

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Y. LİSANS TEZİ

TİRMİT MANTARINDAN (*Lactarius volemus*) BAZI
VİTAMİNLERLE (A, E, C), PROTEAZ ENZİMİNİN
TANIMLANMASI VE ENZİMİN ENDÜSTRİYEL
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Aykut ÖZTEKİN

KİMYA ANABİLİM DALI


ERZURUM

2011


Her Hakkı Saklıdır

Prof. Dr. Nazan DEMİR danışmanlığında, **Aykut ÖZTEKİN** tarafından hazırlanan bu çalışma 29/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

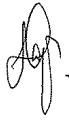
Başkan : Prof. Dr. Nazan DEMİR

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Yaşar DEMİR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza : 

(imza)
Yukarıdaki sonucu onaylıyorum
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİRMİT MANTARINDAN (*Lactarius volemus*) BAZI VİTAMİNLERLE (A, E, C), PROTEAZ ENZİMİNİN TANIMLANMASI VE ENZİMİN ENDÜSTRİYEL UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Aykut ÖZTEKİN

Atatürk Üniversitesi
Fen BilimLeri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Proteazlar proteinlerin peptitlere ve aminoasitlere hidrolizini katalizler. Hem biyokimyasal hem de endüstriyel uygulamalarda en önemLi enzim gruplarından biridir. Bu çalışmada Erzurum'un Hamam deresi kırsalından toplanan yenilebilir bir mantar türü olan tiritmantarından (*Lactarius volemus*) (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi, CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi kolonu kullanılarak proteaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi. Enzim için optimum pH ve optimum sıcaklık, kazein, azokazein, jelatin, hemoglobin, azoalbümin substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Tiritmantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE kullanıldı. Enzimin moleköl ağırlığı 26,1 kD olarak jel filtrasyon kromatografisinden yararlanılarak hesaplandı.

Enzim aktivitesi üzerine Hg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, Mg²⁺ (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) katyonlarının, EDTA, SDS, β-merkapto etanol ve iyodasetamid kimyasallarının etkisi incelendi.

Saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürmesi ve kan lekesi üzerine etkisi araştırıldı. Sonuçlar saflaştırılan proteaz enziminin peynir üretiminde kullanılabileceğini gösterdi. Tiritmantarının (*Lactarius volemus*) A vitamini (β-karoten) miktarı 68±0,24 µg/100 g, E vitamini (α-tokoferol) miktarı 37±0,13 µg/100 g ve C vitamini (askorbik asit) miktarı 18±0,32 mg/100 g olarak belirlendi.

2011, 69 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Proteaz, mantar (*Lactarius volemus*), peynir, kazein, endüstriyel uygulama

ABSTRACT

Master Thesis

CHARACTERIZING SOME VITAMINS (A, E, C), PROTEASE ENZYME FROM NON-TOXIC EDIBLE MUSHROOM (*Lactarius volemus*) AND RESEARCHING THE INDUSTRIAL APPLICATION OF THE ENZYME

Aykut ÖZTEKİN

Atatürk University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Enzymes that hydrolyze peptide bonds, peptides or proteins are classified as proteases. Proteases are one of the important groups both in biochemical and industrial applications. In this study, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate and CM-Sephadex ion exchange chromatography were used for purification of the protease from non-toxic edible mushroom (*Lactarius volemus*) which is grown up in Hamam Deresi in Erzurum. Optimal pH and temperature and K_m and V_{max} values for casein, azocasein, azoalbumin, gelatin, hemoglobin substrats for purified enzyme were calculated. Sodium dodecyl sulphate polacrylamide gel electrophoresis was applied for control of the protease enzyme purified from non-toxic edible mushroom (*Lactarius volemus*) and molecular weight of purified protease enzyme is determined as 26,1 kDa by using gel filtration chromatography.

The effect of Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) cations and EDTA, SDS, β -mercapto ethanol and iodoasetamid chemicals on enzyme activity were studied.

The effect of purified protease enzyme on milk precipitation and blood stain were studied. The results showed that the purified protease enzyme could be used in cheese production. Non-toxic edible mushrooms (*Lactarius volemus*) Vitamin A (β -carotene), Vitamin E (α -tocopherol) and Vitamin C (ascorbic acid) values are determined as $68 \pm 0,24 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, $37 \pm 0,13 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ and $18 \pm 0,32 \text{ mg}/100 \text{ g}$ respectively.

2011, 69 Pages

Keywords: Protease, mushroom (*Lactarius volemus*), cheese, casein, industrial application

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımın baőından sonuna kadar bilgi ve tecrübeleriyle benden hiçbir yardımı esirgemeyen saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e,

Tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e,

Çalıőmalarımın teorik ve deneysel kısmında bana yardımcı olan hocam Sayın Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na,

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'ne,

Çalıőmalarımı yaptığım Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'ne teőekkürlerimi sunarım.

Aykut ÖZTEKİN

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	17
3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	17
3.2. Yaralanılan Alet ve Cihazlar.....	17
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	18
3.4. Yöntemler.....	23
3.4.1. Protein tayini.....	23
3.4.1.a. Kalitatif protein tayini.....	23
3.4.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	24
3.4.2. Tirmit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) proteaz enziminin saflaştırılması.....	24
3.4.2.a. Örneklerinin toplanması.....	24
3.4.2.b. Homojenatın hazırlanması.....	24
3.4.2.d. Diyaliz.....	26
3.4.2.e. CM-Sephadex iyon değişim kolonunun hazırlanması.....	26
3.4.2.f. Tirmit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) elde edilen homojenatın CM-Sephadex iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu.....	27
3.4.3. Proteaz enzimi için aktivite tayini.....	27
3.4.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü ve alt birimlerin belirlenmesi.....	28
3.5. Tirmit Mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	29
3.5.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	29
3.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	29
3.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini.....	30
3.5.4. Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi.....	30

3.5.5. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi	31
3.5.6. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi	32
3.5.7. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması.....	33
3.6. Tirit Mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Sütün öktürölmesi	33
3.7. Tirit Mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Kanın Temizlenmesi Etkisinin İncelenmesi.....	34
3.8. Tirit Mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) (A, C, D) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi.....	34
3.8.1. Ekstrelerin hazırlanması.....	34
3.8.2. Tirit mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) C vitamini miktarının belirlenmesi.....	34
3.8.3. Tirit mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) E vitamini miktarının belirlenmesi.....	35
3.8.4. Tirit mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) A vitamini miktarının belirlenmesi	35
4. ARAşTIRMA BULGULARI	36
4.1. Kantitatif Protein İin Hazırlanan Standart Eğri.....	36
4.2. Tirit Mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	37
4.2.1. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) proteaz enziminin CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	37
4.2.2. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	38
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	39
4.3. Tirit Mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik alışmaların Sonuçları.....	40
4.3.1. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları	40
4.3.2. Optimum sıcaklık sonuçları	41
4.3.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile moleköl ağırlığı tayini sonuçları.....	42
4.3.4. Kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması sonuçları	44
4.3.5. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi sonuçları	45
4.3.6. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi sonuçları	48
4.3.7. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin incelenmesi sonuçları.....	54

4.4. Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Sütün Çöktürölmesi Sonuçları	57
4.6. Tirit Mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) C Vitamini Miktarının Belirlenmesi	58
4.7. Tirit Mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) E Vitamini Miktarının Belirlenmesi	59
4.8. Tirit Mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) A vitamini Miktarının Belirlenmesi	60
5. TARTIşMA ve SONUÇ	62
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİş	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Asp	Aspartik Asit
BSA	Bovin serum albümin
CA	Karbonik anhidraz
CM	Karboksimetil
Dak	Dakika
DTT	Ditiyoeritritol
E	Enzim
E.C	Enzim Kod
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
His	Histidin
I	İnhibitör
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
S	Substrat
Ser	Serin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kimotripsin yapısı	10
Şekil 2.2. Sistein proteazların genel reaksiyon mekanizması	10
Şekil 2.3. Serin proteazlarının genel reaksiyon mekanizması	11
Şekil 2.4. Aspartik proteazların genel reaksiyon mekanizması	12
Şekil 2.5. Çinko (metaloproteaz) genel reaksiyon mekanizması	12
Şekil 2.6. <i>Lactarius volemus</i>	15
Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	36
Şekil 4.2. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) CM-Sephadex iyon değişim kolonu ile saflaştırılan proteaz enziminin aktivite absorbans grafiği	38
Şekil 4.3. CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	40
Şekil 4.4. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	41
Şekil 4.5. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	42
Şekil 4.6. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	43
Şekil 4.7. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği	43
Şekil 4.8. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	44
Şekil 4.9. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	46
Şekil 4.10. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için jelatin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	46

Şekil 4.11. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için azoalbümin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	47
Şekil 4.12. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	47
Şekil 4.13. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	49
Şekil 4.14. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	50
Şekil 4.15. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM CaCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	50
Şekil 4.16. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	51
Şekil 4.17. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl ₃ 'ün etkisinin sonuçları	51
Şekil 4.18. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	52
Şekil 4.19. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MnCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları	52
Şekil 4.20. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA'in etkisinin sonuçları	54
Şekil 4.21. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS'nin etkisinin sonuçları	55

Şekil 4.22. Tirmit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM iodasetamid'in etkisinin sonuçları	55
Şekil 4.23. Tirmit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM β -merkapto etanol'ün etkisinin sonuçları	56
Şekil 4.24. Saflaştırılan proteaz enzimi kullanılarak sütün çöktürülmesi	57
Şekil 4.25. Saflaştırılan proteaz enzimi kullanılarak kanın temizlenmesi etkisinin sonuçları	58
Şekil 4.26. E vitamini tayini standart grafiği	59
Şekil 4.27. A vitamini tayini standart grafiği	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. CM-Sephadex kolonundan tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları	39
Çizelge 4.2. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği sonuçları	48
Çizelge 4.3. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları	53
Çizelge 4.4. Tirit mantarından (<i>Lactarius volemus</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi sonuçları	56
Çizelge 4.5. Tirit mantarının (<i>Lactarius volemus</i>) vitamin tayini sonuçları	61

1. GİRİŞ

Organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için kendi kimyasal reaksiyonlarını seçici ve yeterli bir şekilde katalizleme yeteneğine sahip olmaları gerekir. Kataliz olmaksızın yıllarca sürebilecek kimyasal reaksiyonlar katalizörler varlığında saniyeler içinde gerçekleşebilir. Enzimler benzer substratlar arasında inanılmaz derecede seçim yapabilen, reaksiyonun gerçekleşme hızını 10^{17} kat kadar arttırabilen özgül biyomoleküllerdir.

Enzimler biyokimyasal süreçlerde merkez durumundadır. Enzim katalizli besin moleküllerinin parçalandığı tepkimelerde kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin üretimi sağlanır (Lehninger 2005).

Enzimlerin çoğu protein yapısındadır. Bir kaçı ise ribonükleik asit veya ribonükleoproteinlerdir. Katalitik mekanizma substrat ile enzimin birbirine bağlandığı ve kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği göreceli olarak küçük olan aktif bir bölgede gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlarda ki temel olaylar enzim ve substratın dinamik ve direkt etkileşiminin gerçekleştiği bu bölgede meydana gelir. Aktif bölgede hidrofobik, elektrostatik, dipolar etkileşimler ve hidrojen bağları oluşur. Fonksiyonel gruplar içeren aminoasitlerin yan zincirleri glutamat, aspartat, lizin, histidin, arginin, serin, treonin, trozin ve sistein dizilerinin karboksi, amino, imidazol, hidroksi ve tiol grupları ile kimyasal katalizi gerçekleştirir. Bu fonksiyonel gruplar substrat ile enzim arasında elektrostatik etkileşmeyi sağlar, hidrojen bağları oluşturur ve bu şekilde asit-baz, nükleofilik, elektrofilik katalizi meydana getirir (Frey and Hegeman 2007).

Enzimler 12 000'den 1 000 000'a kadar değişen molekül ağırlığına sahip olabilirler. Enzimlerin bazıları aktiviteleri için yalnızca aminoasit kalıntılarına diğerleri ise aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duyar. Bu kimyasal gruplar kofaktör olarak adlandırılır. Fe, Mg, Mn, Zn gibi metal iyonları ve koenzim olarak adlandırılan organik ve

metalloorganik moleküller kofaktörler olabilir. Enzim proteinine bağlanan metal iyonuna ve koenzime prostetik grup denir. Metal iyonu ya da koenzimiyle aktif olan enzime holoenzim, holoenzimi oluşturan protein kısmı ise apoenzim olarak ifade edilir (Lehninger 2005).

Enzimler; Enzim katalizli reaksiyonlarda ΔG 'yi düşürür ve reaksiyonun gerçekleşmesini kolaylaştırır. Substratın ürüne dönüştüğü geçiş aşamasında ihtiyaç duyulan ortamı yaratır, aktivasyon enerjisini düşürür. ES kompleksini oluşturmak için geçici olarak substratla reaksiyona girer ve reaksiyonun gerçekleşmesi için alternatif bir yol üretir. Substratı reaksiyon için uygun bir hale getirerek reaksiyon entropisini düşürür. Reaksiyonlarda sıcaklığı yükseltir, sıcaklığın yükselmesi enzimin fonksiyonunu gerçekleştirmesinin ve sonuç ürününün oluşmasını hızlandırır, fakat çok fazla sıcaklık enzimin şekline zarar verir ve enzim denature olur (Fersht 1985).

Bir enzimin aktivitesini ifade etmek için IU (International Unit) tanımlaması kullanılır. Bir ünite enzim (EU), bir dakikada 1 μmol substratı ürüne dönüştüren veya 1 μmol ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilir. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bir diğer birim spesifik aktivitedir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır.

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{L. dak}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{EU}}{\text{mg protein}}$$

Enzim katalizli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörleri; sıcaklık, pH, iyonik şiddet, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, ortamda bulunan aktivatör ve inhibitörler olarak sıralayabiliriz.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı denir. Enzim çalışmalarında hidrojen iyonunun konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Bir enzimin optimum pH'sı substratının yapısına ve elde edildiği kaynağa bağlıdır (Özata ve Kutlu 2000).

Enzimler ortamın asidik veya bazik olmasına karşı duyarlıdırlar. Pepsin pH:1,5-2,5 arasında en yüksek aktiviteye sahiptir. Enzimlerin çoğu pH'nın 1'e kadar düşmesine veya 11'e kadar yükselmesine dayanamaz ve aktivitelerini kaybederler (Keskin 1987).

Enzimatik reaksiyonlar için sıcaklığın etkisi değişkendir. Sıcaklık enzimatik reaksiyon hızlarını yükseltir. Ancak enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapılı olduğundan sıcaklık yükseldiğinde denatüre olurlar ve aktivite göstermezler. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık optimum sıcaklıktır (Özata ve Kutlu 2000).

Enzimler 6 ana grup olarak sınıflandırılır:

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasındaki oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasındaki hidrojenden başka fonksiyonel bir grubun transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Eter, ester, peptit, glikozit, anhidrit bağlarının hidroliz reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Proteolitik enzimler, nükleazlar, lipazlar, fosfatazlar ve glikozidazlar bu enzim grubuna dâhildir.
- 4. Liyazlar:** Substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri hidrolizden farklı bir mekanizma ile katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar: Mutaz, epimeraz, rasemaz özel adları ile verilen bu enzimler geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler.

6. Ligazlar: Bir bağın kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla, iki metabolitin bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Hücre içinde enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının belirlenmesi, farklı organizmalarda ve dokulardaki izoenzimlerin karşılaştırılması, metabolizmanın düzenlenmesindeki kontrol mekanizmalarının belirlenmesi, aktivatör ve inhibitör olarak görev yapabilecek maddelerin saptanması, enzimin aktif bölgesindeki aminoasitlerin ve yan grupların belirlenmesi enzimin kataliz mekanizmasını aydınlatmaya yardımcı olur (Temizkan ve Arda 2008).

Bir enzimatik tepkimenin maksimum hızını (V_{max}) bulmak için substrat konsantrasyonunu arttırmak ve bu şekilde serbest enzimlerin (E), substrata bağlanmış (ES) kompleksine dönüştürülmesi gerekir. Enzimin maksimum hızında ES kompleksinin miktarı toplam enzim miktarına eşittir. Enzimin maksimum hızının yarısına ulaşması için gereken substrat miktarı Michaelis-Menten sabiti (K_M) olarak bilinir ve aynı zamanda K_M sabiti enzimin substrata olan ilgisinin bir ifadesidir. Diğer önemli bir parametre ise k_{cat} 'tir, bir saniyede aktif bölgede değişime uğrayan substrat molekülü sayısını ifade eder.

İnhibitor enzim katalizli gerçekleşen reaksiyonların hızlarını azaltan veya reaksiyonları tamamen durduran küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. İnhibitör enzime kovalent olarak bağlanır veya enzimle zor ayrışabilen bir kompleks oluşturursa bu dönüşümsüz inhibisyona örnek olur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_M değişmeden kalır (Altan 2000).

Dönüşümlü inhibisyonda inhibitör ile enzim etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık tip inhibisyon olmak üzere 4 kısımda incelenir.

Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzime bağlanmak için bir yarış içerisindedir. İnhibitör yapısal olarak substrata benzer ve enzim üzerinde substratın bağlanabildiği bölgelere bağlanır. İnhibitörle substrat aynı anda enzime bağlanamaz. Substrat ile inhibitörün enzime bağlanması bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması inhibisyon etkisini düşürür. Yarışmalı inhibisyonda maksimum reaksiyon hızı değişmez (V_{max}), fakat maksimum hıza ulaşmak için substrat konsantrasyonunun artırılması K_M değerinin artmasına neden olur (Price 1979).

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzim yerine ES kompleksine bağlanır. Oluşan EIS kompleksi enzimatik olarak inaktif olur. Bu inhibisyon çeşidine nadiren rastlanır, fakat multimerik enzimlerde görülebilir. EIS kompleksi ortamda sürekli olarak vardır ve bu V_{max} 'ın düşmesine neden olur. ES kompleksi miktarının azalması da K_M 'nin düşmesine yol açar.

Yarışmasız inhibitörler substratla aynı anda enzime bağlanabilir, fakat inhibitörün bağlandığı yer enzimin aktif bölgesi değildir. Oluşan hem EI hem de EIS kompleksleri enzimatik olarak inaktiftir. Yüksek substrat konsantrasyonunda bile enzimden ayrılmayan inhibitör V_{max} değerini düşürür. Substrat enzime yüksek inhibitör konsantrasyonlarında bile bağlı olduğundan K_m değeri değişmeden kalır.

Karışık inhibisyon, yarışmasız inhibisyona benzer, ancak EIS kompleksi düşük de olsa enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu tip inhibisyon çeşidi Michaelis-Menten eşitliğine uymaz.

Birçok organizmada inhibitörler feedback mekanizmasının bir parçası olarak görev alabilirler. Eğer bir enzim organizmada bir maddeden aşırı miktarda üretirse, aşırı miktarda üretilen madde bu maddeyi üreten enzimin inhibitörü gibi davranır ve bu şekilde aşırı bir üretimin önüne geçilmiş olur. Multienzim sistemlerinin kendileri reaksiyon hızlarını düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerde reaksiyonun son ürünü, konsantrasyonu belirli bir düzeye geldiğinde sistemin ilk enzimini veya enzim sistemindeki dallanma noktasındaki enzimi inhibe ederek feedback inhibisyonunu gerçekleştirir.

Biyokimya alanında en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Enzimler tarım, gıda ve kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Peynir, yoğurt, şarap, ekmek yapımında enzim katalizli reaksiyonlardan faydalanılmaktadır. Son yıllarda enzimlerin hastalık tanısı ve tedavisindeki önemi giderek artmıştır (Onat ve Emerk 1987).

Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri dünya enzim pazarının %75'ini oluşturmaktadır. Proteazlar, amilazlar, lipazlar, pektinazlar ve selülozlar gibi hidrolazlar yaygın olarak kullanılan enzim gruplarıdır.

Metabolizmada önemli işlevlere sahip olan proteolitik enzimler in-vitro olarak çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır.

Proteazlar gıda endüstrisinde unlu mamüllerde, fermante ürünlerde, biranın olgunlaştırılmasında, peynir endüstrisinde, et olgunlaştırmada, deterjanlarda, deri sanayiinde biyomedikal uygulamalarda ve benzeri alanlarda yaygın olarak kullanılan enzimlerdir (Topal 2000).

Askorbik asit (C vitamini) sıvılarda oksidasyonu engellemede rol oynayan bir antioksidandır. Bağışıklık hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve enfeksiyon sırasında çabuk bir şekilde tüketilir. Bağışıklık sistemi ile ilgisi tam olarak

bilinmemekle birlikte fagosit aktivitelerini, sitokinlerin üretimini ve monositlerdeki adezyon moleküllerinin sayısını düzenlediği düşünülmektedir (Preedy *et al.* 2010).

Askorbik asit bitkilerin kloroplastlarında, fotosentezin oksidatif stresini iyileştirmede görev alır. Buna ek olarak hücre bölünmesinde ve protein modifikasyonunda da rol oynar (Smirnoff 1996).

α -Tokoferol, yağda çözünen önemli bir antioksidandır. Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunda üretilen lipid radikalleriyle reaksiyona girerek hücre membranlarını oksidasyondan korur. Serbest radikallerin reaksiyona girmesini engeller (Traber and Atkinson 2007).

E vitamininin birçok biyolojik fonksiyonu vardır. Antioksidan fonksiyonu E vitamininin en çok bilinen ve en önemli işlevi olarak düşünülür. Enzimatik aktiviteleri düzenlemesi E vitamininin diğer önemli bir işlevi olarak karşımıza çıkar (Bell 1987).

A vitamini (Retinol, Retinal, Karotenoid) gözün ışık emici retinası, skotopik vizyon ve renk vizyonu tarafından gereksinim duyulan bir vitamindir. Epitelyal ve diğer hücreler için hormon benzeri büyüme faktörü olarak retinoik asit görev yapar. Retinoik asit gen transkripsiyonlarında önemli bir rol oynar. Retinol hücre tarafından alındığında retinol dehidrogenaz tarafından retinala okside edilir ve sonra retinal dehidrogenaz tarafından retinoik aside oksidize edilir (Duester 2008).

A vitamini yiyeceklerde 2 temel formda bulunur: Birincisi retinoldür. Hayvansal yiyecekler yenildiği zaman alınan, A vitamini yapısında yağda çözünebilen, sarı bir maddedir. Saf alkol formu stabil olmadığından dokularda retinil ester formunda bulunur. Ticari olarak retinil asetat ve retinil palmitat olarak üretilir.

İkincisi ise alfa karoten, beta karoten, gama karoten ve ksantofil beta-cryptoxanthindir. Otçul ve etçil hayvanlarda A vitamini olarak fonksiyon gösterir. Bu türevler kullanılmadan önce enzimatik reaksiyonla retinale çevrilmesi gerekir.

Bu çalışmada Erzurum ve çevresinde yaz aylarında yetişen, halk arasında tirit mantarı olarak bilinen, yenilebilir bir mantar türü olan (*Lactarius volemus*)'tan proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, saflaştırılan proteaz, enzimin peynir yapımında ve deterjan katkısı olarak temizlik endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağına araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında tirit mantarının (*Lactarius volemus*) A vitamini, C vitamini, E vitamini miktarları da belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETİ

Hidrolazlar ana grubuna dâhil olan proteazlar (4.3.1.1), proteolitik enzimler olarak da bilinir. Bunlar peptid bağlarının su etkisiyle bölünmesini katalizler. Endüstriyel kullanım potansiyelleri nedeniyle önemli bir enzim grubudur ve dünyada enzim pazarının %60'ına sahiptir (Çalkı 1999).

Proteazlar bitkilerden, hayvanlardan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. Günümüzde hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıkların var olmasından dolayı (SARS, deli dana, kuş gribi vs.), hayvansal proteazların özellikle gıda maddesi yapımında kullanımı konusunda kuşku oluşmuştur bu gelişme araştırmacıları yeni bitkisel proteaz kaynakları aramaya sevk etmiştir (Demir *et al.* 2005).

Proteazlar aktif oldukları bölgelere göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Reaksiyon mekanizmalarına göre ise serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metalo proteazlar olmak üzere dörde ayrılırlar. Serin ve sistein proteazlar nükleofilik olarak substrata saldırırken aspartik ve metalo proteazlar su moleküllerini aktive ederek peptid bağlarını parçalarlar (Barrett *et al.* 1998).

Sistein proteazlar nükleofilik katalizörler gibi sistein kalıntıları ile birleşen peptid hidrolaz aileleri, papain ailesi ve kaspaz ailesini içerir. Bitkisel kaynaklı bir enzim olan papain, mekanik açıdan en kapsamlı incelenmiş papain türüdür. Papain bitki kökenli bir enzim olmasına rağmen, papain benzeri birçok enzim hayvanlarda da bulunur (Barrett *et al.* 1998).

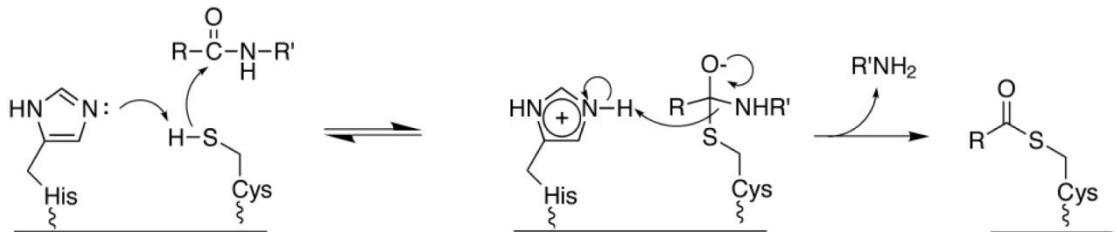
Peptidazlar arasında katepsinler, bleomisin hidrolaz ve ubiquitin C-terminal hidrolazlar papain ailesindedir (Barrett *et al.* 1998). Kaspaz ailesi, diğer proteazlardan fonksiyonel aspartat sitelerinin varlığıyla ayrılan, kalsiyum-bağımlı sistein proteazlardır ve

apoptozis üzerindeki önemli rolünden dolayı hala üzerinde çalışılmaktadır. Sistein proteazlar, ilaç endüstrisinde önemli bir hedef haline gelmiştir (Lecaille *et al.* 2002). Tüm sistein proteazların çalışma mekanizmasının benzer olduğu düşünülür ve papain üzerinde yapılan yoğun çalışmalar proteazlar için önemli bir örnek teşkil eder.



Şekil 2.1. Kimotripsin 3 boyutlu yapısı (yeşil renkli bölgeler aktif bölgeler)

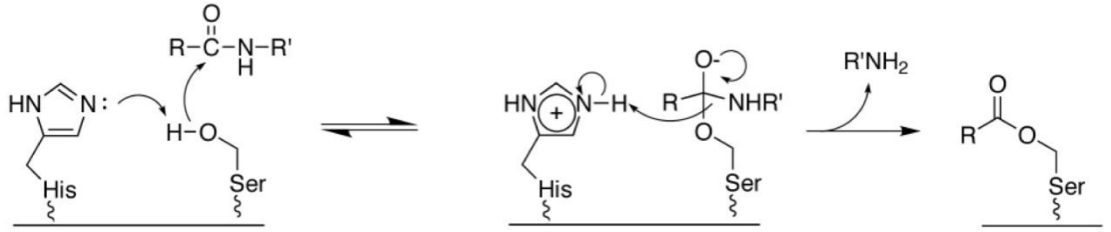
Papain (EC 3.4.22.2), 212 aminoasitten oluşan, papayadan izole edilmiş monomerik bir enzimdir ve peptidaz aktivitesi mekanizması, kimotripsin ve tripsin gibi proteazlara göre daha az bilinir (Glazer and Smith 1971). Papain, kimotripsin gibi ester ve tiyoester hidrolizini katalize eder. Papain iyodoasetat içeren alkilleyici ajanlar üzerindeki hassasiyeti yüzünden sistein kalıntılarına ihtiyaç duyar.



Şekil 2.2. Sistein proteazların genel reaksiyon mekanizması

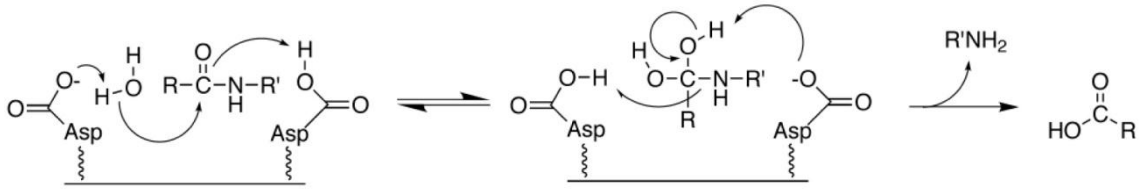
Serin proteazlar peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Peptid bağlarının hidrolizi; polipeptid hormon sürecinin, taşıyıcı proteinlerden lider dizilerin taşınmasının, yeni taşınmış proteinlerden N-terminal metioninin taşınmasının, viral enfeksiyonda polipeptid sürecinin, yabancı proteinlerin sindirilmesinin, apoptozisde hücrel protein sindiriminin, besin proteinlerinin sindiriminin ve diğer birçok sürecin temelini oluşturur.

Serinin hidroksil grubu 13.4 pKa'ya sahiptir. Hücredeki pH değeri nötr olduğundan zor bir süreç olan alkoksit iyonize olmalıdır (Bruice *et al.* 1962). Serinin nükleofilik reaksiyonunun, geçiş evresinde, hidroksil grubundan protonu koparmak için kuvvetli bir baza ihtiyacı vardır. Bunun için de serin proteazlar, pKa'sı 7 olan histidin (Şekil 2.3) kalıntılarını devreye sokarlar.



Şekil 2.3. Serin proteazlarının genel reaksiyon mekanizması

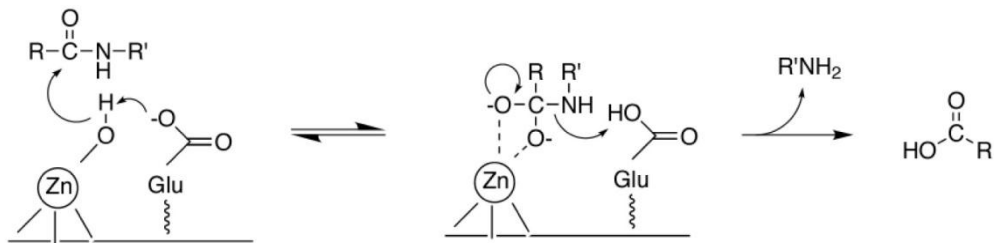
Aspartik proteaz aileleri, peptid bağlarının hidrolizini kataliz eden aktif sitelerinde, iki aspartik asit kalıntısına sahiptir. Bunlardan ilki, hayvanlarda protein sindirimini başlatan gastrik enzim pepsindir (EC 3.4.23.1). Pepsin homologları; lizozomlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunur. HIV proteazı (EC 3.4.23.16), retroviralde önemli bir rol oynayan aspartik proteazların başka bir ailesinin üyesidir.



Şekil 2.4. Aspartik proteazların genel reaksiyon mekanizması

Proteolitik enzimlerin en büyük ailesi metalloproteazlardır (Barrett *et al.* 1998). Mononükleer çinko metalloproteazlar, iki çekirdekli metalloproteazları da içeren proteaz ailesinin önemli örneklerindedir. Metalloproteazın aktif sitesindeki metal iyonun, peptid karbonil grubu ile nükleofilik reaksiyon tarafından peptid bağlarını ayıran su moleküllerini bağladığı düşünülür. Su ve metal iyon koordinasyonu, pKa değerini düşürür ve geçiş aşamasında hidroksit iyonunu oluşturmak için proton koparılmasını kolaylaştırır. Tetrahedral bir kompleks içinde su ile Zn^{2+} 'nin koordinasyonu, suyun pKa'sını 15'ten 9,6'ya kadar düşürür.

Bir ekzopeptidaz, polipeptidin N-terminal veya C-terminal amino asidinin hidrolitik koparılmasını kataliz eder. Lösin aminopeptidaz, N-terminal aminoasitlerini koparan iki çekirdekli metallopeptidazdır (Barrett *et al.* 1998). Karboksipeptidaz A (EC 3.4.17.1), hidrofobik C-terminal aminoasitleri için yüksek bir seçicilikle C-terminal aminoasitlerini koparan mononükleer çinko metallo peptidazdır. Karboksipeptidaz A aynı zamanda ester ve tiyoesterlerin hidrolizini de katalize eden proteolitik bir enzimdir.



Şekil 2.5. Çinko (metalproteaz) genel reaksiyon mekanizması

Alkalın proteazlar fizyolojik ve ticari anlamda kullanılan çok önemli bir enzim grubudur. Bu grup yüksek derecedeki substrat spesifikliği ile proteinlerin hidrolizinde önemli katalitik bir rol oynar ve mikrobiyal olarak büyük miktarlarda üretilirler. Proteazlar deterjan endüstrisi, deri endüstrisi, et ve süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 1994 yılında 400 milyon dolarlık enzim endüstrisi piyasasının 112 milyon doları deterjanlarda kullanılan proteaz enzimine ayrılmıştır (Zhang *et al.* 2010).

E Vitamini güçlü bir antioksidandır. Hücre yapısının bozulmasını engeller. Yaraların iyileşmesini hızlandırır. Kansere karşı koruyucudur. Damar sertliğini ve tıkanmalarını engeller. Vücuda alınan ağır metaller, zehirli bileşikler ve bazı ilaçların yarattığı toksinlere karşı koruma sağlar (Shireen *et al.* 2008).

C vitamini antioksidan özellik göstermektedir. C vitamininin en önemli faydalarından biri, cildi güneşin zararlı etkilerinden koruyabilmesi, melanin üretimini azaltıcı etkisi sayesinde cildi lekelenmekten korumasıdır (Kang *et al.* 2010).

A vitamini cilt gelişimi için zorunlu bir vitamindir. Cilt tarafından emilebilir, hücre yenilenmesini ve çoğalmasını sağlar. Göz sağlığı için hayati önem taşır (Kang *et al.* 2010).

Mantarlar toprağın üzerinde yetişen, etli, sporları olan fungus ailesinden bir besin kaynağıdır. Mantarlar bitki değildir ve fotosentez yapmazlar. Gövdesi, şapkası, lamelleri ve sporları vardır.

Mantarları ayırt edebilmek için makroskobik yapılarının bilinmesi gerekir.

Yenilebilen mantarları zehirli mantarlardan ayırmak büyük dikkat ve özen gerektirir, çünkü ne zehirli mantarları ne de yenilebilen mantarları tespit etmek için belirli bir özellik vardır (Hall *et al.* 2003). Ayrıca, yenilebilir mantarlar bile bazı kişilerde hafif

derecede astımdan şiddetli anafilaktik şoklara kadar alerjik reaksiyona neden olabilir (Ammirati *et al.*1985).

Mantarlar genellikle yemeğe garnitür olarak çiğ veya pişmiş yenen, düşük kalorili yiyeceklerdir. Çiğ diyet mantarları riboflavin, niasin ve pantotenik asit gibi B vitamini ve temel mineraller, selenyum, bakır ve potasyum yönünden zengin kaynaklardır. Yağ, karbonhidrat ve kalori miktarı düşüktür.

Ultraviyole ışığına maruz kaldığında, mantardaki doğal ergosteroller D2 vitamini üretir. Bu süreç perakende gıda pazarında kullanılan bir süreçtir (Koyyalamudi *et al.* 2009).

Birçok mantar türü zehir, antibiyotik, antiviral, ya da bioluminescent gibi ikincil metabolitleri üretebilir. Ölümcül türler az sayıda olmasına rağmen, ölümcül olmayan türlerin bazıları da ağır ve hoş olmayan belirtilere neden olabilir. Toksikite, basidiocarp işlevini koruyan bir rol oynar. Misel, sporları dağıtmak için enerji sarf eder ve protoplazmik materyalleri kullanır.

Ayrıca, mantarların radyoaktif maddeler gibi ağır metalleri emme özelliği nedeniyle Avrupa mantarlarının 1986 Çernobil felaketinden sonra toksisite içerdiği düşünülmektedir ve bunun üzerine çalışmalar hala devam etmektedir (Kostiainen and Jarkko 2008).

Mantarlar, besinsel değerleri ve hoş tatları ile birçok ülkede tüketilmektedir. Bugüne kadar mantarlardan lektinler, nükleazlar, proteazlar, polisakkaritler ve polisakkarit protein kompleksleri izole edilmiştir. Bu bileşenlerin bazılarının klinik etkinliği kanıtlanmıştır (Wang and Ng 2001).

Lactarius cinsi kolayca tanınan, *Russulaceae* familyasından yenebilen bir mantar türüdür. Adı 'sütlü' anlamına gelir, adını şapkası veya mantarın alt kısmı kırıldığında

çıkan beyaz sıvıdan alır. Kuru havalarda bu sıvı yetersiz olabilir, fakat mantar için gerekli hava koşulları sağlandığında boncuk gibi damlaları görebilmek için gerekli olan tek şey mantarın alt kısmını kırmak için şapkasını biraz eğmektir. Taze mantar kesildiği zaman bol miktarda beyaz sıvısı akar, kuru ve yaşlı örneklerde bu özellik yoktur.



Şekil 2.6. (*Lactarius volemus*)

Şapkası 5-15 cm kadar büyüklükte, kuru ve et gibidir, hiçbir zaman yapışkan olmaz. Gençken yarım küre şeklinde tümsek olup olgunlaşınca açılır ve derin olmayan huni şekline dönüşür, üst tarafı düzensiz, dalgalı gibi bir hal alır. Şapkanın etli kısmı kırılımandır, asla sert ya da lifli değildir. Bodur, huni gibi şapkası ve kalın, kısa gövdesi olan birçok türü vardır ve hemen hemen hepsi geniştir ve aynı şekle sahiptir.

Renkleri gökkuşağının renkleri kadar çeşitlidir ve yenilebilirliğine göre değişir. Lameller, gençken sarımsı beyaz turuncu, olgunlaşınca sarı açık kahverengidir, dokunulduğunda kahverengi olur. Oldukça sık olup sap üzerinde az olarak aşağı devam eder. Sapı 12 cm kadar uzunlukta ve oldukça kalın, sağlamdır. Mum gibi bir örtüsü vardır. Şapka ile aynı renkte veya birazcık daha açık, şapka tarafındaki birkaç santimetrelik kısımda sarımsı, diğer kısımlarında kırmızımtırak kahverengidir. Etli kısmı gençken yumuşak, beyaz, olgunlukta sünger gibi, katı ve açık sarıdır, daha sonra

yavaş yavaş kahverengi lekeliik kazanır. Spor izi çok açık kırmızımtırak sarıdır (Christensen 1981).

Lactarius volemus Kuzey Yarım küre'nin kuzey bölgelerinde ve ılıman iklimde sahip yerlerde yetişir. Hollanda'nın bazı bölgeleri hariç Avrupa'nın tamamına yayılmış bir tür olarak karşımıza çıkar (Shimono *et al.* 2007). Amerika kıtasında kuzey sınırı Kanada yakınlarına kadar dağılmış olan bu mantar türü yine bu kıtada Amerika Birleşik Devletleri'nin ve Meksika'nın doğu kıyılarına ve Orta Amerika'da Guatemala'ya kadar uzanır. Bu tür Çin (Shen *et al.* 2009) Japonya, Hindistan, Kore, Nepal, Vietnam Orta Doğu, İran ve Türkiye'nin (Çolak *et al.* 2009) de içinde bulunduğu bölgelerde yetişir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmalarımızda kullandığımız kazein, azokazein, azoalbumin, hemoglobin, standart serum albumin, jelatin, etanol, metanol, amonyum persülfat, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, bromfenol mavisi, glisin, N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin, n-butanol, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sodyum dodesil sülfat, asetik asit, Sephadex G-100, CM-Sephadex, gliserin, sodyum klorür, sodyum asetat, fosforik asit, sülfürik asit, sodyum fosfat, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, protein standartları, trikloro asetik asit (TCA) kimyasalları Sigma firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yaralanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	Bosch
pH metre	Selectra
Magnetik karıştırıcı	Ika
Peristaltik Pompa	Masterflex L/S™
Kromatografi kolonu	Sigma
Otomatik pipetler	Biohit
Su banyosu	Memmert
Elektroforez	Sci-plus
Güç kaynağı	Consort EV231
Çalkalayıcı	Ika
Hassas terazi	Denver Instrument Apx153
Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Kronometre	Sper Scientific
Karıştırıcı	Heidolph
Spektrofotometre	Spekol 1300

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Araştırma boyunca kullanılan tamponların ve çözeltilerin hazırlanması, kullanım yerleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan tampon: 0,05 M CH_3COONa , pH:6. 4,1 g (0,05 mol) CH_3COONa alınarak 950 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak pH:6'ya ayarlandı ve daha sonra toplam hacim saf su kullanılarak 1 litreye tamamlandı.

2. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan TCA çözeltisi: %5'lik TCA çözeltisi, 5 g trikloroasetik asit (TCA) alınarak 90 mL saf suda çözüldü. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 0,1 M fosfat tamponundan (pH:7) 90 mL alındı ve içerisinde 1 g kazein çözüldü. Son hacim 100 mL'ye aynı tampon kullanılarak tamamlandı. Hazırlanan çözelti 15 dakika boyunca kaynayan suyun içerisinde bekletildi. Hazırlanan çözeltinin stabilitesi yaklaşık bir hafta olarak belirlendi.

4. Optimum pH çalışmaları için kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması:

pH:4-5 aralığı için 0,1 M asetat tamponu (CH_3COONa) kullanıldı. 1,36 g CH_3COONa alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:6-7 aralığı için 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. 1,42 Na_2HPO_4 alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:8-9 aralığı için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. 1,21 g Tris alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:10'da 0,1 M borat tamponu kullanıldı. 1,38 g borik asit alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5. Substrat spesifikliğinin belirlenmesi için gereken çözeltilerin hazırlanması:

%1'lik Azokazein çözeltisi: 1 g azokazein alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Hemoglobin çözeltisi: 1 g hemoglobin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Azoalbümin çözeltisi: 1 g azoalbümin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Jelatin çözeltisi: 1 g jelatin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

6. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

10 mM FeCl₃: 0,162 g FeCl₃ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM FeCl₂: 0,126 g FeCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM MnCl₂: 0,125 g MnCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM MgCl₂: 0,095 g MgCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM CaCl₂: 0,111 g CaCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM NiCl₂: 0,130 g NiCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM HgCl₂: 0,472 g HgCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışmalarımız için kullandığımız 1 mM'lık FeCl₃, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, NiCl₂ ve HgCl₂ çözeltilerini hazırlamak için daha önceden hazırladığımız 10 mM'lık çözeltilerden 10 mL alındı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM'lık FeCl₃, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, NiCl₂ ve HgCl₂ çözeltilerini hazırlamak için 1 mM'lık çözeltilerden 10 mL alınarak hacim 100 mL'ye tamamlandı.

7. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

10 mM EDTA: 0,292 g EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM SDS: 0,288 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM β -merkaptto etanol: 69 μ L β -merkaptto etanol alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM iyodasetamid: 0,185 g iyodasetamid alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1 mM'lık EDTA, SDS, β -merkaptto etanol ve iyodasetamid çözeltilerini hazırlamak için daha önceden 10 mM'lık olarak hazırlanan çözeltilerden 10 mL alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM'lık EDTA, SDS, β -merkaptto etanol ve iyodasetamid çözeltilerini hazırlamak için daha önceden 1 mM'lık olarak hazırlanan çözeltilerden 10 mL alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

8. İyon değişim kolonu (CM-Sephadex) dengeleme tamponu: 4,1 g CH_3COONa alınarak 900 mL saf suda çözüldü, pH:5.7'ye kadar 1 M'lık HCl ile titre edildi ve son hacim saf su kullanılarak 1 L'ye tamamlandı (0,05 M CH_3COONa pH:5.7).

9. SDS-Elektroforezinde kullanılan ayırma jelinin hazırlanması: 15 mL Tris-HCl (1 M, pH:8.8), 13,2 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik Bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin), 9,4 mL saf su karıştırıldı, son olarak 0,8 mL %1,5'luk amonyum persülfat (APS) ilave edildi.

10. SDS-Elektroforezinde kullanılan yığma jelinin hazırlanması: 1,24mL Tris-HCl (1 M, pH:6.8) 1 mL, %30'luk akrilamid-%0,8 lik bisakrilamid, 0,1 mL %1'lik SDS, 0,1 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin), 7,8 mL saf su karıştırıldı, son olarak 0,2 mL %1,5'luk amonyum persülfat (APS) ilave edildi.

11. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanması: 1 mL 0,63 M Tris-HCl (pH:6.75), 1 mL gliserol, 1 mL %10'luk SDS, 1 mL %0,1'lik bromofenol mavisi alındı ve son hacim 10 mL'ye saf su ile tamamlandı. Numune tamponu kullanılmadan önce 1 mL başına 50 µL olacak şekilde β-merkaptto etanol eklendi.

12. SDS-Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponunun hazırlanması: 6 g Tris ve 28,8 g Glisin alınarak 200 mL saf su içerisinde çözüldü. Son olarak 20 mL %10'luk SDS ilave edildi ve toplam hacim saf su ile 2 L'ye tamamlandı.

13. SDS-Elektroforezinde kullanılan fiksatif çözeltinin hazırlanması: 500 mL metanol, 100 mL asetik asit (glasiyel) alındı ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

14. SDS-Elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisinin hazırlanması: 1 g Coomassie brillant blue R-250 tartıldı ve 500 mL metanolde çözüldü. 100 mL asetik asit ilave edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

15. SDS-Elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisinin hazırlanması: 125 mL metanol ve 175 mL asetik asit alındı, son hacim saf su ile 2,5 L'ye tamamlandı.

16. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan tampon çözeltinin hazırlanması: 0,05 M Na₃PO₄/1 mM Ditiyoeritrotiyol (DTT) (pH:7), 7,8 gram Na₃PO₄ ve 0,15 g DTT tartıldı ve 950 mL saf su içerisinde çözüldü. 1 M HCl ile pH:7 oluncaya kadar titre edildikten sonra hacim saf su kullanılarak 1 L'ye tamamladı.

17. C vitamini tayininde kullanılan %0,1'lik diklorofenolindofenol (DCPIP) çözeltisinin hazırlanması: 0,01 g diklorofenolindofenol alındı 10 mL saf suda çözüldü.

18. E vitamini tayininde kullanılan 0,01 M tetrazolium blue çözeltisinin hazırlanması: 0,107 g tetrazolium blue alındı ve 50 mL saf su içerisinde çözüldü.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Protein tayini

3.4.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sırasında toplanan tüplerde kalitatif protein miktarı tayini 280 nm'de absorbans okunarak gerçekleştirildi. Bu metot trozin triptofan ve fenilalanin gibi halkalı bir grup ihtiva eden aminoasitlerin 280 nm'de maksimum absorbans göstermeleri esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Eşit hacimde toplanan fraksiyonlar kuarts küvetlere alındı ve absorbansları spektrofotometrede okundu. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.4.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve kromatografi işleminden sonraki aktif eluatlardaki protein miktarı tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem boyanın farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından faydalanılarak geliştirilmiştir. Coomassie brilliant blue G-250 fosforik asitli ortamda proteinlerin yapısındaki, arginin gibi bazik aminoasitlere ve aromatik halka içeren aminoasitlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorban gösterir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığında değişmektedir (Bradford 1976).

3.4.2. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) proteaz enziminin saflaştırılması

3.4.2.a. Örneklerinin toplanması

Tirit mantarı (*Lactarius volemus*) ağustos ayında Erzurum'un Pasinler ilçesinin Hamam Deresi mevkiğinden toplanmış ve çalışmalarımızda kullanılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.4.2.b. Homojenatın hazırlanması

-80°C'de muhafaza edilen tirit mantarından 25 g tartıldı. Sıvı azot ile muamele edildikten sonra mekanik olarak parçalandı ve hacminin yaklaşık olarak 3 katı kadar (60 mL) saf su içerisine alındı. Proteinlerin çözeltilmeye geçmesi için manyetik karıştırıcıda 20 dakika boyunca karıştırıldı ve süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Katı kısım atıldıktan sonra 6000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlendi, çökelek atıldı, süpernatant çalışmalarımızın ilerleyen aşamalarında kullanıldı.

3.4.2.c.Amonyum sülfat çöktürmesi

Mantardan elde edilen homojenatta %0 ile %100 arasındaki doygunluk oranlarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bu çöktürme işlemi 0-30, 30-50, 50-70, 70-100 şeklinde gerçekleştirildi.

Çöktürme işleminde kullanılan amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Amonyum Sülfat (gr)} = \frac{1,77 \times V \times (S - S_0)}{3,54 - S}$$

V: Çözeltinin Hacmi

S₀: l'in kesri olarak amonyum sülfat doygunluğu

S: l'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Yapılan amonyum sülfat çöktürmelerinde 0-30 aralığında aktivite görülmezken 30-50, 50-70 ve 70-100 doygunluklarında proteolitik aktivite gözlemlendi. 50-70 doygunluk oranındaki çökelekteki proteolitik aktivitenin diğer doygunluk oranlarından daha fazla olduğu gözlemlendi. İlk olarak homojenata doygunluk %50 oluncaya kadar katı (NH₄)₂SO₄ azar azar eklendi, ekleme sırasında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve ortam sıcaklığı düşürüldü. 18000 rpm'de 15 dakika santrifüjlemeden sonra çökelek atıldı ve süpernatant %70 doygunluğa ulaşmaya kadar aynı işlem tekrarlandı. Her çöktürme işleminin sonunda çökelekte ve süpernatantta proteolitik aktivite tayini yapıldı %70 doygunluktan elde edilen çökelek uygun tamponda çözülerek saflaştırmanın diğer basamaklarında kullanıldı.

3.4.2.d. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çökelek 0,05 M CH_3COONa tamponunda çözüldükten sonra ilk olarak 1 saat boyunca 0,05 M asetat tamponuna (pH:5.7) karşı diyalizlendi. Diyaliz süresi boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra 3 saat boyunca ikinci kez aynı tampona karşı diyaliz işlemine tekrarlandı. Diyaliz işlemleri $+4^\circ\text{C}$ 'de yapıldı ve diyaliz süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu işlem sonunda enzim çözeltisi CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklemeye hazır hale geldi.

3.4.2.e. CM-Sephadex iyon değişim kolonunun hazırlanması

İyon değişim kromatografisinin temeli katı destek materyali ile proteinlerin yüklü grupları arasında olan elektrostatik etkileşimlerdir. Proteinlerin sahip oldukları değişik yüklerdeki aminoasit dizileri kolon materyaline farklı kuvvetlerde bağlanırlar, pH ve tuz gradientleriyle yapılan elüsyonlarda bağlanma şiddetleri farklı olan proteinler, farklı pH aralıklarında veya farklı tuz konsantrasyonlarında kolon materyalinden ayrılacağından proteinlerin birbirinden ayrımını mümkün kılar.

Anyon değiştiriciler pozitif yüklü işlevsel gruplar ihtiva eder ve (-) yüklü proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Aminoetil ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2$) ve dietilaminoetil ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) sıklıkla kullanılan anyon değiştiricilerdir. Katyon değiştiriciler ise negatif yüklü işlevsel gruplar ihtiva eder ve (+) yüklü proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Karboksimetil (CH_2COO^-) katyon değiştiricilere örnek olarak verilebilir.

Çalışmalarımızda CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi kullanıldı. İlk olarak 5 gram kuru CM-Sephadex tartıldı ve saf su içerisinde bir gece boyunca şişmeye bırakıldı. CM-Sephadex materyalinin aktif gruplarının (CH_2COO^-) ortaya çıkarılması için 0,5 M NaOH ile yarım saat boyunca muamele edildi. 0,5 M HCl ile nötrleştirildikten sonra

kolon materyali kolona (2,5x30) dolduruldu. 4 saat boyunca kolon 0,05M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelendi.

3.4.2.f. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) elde edilen homojenatın CM-Sephadex iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu

0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelenen CM-Sephadex kolonuna enzim çözeltisi yüklendi ve yine aynı tampon çözelti kullanılarak yıkandı. 0,1-0,5 M NaCl ihtiva eden 0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile gradientli mikser kullanılarak enzim elüe edildi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 40 mL/saat'e ayarlandı. Elüsyon işlemine, toplanan elüatlarda 280 nm'de absorbans görülmeyinceye kadar devam edildi. Elüatlar her bir tüpte 5 mL olacak şekilde toplandı ve her bir tüpte proteolitik aktivite ölçümü yapıldı. Aktif olan elüatlar toplandı ve karakterizasyon işlemi için saklandı.

3.4.3. Proteaz enzimi için aktivite tayini

Tirit mantarından saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre belirlendi. 1 g kazein 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH:7) çözüldü ve hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 15 dakika boyunca 95°C'deki su banyosunda bekletildi ve kullanılmaya hazır hale getirildi. Proteolitik aktivite ölçümünde 1 mL substrat (kazein), 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi ve toplam hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL'ye tamamlandı. Enzim ilave edilen tüpler 20 dakika boyunca 40°C'deki su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Proteolitik aktivite enziminin dakikada parçaladığı µg protein/mL olarak hesaplandı (Fadıloğlu 2001).

3.4.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü ve alt birimlerin belirlenmesi.

Laemmli tarafından geliştirilen SDS-PAGE ile saflaştırılan proteaz enziminin saflığı ve alt birimi olup olmadığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Elektroforez plakaları saf su ile iyice yıkandı ve kuruması beklendi. İkinci yıkama işlemi alkol kullanılarak yapıldı ve plakalar jel hazırlama cihazına konuldu. Plakalar sıkıştırıldıktan sonra yaklaşık 2 cm yüksekliğe kadar ısıtılmış agaroz plakaların arasına döküldü. Agaroz tamamen donduktan sonra hazırlanan ayırma jeli enjektör yardımıyla plakalara döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için 1 mL n-bütanol hazırlanan ayırma jelinin üzerine döküldü ve 30 dakika boyunca jelin katılaşması beklendi. Jel katılaşınca üzerindeki n-bütanol döküldü ve saf su ile yıkandı. Daha sonra plakaların üst kısımlarına kadar yığılma jeli döküldü. Tarak dikkatlice yığılma jeline yerleştirildi. Jel tamamen katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve tarak yuvaları saf su kullanılarak iyice yıkandı.

Numuneler 20 µg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi. 3 dakika boyunca hazırlanan numuneler kaynayan suda bekletildi. 3 dakika sonunda numunelerin soğuması beklendi ve otomatik pipet yardımıyla numuneler tarak yuvalarına yüklendi. Elektroforez tankının alt ve üst kısımlarına akım geçecek yüksekliklere kadar yürütme tamponu eklendi, elektroforez cihazının soğutma hortumları musluğa bağlandı ve su akışı başlatıldı. Tank kapağı kapatılarak anot, katot bağlantıları yapıldı ve voltaj 80 V'a ayarlandı. Proteinlerin tamamı ayırma jeline geçtiğinde voltaj 100 V'a yükseltildi ve elektroforez işlemi sonlanana kadar bu şekilde sabit tutuldu.

Elektroforez sonlandırıldıktan sonra plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve 2 saat boyunca çalkalayıcıda fiksatif çözelti içinde bekletildi. Fiksatif çözülden alınan jel boyama çözeltisi içerisinde çalkalayıcıda 30 dakika süresince boyandı ve boyama işlemi bittikten sonra jel tekrar 2 dakika fiksatif çözelti ile yıkandı. Daha sonra fiksatif

çözeltiden alınan jel renksizleştirme çözeltisine alındı ve çalkalayıcıda, protein bantları görünür hale gelinceye kadar yıkama işlemine devam edildi. Protein bantları görünür hale geldiğinde jelin fotoğrafı çekildi (Laemmli 1970).

3.5. Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Kinetik özelliklerini araştırmak üzere saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri bulundu. Enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve kimyasalların etkisi araştırıldı. Azokazein, azoalbümin, jelatin, hemoglobun, kazein substratları için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi.

3.5.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. Optimum sıcaklığın belirlenmesinde pH:4-5 için asetat tamponu, pH:6-7 için fosfat tamponu, pH:8-9 için Tris-HCl tamponu, pH:10 için ise borat tamponu kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlandı. Her bir numune tüpüne 1 mL kazein çözeltisi, 500 μ L enzim çözeltisi ve 1 mL uygun pH'daki tampon çözelti eklendi. Kör olarak her bir numuneye karşılık 1 kör çözelti hazırlandı, kör çözeltilerde enzim yerine tampon kullanıldı.

3.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirleyebilmek için 0-90°C aralığında 10°C artırılarak aktivite tayini yapıldı.

Her sıcaklık denemesi için 1 kör ve 1 numune olmak üzere 2 tüp hazırlandı. Numune tüplerine 1 mL kazein çözeltisi, 500 µL enzim çözeltisi eklendi ve son hacim tampon çözelti ile 2,5 mL'ye tamamlandı. Kör tüp ve numune; 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi (Bradford 1976).

3.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Tirmit mantarından proteaz enzimi saflaştırdıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi. 4 gram kuru Sephadex G-100 saf suda çözüldü ve 1 gece boyunca oda sıcaklığında şişmeye bırakıldı. Daha sonra jel (1x30) kolona yüklendi.

0,05 M Na₃PO₄/1mM DTT tamponu ile kolonda 280 nm'de absorbans gözlenmeyinceye kadar dengeleme işlemi yapıldı. Kolon dengelendikten sonra 0,2 mg/mL olacak şekilde BSA (66 kDa), CA (sığıır) (29 kDa), α-laktalbümin (14 kDa) çözeltileri yüklenerek 0,05 M Na₃PO₄/1mM DTT tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Kolon tekrar dengelendikten sonra saflaştırılan proteaz enzimi kolona yüklendi ve yine aynı tampon kullanılarak kolondan elüe edildi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 20 mL/saat'e ayarlandı. Eluatlar her tüpte 4 mL olacak şekilde toplandı. Oluşturulan standart grafik yardımıyla enzimin moleküler ağırlığı belirlendi.

3.5.4. Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi

Tirmit mantarından saflaştırılan proteaz enziminin V_{max} ve K_M değerlerini belirlemek için enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. 100 mL'sinde 1 g kazein bulunan çözeltiden her bir tüpe 100 µL, 200µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL ilave edildi. Tüplere

500 µL enzim çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 40°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi ve bu süre sonunda tüplere 3 mL %5'lik TCA çözeltisi eklendi. 30 dakika sonunda çöken proteinler 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi ve daha sonra filtre edilerek, süpernatant içerisinde bulunan protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Kör aynı substrat konsantrasyonlarında enzimsiz olarak hazırlandı, enzim yerine tampon çözelti kullanıldı.

1/V'ye karşılık 1/[S] Lineweaver Burk grafiği çizildi. Elde ettiğimiz sonuçlardan V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı.

3.5.5. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi

Hemoglobin, jelatin, azoalbümin, azokazein substratlarına karşı, tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği, enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlendi.

Enzimin aktivitesini belirleyebilmek için %1'lik hemoglobin, jelatin, azoalbümin ve azokazein çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL alındı ve hacim saf su kullanılarak 1 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan her bir tüpe 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edildi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti eklendi. 20 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi (Bradford 1976).

Enzim için proteolitik aktivite parçaladığı μg protein/mL. dakika olarak hesaplandı (Pauling *et al.* 1973).

3.5.6. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi

Mantardan saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisini belirlemek için konsantrasyonu 10 mM olan; HgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 MgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, 1,6 mM ve 2 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı.

Konsantrasyonu 1 mM olan; HgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 , MgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,04 mM, 0,08 mM, 0,12 mM, 0,16 mM ve 0,20 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Konsantrasyonu 0,1 mM olan; HgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 MgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,004 mM, 0,008 mM, 0,012 mM, 0,016 mM ve 0,02 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Proteolitik aktivite %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre belirlendi. Her bir tüpe 1000 μL substrat (%1 lik kazein), 500 μL enzim çözeltisi, 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM katyon çözeltilerinden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL eklendi ve son hacim 2,5 mL'ye tamamlandı. Tüpler karıştırıldıktan sonra su banyosunda 40°C'de 20 dakika inkübe edildi. 20 dakika sonunda her bir tüpe 3 mL %5'lik TCA çözeltilerinden eklenerek 30 dakika süreyle beklemeye bırakıldı. 15 dakika

boyunca 6.000 rpm de santrifüjlendi ve süpernatant filtre edildi. Süpernatant içerisindeki parçalanmış ürün miktarı Bradford metodu ile belirlendi.

3.5.7. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), iyodasetamid, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkapt etanolün etkileri incelendi. Bunun için saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlandı.

0,1 mM, 1 mM ve 10 mM'lık hazırlanan SDS, EDTA, iyodasetamid ve β -merkapt etanol çözeltilerinden 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L alındı, 1 mL %1'lik kazein çözeltisi ve 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi. Hacim tampon çözelti kullanılarak 2,5 mL'ye tamamlandı. Enzimin dakikada parçaladığı protein miktarı Bradford Metodu ile hesaplandı (Bradford 1976).

3.6. Tirit Mantarından (*Lactarius volemus*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Sütün Çöktürülmesi

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürüp çöktürmediği ve en iyi çöktürmenin hangi sıcaklıkta meydana geldiği araştırıldı. Her bir tüpe 10'ar mL süt konulduktan sonra kontrol tüpü içerisine 1 mL pH:7 olan 10 mM'lık Tris-HCl tampon çözeltisi eklenirken deney tüpüne 1 mL enzim çözeltisi eklendi. Her bir tüp karıştırılarak 25°C, 35°C, 50°C'de bekletildi. Çökmenin hangi sıcaklıkta daha fazla olduğu ve çökmenin kaç dakikada meydana geldiği tespit edildi. Bu şekilde saflaştırılan proteaz enziminin peynir endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı (Fadıloğlu 2001).

3.7. Tirit Mantarından (*Lactarius volemus*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Kanın Temizlenmesi Etkisinin İncelenmesi

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin temizlik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla 3 adet (5x5) kumaş parçası üzerine 50 µL kan damlatıldı ve kuruması beklendi. 100 mL'lik 3 adet beher alındı ve 1. behere 1 mL enzim çözeltisi, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı, 2. behere 1 mL deterjan, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı, 3. behere ise 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. Kurutulan kumaşlar hazırlanan 3 beherde 1 gece boyunca bekletildi.

3.8. Tirit Mantarının (*Lactarius volemus*) (A, C, D) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi

3.8.1. Ekstrelerin hazırlanması

-80°C'de muhafaza edilen tirit mantarından 100 g alınarak güneş ışığına maruz bırakılmayacak bir şekilde kurutuldu ve toz haline getirildi. 5 g alınarak 20 mL saf su içerisinde 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve aynı zamanda 5 g alınarak 20 mL petrol eteri içerisinde alındı ve 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. A vitamini, E vitamini ve C vitamini tayinlerinde bu ekstreler kullanıldı.

3.8.2. Tirit mantarının (*Lactarius volemus*) C vitamini miktarının belirlenmesi

Tirit mantarının (*Lactarius volemus*) C vitamini tayini diklorofenolindofenol (DCPIP) ile titrasyon yapılarak belirlendi (Smirnoff, 2000). Mantardan elde edilen su ekstresine %0,1'lik diklorofenolindofenol (DCPIP) çözeltisi damLa damLa ilave edildi ve mavi

renğin oluşması ile titrasyon sonlandı. 0,001 g olan her 1 cm³ DCPIP 0,0015 g askorbik aside karşılık gelecek şekilde hesap yapılarak numunedeki C vitamini miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Smirnoff 2000).

$$\text{Askorbik asit miktarı (mg/100g)} = V \times F \times 100 / W$$

V: harcanan boya çözeltisi miktarı

F: faktör

W: titrasyonda kullanılan örnek miktarı

3.8.3. Tirmit mantarının (*Lactarius volemus*) E vitamini miktarının belirlenmesi

α - tokoferol'ün standart çözeltisinden 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ alınarak H₂SO₄ ilave edilerek tokoferil asetat'ın ester formu hidroliz edildi. Ardından ortama 0,5 mL 0,01 M tetrazolium blue, 5 mL 0,2 M NaOH ve metanol ilave edildi, 90°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 526 absorbanbsı ölçüldü ve standart grafik oluşturuldu. 5 gram Tirmit mantarı (*Lactarius volemus*) 30 mL petrol eteri ile ekstrakte edildi, ardından evaporatörde petrol eteri uzaklaştırıldı. Metanol ile yıkandı ve aynı yöntem kullanılarak 526 absorbanbsı ölçüldü (Amin 2001).

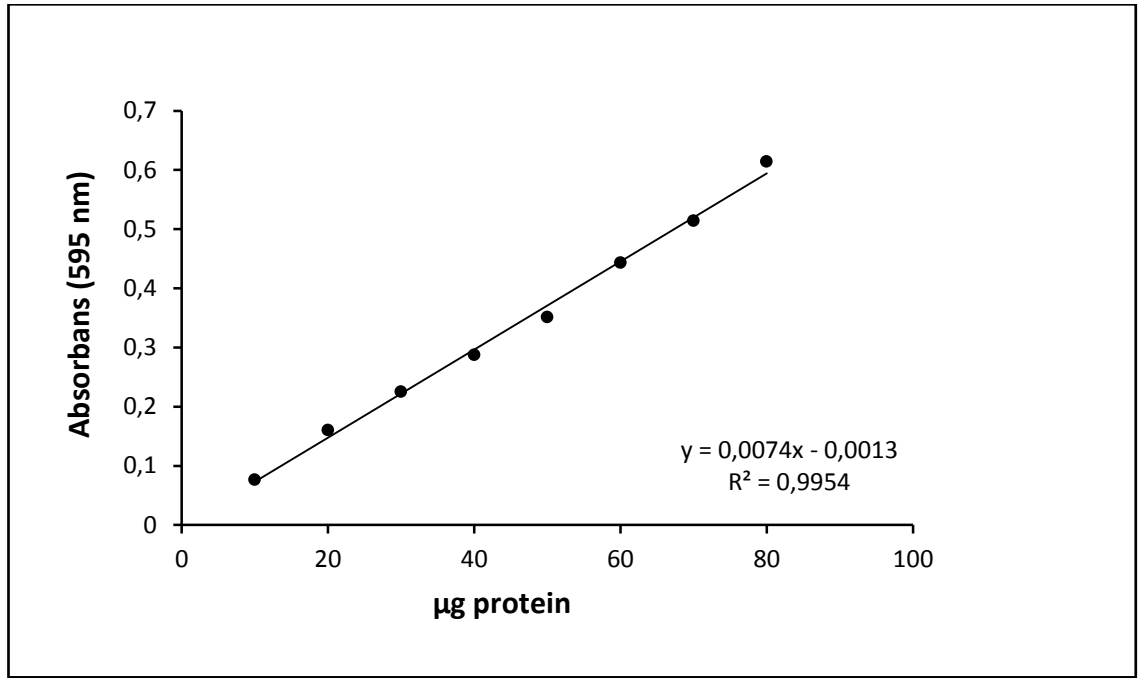
3.8.4. Tirmit mantarının (*Lactarius volemus*) A vitamini miktarının belirlenmesi

Tirmit mantarının (*Lactarius volemus*) A vitamini tayini Limited ve Hyderabad tarafından geliştirilen yöntem ile yapıldı (Limited and Hyderabad 1996). Yöntem A vitaminininin 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli bir bileşik oluşturma ve bu bileşiğin 610 nm'de maksimum absorbanbs gösterme prensibine dayanmaktadır. β -karotenden 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 ve 5,0 mg/mL alınarak 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli türev oluşturuldu ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) elde edilen ekstreden numune alınarak aynı yöntem kullanılarak ölçüm yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif protein için hazırlanan standart eğri

Kantitatif protein tayininde Coomassie brilliant blue yöntemi kullanıldı. BSA kullanılarak ilk önce standart eğri hazırlandı. Homojenatlarda, saflaştırılan enzim çözeltilerinde, proteolitik aktivitenin belirlenmesinde bu eğri kullanıldı. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Tirit Mantarından (*Lactarius volemus*) Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

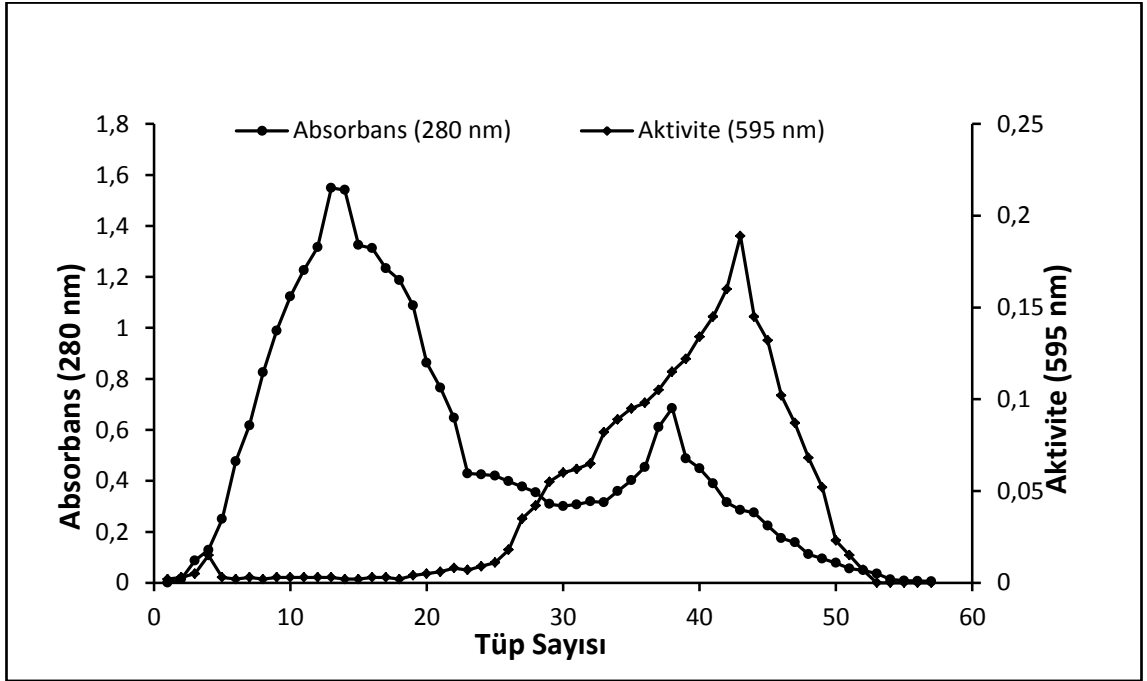
4.2.1. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) proteaz enziminin CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Proteaz enzimi tirit mantarından (*Lactarius volemus*) iki basamakta saflaştırıldı.

1. basamakta homojenatta %0-%100 aralığında amonyum sülfat oktrmesi yapıldı. %50-%70 aralığındaki okelek 0,05 M asetat tamponunda (pH:5.7) ozld, aktivite tayini yapılıncaya yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu gözlendi. Yüksek proteolitik aktivite gösteren enzim zeltisi 4 saat boyunca, +4°C'de, 2 kez 25 µM asetat tamponuna (pH:5.7) karşı diyalizlendi.

2. basamakta homojenat 0.05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelenen CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklendi. Kolon 150 mL 0.05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile yıkandı. Enzimin kolondan elüsyonu 0,1–0,5 M NaCl konsantrasyonu içeren yine aynı tampon kullanılarak yapıldı. Toplanan elüatlarda proteolitik aktivite olld. Aktif elatlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu.

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite absorbans grafiği Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) CM-Sephadex iyon değişim kolonu ile saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği

4.2.2. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) elde edilen homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra, CM-Sephadex iyon değişim kromatografisinden elde edilen aktif eluatlarda Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve her basamakta proteaz enziminin kaç kat saflaştırıldığı hesaplandı.

Sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterildi.

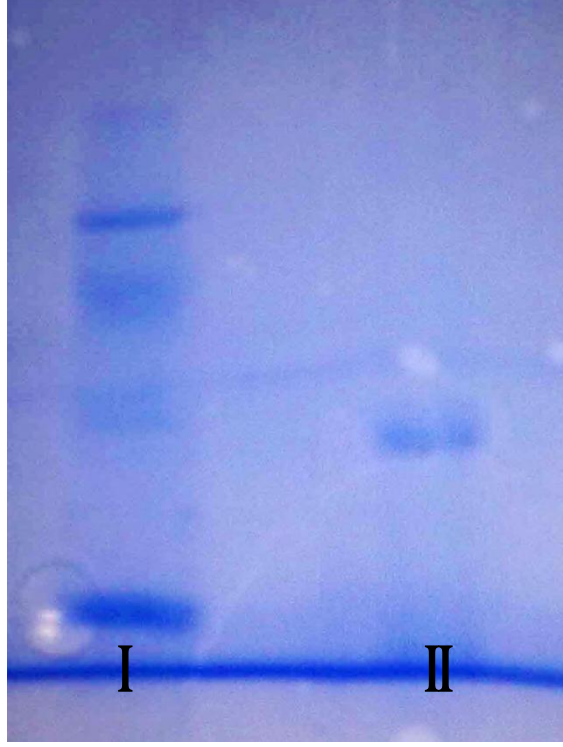
Çizelge 4.1. CM-Sephadex kolonundan tirit mantarından (*Lactarius volemus*) elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Enzim Fraksiyonu	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Total Aktivite		Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite EU/mg	Saflaştırma oranı
			EU	%			
Ham Ekstrakt	100	1.23	123	100	3.53	0.34	-
%70 (NH ₄) ₂ SO ₄	90	0.87	78.3	63.66	0.98	0.88	2.58
CM-Sephadex	20	2.46	49.2	40	0.12	20.5	60.29

4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Kesikli SDS-PAGE'ne saflaştırılan proteaz enzimi yerleştirildi. Proteaz enziminin yanı sıra elektroforeze molekül ağırlığı bilinen standart proteinler yüklendi. Sonuçlar tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin 26,1 kDa ağırlığında tek birimi olduğunu gösterdi.

Protein bantlarının fotoğrafı Şekil 4.3'te gösterildi.



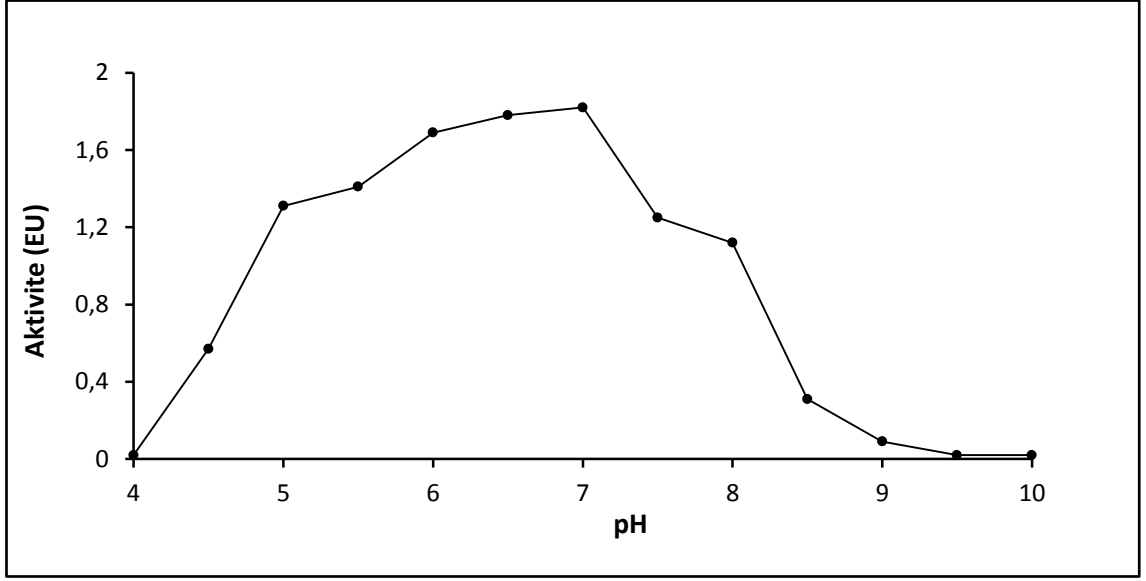
Şekil 4.3. CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırlan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

*(I: BSA 66 kDa, yumurta albümin 45 kDa, CA 29 kDa, α-laktalbümin 14 kDa, II:Tirit mantarından saflaştırlan proteaz enzimi)

4.3. Tirit Mantarından (*Lactarius volemus*) Saflaştırlan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmaların Sonuçları

4.3.1. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırlan proteaz enziminin optimum pH sonuçları

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırlan proteaz enziminin optimum pH'sını belirleyebilmek için pH 4-9 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. pH 4-5 aralığında 0,1 M asetat tamponu, pH 6-7 aralığında 0,1 M fosfat tamponu, pH 8-9 aralığında 0,1 M Tris-HCl, pH:10'da ise 0,1 M borat tamponu kullanıldı. Proteaz enzimi için pH değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 4.4'te verildi.

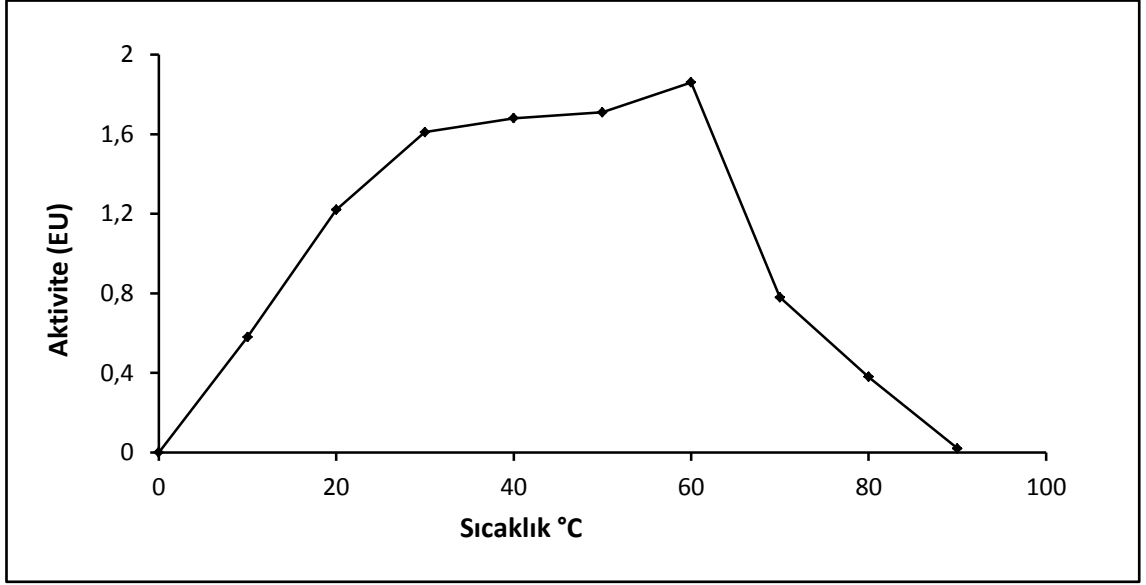


Şekil 4.4. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.3.2. Optimum sıcaklık sonuçları

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C' de aktivite ölçümleri yapıldı.

Aktivite – Sıcaklık grafiği Şekil 4.5'te verildi.

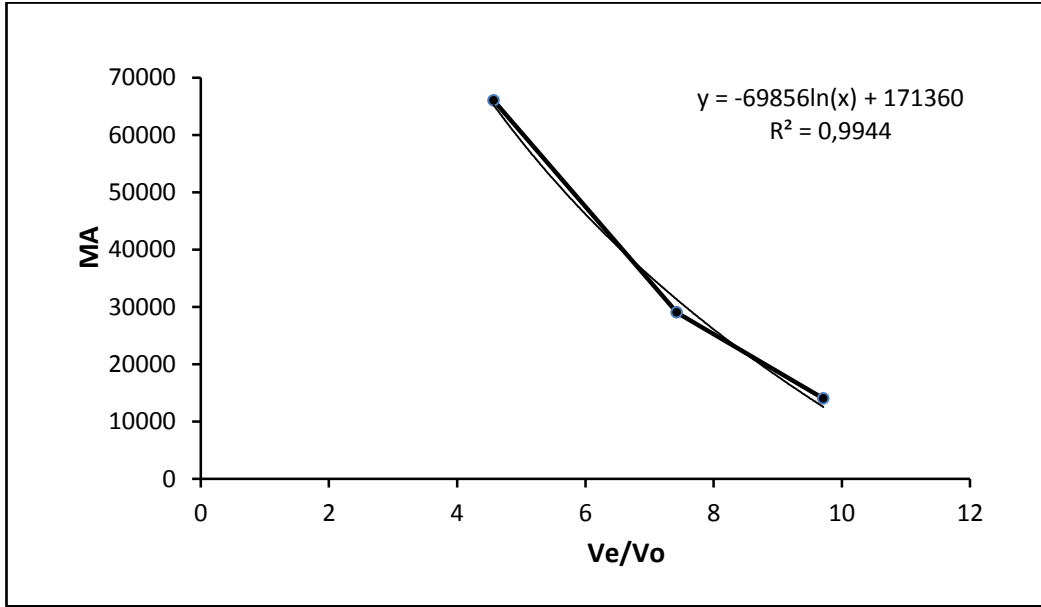


Şekil 4.5. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.3.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

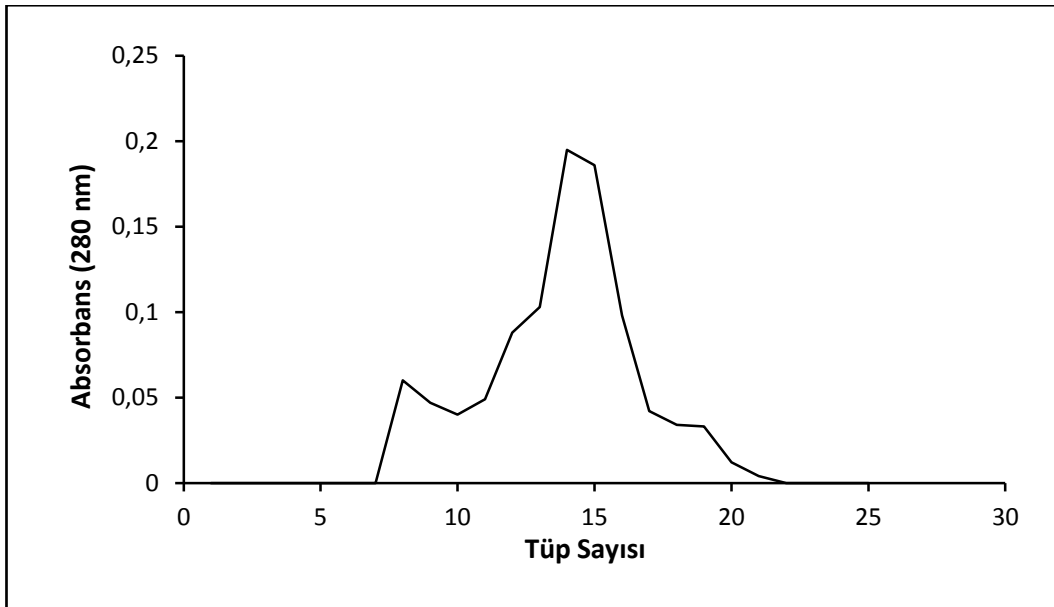
Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile belirlendi. 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (pH:7) tamponu ile dengelenmiş kolana ilk olarak BSA (66 kDa), CA (29 kDa) ve α -laktalbümin (14 kDa) protein standartları yüklendi ve aynı tamponla elüe edilerek standart grafik oluşturuldu. Daha sonra saflaştırılan proteaz enzimi kolona yüklendi ve 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (pH:7) tamponu ile elüe edildi. Sonuçlar standart grafiklerle karşılaştırıldı.

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 26,1 kDa olarak belirlendi. Molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik Şekil 4.6'da, enzimin absorbans grafiği Şekil 4.7'de verildi.



Şekil 4.6. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği

*(Sephadex G-100, BSA (66 kDa), CA bovine (29 kDa), α -laktalbumin (14 kDa)).

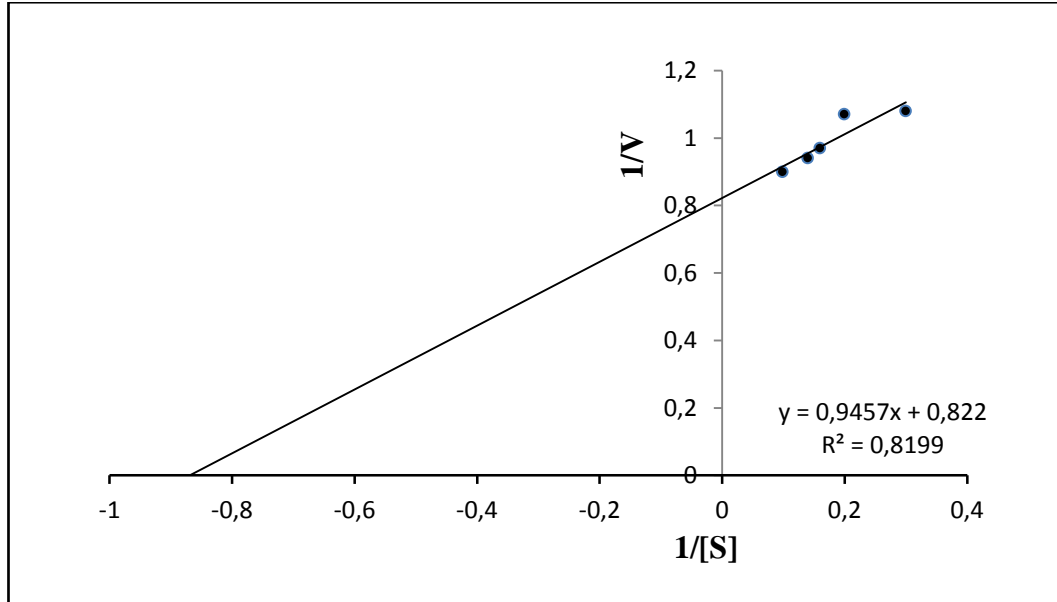


Şekil 4.7. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorban grafiği

4.3.4. Kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması sonuçları

V_{max} ve K_M değerlerini belirlemek için enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. 100 mL’inde 1 gr kazein bulunan çözeltiden her bir tüpe 100 μ L, 200 μ L, 400 μ L, 600 μ L, 800 μ L ilave edildi. Tüplere 500 μ L enzim çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 40°C’de 20 dakika boyunca inkübe edildi ve bu süre sonunda tüplere 3 mL %5’lik TCA çözeltisi eklendi. 30 dakika sonunda çöken proteinler 6.000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlendi ve daha sonra filtre edilerek, süpernatant içerisinde bulunan protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Kör aynı substrat konsantrasyonlarında enzimsiz olarak hazırlandı, enzim yerine tampon çözelti kullanıldı.

1/V’ye karşılık 1/[S] Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Elde ettiğimiz sonuçlardan V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı. Tirmite mantarından saflaştırılan proteaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,975 μ M ve 1,21 μ g/mL.dak olarak belirlendi.



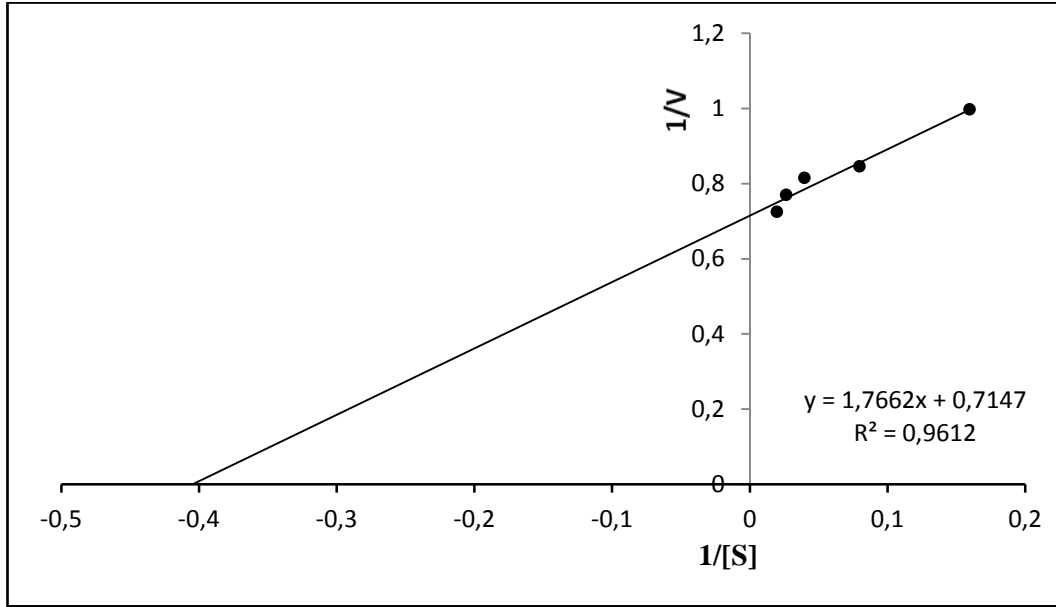
Şekil 4.8. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

4.3.5 Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi sonuçları

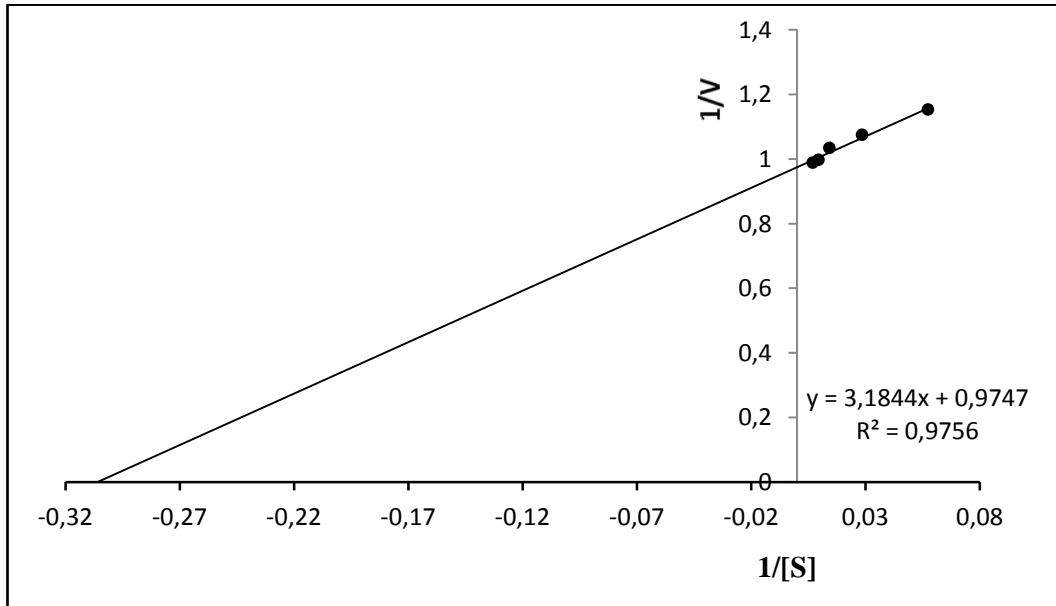
Hemoglobin, jelatin, azoalbümin, azokazein substratlarına karşı, tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği, enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlendi.

Enzimin aktivitesini belirleyebilmek için %1'lik hemoglobin, jelatin, azoalbümin ve azokazein çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL alındı ve hacim saf su kullanılarak 1 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan her bir tüpe 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edildi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti eklendi. 20 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekteşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi.

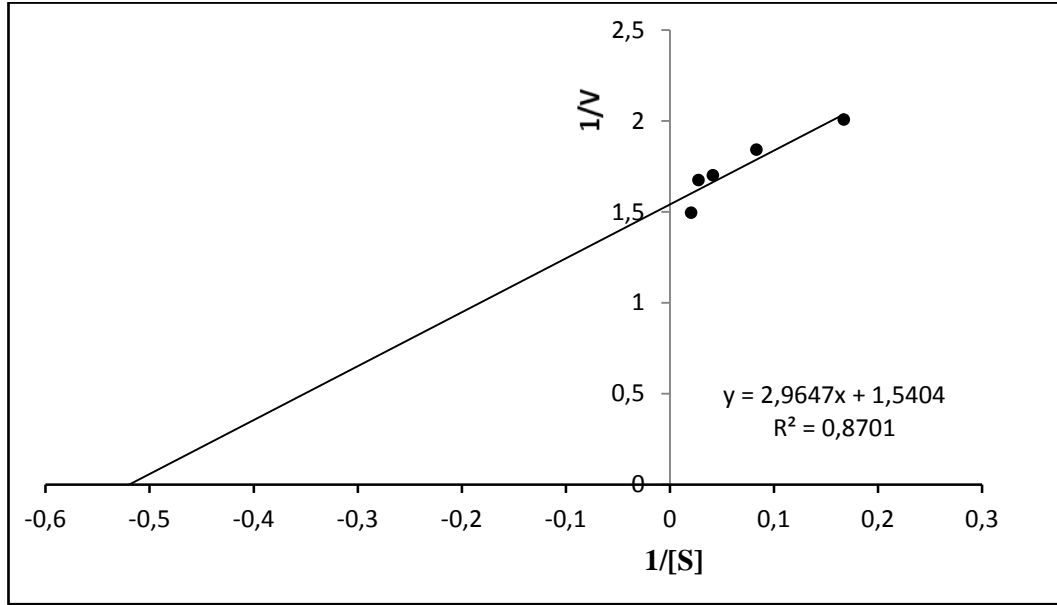
Sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.



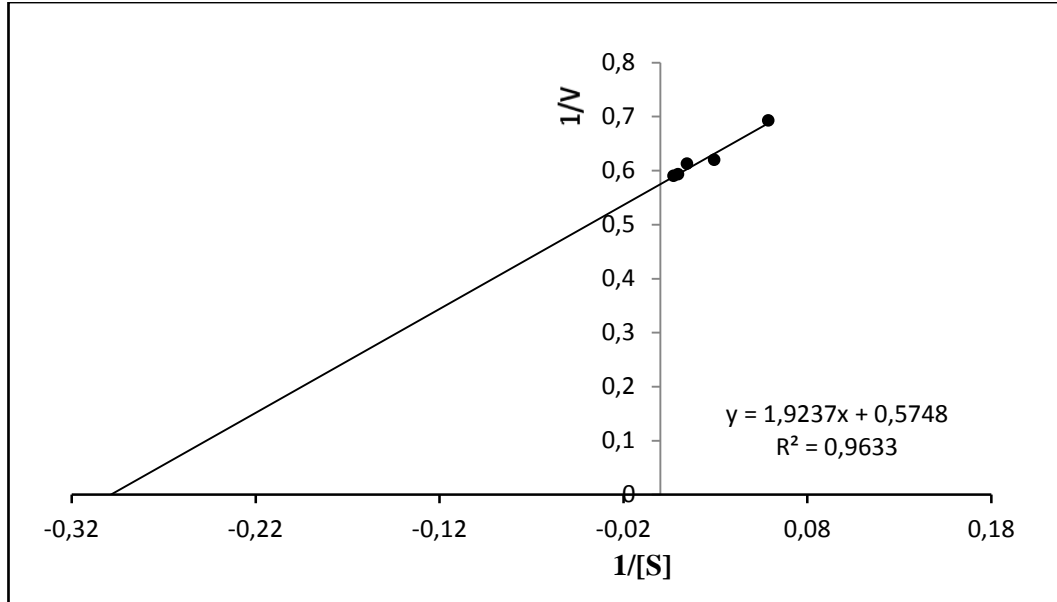
Şekil 4.9. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi için jelatin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.11. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi için azoalbümin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı sonuçları

Substrat	K_M (μM)	V_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL.dak}$)
Kazein	0,975	1,21
Hemoglobin	2,5	1,4
Jelatin	3,33	1,03
Azoalbümin	1,92	0,65
Azokazein	3,35	1,74

4.3.6. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi sonuçları

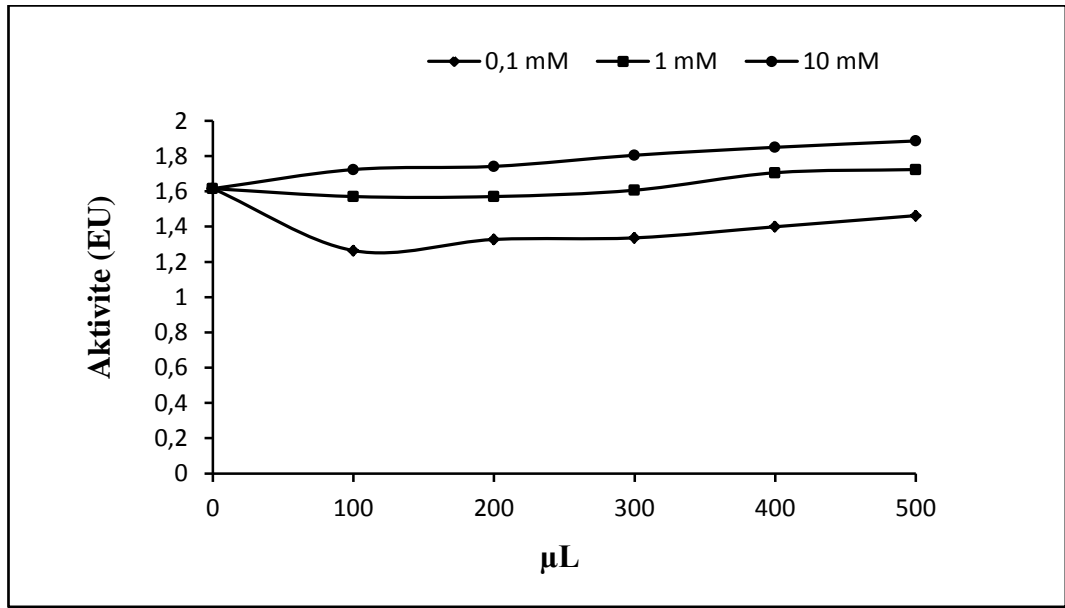
10 mM olan; MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, 1,6 mM ve 2 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı.

Konsantrasyonu 1 mM olan; MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,04 mM, 0,08 mM, 0,12 mM, 0,16 mM ve 0,20 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

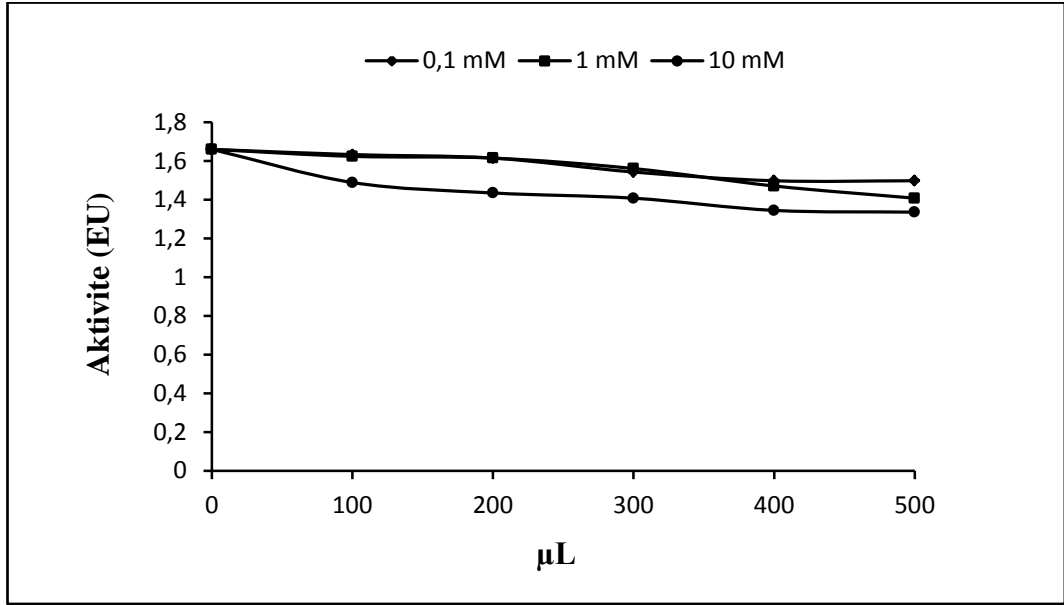
Konsantrasyonu 0,1 mM olan; MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,004 mM, 0,008 mM, 0,012 mM, 0,016 mM ve 0,02 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Proteolitik aktivite %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre 3.5.6'da anlatıldığı gibi belirlendi.

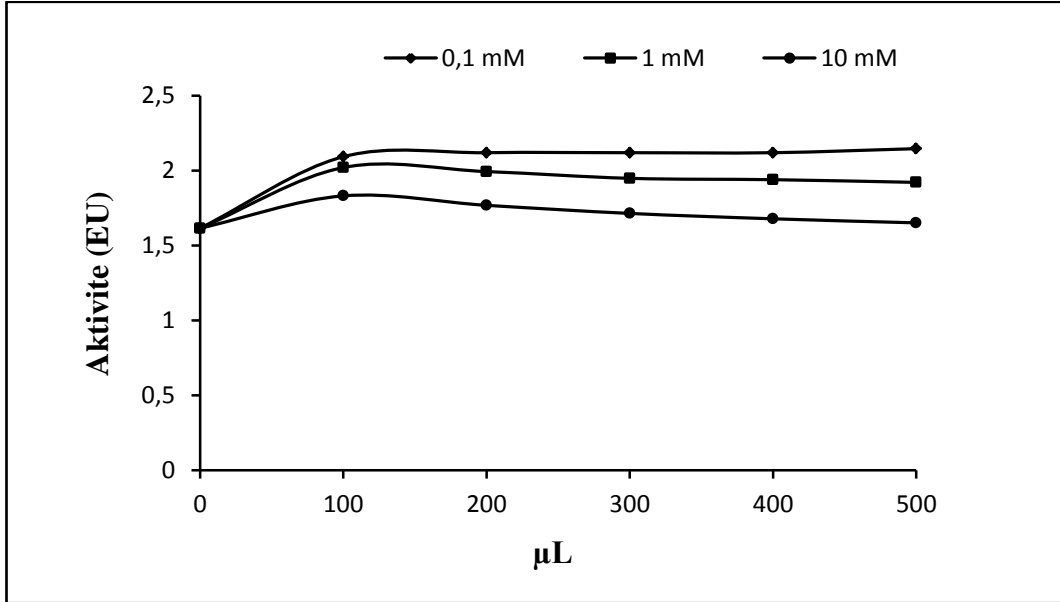
Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.



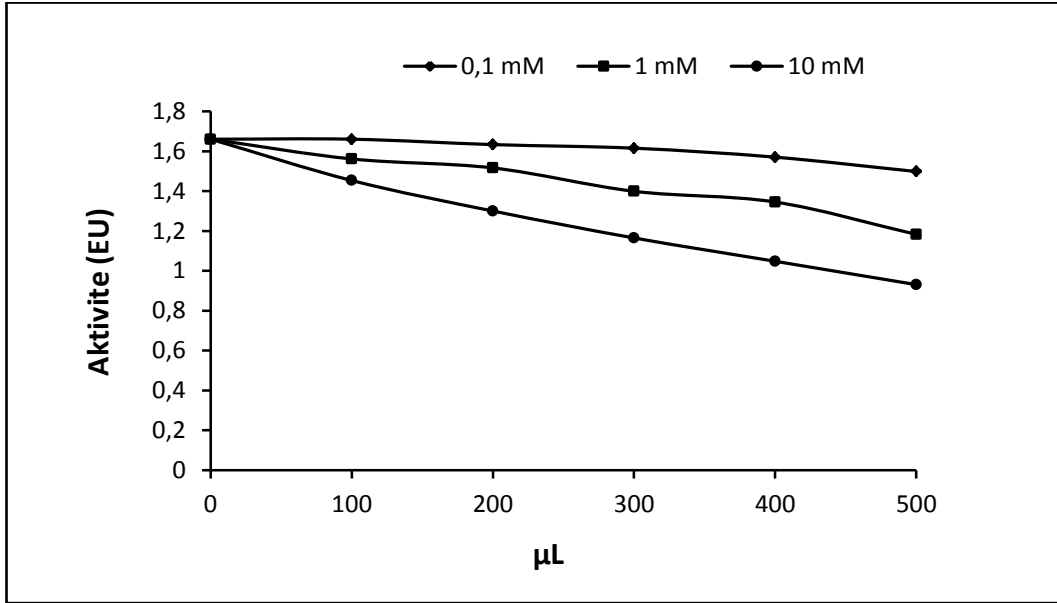
Şekil 4.13. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM FeCl₂'ün etkisinin sonuçları



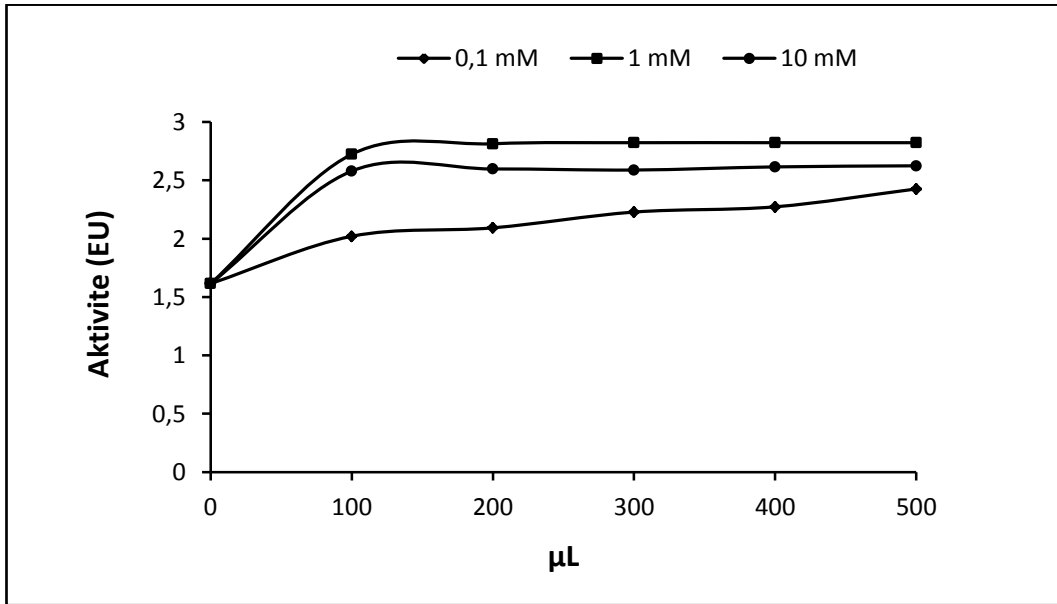
Şekil 4.14. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM $MnCl_2$ 'ün etkisinin sonuçları



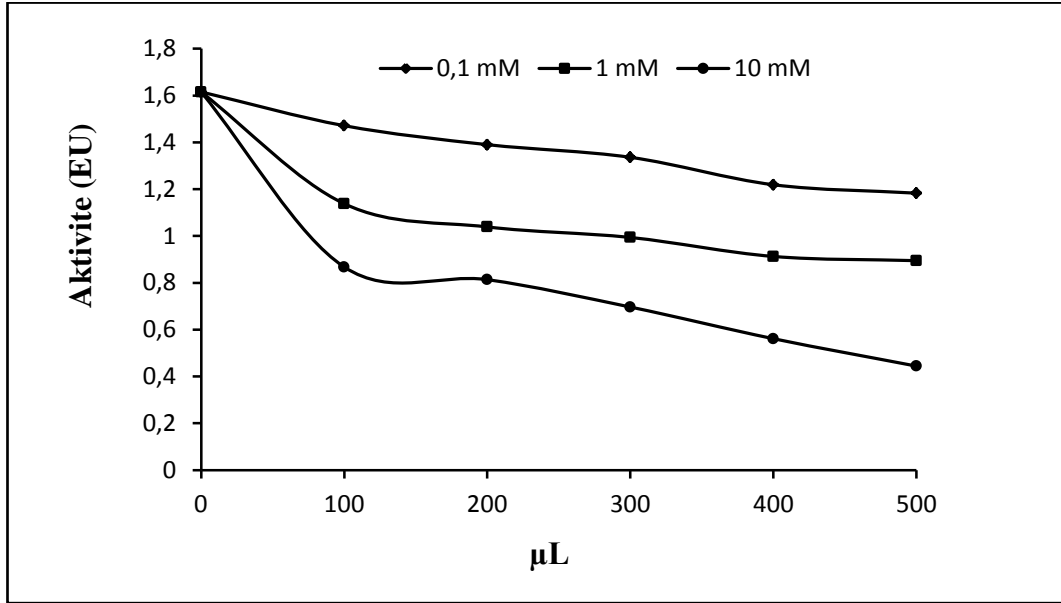
Şekil 4.15. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM $CaCl_2$ 'ün etkisinin sonuçları



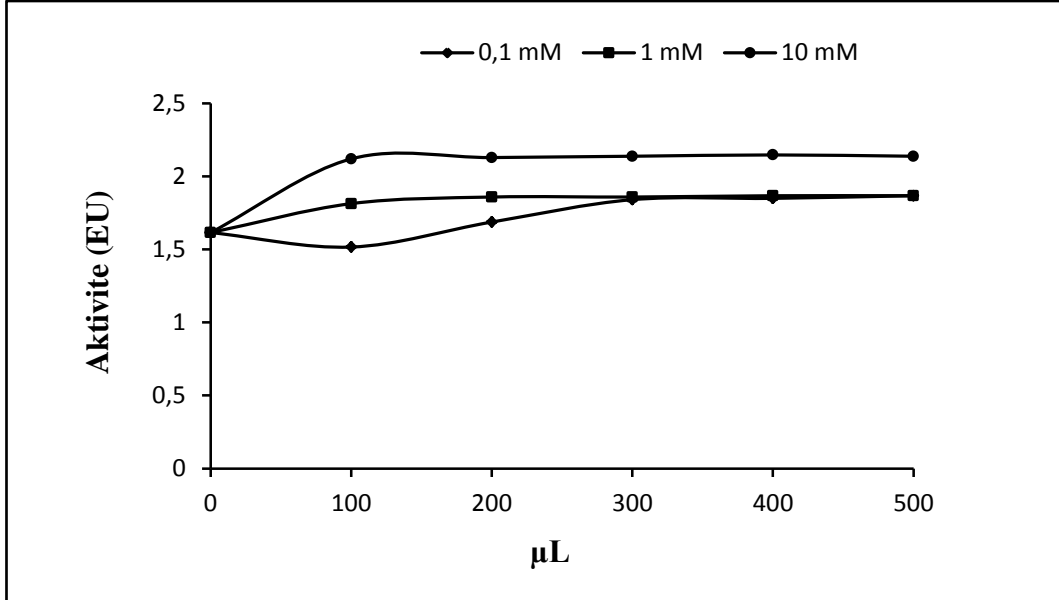
Şekil 4.16. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl_2 'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.17. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl_3 'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.18. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl_2 'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.19. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl_2 'ün etkisinin sonuçları

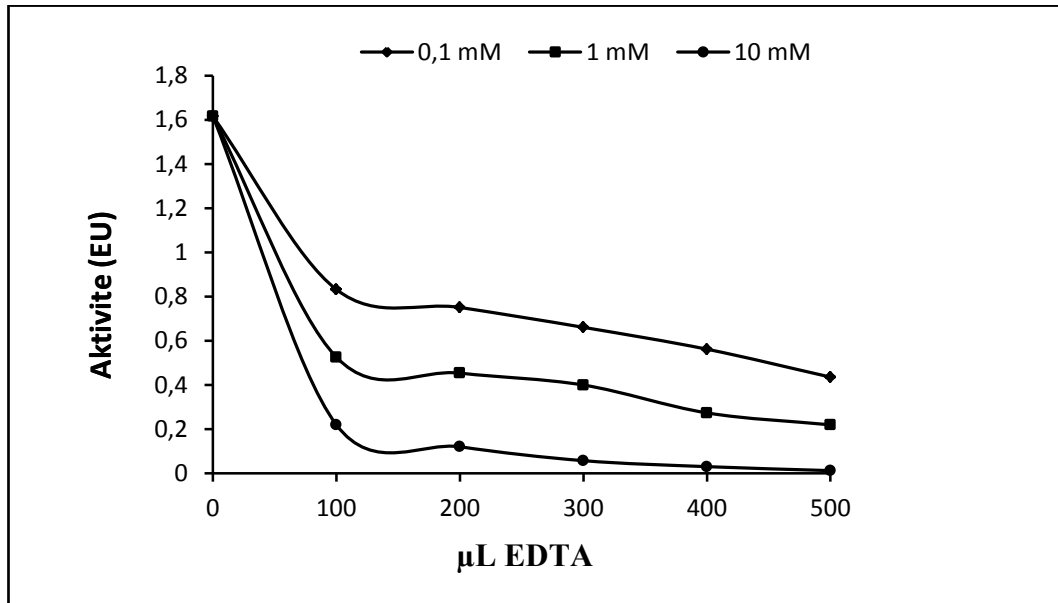
Çizelge 4.3. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
MgCl ₂	0,1	124,08
	1,0	94,06
	10	113,91
MnCl ₂	0,1	91,71
	1,0	71,60
	10	70,20
FeCl ₂	0,1	90,06
	1,0	85,50
	10	100,09
NiCl ₂	0,1	94,50
	1,0	61,62
	10	50,27
FeCl ₃	0,1	149,52
	1,0	142,77
	10	139,09
CaCl ₂	0,1	132,73
	1,0	95,41
	10	86,82
HgCl ₂	0,1	73,05
	1,0	27,75
	10	08,86

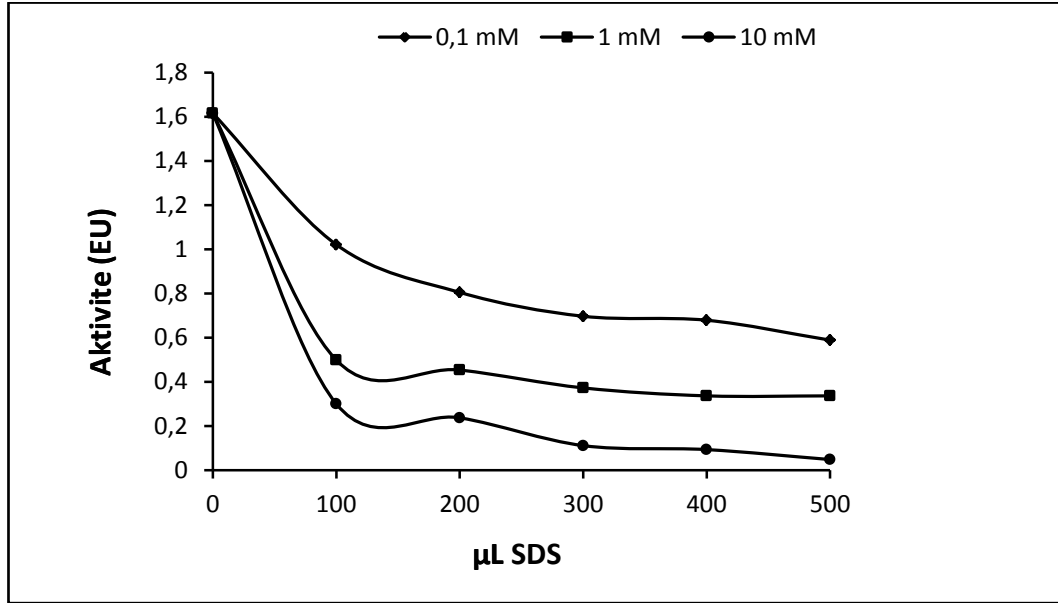
4.3.7. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin incelenmesi sonuçları

Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), iyodasetamid, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkapt etanolün etkileri incelendi. Bunun için saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı.

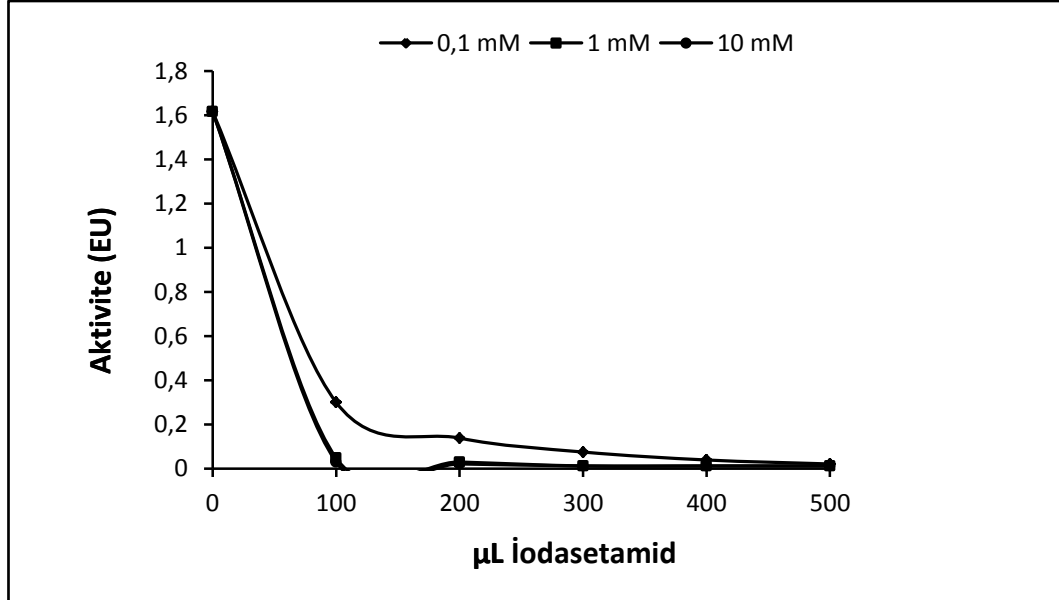
0,1 mM, 1 mM ve 10 mM'lık hazırlanan SDS, EDTA, iyodasetamid ve β -merkapt etanol çözeltilerinden 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L alındı, 1 mL %1'lik kazein çözeltilisi ve 0,5 mL enzim çözeltilisi eklendi. Enzim için proteolitik aktivite dakikada parçaladığı μ g protein/mL olarak hesaplandı.



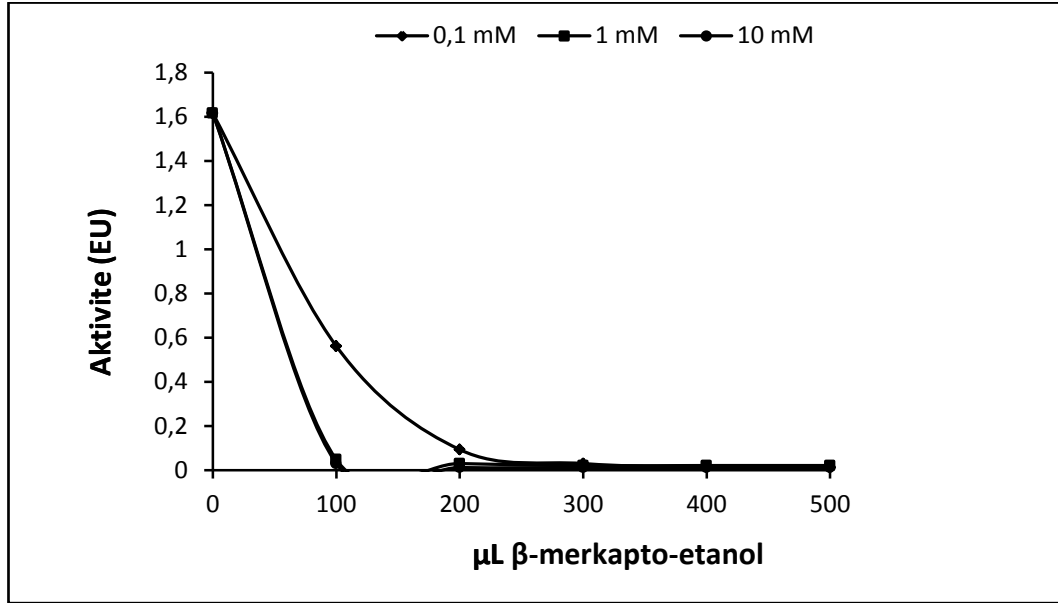
Şekil 4.20. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA'nin etkisinin sonuçları



Şekil 4.21. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS'nin etkisinin sonuçları



Şekil 4.22. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM iodasetamid'in etkisinin sonuçları



Şekil 4.23. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM β-merkaptto etanol'ün etkisinin sonuçları

Çizelge 4.4. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon	Proteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
İyodasetamid	0,1	1,61
	1,0	0,49
	10	0,00
β-merkapttoetanol	0,1	1,09
	1,0	0,55
	10	0,00
SDS	0,1	35,87
	1,0	15,89
	10	0,00
EDTA	0,1	29,54
	1,0	11,96
	10	0,00

4.4. Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Sütün Çöktürülmesi Sonuçları

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürüp çöktürmediği araştırıldı. Çökmenin 30 dakika sonunda 50°C’de meydana geldiği belirlendi.

Sonuçlar Şekil 4.24’de verilmiştir.



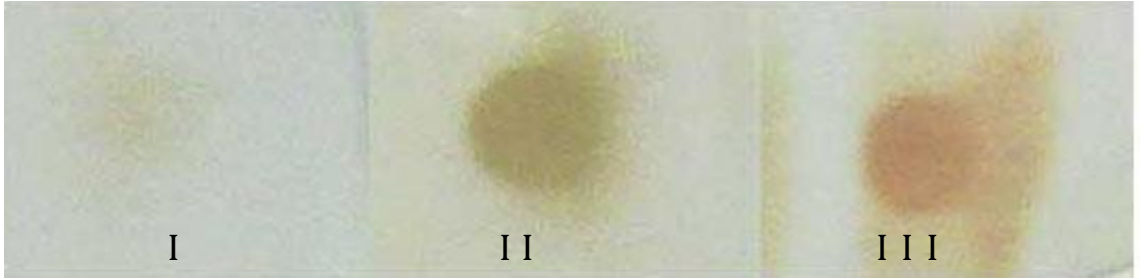
Şekil 4.24 Saflaştırılan proteaz enzimi kullanılarak sütün çöktürülmesi

*(I: Kontrol, II: Enzim, III: Homojenat)

4.5. Saflaştırılan Proteaz Enzimi Kullanılarak Kan Lekesini Temizleme Etkisinin İncelenmesinin Sonuçları

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin temizlik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla 3 adet (5x5) kumaş parçası üzerine 50 µL kan damlatıldı ve kuruması beklendi. 100 mL'lik 3 adet beher alındı ve 1. behere 1 mL enzim çözeltisi, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL ye tamamlandı, 2. behere 1 mL deterjan, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL ye tamamlandı, 3. behere ise 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6) eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. Kurutulan kumaşlar hazırlanan 3 beherde 1 gece boyunca bekletildi.

Sonuçlar Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25. Saflaştırılan proteaz enzimi kullanılarak kanın temizlenmesi etkisinin sonuçları

*(I: Deterjan, II: Enzim, III: Kontrol)

4.6. Tirmit Mantarının (*Lactarius volemus*) C Vitamini Miktarının Belirlenmesi

Tirmit mantarında (*Lactarius volemus*) bulunan C vitamini miktarı diklorofenolindofenol (DCPIP) ile titrasyon yapılarak belirlendi (Smirnoff, 2000). Bitki homojenatına %0,1'lik diklorofenolindofenol (DCPIP) çözeltisi damla damla ilave edildi. Mavi rengin oluşması ile titrasyon sonlandı. 0,001 g olan her 1 cm³ DCPIP

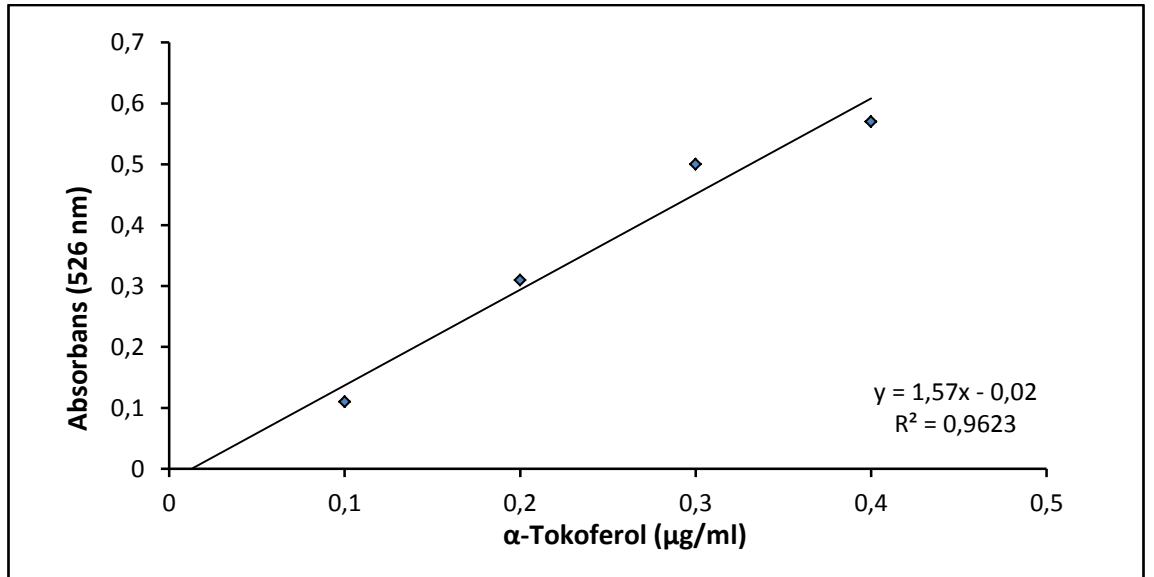
0,0015 g askorbik aside karşılık gelecek şekilde hesap yapılarak numunedeki C vitamini miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Smirnoff 2000).

$$\text{Askorbik asit miktarı (mg/100g)} = V_x F_x 100 / W$$

Sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

4.7. Tirmit Mantarının (*Lactarius volemus*) E Vitamini Miktarının Belirlenmesi

α -tokoferol'ün standart çözeltisinden 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ alınarak H_2SO_4 ilave edilerek tokoferil asetatın ester formu hidroliz edildi. Ardından ortama 0,5 mL 0,01 M tetrazolium blue, 5 mL 0,2 M NaOH ve metanol ilave edildi, 90°C 'de 10 dakika inkübasyondan sonra 526 absorbanbsı ölçüldü ve standart grafik oluşturuldu. Tirmit mantarının (*Lactarius volemus*) E vitamini miktarı standart grafikten faydalanılarak hesaplandı (Çizelge 4.5).

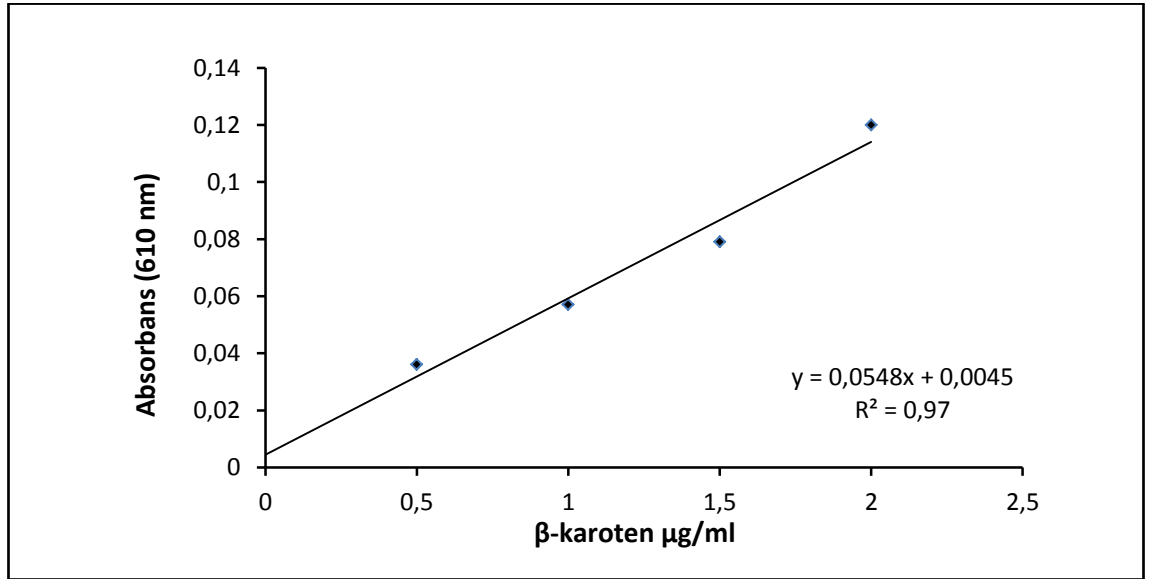


Şekil 4.26. E vitamini tayini standart grafiği

4.8. Tirit Mantarının (*Lactarius volemus*) A Vitamini Miktarının Belirlenmesi

Tirit mantarının (*Lactarius volemus*) A vitamini tayini Limited ve Hyderabad tarafından geliştirilen yöntem ile yapıldı (Limited and Hyderabad 1996). Yöntem A vitamininin 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli bir bileşik oluşturma ve bu bileşimin 610 nm'de maksimum absorbanans gösterme prensibine dayanmaktadır. β -karotenden 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 ve 5,0 mg/mL alınarak 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli türev oluşturuldu ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) elde edilen ekstreden numune alınarak aynı yöntem kullanılarak ölçüm yapıldı ve A vitamini miktarı hesaplandı.

Sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.27. A vitamini tayini standart grafiği

Çizelge 4.5. Tirit mantarının (*Lactarius volemus*) vitamin tayini sonuçları

Vitamin	Su ekstraktı (mg/100 gr)	Petrol eteri ekstraktı (µg/100 gr)
A Vitamini (β-Karoten)	-	68 ± 0,24
E Vitamini (α-tokoferol)	-	37 ± 0,13
C Vitamini (Askorbik asit)	18 ± 0,32	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada yenilebilir tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) proteaz enzimi saflaştırıldı, tirmite mantarında (*Lactarius volemus*) A vitamini, E vitamini ve C vitamini miktarları belirlendi ve ayrıca saflaştırılan proteaz enziminin gıda ve temizlik endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı.

Literatür araştırmalarımız sonucunda proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan en yaygın yöntemin iyon değişim kromatografisi olduğu belirlenmiştir ve bu yöntem 2 basamaktan oluşmaktadır.

1. Basamakta %50-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve çökelekte yüksek proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

2. Basamakta ise diyalizlenen enzim homojenatı CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklenmiş ve 0,1-0,5 mM NaCl ile tuz gradienti oluşturularak elüe edilmiş ve aktif elüatlarda protein tayini yapılmıştır.

Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) 2 basamakta saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir. Ayrıca her basamakta spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma tablosu oluşturulmuş ve proteaz enziminin 60,29 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir. Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Enzimin saf olduğu belirlenmiş olup jelin fotoğrafı çekilmiştir. Jelin fotoğrafı Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

Tirmite mantarından (*Lactarius volemus*) proteaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için pH:4-10 aralığında aktivite ölçümleri yapılmış ve aktivite-pH grafiği

çizilmiştir (Şekil 4.4). Enzimin optimum pH'sının 7 olduğu ve pH:4-9 aralığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 10-90°C aralığında enzimin aktivitesi ölçülmüş ve optimum sıcaklığın 60°C ve enzimin 10-80°C aralığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 26,1 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği ve molekül ağırlığı tayini grafiği sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında Linewear-Burk grafikleri oluşturulmuş ve K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,975 μ M ve 1,21 μ g/mL*dakika olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için hemoglobin, jelatin, azoalbumin, azokazein substratlarına karşı proteolitik aktivite ölçümleri yapıldı ve Linewear-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak her substrat için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi ve en fazla ilginin kazein substratına karşı olduğu görüldü. Sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) katyonlarının etkisi de belirlenmiştir. Tüm katyonların klorürlü tuzları kullanılmıştır. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} iyonlarının enzimi aktivite ettiği Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} katyonlarının enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM β -merkapto etanol, SDS, EDTA ve iyodasetamid kimyasallarının etkisi belirlenmiştir. SDS ve EDTA'nın düşük konsantrasyonlarda enzimi kısmen inhibe ettiği, yüksek konsantrasyonlarda ise uygulanan tüm kimyasalların enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürüp çöktürmediği konusunda araştırılmış ve en iyi çökmenin 50°C'de 30 dakikada meydana geldiği belirlenmiştir.

Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin temizlik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı da araştırılmış olup kan lekelerini temizleme etkisi incelenmiş ve kısmen etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.23).

Tirmit mantarında (*Lactarius volemus*) bulunan C vitamini, E vitamini ve A vitamini miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Sonuç olarak;

1. Proteaz enzimi, tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) amonyum sülfat çöktürmesi ardından CM-Sephadex kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı.
2. CM-Sephadex iyon değişim kolonu ile enzim 60.29 kat saflaştırılmıştır.
3. Tirmit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur.

4. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir.
5. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,975 μM ve 1,21 $\mu g/mL \cdot dakika$ olarak belirlenmiştir.
6. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin hemoglobin, jelatin, azokazein, azoalbümin substratlarına karşı substrat spesifikliği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).
7. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin moleköl ağırlığı 26,1 kDa olarak hesaplanmıştır.
8. Proteaz enzim aktivitesi üzerine Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} kasyonlarının, β -merkaptö etanol, SDS, EDTA ve iyodasetamid kimyasallarının etkileri incelenmiş ve yüksek konsantrasyonlarda Hg^{2+} ve β -merkaptö etanol, SDS, EDTA ve iyodasetamidin saflaştırılan proteaz enzimini tamamen inhibe ettiği görölmüştür.
9. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürüp çöktürmediği araştırılmıştır. En iyi çökmenin 50°C'de 30 dakikada olduğu gözlenmiştir.
10. Tirit mantarında (*Lactarius volemus*) bulunan C vitamini miktarı 18 mg/100g olarak belirlenmiştir. Tirit mantarında (*Lactarius volemus*) bulunan c vitamini miktarı limon ve portakalla karşılaştırıldığında çok düşük sayılabilir. Limonda 100 mg/100g, portakalda ise 190 mg/100g olarak c vitamini (askorbik asit) miktarı belirlenmiştir. (Bacharach *et al.* 1934)

11. Tirit mantarında (*Lactarius volemus*) bulunan E vitamini miktarı 37 µg/100g olarak bulunmuştur. Patateste E vitamini miktarı 230 µg/100g iken mısırdaki 133 µg/100g olarak belirlenmiştir (Warman and Havard 1998).

12. Yapılan araştırmalarda avucun A vitamini miktarı 12,45 mg/100g (Warman and Havard 1997) Tirit mantarında ise (*Lactarius volemus*) A vitamini miktarı 68 µg/100g olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada Erzurum ve çevresinde doğal olarak yetişen bilimsel adı *Lactarius volemus* olan mantar türünden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterize edilmesi ve bu enzimin temizlik ve gıda endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağı sorusuna cevap arandı. Saflaştırılan proteaz enziminin sütü çöktürdüğü ve peynir yapımında kullanılabileceği görüldü. Saflaştırılan proteaz enziminin kan proteinlerini parçaladığı yapılan deneyler sonucunda anlaşıldı. Mantarın vitamin yönünden de zengin olduğu belirlendi ve protein miktarınca zengin olan yenilebilir bu mantar türünün besleyici bir gıda ürünü olarak rahatlıkla tüketilebileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Altan, N., **2000**. Biyokimya Olgu Yaklaşımı. Palme Yayıncılık, 69-74s, Ankara.
- Amin, A.S., **2001**. Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multi-vitamin capsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 51, 267-272.
- Ammirati., J.F., Traquair J.A., Horgen P.A., **1985**. Poisonous Mushrooms of the Northern United States and Canada. Ontario: Fitzhenry & Whiteside Ltd.
- Bacharach, A.,L., Cook, P.,M.,Smith, E.,L.,**1934** The Ascorbic acid content of certain citrous fruits and some manufactured citrous products. The Glaxo Laboratories, 56 Osnaburgh Street, London, n. w. 1.
- Barrett, A.J., N. D., Rawlings, and J. F., Woessner, eds., **1998**. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press. San Diego.
- Bell, E. F., **1987**. History of vitamin E in infant nutrition. *Am. J. Clin. Nutr* 46 (1 Suppl), 183–186.
- Bradford, M. M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Bruice, T. C., TH Fife, Bruno j. j., Brandon N. E., **1962**. *Biochemistry*, 1, 7.
- Christensen, C. M., **1981**. Edible Mushrooms. Second Edition. 118 pp. University of Minnesota Press, Minneapolis
- Çalkı, Ş., **1999**. Bazı Su Ürünlerinde Proteolitik Enzim Aktiviteleri. *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 385-390.
- Çolak, A., Faiz, Ö., Sesl, i. E., **2009**. Nutritional values are based on chemical analysis of Turkish specimens. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry]*, 34 (1), 25–21.
- Demir, Y., Alaylı A., Yıldırım S., Demir N. **2005**. Identification of Protease from *Euphorbia Amygdaloides* Latex and It's Using in Cheese Producing. *Biochemistry and Biotechnology*, 35. 291–299.
- Duester, G., **2008**. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134 (6), 921–31.
- Fadıloğlu, S., **2001**. Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/Food*, 45 (2), 143-146.
- Fersht, A., **1985**. Enzyme structure and mechanism. San Francisco. W. H. Freeman. pp. 50–2.
- Frey, A. and Hegeman A. D **2007**. Enzymatic Reaction Mechanisms Oxford University Press, Inc.
- Glazer, A. N., Smith E. L., . **1971**. Papain and other sulfhydryl proteolytic enzymes. *The Enzymes*, Vol III, Boyer PD (Eds.), Academic Press. New York pp. 501-546.
- Hall, I.R., Yun, W., Amicucci, A., **2003**. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends In Biotechnology*, 21 (10): 433-438.
- Kalisz, H. M., **1988**. Microbial Proteinases. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 36, 1-65

- Kang, J. H., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., Albert, C. M., Grodstein, F., **2010**. Vitamin E, Vitamin C, Beta Carotene, and Cognitive Function Among Women With or at Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 2772-2780.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö., İ., **2005**. *Biyokimya*, Aktif Yayın Evi, 91-95, 118s, İstanbul.
- Keskin, H., **1987**. *Besin Kimyası*. Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Sti, 49, 51s, İstanbul.
- Kostiainen, E. and Jarkko Y., **2008**. Cesium-137 in mushrooms after the Chernobyl deposition Radiation and Nuclear Safety Authority Finland.
- Koyyalamudi, S.R., Jeong S.C., Song CH, Cho, K.Y., Pang G., **2009**. Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (8): 3351–5.
- Laemmli, U. K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-85.
- Lecaille, F., J. Kaleta. D., Brömme. **2002**. *Chem Rev* 102, 4459.
- Lehninger, A. L., **2005**. *Principles of biochemistry*. New York. Worth Publishers Inc.
- Limited, S., Hyderabad, L.B.N., **1996**, Colorimetric determination of vitamin-A with 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(4): 171-3.
- McIntosh, J. E. A., 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and dorsolateral prostate of the rat. *Biochemical Journal*, 114 (3), 463-476.
- Onat, T., Emerk, K., **1997**. *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı, İzmir.
- Özata, A., Kutlu, M., **2000**. *Enzimoloji Ders Notları*, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 1254. Eskişehir.
- Pauling, L., **1973**. *Die Natur der chemischen Bindung*, chemie-varlag, Weinheim, 470-523.
- Preedy, V. R., Watson, R. R. Sherma, Z., **2010**. *Dietary Components and Immune Function*. Nutrition and Health. Totowa, NJ, Humana Press. pp. 36-52.
- Price, N. C., **1979**. What is meant by 'competitive inhibition. *Trends in Biochemical Sciences* 4: pN272.
- Shen, Q., Chen, W., Yan, Z., Xie, X. **2009**. Potential pharmaceutical resources of the Qinling Mountain in central China: medicinal fungi, *Frontiers of Biology in China*. 4 (1), 89–93.
- Shimono, Y., Hiroi, M., Iwase, K., Takamatsu, S., **2007**. Molecular phylogeny of (*Lactarius volemus*) and its allies inferred from the nucleotide sequences of nuclear large subunit rDNA. *Mycoscience* 48 (3), 152–57.
- Shireen, K. F., Pace, R. D., Mahboob, M., Khan, A. T., **2008**. Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food Chem. Toxicol*, 46, 3290–3294.
- Smirnoff N., **2000**, Ascorbic Acid: metabolism and function of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 229-235.
- Smirnoff, N., **1996**. Botanical Briefing. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants, *Annals of Botany* 78 (6), 661–9.

- Temizkan, G., ve Arda, N. **2008**. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı. İstanbul.
- Topal, S.,2000. TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknoloji Araştırma Enstitüsü. PK:21, 41470. Gebze, Kocaeli-Türkiye
- Traber and Atkinson, J. **2007**. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology Medicine*, 43 (1), 4–15.
- Wang, X. And Ng, T. B., **2001**. Pleureryn, a Novel Protease from Fresh Fruiting Bodies of the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 750–755.
- Warman, P., R., Havard, K.,A.,**1998**, Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 68_1998.207–216
- Warman, P., R., Havard, K.,A.,**1997**. Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown carrots and cabbage, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 61 155-162
- Zhang, G., Wang, H., Zhang, X., Ng, T., **2010**. Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109. 20–24.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Edirne’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Edirne’de tamamladıktan sonra 2004 yılında Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümünde başladığı üniversite eğitimini 2009 yılında tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır.