ile tirozinazın *o*-kinona dönüşümü ile (Şekil 3.7.) 410 nm'deki absorbans değişimi izlenerek tirozinaz aktivitesi belirlendi.



Şekil 3.7. 4-metil katekol substratının tirozinaz aktivitesi ile gerçekleşen renk değişimi

Distile su içerisinde hazırlanan *L*-tirozin substratı çözeltisinde tirozinazın monofenolaz aktivitesi belirlendi. Tirozinaz enziminin *L*-tirozin ile reaksiyonu sonucu oluşan 3,4-dihidroksifenilalanin'in 475 nm'de absorbansı ölçülerek tirozinaz aktivitesi ölçüldü.

Aktivite hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir;

$$\frac{E\ddot{U}}{ml} = \frac{\Delta OD}{36,0} \times \frac{V_T}{V_E} \times 1000$$

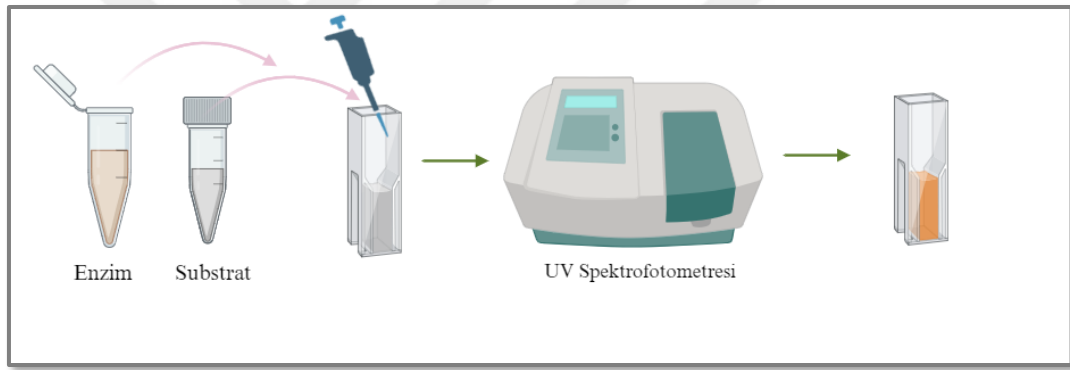
E $\ddot{U}$ /ml: Enzim miktarının 1 ml $\ddot{c}$ özeltideki konsantrasyonu

ΔOD : Dakikadaki absorbans değişimi

36,0: Tirozinazın katekol substratı için molar ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1} cm^{-1}$)

V_T : Küvetin toplam hacmi (ml)

V_E : Ölçüm küvetine eklenen enzim numunesinin hacmi (ml)



Şekil 3.8. Tirozinaz enzimi aktivite tayini şematik gösterimi (Görsel BioRender.com’da oluşturulmuştur).

3.2.8. Kantitatif protein tayini (Bradford Yöntemi ile)

Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanıldı. Bu boyanın negatif yüklü olması, proteinlerdeki pozitif yüklere bağlanarak kırmızı formunu mavi forma dönüştürür ve bu oluşan kompleks 595 nm’de bir absorbans gösterir ($\lambda_{max} = 595 nm$). Sığır serum albümini (BSA) protein standardı olarak kullanıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan BSA $\ddot{c}$ özeltileri, kalibrasyon grafiği oluşturmak için kullanıldı. Bu amaçla, 1 mg/ml stoğundan 10, 20, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındıktan sonra distile su eklenerek son hacim 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her tüpe 5'er ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi eklendi. Tüpler karıştırıldı ve inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonunda spektrofotometrede 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu sonuçlarla protein standart grafiği oluşturuldu.

Homojenizasyon, aseton çöktürmesi, diyaliz ve son basamak olan afinite kromatografisinde elde edilen enzim numunelerinde bu yöntem ile kantitatif protein tayini yapıldı (Kruger, 2009).

3.2.9. Kalitatif protein tayini

Bu yöntem, proteinlerin yapısındaki bazı aminoasitlerin 280 nm'de absorbans göstermeleri esasına dayalıdır. Toplanan fraksiyonlarda köre karşı absorbans değerleri okunarak protein varlığı tespit edilmiştir (Segel, 1968).

3.2.10. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi

Bu kromatografi yöntemi, biyomakromoleküllerin saflaştırılması için ana yöntemlerden biridir. Yüklü protein grupları ile katı destek malzemesi (matris) arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Matris, ayrıştırılacak proteininkine zıt bir iyon yüküne sahiptir. Proteinin kolona ilgisi iyonik bağlarla sağlanır ve matris, ayrılacak proteinin iyon yüküne zıt bir iyon yüküne sahiptir. Proteinler, iyon tuzlarının konsantrasyonunu, pH ya da tampon çözeltinin iyonik gücünü değiştirerek kolondan ayrıştırılırlar.

İyon değişim kromatografisinin anyon değişim ve katyon değişim olmak üzere iki farklı türü bulunmaktadır. Pozitif yüklü iyon değişim matrislerine anyon değişim (negatif yüklü proteinleri adsorbe eder) ve negatif yüklü gruplarla bağlanan matrislere katyon değişim matrisleri (pozitif yüklü proteinleri adsorbe eder) adı verilir (Coşkun, 2016).

DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim jelini hazırlamak için, 500 ml distile suya kuru jel malzemesinden 5 g eklenmiştir. Bu karışım 85°C sıcaklığındaki su banyosunda 5 saat bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. 5 saatin sonunda jelin üzerine 100 ml soğuk HCl (0,5 N) eklenmiş ve bu karışım 1 saat boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Ardından HCl bulunan jele 100 ml NaOH (0,5 N) çözeltisi eklenmiş ve yarım saat buzdolabında bekletilerek nötralizasyonu sağlanmıştır. Oluşturulan jelin havası, vakum pompası yardımıyla kurulan düzenek kullanılarak alınmıştır. Jel, 100 mM Na-fosfat (pH 7,0) dengeleme tamponu ile dolu olan 2,5 cm² x 20 cm boyutlarındaki kolona dikkatlice yüklenmiştir (Şekil 3.9.).

Peristaltik pompada kolon akış hızı saatte 10-15 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Enzim numunesi kolona tatbik edildikten sonra pH 7,0 100 mM Na-fosfat tamponu yıkama ve dengeleme tamponu olarak kullanılmıştır. Elüatın 280 nm'de ölçülen absorbans değeri ile tamponun absorbans değeri eşitlendiğinde, yıkama işlemi tamamlanmıştır. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra, kolona bir gradient mikseri (iki bölmeli) bağlanmıştır. Birinci bölmeye 100 mM Na-fosfat (pH 7,0) tamponundan 250 ml, diğer bölmeye ise 100 mM NaCl çözeltisinden 250 ml eklenerek kolon akış hızı 5 ml/saat olarak ayarlandı. Elüsyon süreci başlatıldı ve 2 ml olarak toplanan her elüatın absorbans değeri ölçüldü (280 nm). Toplanan elüatlarda substrat ile aktivite tayini yapıldı.



Şekil 3.9. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonu

3.2.11. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

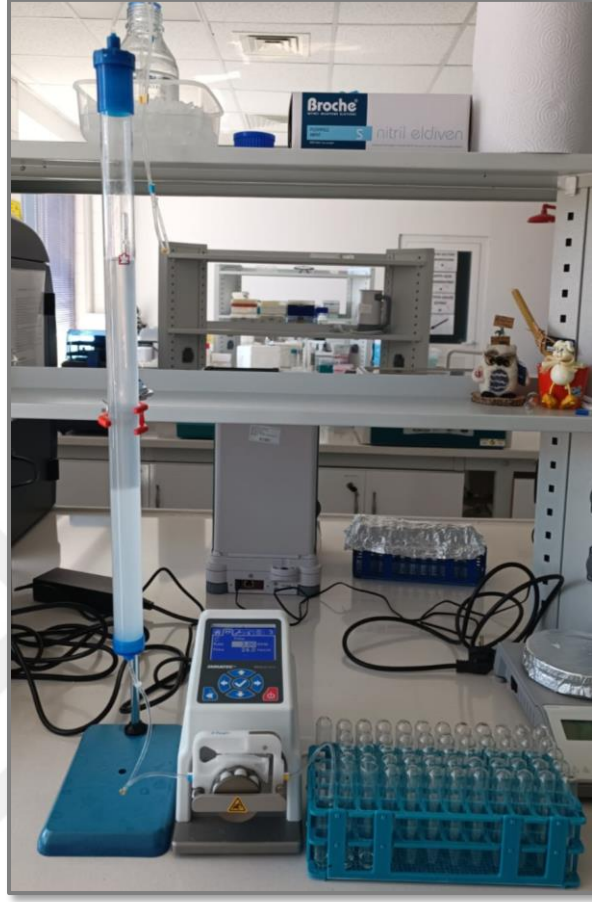
Jel filtrasyon kromatografisi (boyut dışlama kromatografisi), makromoleküllerin moleküler boyutlarındaki farklılıklara göre ayrılması için kullanılır. Jel filtrasyon kolonunda sabit faz, küçük gözeneklere sahip inert moleküllerden oluşur. Kolon malzemesi olarak dekstran, agaroz, poliakrilamid kullanılmaktadır (Coşkun, 2016).

Farklı molekül boyutlarına sahip molekülleri içeren çözelti, kolondan sabit bir akışta geçirilir. Proteinler ve polimerler gibi büyük moleküller, jel parçacıklarının içine nüfuz edemez ve sınırlı bir alanda parçacıklar arasında tutulurlar ve büyük moleküller gözenekli

parçacıklar arasındaki boşluklardan geçerek kolonun içinde hızla hareket eder. İyonlar ve tampon tuzları gibi daha küçük moleküller ise gözeneklere yayılır ve moleküller küçüldükçe kolondan orantılı olarak daha uzun alıkonma süreleri ile ayrılırlar. Yani moleküller büyüklüklerine göre ayrılır; önce büyük moleküller, ardından küçük olanlar toplanır (Cutler, 1996).

Kuru haldeki 5 gram Sephadex G-100 jel, 200 ml distile su ile birleştirilmiştir. Jel, 85°C sıcaklığındaki su banyosunda şişirilmiş ve su miktarı jelin emme kapasitesine uygun olarak ayarlanmıştır. Şişen jelin havası vakum pompası yardımıyla kurulan düzenek kullanılarak alınmıştır. 3 cm² x 90 cm boyutlarındaki kolona, 100 mM Na-fosfat (pH 7,0) dengeleme tamponu eklendikten sonra, havası alınan jel pipet yardımıyla yavaşça kolona yüklendi (Şekil 3.10.).

Kolon akış hızı saatte 3 ml olacak şekilde ayarlandı, tamponun absorbans değeri (280 nm) ile toplanan elüatın absorbans (280 nm) değeri eşitlendiğinde dengeleme tamamlandı. Jelin üst kısmındaki tampon azaldığında, Sephadex A-50 kolonundan alınan enzim numunesi (0,125 µl gliserolle karıştırılarak) pipetle kolona yüklendi. Numune yüklendikten sonra kapalı sistemle 100 mM Na-fosfat (pH 7,0) tamponu ile elüsyona başlandı ve 2 ml'lik elüatlar toplandı. Her elüatın absorbans (280 nm) değeri ölçüldü ve substrat ile aktivite tayini yapıldı.



Şekil 3.10. Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu

3.2.12. Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografisi

Bu kromatografi yöntemi, karmaşık karışımlardan belirli bir molekül veya molekül grubunu seçici bir şekilde saflaştırmak için kullanılan, oldukça spesifik biyolojik etkileşime dayanan en çeşitli ve güçlü kromatografik yöntemlerden biridir (Urh vd., 2009).

Bu biyolojik etkileşimlerin örnekleri arasında bir enzimin bir inhibitöre, bir ilacın bir reseptöre veya bir antikorun bir antijene bağlanması yer alır (Hage, 1999).

Afinite kromatografisi 1910 yılına kadar kullanılmış fakat, modern afinite kromatografisi, Axen vd. tarafından ligandların agaroz destekler üzerinde immobilizasyonu için siyanojen bromür yönteminin geliştirilmesiyle başlamıştır (Axen vd., 1967).

Afinite kromatografisinde, spesifik bir protein ile kompleks oluşturabilen bir ligand, kolonun dolgu maddesini bağlar. Spesifik protein, bir matrise (katı destek) bağlanarak ligandla kompleks oluşturur ve bu kompleks kolonda tutulurken serbest proteinler kolonu terk eder. Daha sonra kolona tutunan (bağlanan) protein, pH'ın değiştirilmesi veya bir tuz çözeltisinin eklenmesi yoluyla iyonik güç değiştirilerek kolondan ayrılır. Afinite kromatografisinde bazı terimler;

Bağlanma: Tampon koşulları, hedef moleküllerin ligand ile etkili bir şekilde etkileşime girmesini ve diğer tüm moleküller kolon boyunca yıkanırken afinite ortamı tarafından tutulmasını sağlamak üzere optimize edilmiştir.

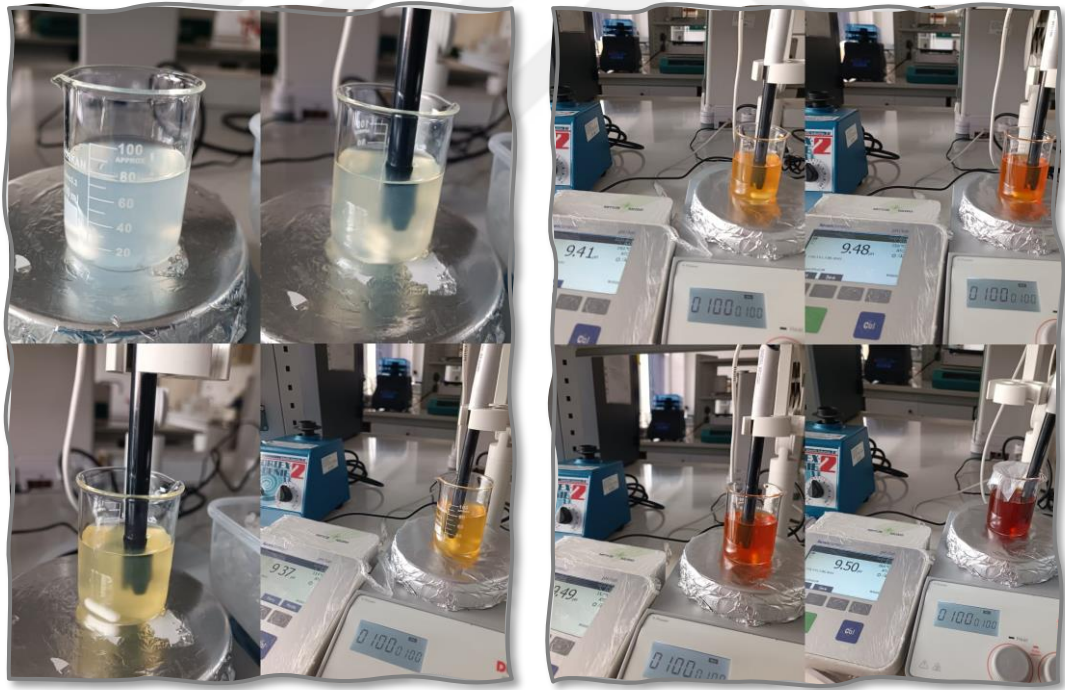
Yıkama: Hedef molekülleri elüe etmeden önce kolondan bağlanmamış maddeleri uzaklaştırmak veya kolonu başlangıç koşullarına getirmek için yeniden dengeleyen tampon koşulları ile gerçekleştirilir.

Elüsyon: Tampon koşulları, hedef moleküller ve ligand arasındaki etkileşimi tersine çevirecek (zayıflayacak) şekilde değiştirilir, böylece hedef moleküller kolondan ayrıştırılabilir (Amersham, 2002).

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B hazır olarak kullanıldı. 1,1 g CNBr-Sepharose-4B tartılarak 250 ml pH'ı 10,0 olan 0,1 M NaHCO₃ tamponunda yıkandı. Yıkama bittikten sonra vakum altında süzüldü. 10 mg *L*- tirozin pH'ı 10,0 olan soğuk NaHCO₃ tamponuyla 20 ml hacminde oluşturuldu. Yavaşça karıştırılan süspansiyondan, bağlanma verimliliğini belirlemek amacıyla, 15 dakikada bir, sıvı kısmından 0,2 ml örnek alındı. Daha sonra 1 M NaOH çözeltisi ile 20 ml'ye tamamlanarak absorbans (294 nm) değişimi izlendi. *L*- tirozinin, CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B matriksine bağlanmış olduğu belirlendi.

Süspansiyon, 16 saat boyunca 4°C'de buzdolabında bekletildi. Sonrasında süspansiyon buchner hunisine yerleştirilen mavi bant üzerine alındı. Yıkama işlemi için distile su kullanılarak, süzüntünün absorbans (280 nm) vermediği noktaya kadar yıkanarak *L*- tirozin'in reaksiyona girmeyen kısmı tamamen uzaklaştırıldı. Üstte kalan katı kısım, 100 ml hacminde 0,2 M pH 8,8 NaHCO₃ tamponuyla yıkandı. Devamında 40 ml NaHCO₃ tamponu içine alındı. Bu işlemle, sepharose-4B-*L*- tirozin, ligand bağlama işlemi için hazır hale getirildi.

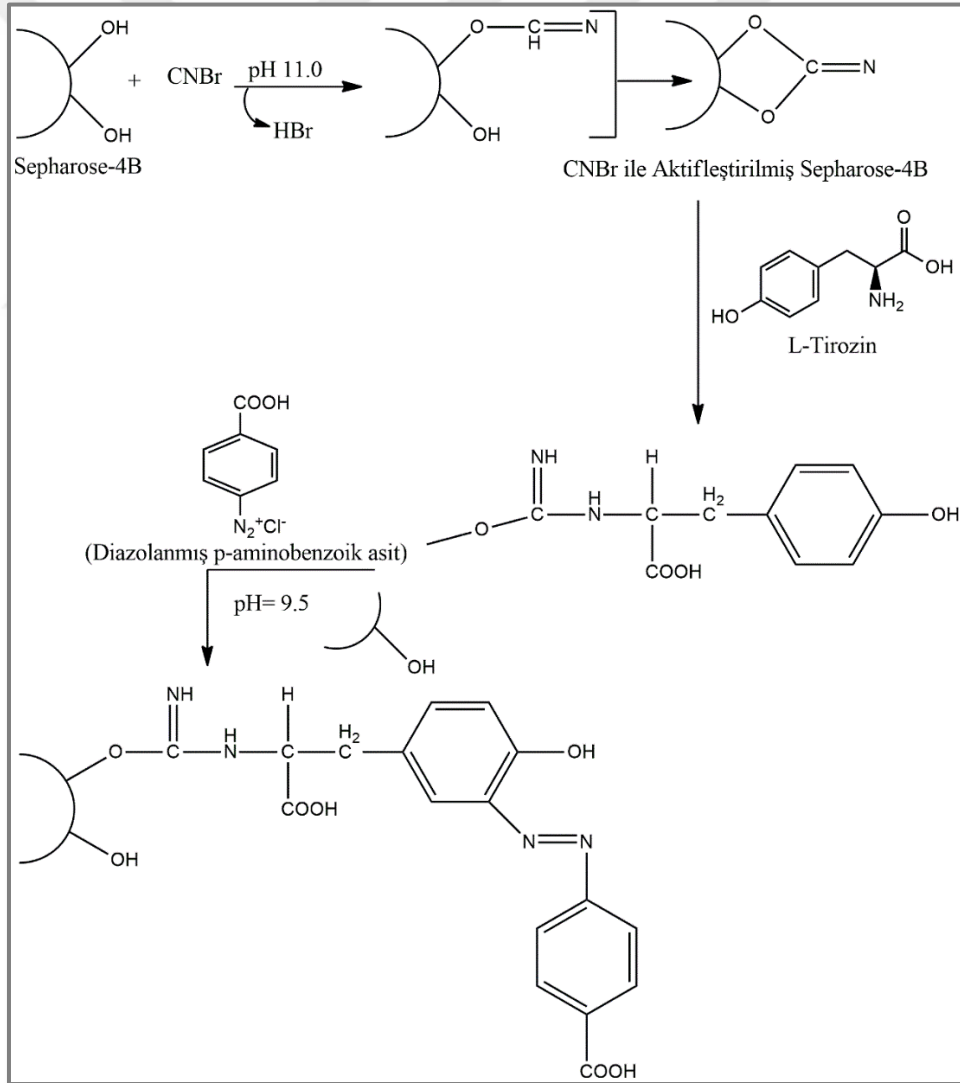
p-aminobenzoik asit, tirozinaz enziminin spesifik inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına katılarak enzimin saflaştırılmasında etkili olduğu için ligand olarak seçildi. Bu işlem için, 25 mg *p*-aminobenzoik asit, soğuk 10 ml HCl (1 M) içinde çözöldü ve buz banyosunda bekletildi. Diğer yandan 75 mg NaNO₂, 7,5 ml soğuk distile suda çözöülerek hazırlanan çözelti, *p*-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla eklenerek reaksiyona sokuldu. Buz banyosunda (10 dakika) bekletilen bu reaksiyon sonucunda, diazolanmış halde bulunan *p*-aminobenzoik asit, 40 ml hacmindeki sepharose-4B-*L*-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 4 M NaOH, damla damla eklenerek pH değeri 9,5'e ayarlandı ve karışım 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süreçte pH artışıyla birlikte renk, şeffaftan turuncuya döndü (Şekil 3.11.). 3 saatlik sürenin sonunda, jel, 1 litre distile su ile yıkanarak vakum yardımıyla süzüldü. Ardından, 200 ml hacmindeki 0,01 M Na₂HPO₄ (pH 6,0) tamponuyla yıkandı. Aynı tampon içinde muhafaza edildi.



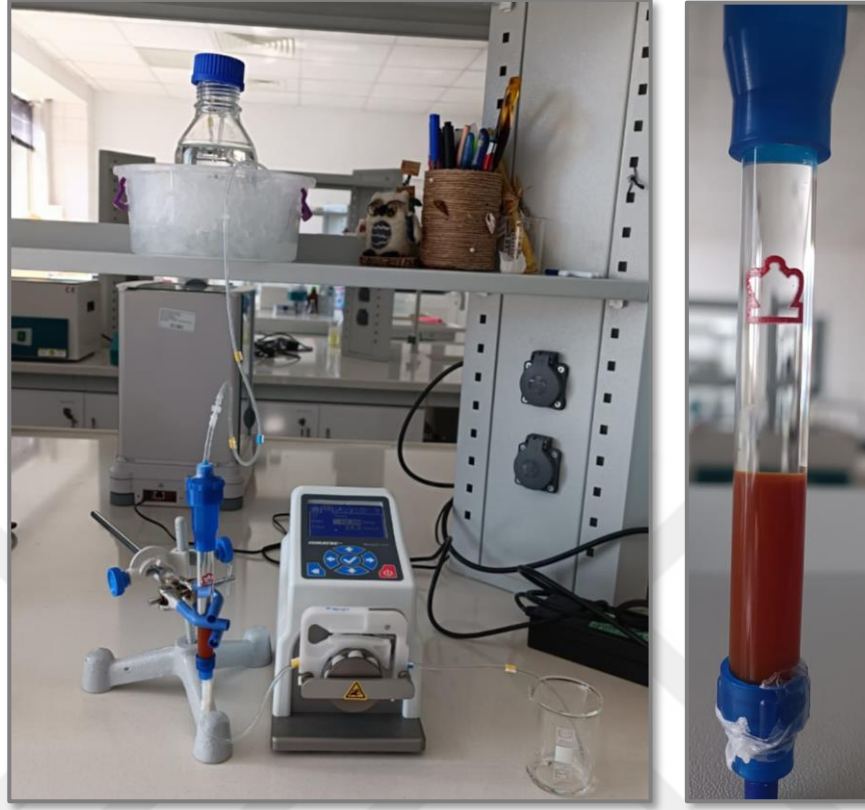
Şekil 3.11. Afinite jeli sentezi basamakları

Sentez basamakları (Şekil 3.12.) tamamlandıktan sonra, hazırlanan jel 1x10 cm boyutundaki kolona pastör pipet ile damla damla hava kabarcığı oluşmayacak şekilde

yüklendi (Şekil 3.13.). Absorbans (280 nm) değerleri birbirine eşit oluncaya kadar 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,0) ile kolon dengelendi. Enzim özütü, dengelenen kolona tatbik edildikten sonra yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkama gerçekleştirildi. Kör ve kolondan alınan elüatın absorbans (280 nm) değerleri birbirine eşit oluncaya kadar yıkama işlemine devam edildi. Bu aşamada, enzim özütünde var olan istenmeyen proteinlerin ve diğer maddelerin kolondan uzaklaştırılarak tirozinazın büyük kısmının afinite jeline tutunması gerçekleştirildi. Dengeleme tamamlandıktan sonra, 1 M NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 8,0) ile elüsyona başlandı ve elüatlar 1,5 ml olacak şekilde toplandı. Toplanan elüatların absorbansı (280 nm) ölçüldü ve substratlar ile aktivite tayini yapıldı.



Şekil 3.12. Sepharose-4B modifikasyon basamakları



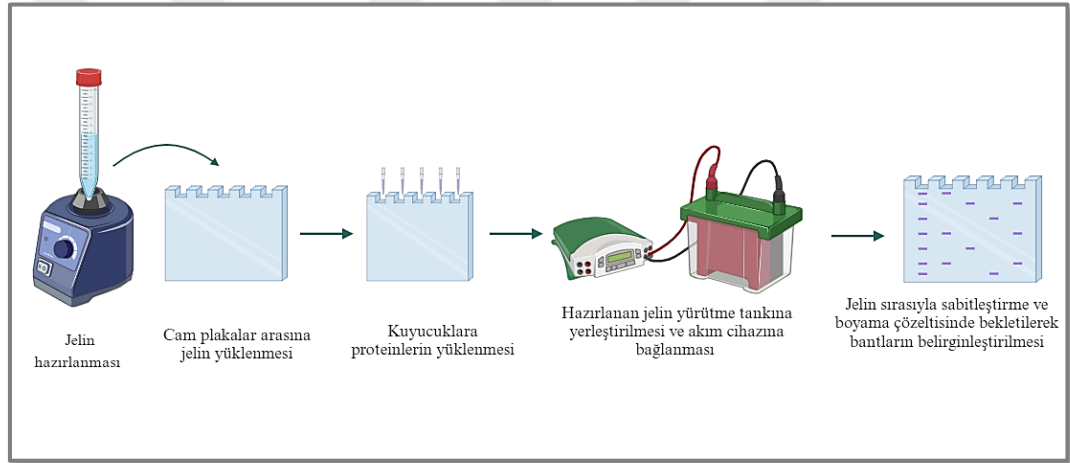
Şekil 3.13. CNBr ile aktifleştirilmiş *L*- tirozin Sepharose-4B Afinite kolonu görselleri

3.2.13. SDS–Poliakrilamid jel elektroforezi ile tirozinaz enzimi saflığının kontrolü

Afinite kromatografisinden alınan aktif elüatlarda tirozinaz enziminin saflık derecesi SDS-PAGE ile Laemmli yöntemine göre kontrol edildi (Şekil 3.14.) (Laemmli, 1970).

Elektroforez plakaları distile su ve alkol ile temizlenerek plakalar arasına plastik aparatlar yerleştirildi. Cam plakalar jel hazırlama tankına sabitlendi. Cam plakanın $\frac{3}{4}$ 'ü ayırma jeli olacak şekilde ayırma jeli iki cam plaka arasına yavaş yavaş tatbik edildi. İki saat sonunda katılaştıran ayırma jeli üzerine yığma jeli eklendi. Yığma jeli eklendikten sonra plakalar arasına yerleştirilen tarak ile kuyucukların oluşması sağlandı. Yaklaşık iki saat sonunda plaka arasında katılaştıran ve kuyucukları oluşturan jel elektroforez tankına yerleştirildi ve tanka yürütme tamponu konuldu. 20 µg protein ihtiva eden enzim numunesine numune tamponu (1:1) ilave edilerek 3 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletildi. Numune ve

marker, oluşan kuyucuklara mikropipet ile tatbik edildi. Tank akım cihazına bağlandı. Örnekler ayırma jeline gelene kadar 80 volt akımda 20 dakika yürütüldü. Örnekler ayırma jeline ulaşıncaya 120 volt akıma çıkarılarak numuneler alt sınıra ulaşincaya kadar iki buçuk saat süresince yürütme işlemi yapıldı. İşlem bittikten sonra plaka içindeki jel çıkarılarak sabitleştirme çözeltisine alındı. Jel sabitleştirme çözeltisinde yarım saat bekletildikten sonra boyama çözeltisi içerisine alındı. Çalkalayıcıda düşük hızda karıştırılarak boyanan jel, fazla boyanın uzaklaştırılması böylece bantların belirginleşmesi için yıkama çözeltisinde 30 dakika bekletildi. Son olarak distile su içerisine alınan jelin kamera ve görüntüleme cihazı ile görüntüleri alındı.



Şekil 3.14. SDS-PAGE şematik gösterimi (Görsel BioRender.com'da oluşturulmuştur).

3.2.14. Doğal elektroforez ile tirozinaz enziminin saflığının kontrolü

Tirozinaz izoenzim varlığının belirlenmesi için doğal jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez plakaları distile su ve alkol ile temizlendikten sonra plakalar arasına şeritler yerleştirildi. Sonrasında plakalar jel hazırlama tankına sabitlendi. Cam plakanın $\frac{3}{4}$ 'ü ayırma jeli olacak şekilde ayırma jeli iki plaka arasına yavaş yavaş tatbik edildi. İki saat sonunda katılan ayırma jeli üzerine yığma jeli eklendi. Yığma jeli eklendikten sonra plakalar arasına yerleştirilen tarak ile kuyucukların oluşması sağlandı. İki saat sonunda plaka arasında kuyucukları oluşan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına doğal jel

yürütme tamponu konuldu. 20 µg protein içeren numuneye, toplam hacim 100 µL'ye tamamlanacak oranda doğal jel numune tamponu eklendi. Numune ve marker, oluşan kuyucuklara mikropipet ile tatbik edildi.

Elektroforez tankı buz banyosu içerisine yerleştirilerek soğuk ortamda yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi sonra jel dikkatlice çıkarıldı. Jel üzerindeki bantların belirginleşmesi için sırasıyla boyama çözeltisinde ve yıkama çözeltisinde bekletildi. Son olarak distile su içerisine alınan jelin kamera ve görüntüleme cihazı ile görüntüleri alındı.

3.2.15. Tirozinaz enziminin inhibisyon çalışmaları

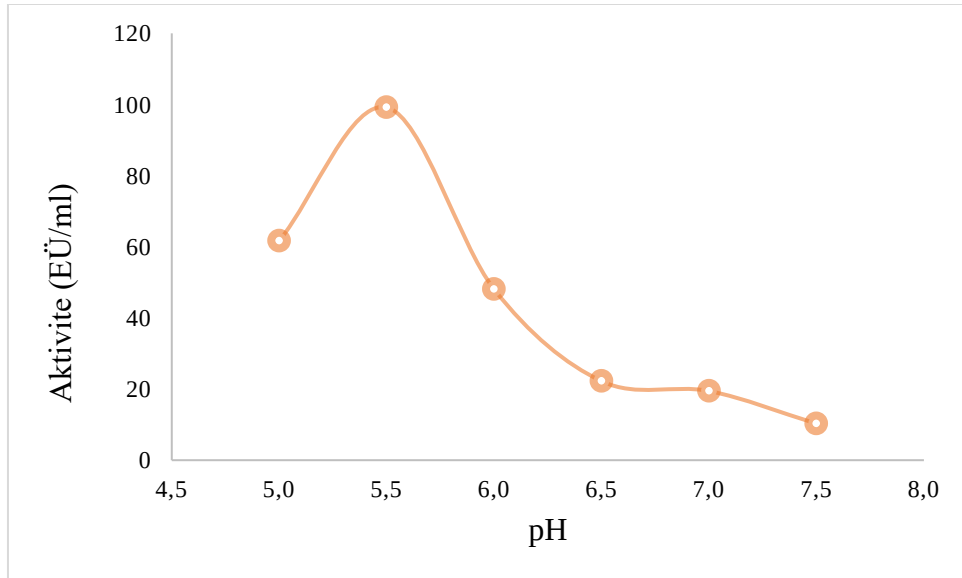
Tirozinaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisini incelemek amacıyla, günümüzde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan organofosfatlı pestisitler sınıfına ait glifosat ve paration metil bileşikleri kullanıldı. İnhibitörlerin etkisini bulmak amacıyla, farklı konsantrasyonlar ile çalışılarak inhibisyonun etkili olduğu aralık bulundu. 4-metil-katekol substratı için en uygun konsantrasyon 5,91 mM belirlendi ve kullanıldı. En az beş farklı inhibitör konsantrasyonlarıyla aktiviteler ölçüldü. Elde edilen değerler ile %Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Sabit substrat konsantrasyonunda değişen inhibitör konsantrasyonuna göre % aktivite değişimini ifade eden % Aktivite-[I] grafiğinin denklemden IC_{50} değeri hesaplandı. K_i değerlerini belirlemek amacıyla inhibitörsüz ortamda farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak aktiviteler bulundu. Sonrasında IC_{50} değeri ve bu değer altındaki ve üstündeki inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Bulunan değerler ile grafikler çizilerek inhibisyon türleri belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Optimum ve stabil pH belirlenmesine ait bulgular

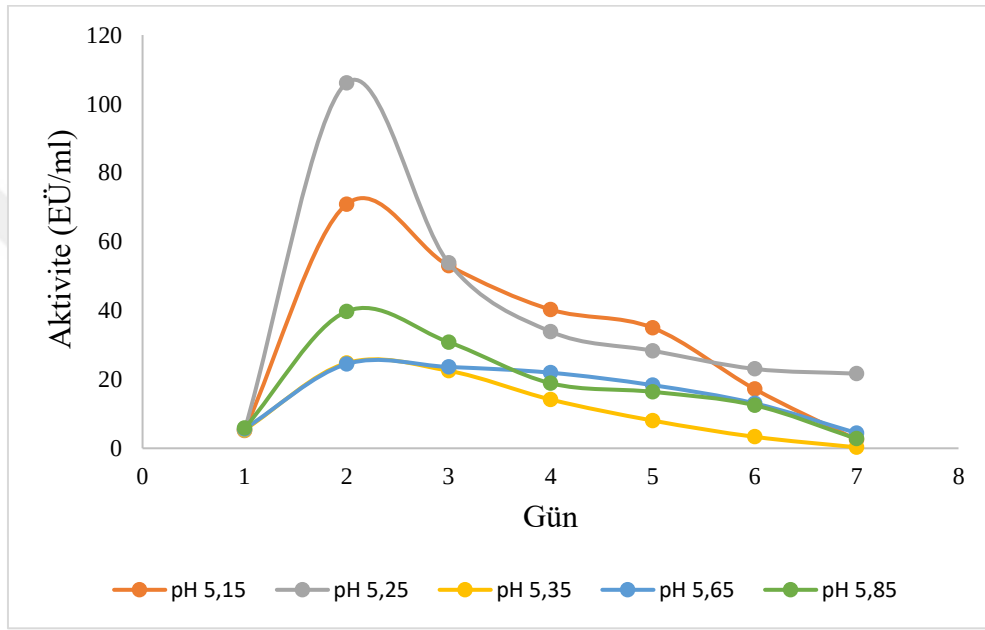
Tirozinaz enzimi aktivitesinin maksimum olduğu optimum pH'ı belirlemek için bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi değişen pH'larda potasyum fosfat tampon çözeltileri ile hazırlanan homojenatın aktivitesi, *L*-Dopa substratı kullanılarak belirlendi. Enzimin aktif bölgesine karşı davranışı, ortam pH'ına bağlı olarak farklılık gösterdi. Değişen pH'a karşı aktivite grafiği (Şekil 4. 1.) çizilerek *L*-Dopa substratıyla en yüksek aktivite pH 5,5'te tespit edildi.

Literatürde, Zaidi vd. tarafından *Agaricus bisporus*'tan izole edilen tirozinazın optimum pH'ı 7,0 olarak tespit edilirken, *Pleurotus ostreatus*'tan izole edilen tirozinazın optimum pH'ının 6,0 olduğu belirlenmiştir (Zaidi, 2015). Sharma vd. tarafından *Pleurotus djamor*'dan izole edilen tirozinazın optimum pH'ı 7,0 olarak belirlenmiştir (Sharma, 2020).



Şekil 4.1. Tirozinaz enzimi optimum pH grafiği

Enzimin stabil olduğu pH'ı tespit etmek için pH'ları 5,0-6,0 aralığında potasyum fosfat tamponu kullanıldı. 5 farklı pH'taki tampon çözeltiler ile hazırlanan homojenat 4°C'de muhafaza edilerek aktiviteleri bir hafta boyunca kontrol edildi. 7. gün sonunda değişen pH'a karşı aktivite grafiği çizilerek (Şekil 4.2.) *L*-Dopa substratıyla en yüksek aktiviteyi gösteren stabil pH 5,25 olarak tespit edildi.



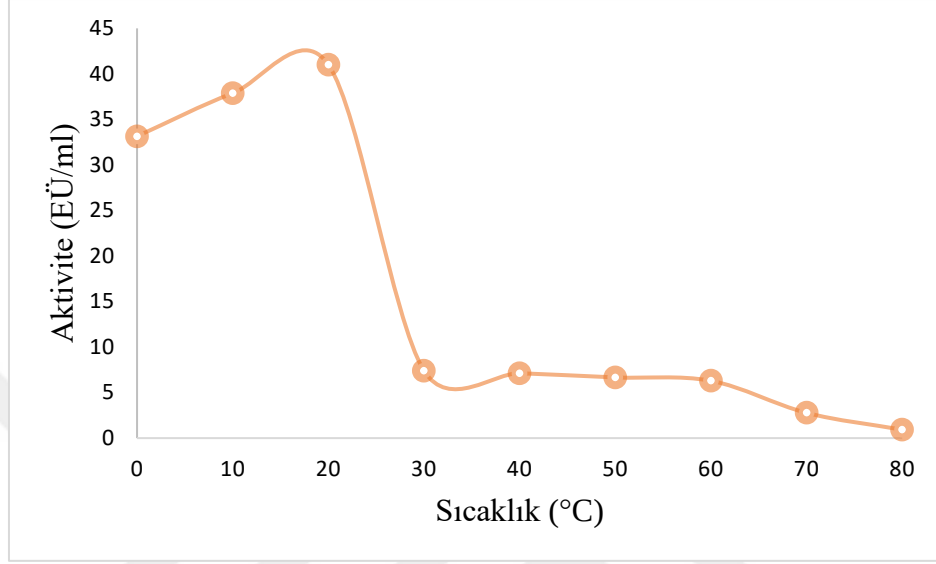
Şekil 4.2. Tirozinaz enzimi stabil pH grafiği

4.2. Optimum Sıcaklık Belirlenmesine Ait Bulgular

Tirozinaz enzimi aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklığı belirlemek amacıyla bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi aktivite değerleri belirlendi. Katekol substratı varlığında, optimum pH şartlarında, değişen sıcaklığa karşı aktivite grafiği (Şekil 4.3.) çizilerek katekol substratı varlığında optimum sıcaklık 20°C olarak tespit edildi.

Literatürde, Zaidi vd. tarafından yenilebilir bir mantar olan *Agaricus bisporus*'tan saflaştırılmış tirozinazın optimum sıcaklığı *L*-Dopa substratı varlığında 30 ile 65°C aralığında çalışılmış ve 35°C olarak belirlenmiştir (Zaidi, 2015). Sharma vd. tarafından, *Pleurotus djamor*'dan saflaştırılan tirozinazın optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla *L*-

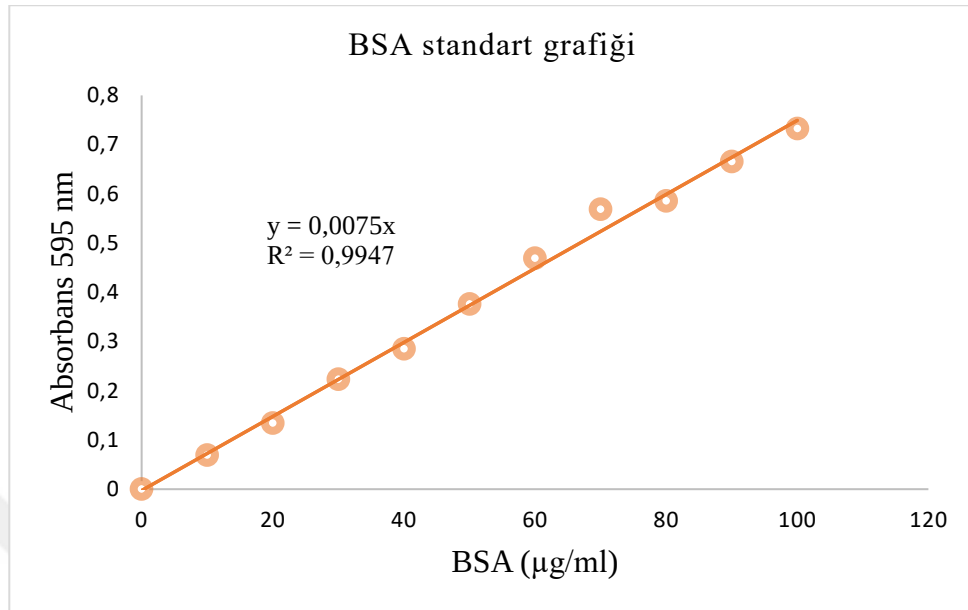
Dopa substratı varlığında 30-80°C aralığında çalışılmış ve en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir (Sharma, 2020).



Şekil 4.3. Tirozinaz enzimi optimum sıcaklık grafiği

4.2. Kantitatif Protein Tayini

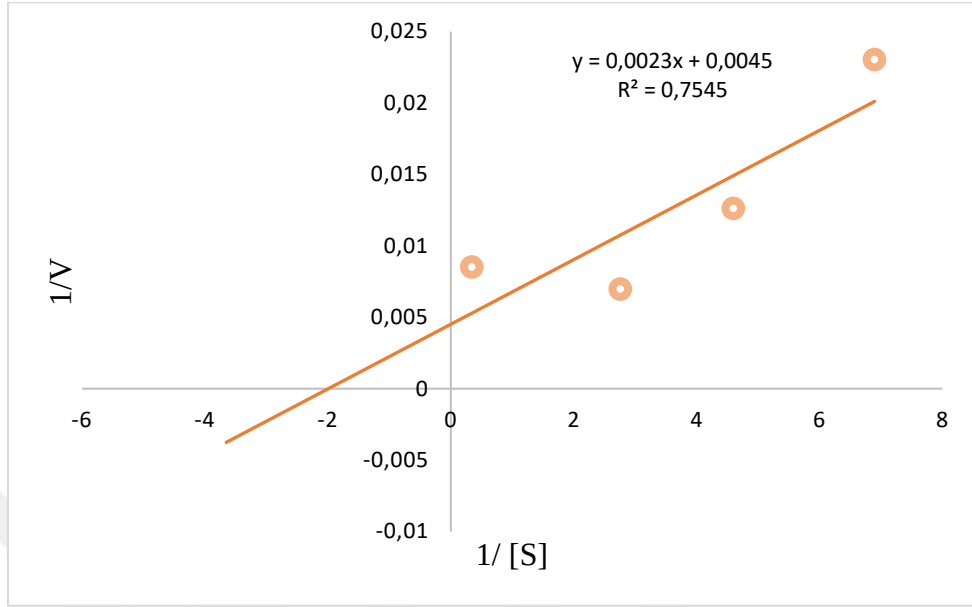
Enzim numunesinde protein miktarı Bradford yöntemiyle, BSA standart grafiği kullanılarak tayin edildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği

4.3. 4-Metil Katekol Substratı için K_m ve V_{max} Değerinin Hesaplanması

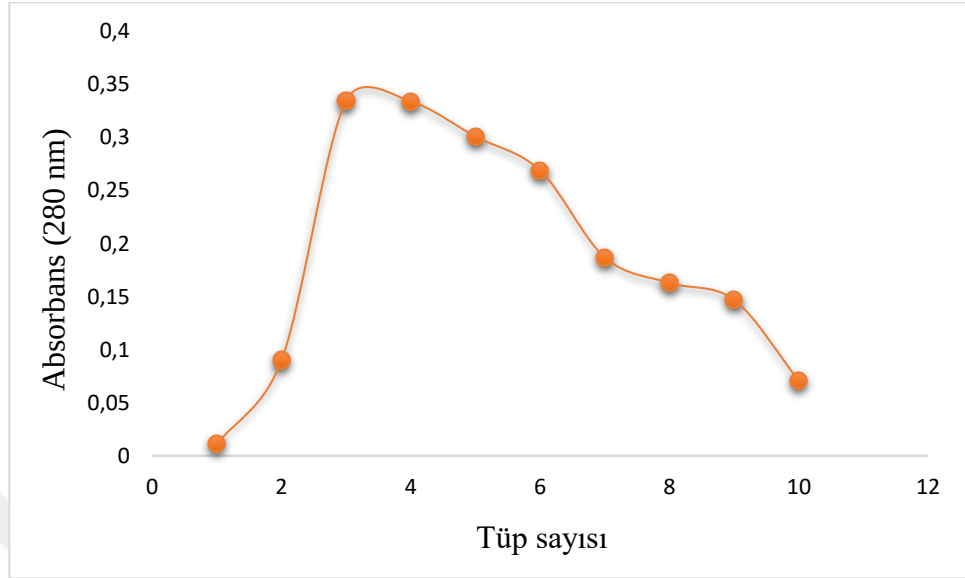
V_{max} ve K_m değerlerinin hesaplanması için optimum şartlarda 0,145 M, 0,217 M, 0,290 M ve 0,362 M olmak üzere 4 farklı 4-metil katekol konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü. Her substrat için $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi. 4-metil katekol substratı varlığında, grafik denklemlerinden yararlanılarak K_m değeri 0,833 mM ve V_{max} değeri 1,12 olarak belirlendi (Şekil 4.5.).



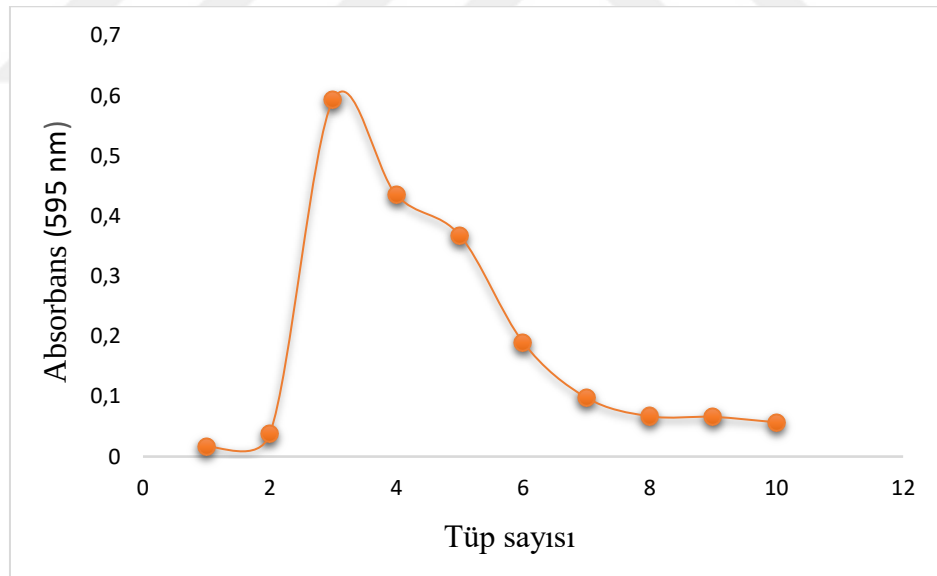
Şekil 4.5. 4-Metil katekol K_m ve V_{max} grafiği

4.4. Tirozinaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

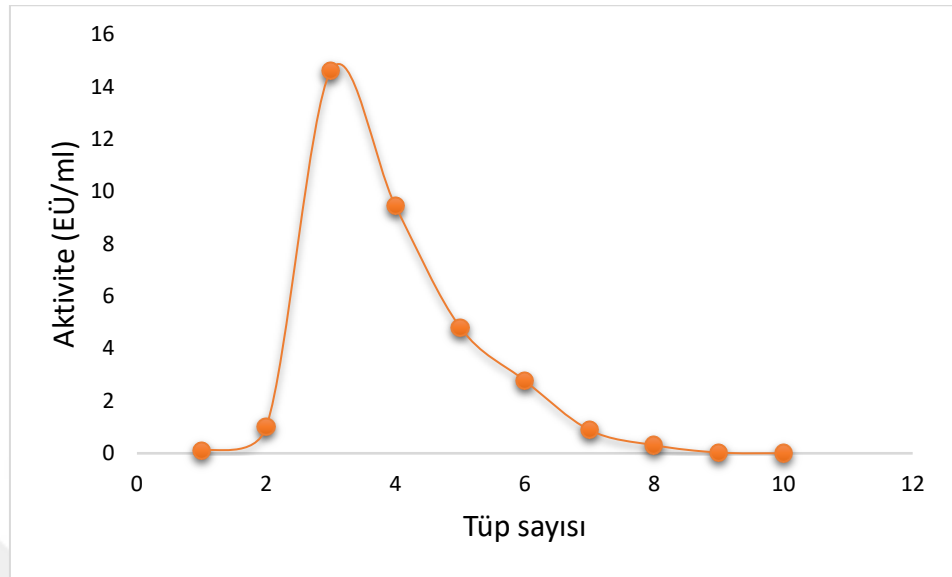
Aseton çöktürmesi sonrasında elde edilen enzim numunesi diyalizden sonra afinite kolonuna yüklendi. Elüatlar 1,5 ml olacak şekilde toplandı. Absorbans değerleri (280 nm ve 500 nm’de) ölçülerek (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.), tüp sayısına karşı, enzim aktivite grafiği çizildi (Şekil 4.8.). Ham ekstrakt ve kolondan alınan elüatlardaki protein miktarları ve aktivite (EÜ/ml) değerleri hesaplanarak oluşturulan sonuçlar Çizelge 4.1.’de verildi.



Şekil 4.6. Afinite kolonu 280 nm’de absorbans grafiği



Şekil 4.7. Afinite kolonu 595 nm’de protein tayini grafiği



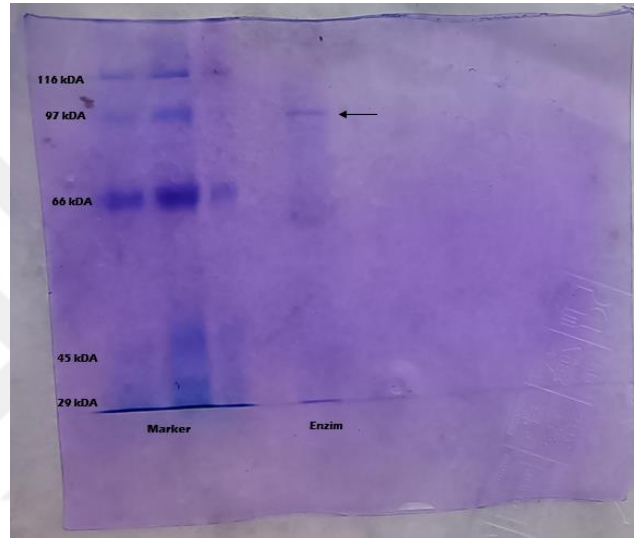
Şekil 4.8. Tirozinaz enzimi afinite kromatografisi aktivite grafiği

Çizelge 4.1. *P. ostreatus* tirozinaz enziminin saflaştırma çizelgesi

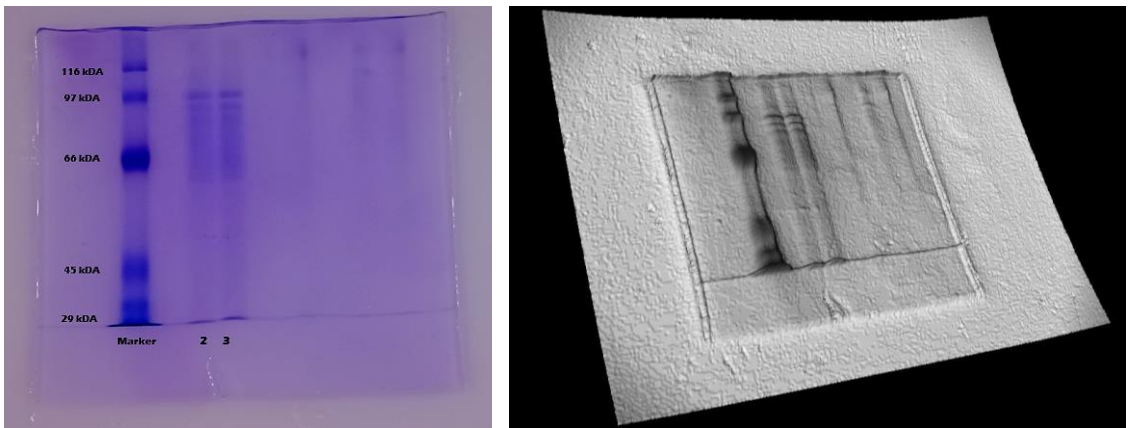
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrakt	20	15,93	104,67	318,52	2093,34	0,152	100	1
Aseton çöktürmesi	10	19,54	143,94	195,37	1439,40	0,136	61,34	0,89
Sepharose-4B-L-tirozin-p-amino Benzoik Asit Afinitite Jeli	3	19,35	68,54	58,06	205,61	0,282	18,23	1,54

4.5. SDS-PAGE ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Afinite kromatografisi yöntemi ile *P. ostreatus*'tan saflaştırılan tirozinaz enziminin saflığı SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (Şekil 4.9.) ve doğal jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jel Sygene G-BOX görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Tirozinaz enziminin SDS-PAGE görseli



Şekil 4.10. Tirozinaz enziminin doğal elektroforez görselleri

SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE jellerinde *P. ostreatus* 'tan saflaştırılan tirozinaz enziminin moleköl ağırlığı yaklaşık 97 kDA olduğu tespit edildi.

Literatür çalışmalarında, *P. ostreatus* 'tan saflaştırılan tirozinazın moleköl ağırlığının genellikle 60 ile 120 kDA arasında olduğu tespit edildi. Değişen moleköl ağırlıkları; çalışılan kaynağın farklılığı, çalışılan *P. ostreatus* 'un spesifik türü, ekstraksiyon yöntemleri, kullanılan farklı kromatografik yöntemler ve analitik teknikler gibi faktörlere bağılı olmasından kaynaklanmaktadır.

Haghbeen vd. tarafından 2004'te *Agaricus bispora* 'dan DEAE-Selölöz (DE-52) ve Sephadex G-200 kolonları kullanılarak saflaştırılan tirozinaz enzimi 128 kDA moleköl ağırlığında bulunmuştur (Haghbeen vd., 2004).

Zaidi vd. tarafından 2014'te *Agaricus bisporus* 'tan DEAE-Selölöz kromatografisi ile saflaştırılan tirozinaz enzimini 95 kDA, *Pleurotus ostreatus* 'dan yine DEAE-Selölöz kromatografisi ile saflaştırılan tirozinaz enziminin ise 75 kDA moleköl ağırlığında bulunmuştur (Zaidi, 2014).

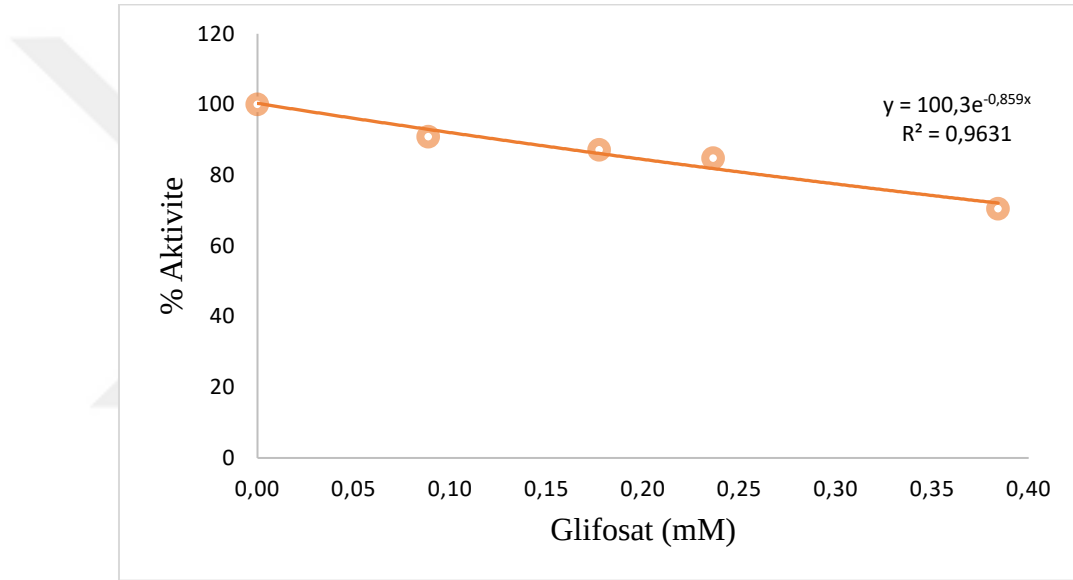
Sharma vd. tarafından 2021'de *Pleurotus djamor* 'dan DEAE-Selölöz ve Hidroksiapatit kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılan tirozinaz enzimi 90 kDA moleköl ağırlığında bulunmuştur (Sharma vd., 2021).

4.6. Tirozinaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi

Pestisitlerin yaygın kullanımı, canlıların sürekli olarak pestisitlere maruz kalmasına neden olmaktadır. Bazı enzimleri inhibe ederek çalışan pestisitler insan ve çevre sağlığı açısından risk taşımaktadır. Her pestisit kimyasal özellikleri ve moleköl etkileşimlere bağılı olarak canlılarda, organlarda ve dokularda farklı etkiler göstermektedir. Bu nedenle, belirli pestisit gruplarının farklı enzimleri de etkilediğı, özellikle dopamin metabolizmasında rol oynayan tirozinaz enzimini spesifik olarak inhibe edebildiğı araştırmalarda yer almaktadır (Martins-Gomez vd., 2022).

4.6.1. Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine glifosat pestisitinin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait bulgular

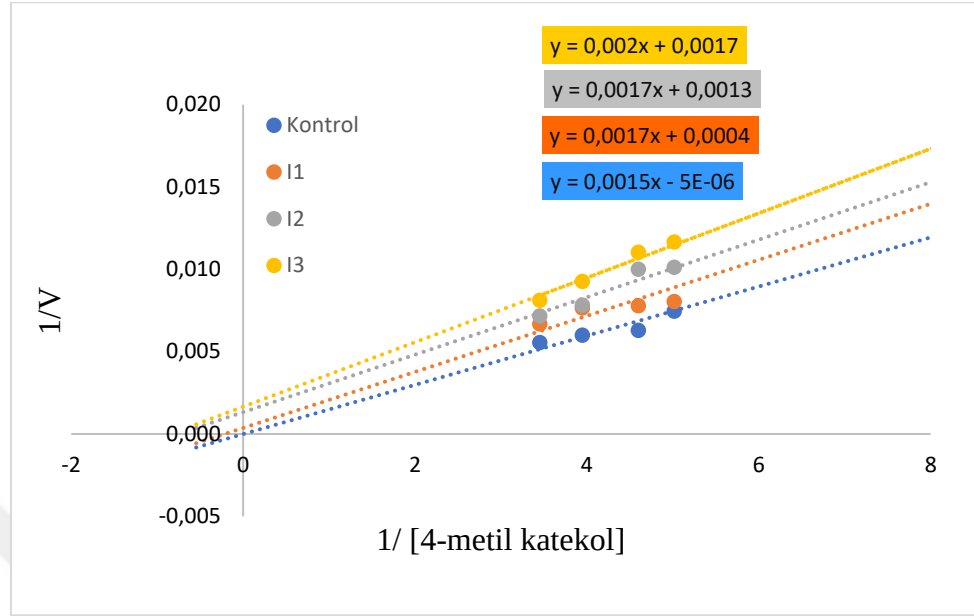
IC₅₀ değerinin tespitinde; 3,62 molar sabit 4-metil katekol konsantrasyonuna karşı beş farklı glifosat konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Elde edilen aktivite değerlerinden enzim aktivitesini yarı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀, % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek 0,807 mM olarak belirlendi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Glifosat pestisitinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, IC₅₀ grafiği

4.6.2. Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine glifosat pestisitinin K_i sabitlerinin belirlenmesine ait bulgular

Glifosat inhibitörünün K_i sabitlerinin bulunmasına yönelik çalışmada, öncelikle inhibitör kullanılmadan 4 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri bulundu. Sonrasında 4 farklı substrat konsantrasyonuna karşı, 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. 1/V ve 1/[S] değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, K_i değeri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Şekil 4.12.). Grafik denkleminde yararlanılarak K_i değerleri belirlendi (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.12. Glifosat pestisitinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, K_i grafiği

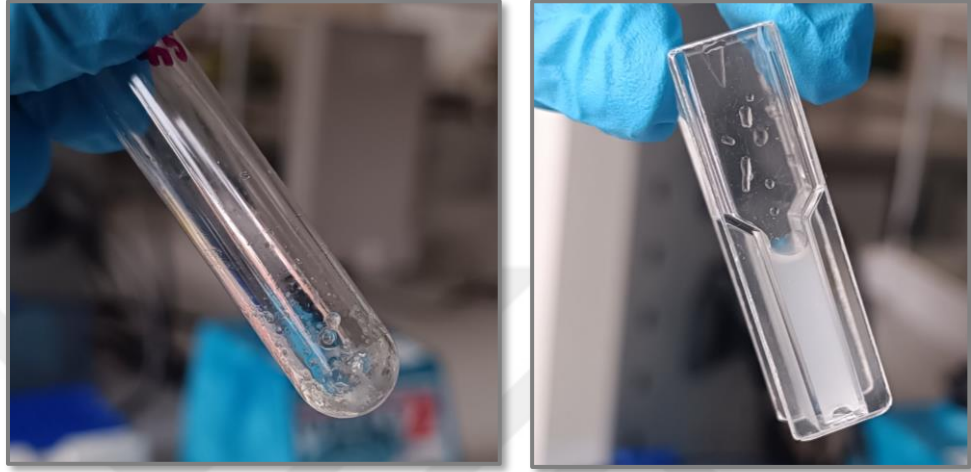
Çizelge 4.2. Tirozinaz enzimi için IC_{50} değeri, K_i sabiti ve inhibisyon türü

Pestisit	IC_{50} (mM)	K_i (μ M)	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon türü
Glifosat	0,807	4,74	$2,97 \pm 0,01$	Yarı yarışmalı
		2,21		
		1,97		

4.6.3. Tirozinaz enzimi ile paration metil pestisitinin çalışılması

Paration metil pestisitinin sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle sıcak su banyosu kullanılarak farklı sıcaklıklarda çözülmeye çalışıldı. Sıcaklık çözünürlüğü kayda değer bir şekilde etkilemedi. Paration metilin çözünmesini sağlamak amacıyla alternatif olarak DMSO ve etanol çözücüler denendi. %100, %90, %80, %70, %60, %50 oranlarında hazırlanan DMSO-H₂O ve etanol-H₂O çözeltilerinde paration metilin çözünmesi kontrol edildi. %100 DMSO ve %100 etanol gibi çözücülerde homojen olarak çözünmesine rağmen, ortama su girildiğinde çözünürlüğün tekrar bozulması ve %100 organik çözücülerde enzim

aktivitesinin, inhibitöre kıyasla daha fazla düşmesi sebebiyle bu pestisit ile çalışılamadı. Şekil 4.13.'de ortama su ekledikten sonra meydana gelen heterojen durum ve tüpün dibinde tekrar katılaşarak çözünürlüğü kaybolan paration metil görselleri gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı çözeltilerde hazırlanan paration metil

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

P. ostreatus tirozinaz enziminin kısmi saflaştırma işlemi homojenizasyon, çöktürme ve diyaliz işlemleriyle tamamlandı. Enzim ekstraktı her aşamada 4°C’de santrifüj edilerek istenmeyen proteinler ve safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Diyaliz işlemi ve son santrifüj işlemi sonrasında enzim numunesi İyon değişim ve jel filtrasyon kolonlarına tatbik edildi. Kolonlardan alınan elüatlarda enzim aktivitesi gözlenmedi. Proteinlerin saflaştırılması için daha spesifik ayırma işlemi gerçekleştiren afinite kromatografisi ile çalışılmasına karar verildi. Afinite kolonu hazırlandı ve enzim numunesi (20 ml) sepharose-4B-*L*-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonuna tatbik edildi. Toplanan elüatlarda protein ve aktivite tayinleri yapılarak grafikler oluşturuldu (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.).

Elde edilen homojenat ve sepharose-4B-*L*-tirozin-*p*-aminobenzoik asit kolonu işlemlerinden sonra saflaştırma verileri hesaplandı. Tirozinaz enzimi için verim; %18,23 belirlendi ve 1,86 kat saflaştırıldı. Spesifik aktivite; homojenatta 0,152 EÜ/mg, aseton çöktürmesi sonrası 0,136 EÜ/mg ve sepharose-4B afinite kolon kromatografisi sonrası 0,282 EÜ/mg olarak bulundu. Afinite kromatografisi ile *P. ostreatus*’tan saflaştırılan tirozinaz enziminin saflığı SDS-PAGE ve Doğal-PAGE ile kontrol edildi. Molekül ağırlığı yaklaşık 97 kDA olarak belirlendi.

Bu tez çalışmasında tirozinaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonundan sonra, glifosatın inhibisyon potansiyelini araştırmak amaçlanmıştır. Glifosatın (herbisit), tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi doğrudan *in vitro* enzimatik inhibisyon yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinden sonra *P. ostreatus* tirozinaz enziminin aktivitesi üzerine glifosatın etkisi, 4-metil katekol substratı varlığında incelendi. Tirozinaz enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonunun göstergesi olan IC₅₀ değerini bulmak için %Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.11.). Grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC₅₀ değeri 0,807 mM olarak hesaplandı. Tirozinaz enzimi üzerinde inhibisyon etki gösteren glifosatın K_i sabitlerinin bulunması için farklı 4 substrat konsantrasyonuna karşılık 3 inhibitör konsantrasyonu ile çalışıldı. 1/V ve 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi. (Şekil 4.12.) K_i sabiti 2,97 µM olarak

hesaplandı. Çalışmada etkisi incelenen glifosatın, tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyonu “yarı yarışmalı inhibisyon” olarak tespit edildi. Enzim inhibisyonu; enzim aktivitesi inhibisyonuna dayalı biyosensörlerin geliştirilmesi, pestisitlerin geliştirilmesi ve pestisit varlığının tespit edilmesi, bazı hastalık mekanizmalarının anlaşılması, enzimi hedef alan ilaçların geliştirilmesi de dahil olmak üzere birçok uygulamaya sahiptir. Enzim aktivitesi inhibisyonunun çeşitli alanlarda önemli uygulamalara sahip olması, inhibisyon çalışmalarının yapılması ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi, böylece inhibisyona dayalı uygulamaların geliştirilmesi önemlidir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdulazeed M.A. (2022). *Sırtıgökçe Mantarından (Russula cyanoxantha, L.) Polifenol Oksidaz Enziminin Elde Edilmesi ve Saflaştırılması*. [Yüksek Lisans Tezi, Karabük Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü] YÖK Ulusal Tez Merkezi.
- Adeyinka A., Muco E., Pierre L. (2023). *Organophosphates*. PMID: 29763035
- Akdoğan A., Divrikli Ü., Elçi L. (2012). *Pestisitlerin Önemi ve Ekosisteme Etkileri*. Akademik Gıda, 10(1), 125-132 s.
- Amersham P. (2002). *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. 18-1022-29, Amersham Pharmacia Biotech AB.
- Anzecc A. (2000). *Parathion in freshwater and marine water*. Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality.
- Asem D., Kumari M., Singh L.R., Bhushan M. (2023). *Chapter 11- Pesticides: Pollution, risks, and abatement measures*. 307-326 s. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96002-1.00014-6>
- Atri, N., Sharma, S. K., Joshi, R., Gulati, A., Gulati, A. (2013). *Nutritional and nutraceutical composition of five culinary-medicinal species of genus Pleurotus (higher Basidiomycetes) from northwest India*. Int. J. Med. Mushrooms, 15, 49-56. doi: 10.1615/intjmedmushr. v15.i1.60
- Avcı S. (2015). *Farklı Ağaç Türlerine Ait Talaş Ortamlarının Pleurotus Ostreatus Mantarının Verimi, Kalitesi Ve Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkileri*. [Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] YÖK Ulusal Tez Merkezi.
- Axén R., Porath J., Ernback S. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 214(5095). doi: 10.1038/2141302a0

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bandera A., Bandas A.J., (2020). Spawn Production and Return on Investment of Four Varieties of Mushroom (*Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Calocybe indica*) Using Sawdust Media. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 5(7). doi: 10.38124/IJISRT20JUL850
- Bao, J., Hou, C., Chen, M., Li, J., Huo, D., Yang, M., Luo, X., & Lei, Y. (2015). *Plant Esterase-Chitosan/Gold Nanoparticles-Graphene Nanosheet Composite-Based Biosensor for the Ultrasensitive Detection of Organophosphate Pesticides*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(47), 10319–10326 s. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03971>
- Bhat S.U., Akhter Z., Neelofar M., Qayoom U. (2022). *Chapter 5- Towards understanding the impact of pesticides on freshwater ecosystem*. *Pesticides in the Natural Environment Sources, Health Risks, and Remediation*. 121-138 s. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90489-6.00005-7>
- Bruggen A., MM O., Shin K., Mai V., Jeong KC., Finckh B., JG Morris JG. (2017). *Environmental and health effects of the herbicide glyphosate*. *Review Sci Total Environ*, 616-617:255-268. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309
- Büyükemir O. (2018) *İnsan Serumundan Paraoksonaz I İzoenziminin Saflaştırılması Ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. [Yüksek Lisans tezi, Eskişehir Anadolu Üniversitesi]1-176 s.
- Carvalho, C. S. M., Sales-Campos, C., Andrade, M. C. N. (2010). *Mushrooms of the Pleurotus genus: a review of cultivation techniques*. *Interciencia*, 35, 177-182.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Casanola-Martin G.M., Le-Thi-Thu H., Marrero-Ponce Y, A Castillo-Garit J., Torrens F., Rescigno A., Abad C., Khan M.T.H. *Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target.* Curr Top Med Che 501-1494 s. doi: 10.2174/1568026614666140523121427
- Castagna G., Weis C., Oliveira Alves A.D., Assmann C., Bonadiman B., Costabeber I. (2019) Pesticides: *Classifications, Exposure And Risks To Human Health Review.* Archives in Biosciences & Health 1(1):29-44 DOI: 10.18593/abh.17454
- Chang T.S. (2009). *An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors.* Int J Mol Sci. 10(6): 2440–2475 s. DOI: 10.3390/ijms10062440
- Coşkun Ö. (2016). *Separation techniques: Chromatography.* 3(2), 156–160 s. DOI: 10.14744/nci.2016.32757
- Cutler P. (1996). *Size-exclusion chromatography.* Part of the Methods in Molecular Biology book series 244, 239-252 s. DOI: 10.1385/1-59259-655-x:239
- Çörtenlioğlu E. (2006). *Tirozinaz Enzimi Kullanılarak L-Dopa Üretimi,* Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-50 s.
- Deri B., Kanteev M., Goldfeder M., Lecina D., Guallar V., Adir N., Fishman A. (2016). *The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition*
- Duckworth HW., Coleman JE. (1970). *Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase.* J Biol Chem 10; 245 (7): 25-1613.
- Eger G., Eden G., Wissig E. (1976). *Pleurotus ostreatus- breeding potential of a new cultivated mushroom.* Theoretical and Applied Genetics volume 47, s. 155–163

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ercili-Cura D., Huppertz T., Kelly A. (2015). *Enzymatic modification of dairy product texture*. *Modifying Food Texture*, 71-97 s. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-333-1.00004-8>
- Ergün A., (2016). *Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı 1-104 s.
- Fenoll et al. 2000; Espin et al. 2001; Brooks et al. 2004, r (Cabanès vd., 1994; Rodríguez-López vd., 1994; Espin vd., 1997; Fenoll vd., 2000; Espin vd., 2001; Brooks vd., 2004).
- Ferrier, D.R. (2014). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Sixth edition ed. New York
- Galván I., Solano F. (2016). *Bird Integumentary Melanins: Biosynthesis, Forms, Function and Evolution*. *Int J Mol Sci*. 17(4): 520. doi: 10.3390/ijms17040520
- García S., Abu-Qare A., Meeker-O'Connell W., Borton A., Abou-Donia M. (2003). *Methyl Parathion: A Review of Health Effects*. *Journal of Toxicology and Environmental*
- Guyton K., Loomis D., Grosse Y., El F., Benbrahim L., Guha N., Scoccianti C., Mattock H., Straif K., (2015). *Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate*. 16(5), 490-491 s. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Hage S.D. (1999). *Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications*. *Clinical Chemistry*, 45 (5), 593-615 s. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.5.593>
- Haghbeen K., Jazii F.R., Karkhane A.A., Borojerdi S.S. (2004). *Purification of Tyrosinase from Edible mushroom*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(3), 189-194 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Hagbbeen K., Tan E.W. (2003). *Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates*. Analytical Biochemistry Volume 312, Issue 1, 23-32 s. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00408-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00408-6)
- Harel E., Mayer A.M., Shain Y., (1964). *Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition*. Plant Physiology, 17, 921 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1964.tb08219.x>
- Hassaan M., Nemr E. (2020). *Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques*. The Egyptian Journal of Aquatic Research 46(3), 207-220 s. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- Health Part B Critical Reviews, 6(2), 185-210 s. <https://doi.org/10.1080/10937400306471>
- https://www.creative-enzymes.com/resource/oxidoreductase-introduction_19.html
- <https://www.mushroomrevival.com/blogs/blog/mushroom-anatomy>
- Inacio, F.D., Ferreira, R.O., Vaz de Araujo, C.A., Peralta, R.M., Marques de Souza, C.G. (2015). *Production of enzymes and biotransformation of orange waste by oyster mushroom, Pleurotus pulmonarius (Fr.) quel*. Adv. Microbiol., 5, 1-8. doi: 10.4236/aim.2015.51001
- İstanbulluoğlu S., Timur S.S., Gürsoy R.N. (2019) *Kozmetiklerde Kullanılan Biyoteknolojik Etkin Ve Yardımcı Maddeler*, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Volume 39 / Number 2, 98-112 s.
- Kalipcı E., Özdemir C., Öztas F., Sahinkaya S. (2010). *Ecotoxicological effects of Methyl parathion on living things and environment*. African Journal of Agricultural Research Vol. 5(8), 712-718 s. doi: 10.5897/AJAR10.113

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Kanser Değerlendirme İnceleme Komitesi, HED, Pestisit Programı Ofisi, US EPA (1 Ekim 2015). Glifosatın Kanserojen Potansiyelinin Değerlendirilmesi, Nihai Rapor. Washington: ABD EPA. 77–78.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2015). *Biyokimya* (s. 89-137). Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Kızıl Ç. (2016) *Gıdalarda bulunabilecek bazı pestisitlerin bozunma ürünlerinin belirlenmesi için metot geliştirilmesi ve metodun validasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 1-58 s.
- Kıbar B. (2019). *Farklı Pleurotus ostreatus (İstiridye Mantarı) İzolatlarının Verim ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*. Cilt: 5 Sayı: 2, 223-230. <https://doi.org/10.24180/ijaws.647848>
- Korkmaz H., TINKILIÇ N., ÖZEN T., GÜDER A. (2012). *Biyokimya-I Ders Notları* Samsun OMÜ Fen -Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı
- Kruger N. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook (s. 17–24). Springer Protocols Handbooks
- Kurutaş EB., Kılınç M. (2003). *Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi*. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, 12(3).
- Laemlli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. doi: 10.1038/227680a0
- Liu Q., Luo L., Zheng L. (2018). *Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants*. Int J Mol Sci. 19(2): 335 s. doi: 10.3390/ijms19020335
- Martins-Gomes C., Countinho E.T., Silva L.T., Andreani T., Silva M.A. (2022). *Neurotoxicity Assessment of Four Different Pesticides Using In Vitro Enzymatic Inhibition Assays*. Toxics, 10 (448), <https://doi.org/10.3390/toxics10080448>

KAYNAKLAR DİZİNİ

- May S.W. (1999). *Applications of oxidoreductases*. Review Curr Opin Biotechnol, 10(4), 370-5 s. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80067-6.
- Mayer M. A. (2006). *Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review* Phytochemistry Volume 67, Issue 21, 2318-2331 s. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
- Mertens M., Hoss S., Neumann G., Afzal J., Reichenbecher W. (2018). *Glyphosate, a chelating agent-relevant for ecological risk assessment?* Review Environ Sci Pollut Res Int. 25(6):5298-5317. doi: 10.1007/s11356-017-1080-1
- Michael C.R., Alavanja M. (2009). *Introduction: Pesticides Use and Exposure, Extensive Worldwide*. Rev Environ Health, 24(4): 303–309. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2009.24.4.303>
- Nawaz A., Shafi T., Khaliq A, Mukhtar H., Haq I. (2017). *Tyrosinase: Sources, Structure and Applications*. Int J biotech & bioeng. 3(5), 142-148 s. doi: 10.25141/2475-3432-2017-5.0135
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). Enzimler, N. Kılıç (Ed.), in Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (s. 243-290). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Özel A. (2008). *Boletus Erythropus Mantarından Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Sentetik Kimyada Katalitik Etkinliğinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 1-98 s.
- Panzella L., Napolitano A. (2019). *Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances*. Cosmetics 6(4), 57. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040057>

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., & Bae, H. (2007). *Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries*. *Phytotherapy research:PTR*, 21(9), 805–816 s. <https://doi.org/10.1002/ptr.2184>
- Patil S.A., Apine O., Surwase N., Jadhav J. (2013). *L-Dopa'nın biyolojik kaynakları: Alternatif bir yaklaşım*. *Parkinson Hastalığında Gelişmeler*, 2(3), 81-87 s. doi: 10.3390/ijms10062440.
- Pekşen A. (2001). Fındık Zurufundan Hazırlanan Yetiştirme Ortamlarının *Pleurotus Sajor-Caju* Mantarının Verimine Ve Bazı Kalite Özelliklerine Etkisi. 30(1).
- Pillaiyar T., Manickam M., Namasivayama V. (2017) *Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 403-404 s. doi: 10.1080/14756366.2016.1256882
- Polatoğlu İ. (2016). *Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Parametre Etkilerinin UV Spektrofotometre ile Yerinde Analiz Edilmesi*. *CBÜ Fen Bil. Dergi*, 12 (2), 319-325 s. doi: <http://dx.doi.org/10.18466/cbujos.13757>
- Ren, L., Perera, C., Hemar, Y. (2012). *Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review*. *Food Funct.*, 11 (3), 1118-1130 s. doi: 10.1039/c2fo10279j
- Robert Roskoski R. (2015). *Michaelis-Menten Kinetics*. LSU Health Sciences Center. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6>
- Roberts M.S., Gibb A.J. (2013). *Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs*. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*, 1-55 s. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7>
- Sanchez C. (2010). *Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms* *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 85,1321–1337.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Sanchez-Amat A., Solano F. (1997). *A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases*. Biochem Biophys Res Commun, 240 (3). doi: 10.1006/bbrc.1997.7748.
- Segel I.H. (1968). Biochemical calculations, second edition, Publised by, John Wiley and Sons Inc. New York, USA, 458 s., ISBN: 0-471-77421-9.
- Segel I.H. (2013). *Enzyme Kinetics*. Encyclopedia of Biological Chemistry, 216-220 s. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00012-8>
- Senol, F. S., Khan, M. T., Orhan, G., Gurkas, E., Orhan, I. E., Oztekin, N. S., & Ak, F. (2014). *In silico approach to inhibition of tyrosinase by ascorbic acid using molecular docking simulations*. Current topics in medicinal chemistry, 14(12), 1469–1472. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140610121253>
- Sharma J., Sharma D., Sharma A., Bansal S. (2021). *Thermo stable tyrosinase purified from *Pleurotus djamor* grown in biomimetic calcium carbonate: A biological strategy to industrial waste remediation*. Environmental Technology & Innovation, 21(2), 101294. doi: 10.1016/j.eti.2020.101294
- Sheptovitsky Y., Brudvig G. (1996). *Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase*. Biochemistry, 35(50), 16255–16263 s. doi: 10.1021/BI9613842
- Silberman, J., & Taylor, A. (2023). *Carbamate Toxicity*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Urh M., Simpson D., Zhao K. (2009). Affinity chromatography: general methods. Methods in Enzymology, Volume 463, 417-438 s. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63026-3

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). *Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life*. International journal of microbiology, 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 634. <https://doi.org/10.3390/ijms22020634>
- Waldrop G.L. (2020). Protein Function Kinetics of Enzyme Inhibition. Encyclopedia of Biological Chemistry III, Volume 3, 14-20 s. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00027-X>
- Whitaker JR. (1995). *Polyphenol Oxidase*. Food Enzymes, chapter 9, Springer, Boston, MA., 271–307 s. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2349-6_9
- Yapar A. E. (2017). *Cilt Beyazlatıcılara Genel Bakış*. Marmara Pharmaceutical Journal 21: 48-53. doi: 10.12991/marupj.259880
- Zaidi K. U., Ali S. A. (2014). *Comparative evaluation of purified and characterized tyrosinases from two edible mushrooms, Agaricus bisporus and Pleurotus ostreatus and their clinical potential*. Biosci. Biotech. Res. Comm. 8(2): 161-170 s.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). *A comprehensive review on tyrosinase inhibitors*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 34(1), 279–309 s. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>