

**Termofilik Mantar *Scytalidium thermophilum*'un Çift  
Aktiviteli Katalaz/Katekol Oksidaz Enziminin Fenolik  
Maddeler Varlığında Üretimi ve Biyokatalitik Özellikleri**

**Proje No: 107T611**

**Yrd.Doç.Dr. İlkay ŞENSOY  
Prof.Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL  
Prof.Dr. Gürkan KARAKAŞ  
Doç.Dr. Nursen ÇORUH**

**KASIM 2009**

**ANKARA**

# **Termofilik Mantar *Scytalidium Thermophilum*'un Çift Aktiviteli Katalaz/Katekol Oksidaz Enziminin Fenolik Maddeler Varlığında Üretimi ve Biyokatalitik Özellikleri**

## **ÖNSÖZ**

Ekte sunulan proje TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından 2007-2009 yılları arasında 157980 TL lik bütçe ile desteklenmiştir. Bu projede *Scytalidium thermophilum* isimli termofilik küf mantarının ürettiği özgün çift-aktiviteli katalaz-fenol oksidaz (KATFO/CATPO) enziminin üretimi ve biyokatalitik özellikleri incelenmiştir. Yaklaşık 2000 yılında başlayan çalışmalarımız TÜBİTAK'ın desteği ile daha ileri boyutlara taşınabilmiştir. Sağlanan destek ile KATFO üretimi ve biyokatalitik özellikleri 15 farklı fonksiyonel fenolik maddeye karşı incelenmiş ve bunlardan 5 tanesinin ürünleri karakterize edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre projenin başında öngörülen amaçlara ulaşılmıştır. Proje kapsamında bir adet HPLC ve bir dizi sarf malzeme alımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bir bursiyer proje bütçesinden desteklenmiş, diğer bursiyer hakkı ise araştırmacının TÜBİTAK'dan doktora bursu alıyor olması sebebi ile kullanılmamıştır. Projede görev alan Yonca Yüzügüllü ve Gülden Koçlar Avcı burada sunulan deneysel çalışmalara olağanüstü derecede yoğun emek harcamışlardır. Aynı şekilde ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü doktora öğrencisi Betül Söyler'de çalışmalara önemli katkıda bulunmuştur. Bu genç araştırmacılarımıza özverili çalışmalarından dolayı teşekkür ederiz. Burada sunulan LC-MS deneyleri TÜBİTAK-ATAL'da gerçekleştirilmiştir. Katkılarından dolayı ATAL ekibine de içten teşekkürlerimizi sunarız.

Araştırma grubumuz olarak sağladıkları destekle KATFO/CATPO çalışmalarımızın ilerlemesine katkıda bulunan TÜBİTAK'a şükranlarımızı sunarız.

Saygılarımızla,

Yrd.Doç.Dr. İlkay Şensoy

## İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	2
Tablo ve Şekil Listesi.....	4
Özet .....	6
Abstract.....	7
Giriş.....	8
Genel Bilgiler .....	10
Gereç ve Yöntem .....	13
Bulgular ve Tartışma .....	18
<i>Scytalidium thermophilum</i> 'un çeşitli fenolik maddeler varlığında büyütülmesi biyokütlenin katalaz ve fenol oksidaz üretiminin belirlenmesi .....	18
Genel Değerlendirme .....	44
Ortam sıvısı ve saflaştırılmış KATFO varlığında çeşitli fenolik maddelerin oksidasyonu ...	45
Oksidasyon ürünlerinin tanımlanması .....	47
FT-IR sonuçları.....	66
Sonuçlar .....	69
Kaynakça.....	71
EK A .....	74

# TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

## Tablolar

<b>Tablo 1</b> Projede denenen fenolik maddelerin kimyasal yapıları .....	19
<b>Tablo 2.</b> Fenolik maddelerin KATFO ile oksidasyonu.....	45

## Şekiller

<b>Şekil 1</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin katekol dozuna göre değişimi .....	20
<b>Şekil 2</b> Katekolün farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri.....	20
<b>Şekil 3</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	21
<b>Şekil 4</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin hidrokinoon dozuna göre değişimi .....	21
<b>Şekil 5</b> Hidrokinoonun farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri ..	22
<b>Şekil 6.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	22
<b>Şekil 7.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin resorsinol dozuna göre değişimi .....	23
<b>Şekil 8.</b> Resorsinol'ün farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri.....	23
<b>Şekil 9.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	24
<b>Şekil 10.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin gallik asit dozuna göre değişimi .....	25
<b>Şekil 11.</b> Gallik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri .....	25
<b>Şekil 12.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	26
<b>Şekil 13.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin vanillik asitin dozuna göre değişimi.	26
<b>Şekil 14.</b> Vanillik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri.....	27
<b>Şekil 15.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	27
<b>Şekil 16.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin kafeik asit dozuna göre değişimi.....	28
<b>Şekil 17.</b> Kafeik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri .....	28
<b>Şekil 18.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	29
<b>Şekil 19.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin klorojenik asit dozuna göre değişimi .....	29
<b>Şekil 20.</b> Klorojenik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri	30
<b>Şekil 21.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	30
<b>Şekil 22.</b> <i>S. thermophilum</i> 'un 5. gündeki biyokütlesinin kumarik asit dozuna göre değişimi..	31
<b>Şekil 23.</b> Kumarik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri...	31
<b>Şekil 24.</b> Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi.....	32
<b>Şekil 25.</b> Mirisetin varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim.....	32

<b>Şekil 26.</b> Mirisetin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	33
<b>Şekil 27.</b> Mirisetin varlığında birim biyokütle başına katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	33
<b>Şekil 28.</b> Kaempferol varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim .....	34
<b>Şekil 29.</b> Kaempferol varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	34
<b>Şekil 30.</b> Kaempferol varlığında birim kütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	35
<b>Şekil 31.</b> Kuersetin varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim .....	35
<b>Şekil 32.</b> Kuersetin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	36
<b>Şekil 33.</b> Kuersetin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	36
<b>Şekil 34.</b> Katekin varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim .....	37
<b>Şekil 35.</b> Katekin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	38
<b>Şekil 36.</b> Katekin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	38
<b>Şekil 37.</b> Epikatekin varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim.....	39
<b>Şekil 38.</b> Epikatekin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	39
<b>Şekil 39.</b> Epikatekin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	40
<b>Şekil 40</b> Resveratrol varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim.....	40
<b>Şekil 41.</b> Resveratrol varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	41
<b>Şekil 42.</b> Resveratrol varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz .....	41
aktiviteleri .....	
<b>Şekil 43.</b> Fenillaktik asit varlığında <i>S. thermophilum</i> 'un biyokütlesindeki değişim.....	42
<b>Şekil 44.</b> Fenillaktik asit varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	42
<b>Şekil 45.</b> Fenillaktik asit varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri .....	43

## ÖZET

*Scytalidium thermophilum* mantar kompostunda yaşayan ve yenebilir mantar *Agaricus bisporus*'un üretimini tetikleyen bir termofilik mantardır. *S. thermophilum*'un çok miktarda melanin üretmesinden hareketle, bu küfte fenol oksidaz enzimlerinin varlığının araştırılması hedeflenmiştir. Sonuç olarak, *S. thermophilum* hücre-dışı fenol oksidazının bir çift aktiviteli katalaz-fenol oksidaz (KATFO/CATPO) olduğu belirlenmiştir. Bu proje kapsamında *S. thermophilum* 15 farklı fenolik madde varlığında ve farklı dozlarda büyütülmüş ve KATFO'nun üretimi incelenmiştir. Daha sonra, hem ortam sıvısı hem de saf enzim kullanılarak 15 maddenin oksidasyonu incelenmiştir. Saf enzimle okside olabilen ürünlerden 5 tanesinin oksidasyon ürünleri karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, KATFO sürekli (konstitütif) ve büyümeye paralel olarak üretilmektedir, ancak fenolikler büyümeyi ve enzim üretimini etkileyebilmektedirler. KATFO katekol, hidrokinon, katekin, kuersetin, klorojenik asit ve kafeik asiti okside edebilmiştir. Bunlardan katekol, hidrokinon, kafeik asit, klorojenik asit ve katekinin C-C ve C-O-C bağları ile polimerleştiği görülmüştür. Özellikle dimer, trimer ve tetramer yapıları belirlenmiş ancak, genel olarak, çoklu ürünlerin varlığı ve polimerleşmenin zamana karşı devam ettiği gözlenmiştir.

Katekol, hidrokinon, mirisetin, kaempferol ve kumarik asit artan dozlarda büyümeyi olumsuz etkilemiş, kafeik asit, klorojenik asit, kuersetin, katekin, epikatekin, resorsinol, vanillik asit ve resveratrol varlığında ise büyüme olumsuz etkilenmemiş, hatta %50'ye varan artışlar görülmüştür. Büyümeyi olumlu etkileyen fenolikler varlığında KATFO üretimi ya belirgin bir değişim göstermemiş veya artan dozlarda az ya da çok baskılanmıştır. Toksik etkinin görüldüğü durumlarda genelde KATFO'da olumsuz etkilenmiş, ancak antifungal etki gösteren hidrokinon ve mirisetinde KATFO doza bağlı tetiklenmiştir. Büyümeyi olumlu etkileyen fenoliklerin antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir. Bunların çoğu ve özelinde yapısında *orto*-difenol bulunduran fenolik asitler ve flavonoidler KATFO tarafından okside olabilmektedir. Diğer yandan, antifungal/toksik etki gösteren maddelerin büyük bir kısmı, mirisetin, kaempferol ve kumarik asit, KATFO tarafından okside olmamıştır. Buna göre, KATFO'nun fenolik maddelerin oksidasyonu ile onların toksik etkilerini azalttığı ve/veya antioksidan etkilerini artırdığı yönünde bir olasılık ortaya çıkmıştır.

**Anahtar kelimeler:** termofilik mantar, *Scytalidium thermophilum*, katalaz, fenol oksidaz, antioksidan, fenolik madde

## ABSTRACT

*Scytalidium thermophilum* is a thermophilic fungus found in mushroom compost, where it triggers the production of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Since *S. thermophilum* produces immense amounts of melanin, phenol oxidase production was analysed. As a result, the extracellular phenol oxidase of *S. thermophilum* was determined as a bifunctional catalase phenol oxidase (CATPO/KATFO). In the scope of this project *S. thermophilum* was cultivated in the presence of 15 different phenolic compounds, at different concentrations, to explore CATPO production. Next, the oxidation of these 15 substances was analyzed by using both the supernatant and pure enzyme. The oxidation products of 5 of these compounds was further characterized. According to the findings, CATPO is produced constitutively and in a growth-associated manner. Nonetheless, phenolics could affect the growth and enzyme production. CATPO could oxidize catechol, hydroquinone, catechin, quercetin, chlorogenic acid and caffeic acid. These compounds were mainly polymerized by C-C and C-O-C bonds. Especially dimer, trimer and tetramer structures were determined, however, the presence of multiple products and the progression of polymerization by time was also observed.

Catechol, hydroquinone, myricetin, kaempferol and coumaric acid have influenced the growth adversely in an increasing concentration manner, on the other hand under the influence of caffeic acid, chlorogenic acid, quercetin, catechin, epicatechin, recorcinol, vanillic acid and resveratrol the growth was not adversely affected, in fact, upto 50% increase in biomass was detected. Most phenolics that positively affected growth either did not change CATPO production or, more or less, repressed it, in a dose-dependent manner. Under toxic conditions CATPO production was adversely affected, however, hydroquinone and myricetin, which showed antifungal activity, enhanced CATPO, in a dose-dependent manner. It is suggested that phenolics that affect growth positively show antioxidant activity. Among these, especially the phenolic acids and flavonoids bearing *ortho*-diphenols in their structures were oxidized by CATPO and did not inhibit growth. However, most phenolics acting in an antifungal/toxic manner, were not oxidized by CATPO. Accordingly, it is suggested that the oxidation of phenolics by CATPO has an affect either on their detoxification and/or enhancing their antioxidant activity.

**Keywords:** thermophilic fungi, *Scytalidium thermophilum*, catalase, phenol oxidase, antioxidant, phenolic substance

# GİRİŞ

Termofilik mantarlar sıcağa en fazla dayanabilen ökaryotik canlılardır. Isıya adaptasyon sonucu, mezofilik atalarından evrimleştikleri iddia edilmektedir. Laboratuvarımızda 10 yıldan fazla bir süredir hem kendi izolatlarımız hem de çeşitli kaynaklardan edinilen termofilik ve termotolerant mantarların enzimleri üzerine araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bunlardan, özellikle *S. thermophilum*, yemeklik mantar *Agaricus bisporus*'un üretilmesinde verimi artırıcı önemli bir role sahiptir ve lignoselülozik maddelerin parçalamasında rol oynayan termostabil enzimlerin üretimi yönünden endüstriyel önem taşımaktadır. Sporulasyon sonrası melanin-kaynaklı koyu bir renge bürünen *S. thermophilum*'un fenol oksidaz enzimleri grubumuz tarafından merak konusu olmuş ve yaklaşık 5 yıl önce bu yönde araştırmalar başlatılmıştır. Yakın bir geçmişte yayınlanan ilk bulgulara göre *S. thermophilum* büyüme ile paralel olarak ortaya çıkan ve fenolik maddeler varlığında üretimi tetiklenen bir hücre-dışı fenol oksidaz üretmektedir (Ögel, 2006). Bu enzim öncelikle bilinen hiç bir fenol oksidaz sınıfına dahil edilememiş ancak ağırlıklı olarak katekol oksidaz özelliği sergilemiştir. Daha sonra yapılan ayrıntılı saflaştırma ve dizi analizleri sonucunda *S. thermophilum*'un hücre-dışı fenol oksidaz enziminin aslında çift aktiviteli bir katalaz olduğu belirlenmiştir. Literatürde memeli katalaz-oksidad adı altında bu tür bir enzime dair tek bir yayın bulunabilmiştir (Vetrano., 2005). Bu yayında, bir çok fonksiyonel öneme sahip fenolik maddeyi okside etmesi bakımından, bu enzimin, önemli bir biyolojik rolü olabileceği vurgulanmaktadır (Vetrano, 2005). Katalazlar hücre ömrünü etkileyen antioksidan enzimlerden biridir. Bu özellikleri, oksidatif stres varlığında oluşan reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS) ile hücrenin baş edebilmesi esnasındaki katkılarından kaynaklanmaktadır. Diğer yandan, fenolik maddelerin hem antioksidan, hem pro-oksidadan aktiviteleri olabildiği, aynı zamanda sinyal iletiminde rol oynayabildikleri bilinmektedir. Özellikle antikanser rolleri konusunda yapılan araştırmalar, antioksidan özelliklerinin mi yoksa, başta kinazlar olmak üzere, iletişime geçtikleri proteinler vasıtası ile mi bu fonksiyonu gerçekleştirebildiklerinin çok açık olmadığını göstermektedir (Williams, 2004).

Önerilen proje, *S. thermophilum* çift aktiviteli katalaz/fenol oksidaz (KATFO) enziminin, farklı kimyasal yapı ve fonksiyonel özelliklerine göre seçilmiş, fenolik maddeler varlığında üretiminin ve biyokatalitik özelliklerinin daha ayrıntılı olarak irdelenmesi ile biyolojik rolü yönünde yeni bulguların elde edilmesini hedeflemiştir. Enzimoloji açısından henüz çok yaygın bir olgu olmayan çift aktivitenin daha ayrıntılı olarak araştırılmasının, özelinde katalazlar ve fenol oksidadlar, genelinde ise enzim mühendisliği alanında özgün



uygulamaların geliştirilmesi anlamında da yararlı bilgiler sunacağına ve katalaz-ROS-fenolik maddeler üçgenindeki ilişkiye ışık tutacağına inanılmaktadır.

Buna göre, 2 yıl süre ile gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda belirtilen 2 ana başlıkta özetlenmektedir:

✓ 15 farklı fenolik maddenin 5 ayrı derişimde *S. thermophilum*'un büyümesine ve katalaz ve fenol oksidaz üretimine etkisinin araştırılması.

✓ Ortam sıvısı ve saflaştırılmış KATFO varlığında 15 fenolik maddenin okside olup olmadığının belirlenmesi ve oksidasyon ürünlerinin en az 5 fenolik madde için karakterize edilmesi.

Belirtilen süre içinde projede öngörülen çalışmaların tamamı gerçekleştirilmiştir. Bir yayın hazırlık aşamasındadır. Buna ek olarak en az iki tane daha yayın yapılabileceği düşünülmektedir.

Projede yapılması tasarlanan çalışmalarda yapılan değişiklikler aşağıda özetlenmektedir. Bu değişiklikler amaca ulaşmamızda bize daha fazla yardımcı olacağı için gerçekleştirilmiştir.

✓ Proje önerisinde sadece katalaz aktivitesine bakılacağı söylenmiştir, ancak aynı zamanda fenol oksidaz aktivitesine de bakılmıştır.

✓ Proje önerisinde DSC yapılacağı söylenmiştir. Bunun yerine LC-MS yapılmıştır. LC-MS verileri oksidasyon ürünlerinin çözülmesinde en fazla yararlandığımız teknik olmuştur.

## GENEL BİLGİLER

Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküllerdir. Bu açıdan, oksidatif stresin, kanser, yaşlanma ve çok sayıda hastalığın temel nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Hücreler kendilerini zararlı miktardaki serbest radikallerden koruyabilmek amacı ile başlıca üç enzimden yararlanmaktadır. Bunlar, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir.

Katalazlar  $H_2O_2$  'in su ve moleküler oksijene parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Kurakov, 2001). Katalazlar, antioksidan metalloenzimler grubuna dahil olup çoğunlukla tetramer halindedirler. Monomerleri birbirine benzemekle birlikte 60-90 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptirler. Her bir monomer ayrıca yapısında ferriprotoporfirin içermektedir. Katalazları genel olarak dört gruba ayırabiliriz: monofonksiyonel hem (heme, haem) grubu içeren katalazlar, katalaz peroksidazlar, demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar ve düşük katalaz aktivitesi gösteren çeşitli proteinler (Chelikani, 2003). Hem grubu içeren monofonksiyonel katalazlar hidrojen peroksidin yıkımını iki ayrı basamakta gerçekleştirirler. İlk basamakta birinci hidrojen peroksit enzimdeki hem grubunu oksiferril formuna çevirir. İkinci hidrojen peroksit molekülü ise ilk basamakta oluşan bileşiği tekrar indirgeyip enzimin orjinal formuna dönüşmesinde ve su ile oksijenin oluşumunda görev alır (Chelikani, 2003). Katalaz peroksidazlar hem içeren ve monofonksiyonel katalazlara benzeyen enzimlerdir. Uygun organik elektron vericinin ortamda bulunmasıyla ve hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumda peroksidaz aktivitesi de gösterebilmektedirler. Ancak; şimdiye kadar bu enzimlere uygun peroksidatik sübstrat henüz tanımlanamamıştır. Bu nedenle enzimlerin peroksidatik reaksiyonları belirlenememiştir (Chelikani, 2003). Mn içeren enzimler ise aynı zamanda yalancı-katalazlar olarak da tanımlanabilir. Bu tip katalazlar hem içeren katalazlara göre daha az yaygındırlar. Mantarlar, iyi katalaz üreticisi olarak bilinirler. Hücre dışı katalaz üretimi için *Penicillium*, *Talaromyces* ve *Aspergillus* cinslerine ait mantar türleriyle çalışmak mümkündür (Kurakov, 2001).

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bir süredir fenolik maddelerin antioksidan özellikleri hakkında ve bunların sağlık üzerine olumlu etkileri konusunda bulgular yayınlanmıştır. Oysa bazı

fenoliklerin bazı derişimlerde oksidatif strese neden olabildikleri yönünde bulgular edinilmiştir (Anderson, 1999). Bitki kaynaklı olan birçok fenolik madde antioksidan özelliğe sahip olup lipid peroksidasyonunun oluşumunu engeller. Ancak bazıları ise lipid dışındaki diğer biyomoleküllere oksidatif zarar verebilirler (Laughton, 1989). Dolayısıyla fenollerin çift fonksiyon gösterdiklerini görmekteyiz. Düşük miktarlarda antioksidan gibi davranırlarken, yüksek dozlarda ise pro-oksidan olarak işlev görürler. Fenol kaynaklı gerçekleşen toksisite, fenollerin radikal üretim kabiliyetlerine ve X-fenoksil radikallerin hücrenel biyokimyasal reaksiyonlara müdahale etmesine bağlıdır (Selassie, 1998).

Fenolik maddelerin oksidasyonunda rol oynayan fenol oksidazlar çok geniş bir enzim ailesini oluştururlar. Genel olarak lakkazlar ve katekol oksidaz/tirosinazlar olarak sınıflandırılabilirler. Her iki grup ta kendi içlerinde oldukça fazla çeşitlilik göstermekle beraber, genel olarak, lakkazlar dört bakır atomu, katekol oksidaz/tirosinazlar ise iki bakır atomunu bünyelerinde barındırırlar. Bakır atomları tüm fenol oksidazlarda aktivite açısından gereklidir. Mikrobiyel fenol oksidazlar genellikle savunma amaçlı üretilir ve sadece fenolik madde eşliğinde değil, savunmayı gerektiren çok sayıda çevresel faktör ile üretilebilirler. Fenol oksidazların fenollerini oksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif kinonlar, genellikle, hızla polimerize olurlar. Katekol oksidazlar/tirosinazlar, bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve moleküler oksijeni kullanarak *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler aktif bölgelerinde binükleer bakır bulundururlar (Torelli, 2002). Mantarlarda bulunan katekol oksidazlar hücre zarına bağlı olarak değil suda çözünür durumda serbest olarak bulunurlar. Katekol oksidazların optimum olarak çalıştığı pH değerleri 5.0 - 7.0 olarak belirlenmiştir (Mayer ve Harel, 1978). Katekol oksidazlar oksidasyon için moleküler oksijene gereksinim duyarlar.

Termofilik ve termotolerant mantarlar tahıl ve saman gibi tarımsal ürünlerin çürümmesine neden olurlar. Termofilik mantarlar aynı zamanda kakao ve tütün işlenmesinde, lignosellulozun parçalanmasında rol almaları açısından ekonomik öneme sahiptirler (Sharma, 1989). Termofilik mantarların ürettiği enzimler, denaturasyona ve proteolize karşı direnç gösterirler. Sıcaklığa dirençli enzimler oldukça spesifiktirler ve endüstriyel açıdan önemlidirler (Haki, 2003). Mantarlar tarafından üretilen katalazlar hakkında literatürdeki bilgiler sınırlıdır. Son zamanlarda hidrojen peroksitin endüstride kullanımının artması, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin su ve oksijene dönüştürülmesini sağlayan ekonomik ve oldukça kararlı katalaz enziminin üretilmeye çalışılmasını gerekli kılmıştır (Wang,1998). Laboratuvarımızda bir süre önce *Scytalidium thermophilum*'un fenol oksidaz enziminin çift aktivite gösterebilen bir katalaz/katekol oksidaz olduğu belirlenmiştir (Ögel, 2006). Elde ettiğimiz bulgular *Scytalidium thermophilum*'un da oksidaz aktivitesi gösteren bir katalaz ürettiği ve bu enzimin bazı fenolik maddelerin varlığında oluşumunun arttığı neticesindedir. *Scytalidium thermophilum*'un hücre

dışı fenol oksidaz enziminden elde edilen amino asit dizilimi sonrası bu enzimin Novo Nordisk tarafından dizilimi belirlenmiş *Scytalidium* katalaz enzimi ile birebir örtüşmekte olduğu görülmüştür (US Patent no: 5571719), ancak bu patent içinde enzimin bir fenol oksidaz aktivitesine sahip olduğuna dair bir bilgi bulunamamıştır. Ortam sıvısı kullanılarak yapılan biyodönüşüm denemelerinde, *S.thermophilum* katalaz/katekol oksidaz enziminin (KATFO) farklı yapılara sahip fenolik maddeleri okside edebildiği ince tabaka kromatografi tekniği ile gözlemlenmiştir. Ayrıca çeşitli inhibitörlerin etkisi de incelenmiş, enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş, kinetik parametreleri belirlenmiş ve Leeds Üniversitesi ile işbirliği halinde kristalizasyon ve yapı çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Kocabaş 2008, 2009). Ayrıca KATFO'nun geni klonlanmış ve *Aspergillus sojae* ve *E. coli*'de ifade edilerek alan hedefli mutagenез çalışmalarına başlanmıştır (Erçin 2007, Yüzügüllü, 2010).

Yukarıda sözü edilen katalaz ve katekol oksidaz enzimlerinin özelliklerini tek bir enzimin bünyesinde toplayabilen bir enzime literatürde tek bir yayında rastlanmıştır. Memeli hücrede (chinese hamster) bulunan katalaz-oksidadaz enzimi oksidadaz aktivitesi için oksijene gereksinim duymaktadır ve ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya da herhangi bir kofaktör bulunmadığında dahi elektron veren sübstratları kullanabilmektedir. Birçok fonksiyonel öneme sahip fenolik maddeyi okside edebilen bu çift aktiviteli enzimin önemli bir biyolojik rolü olabileceği belirtilmektedir (Vetrano, 2005). Diğer yandan memeli katalaz-oksidadaz olarak sözü edilen enzimin protein karakterizasyonu yapılmamıştır. Bu nedenle, ekibimizin yayınlamış olduğu KATFO'nun karakterizasyonuna yönelik çalışma, bu tür bir çift aktiviteli enzim için literatürdeki ilk yayın olma özelliğine sahiptir. Leeds Üniversitesi ile ortak yürütülen çalışmalar sonunda ise fenol oksidadaz aktivitesinin enzimin hangi bölgesinde yer aldığı ve hangi amino asitlerin bu aktivitede rol oynadığını belirlemek hedeflenmektedir.

Bu projede, KATFO'nun fenol oksidadasyon spektrumunun daha kapsamlı olarak araştırılması ve enzimin olası biyolojik rolü hakkında verilerin elde edilmesi hedeflenmiş ve gerçekleştirilmiştir. KATFO'nun bilinen diğer fenol oksidadazlardan farklı olması ve aslında bir katalaz olması sebebi ile oluşan oksidadasyon ürünlerinin karakterize edilmesi de literatürde bir ilk olacaktır. Projenin bulguları henüz yayınlanmamıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Mikroorganizma ve kültür hazırlanması

*S. thermophilum* (kültür tipi: *Humicola insolens*) 500 ml'lik erlenler içinde 45°C 'de büyütülmüştür. Ortam sıvısına %4 glikoz, 4 g/l maya ekstraktı, 1 g/l  $K_2HPO_4$ , 0,5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ve uygun derişimde fenolik madde eklenmiştir. Stoklama amacı ile termofilik mantarlar için geliştirilmiş olan YpSs ortamı (Cooney ve Emerson, 1964) kullanılmıştır. Kültürler 20°C de (termofiliklerin buzdolabı sıcaklığı) ve -20°C de saklanmıştır. Kullanılan fenolik maddelerin doz aralığı fenoliklerin büyümeyi durdurmadığı ancak etkilerinin görülebileceği aralıkta olmak üzere ön-çalışmalarla saptanmıştır. Bazı fenolikler için literatür bilgilerinden de yararlanılmıştır (Figueiredo, 2008). Örneğin katekolde 0.5 mM'a kadar büyüme çok etkilenmemekle beraber, daha sonra büyümede düşüş görülmüş ve 2 mM üstünde büyüme çok olumsuz etkilenmiştir. O nedenle, ortama eklenecek fenolik madde derişimleri 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM olarak belirlenmiştir.

### Enzim Aktivite Tayini

#### Katalaz aktivitesi

Katalaz aktivitesi (EC 1.11.1.6) spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. 1 ml'lik reaksiyon sıvısı 10 mM  $H_2O_2$  solusyonundan 0.966 ml ve ortam sıvısından 0.034 ml (pH 7.0) içermektedir. Reaksiyon sıcaklığı 25° C'ye ayarlandıktan sonra hidrojen peroksidin kaybolma hızı 240 nm'de ölçülerek hesaplanmıştır.

#### Fenol Oksidaz Aktivitesi

Fenol oksidaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Buna göre, 2 ml'lik reaksiyon sıvısı, 0.1M fosfat tampon çözeltisi (pH 7) içinde hazırlanmış 100 mM katekol çözeltisinden 0.5 ml, ortam sıvısından 0.5 ml ve tampon çözeltisinden 1 ml ilave edilerek hazırlanmıştır. 60°C'de gerçekleşen reaksiyon sırasındaki katekol oksidasyon ürünü zamana karşı 420 nm'deki soğurma (absorbans) değişimi olarak belirlenmiş ve aktivite buna göre hesaplanmıştır. 1 Ünite aktivite 1  $\mu\text{mol } H_2O_2$ 'i 1 dakikada parçalayabilen enzime karşılık gelmektedir.

## **Biyokütle Tayini**

Biyokütle tayini için 2 X 115 ml'lik büyüme ortamları hazırlandıktan sonra her birine 10 ml'lik fenolik madde çözeltisi ilave edilmiş ve 100µl'lik spor süspansiyonu ( $10^6$ / ml) inokule edilmiştir. 45°C'de ve 155 rpm de gerçekleşen büyüme periyodunun 4. gününde 2. erlen ise 5. günde durdurularak süzölmüş ve biyokütle ortam sıvısından 3MM filtre kağıdından süzülerek 60°C kurutulmuş ve tartılmıştır. Her bir işlem iki kez tekrarlanmıştır. Biyokütleden ayrılan ortam sıvısı enzim aktivite tayininde kullanılmıştır.

## **İnce Tabaka Kromatografisi**

TLC plakaları genişliği 5cm ve boyu 6cm olacak şekilde kesildikten sonra örnekler silika üzerine kapiller yardımıyla yüklenmiştir. Örnekler plakalara yüklendikten sonra içinde çözünenin bulunduğu cam içine daldırılmış, çözünen sisteminde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar kurumaya bırakılarak UV altında incelenmiştir.

Reaksiyon için kullanılan koşullar şöyledir:

Reaksiyon Sıcaklığı : 60°C

Çözgen : %100 Saf etanol

Saflaştırılmış enzim için belirlenen spesifik aktivite değeri, katalaz ve fenol oksidaz için sırasıyla 3006 U/mg ve 0.559 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Ortam sıvısı için tayin edilen katalaz aktivite değeri 168 U/ml olarak belirlenmiştir

## **Protein Saflaştırma**

Saflaştırma çalışmaları AktaPrime (Amersham Biosciences) sisteminde iki basamaklı kromatografik yöntemle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak enzim anyon değişim kolonunda kısmi olarak saflaştırılıp, jel filtrasyon kolonunda tam olarak saflaştırılmıştır.

### **• Anyon Değişim**

Anyon değişim kromatografisi HiPrep 16/10 Q XL kolonu kullanılarak pH 8.0'de 4 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. 4 ml'lik fraksiyonlar toplanacak ve hem katalaz hem de fenol oksidaz aktiviteleri açısından incelenmiştir. Aktif fraksiyonlar konsantre edilerek jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir.

### **• Jel Filtrasyon**

Jel filtrasyon çalışmaları HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade kolonu ile pH 8.0'de 2 ml/dak akış hızında yapılmıştır. 4 ml'lik fraksiyonlar toplanarak hem katalaz hem de fenol

oksidaz aktiviteleri belirlenmiştir. Aktif fraksiyonlar ayrılarak konsantre edilmiş, saflaştırılan enzim, farklı fenolik maddelerin oksidasyonu deneylerinde kullanılmıştır.

### HPLC Analizleri

Oksidasyon süreci önce spektrofotometre yöntemi ile ölçülmüş, daha sonra da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ürün oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. HPLC için C18 ters fazlı kolon kullanılmıştır (Shimadzu SIL-20AHT/20ACHT). HPLC ölçümleri fenolik maddeler için 254nm de yapılmıştır. Fenolik maddelerin oksidasyonlarının analizi için iyon değişim kolonu ile saflaştırılmış KATFO kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 2ml 10mM fenolik madde, 2ml potasyum fosfat tampon çözelti (pH 7.0) ve 1 ml enzim (23U/ml) kullanılarak hazırlanmıştır. Çözücü sistemler A; 0.04% fosforik asit ve B was asetonitril, metanol and H<sub>2</sub>O (52:37:11) dan oluşmaktadır. Elüsyon zamana bağlı olarak çözücü sistem oranları değiştirilerek yapılmıştır.

Zamana bağlı çözücü sistem konsantrasyon değişimi:

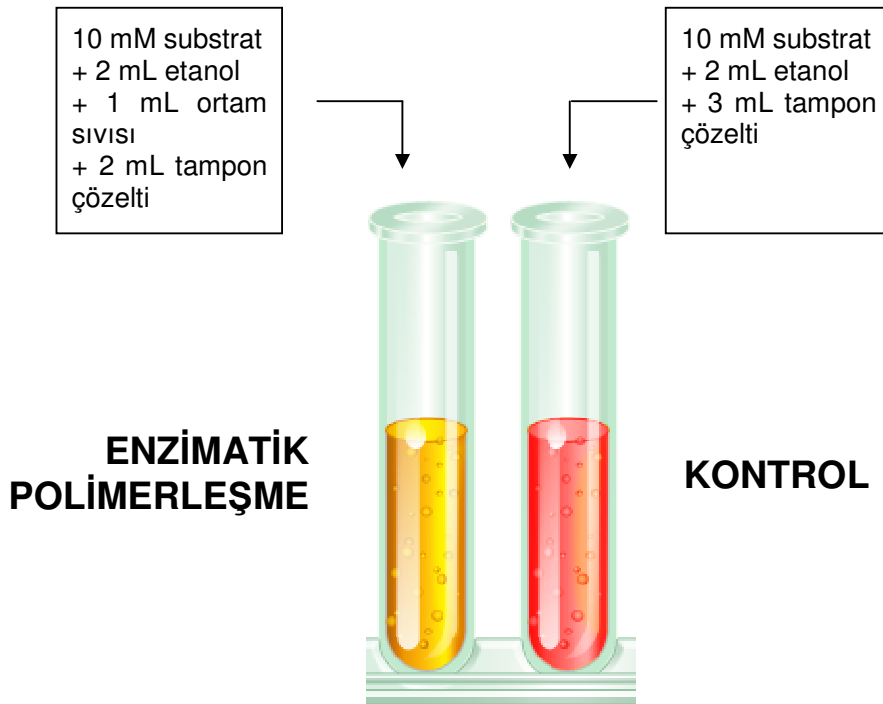
Zaman	Çözücü sistem B'nin
0.1 dk	0%
2 dk	0%
5 dk	12%
7 dk	12%
10 dk	18%
15 dk	18%
17 dk	35%
20 dk	50%
22 dk	50%
25 dk	20%
26 dk	0 %
28 dk	BİTİŞ

## FTIR Analizleri

FTIR için örnek hazırlama

### 1- Reaksiyon kurma

Reaksiyon karışımı substrat + çözücü + ortam sıvısı ile hazırlanır. 60°C'de, pH=7.0'de 5 gün süreyle çökelti oluşumuna bırakılır.



### 2- Çözücüyü ve suyu uzaklaştırma

Çökelti +4°C'de 1 gece bekletilir, böylece çökme işlemi tamamlanır. Santrifüjleme ile de çöktürme tamamlanır. Katı çökelti dışındaki üst faz dökülür. Çökelti 2 mL suda çözündürülür. Çökenler arasında maddenin kendisi varsa uzaklaştırmak için. Tekrar santrifüjlendikten sonra, sıvısı atılır.



### 3- Kurutma

Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kalan çökelti 45 °C'de tüpün ağzı açık şekilde 3 gün kurutulur.

### 4- KBr pelet hazırlama

0,2 g KBr ile 1 mg örnek havanda incecik bir toz elde edilene kadar dövülür. Basınçla preslenerek tablet haline getirilir. KBr görünür bölge dışında kaldığından alınan spektrum sadece numuneye aittir.

### 5- FTIR spektrumu

Bruker Equinox 55 marka FTIR cihazı kullanılarak KBr pelet hazırlanmış örnekler 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında transmittans olarak spektrumları alındı.

### **LC-MS Analizleri**

Kütle spektrometri analizleri, negatif iyonizasyon ile işleyen Atmosferik Basınç İyonizasyon Elektrospray (API-ES) ile donatılmış AGILENT 1100 MSD cihazında yapılmıştır. ESI için iyonizasyon voltajı 4kV, kapillari sıcaklığı 350 °C, gaz akışı 10 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Bu çalışmalar TÜBİTAK-ATAL'da gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### ***Scytalidium thermophilum*'un çeşitli fenolik maddeler varlığında büyütülmesi biyokütlenin katalaz ve fenol oksidaz üretiminin belirlenmesi**

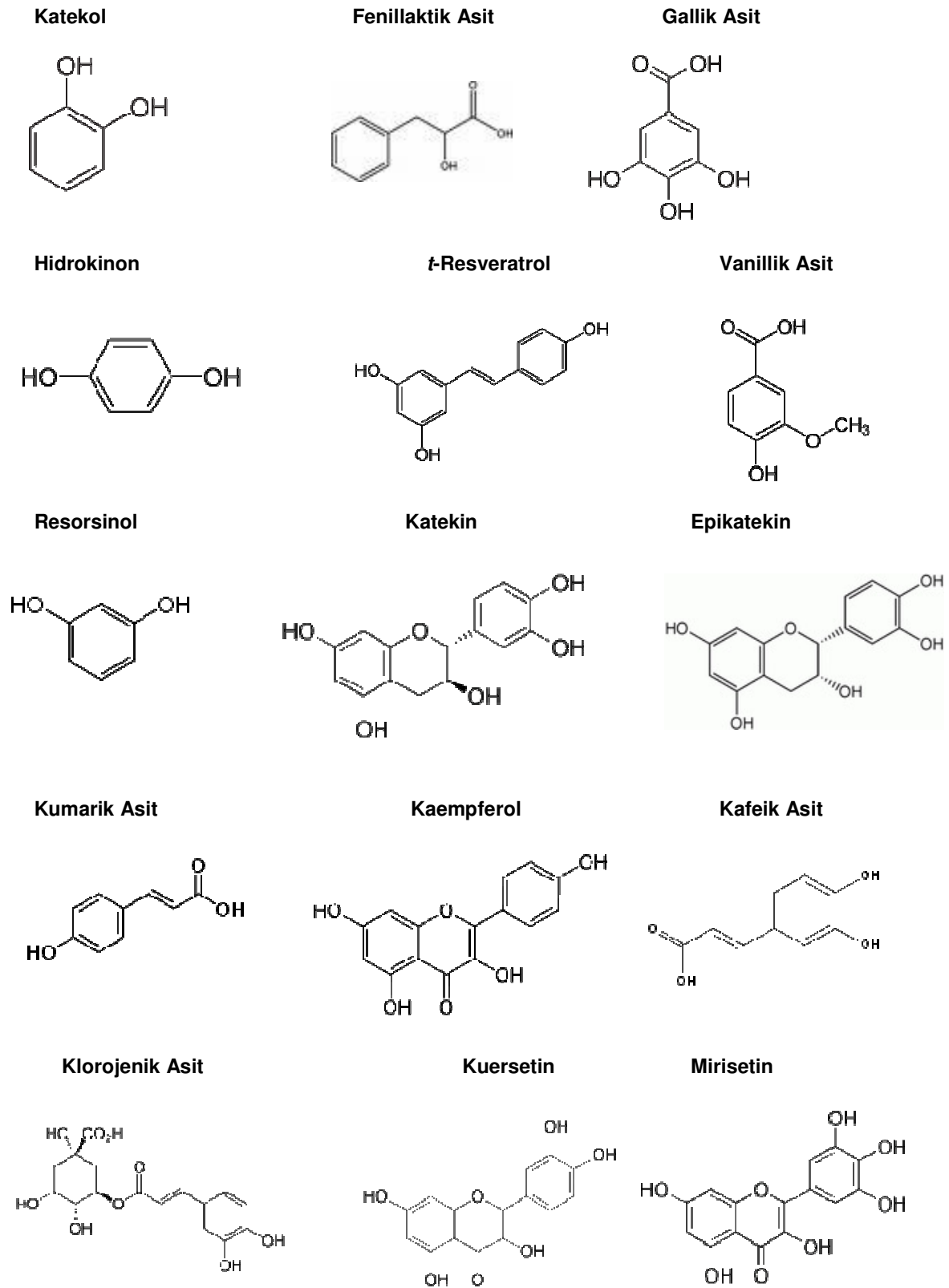
Çalışmada kullanılan fenolik maddeler fonksiyonel ve kimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir (Tablo 1). Buna göre 15 farklı fenolik madde, ön-çalışma ile belirlenen, 5 ayrı derişimde *S. thermophilum*'un büyüme ortamına eklenerek mantar büyümesinin nasıl etkilendiği ve bu fenolik maddeler varlığında ortam sıvısındaki katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinin nasıl değiştiği belirlenmiştir.

Katalaz'ın mezofilik canlılarda ısı şoku ile arttığı bilinmektedir. Bu nedenle, katalaz üretiminin *S. thermophilum*'da büyüme sıcaklığından nasıl etkilendiği ön-çalışmalarla belirlenmiştir. Buna göre, daha düşük sıcaklıklar da dahil, optimum büyüme sıcaklığından sapma olduğunda, biyokütle başına katalaz üretimi artmaktadır. Buna göre, termofilik mantarlarda ısı şoku optimum büyüme sıcaklığından sapma olarak ortaya çıkmaktadır. Bu projede amacın fenoliklerin etkisinin incelenmesi olması nedeni ile katalaz üretiminin sıcaklık faktöründen en az etkileneceği optimum büyüme sıcaklığı seçilmiştir. Seçilen 5 ayrı derişim de yine ön-çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmalarda *S. thermophilum*'un agar ortamında ve sıvı ortamda en fazla hangi derişime kadar büyüebildiği saptanmıştır. Proje kapsamında, *S. thermophilum*, fenolik maddelerin farklı derişimlerinde 5 gün süre ile büyütülmüş ve 4. ve 5. günlerden alınan örneklerde analizler gerçekleştirilmiştir. Buna karşılık, 4. ve 5. gün arasında trend açısından önemli bir fark görülmediğinden dolayı burada sadece 5. gün sonuçları sunulmuştur.

Sonuçlar her fenolik madde için ayrı olarak ele alınmıştır. Elde edilen veriler biyokütle tayini (mg/ml), katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri (U/ml), katalaz ve fenol oksidaz üretimleridir (U/mg biyokütle). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede tek-yönlü ANOVA ve %95 güvenilirlik derecesi ( $p=0.05$ ) kullanılmıştır.

KATFO'nun çift aktiviteli olması sebebi ile aktivitedeki artış veya azalışlarda paralellik göstermesi beklenebilir, ancak bu iki aktivite ayrı aktif bölgelerde gerçekleşiyor olabileceği gibi aynı bölgede de olabilirler. Sonuçlara göre, genel olarak, aktiviteler, istisnalar haricinde oldukça paralellik göstermiştir. Henüz yayınlanmamış ve, bu proje kapsamı dışındaki mutasyonel çalışmalara göre, her iki aktivite de enzimin 'hem *d*' merkezinde gerçekleşmektedir. Bu da bizim bulgularımızı desteklemektedir.

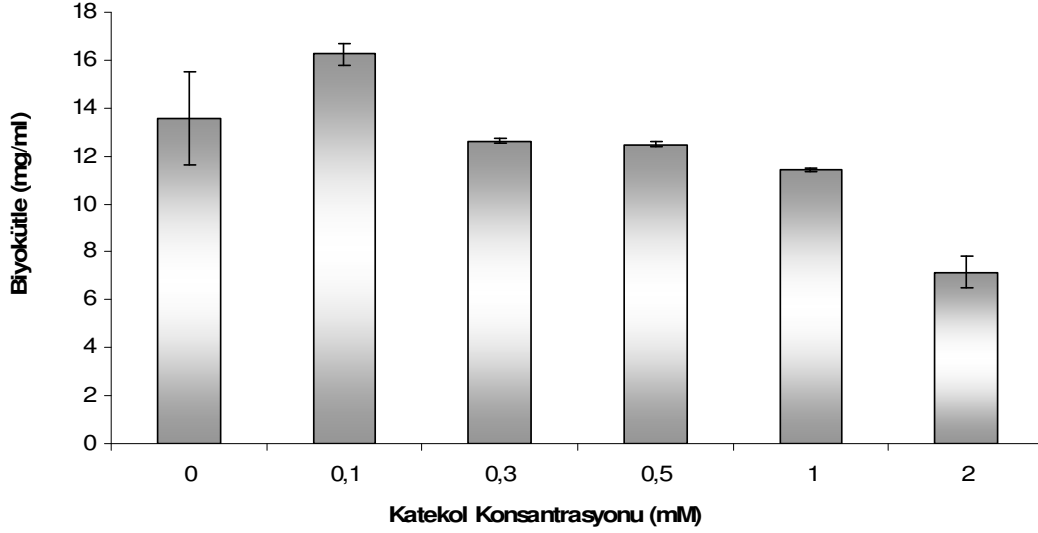
**Tablo 1** Projede denenen fenolik maddelerin kimyasal yapıları



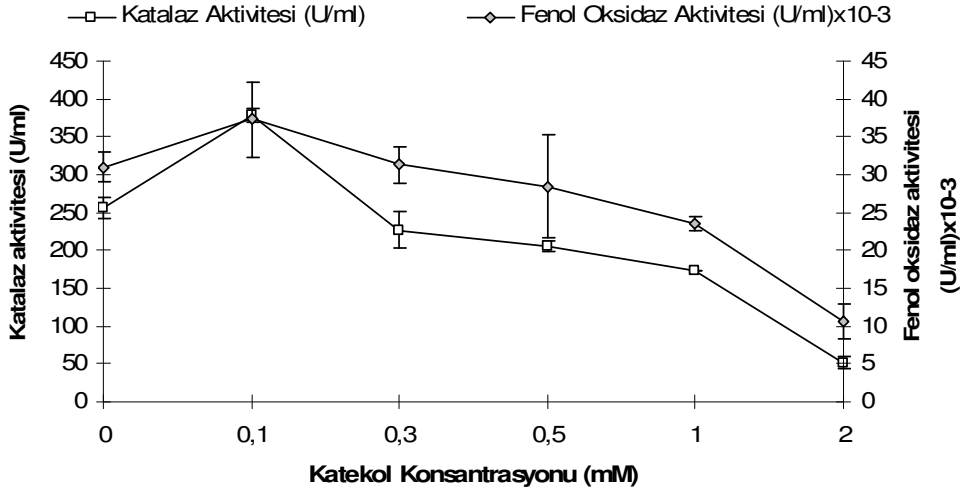
## Difenolik Bileşikler

Difenolik bileşikler olarak katekol (*o*-difenol), hidrokinon (*p*-difenol) ve resorsinol (*m*-difenol) seçilmiştir. Bu maddelerin tümünde seçilen 5 farklı derişim 0.1, 0.3, 0.5, 1 ve 2 mM olmuştur.

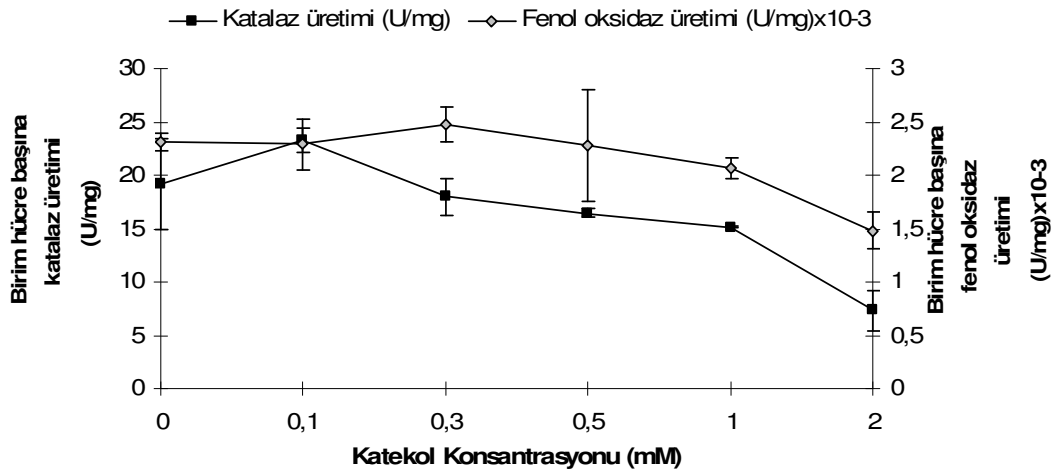
### Katekol



Şekil 1. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin katekol dozuna göre değişimi



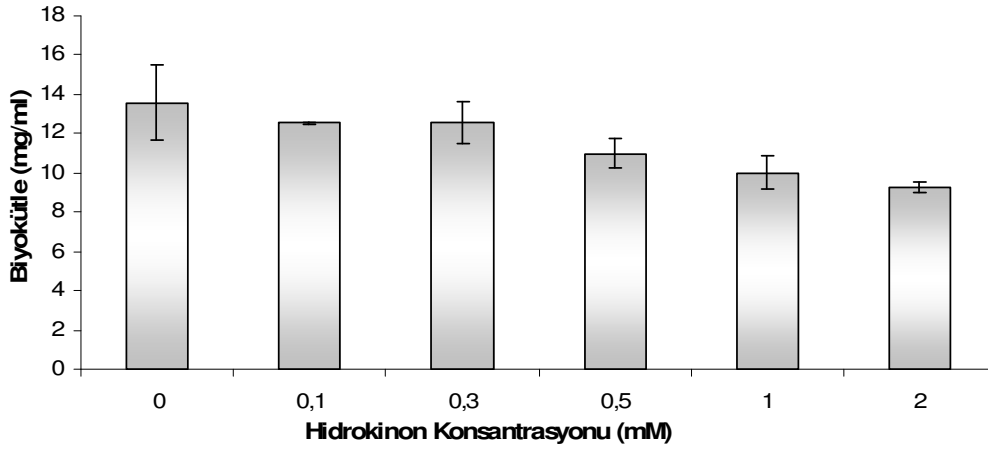
Şekil 2. Katekolün farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



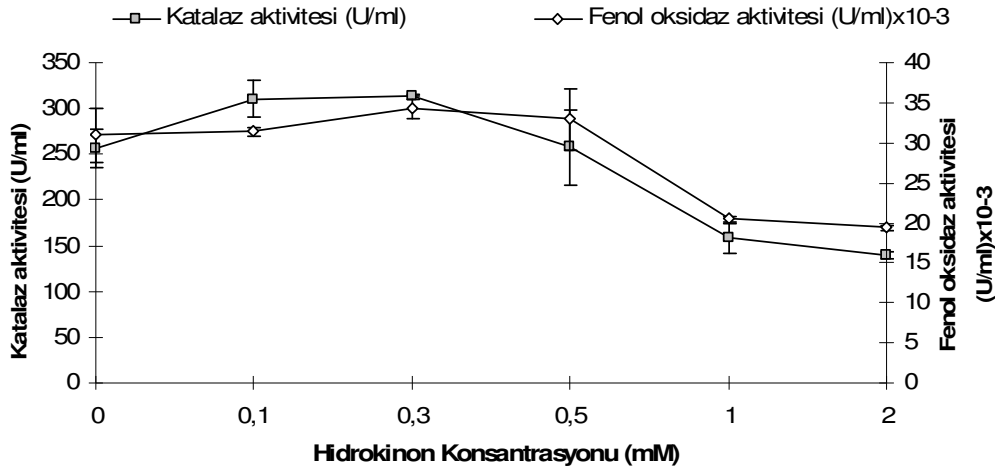
**Şekil 3.** Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Katekol'ün katalaz ve fenol oksidaz aktivitesi üzerine olan etkisi birbiriyle paralellik göstermiştir. Buna göre, 0.1 mM derişimde katekolün, büyüme ortamına eklenmesi biyokütle, katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde, olası antioksidan etki ile, artışa neden olurken, bu derişimin üzerinde büyüme ve enzim üretiminin, olası toksik etki ile, baskılandığı gözlenmiştir. Katekol'ün yüksek miktarlarda (1-2 mM) mantar büyümesini olumsuz yönde etkilemesinin istatistiksel analiz neticesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Kontrole göre büyümedeki düşüş 2 mM da %47, enzim üretimindeki düşüş ise %63 olarak saptanmıştır.

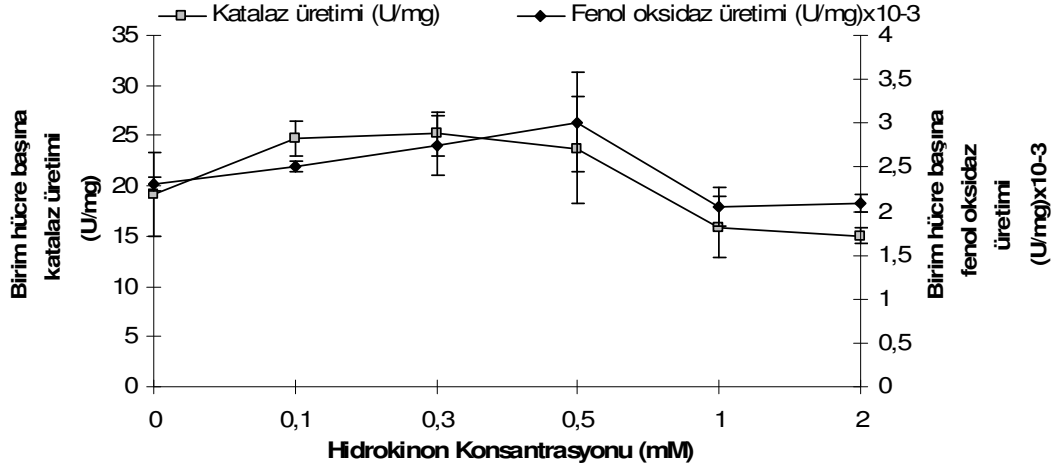
### Hidrokinon



**Şekil 4.** *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin hidrokinon dozuna göre değişimi



**Şekil 5.** Hidrokinonun farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

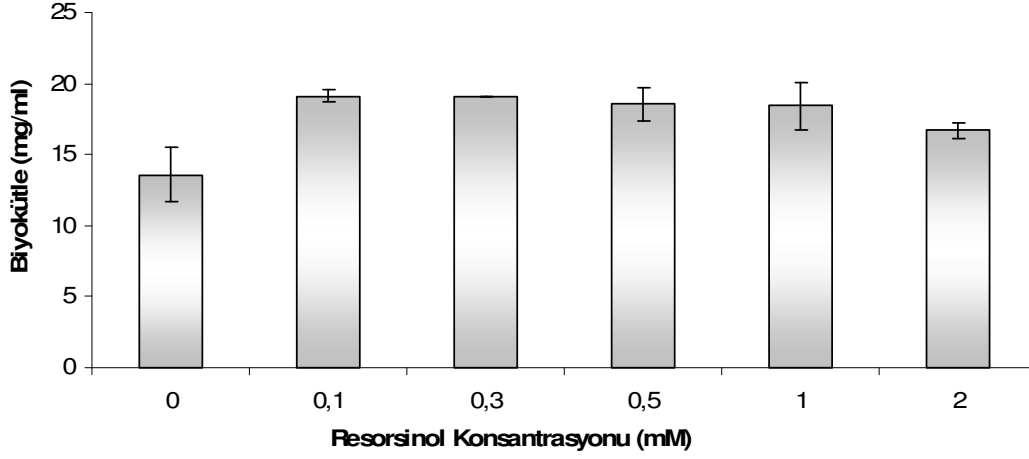


**Şekil 6.** Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

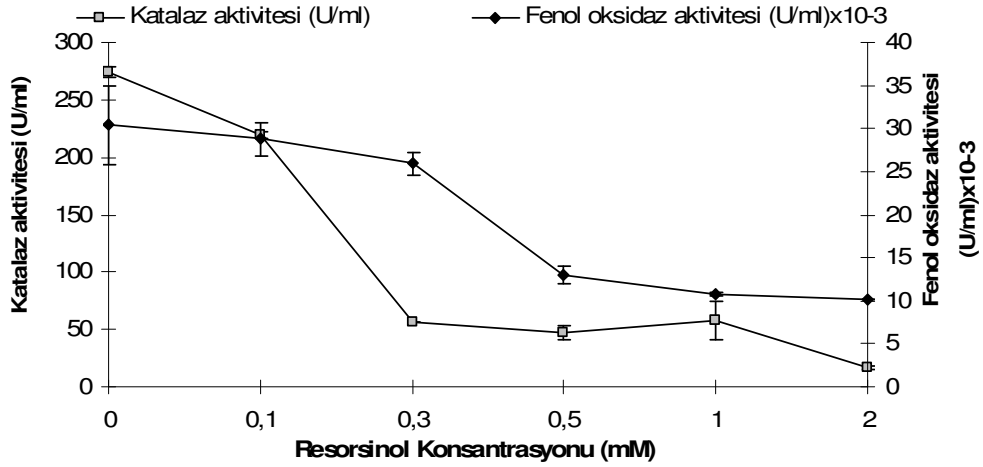
Büyüme ortamına hidrokinon eklenmesi mantarın büyümesini, aşamalı olarak, olumsuz yönde etkilemiştir. Katekolle karşılaştırınca, düşük derişimlerdeki (0.1 mM) olumlu etkiye hidrokinonda rastlanmamıştır. Özellikle 1-2 mM derişimde mantarın büyümesi önemli derecede baskılanmıştır. Her iki aktivitede yine paralellik gözlenmiş, KATFO üretiminde istatistiksel olarak önemli görünmemekle beraber, 0.5 mM'a kadar olan dozlarda %30 luk bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre, hidrokinonun antifungal etkiye sahip olduğu söylenebilir. Düşük dozlarda (0.5 mM'a kadar) biyokütlerde önemli bir düşüşün görülmemesi, KATFO üretimindeki artışla paralellik göstermektedir. Bu da KATFO üretimindeki artışın, düşük dozlarda, hidrokinonun de-toksifikasyonuna katkıda bulunmuş olabileceğine işaret

etmektedir. Nitekim, bulgularımıza göre, KATFO hidrokinonu okside ederek polimerleşmesini sağlayabilmektedir.

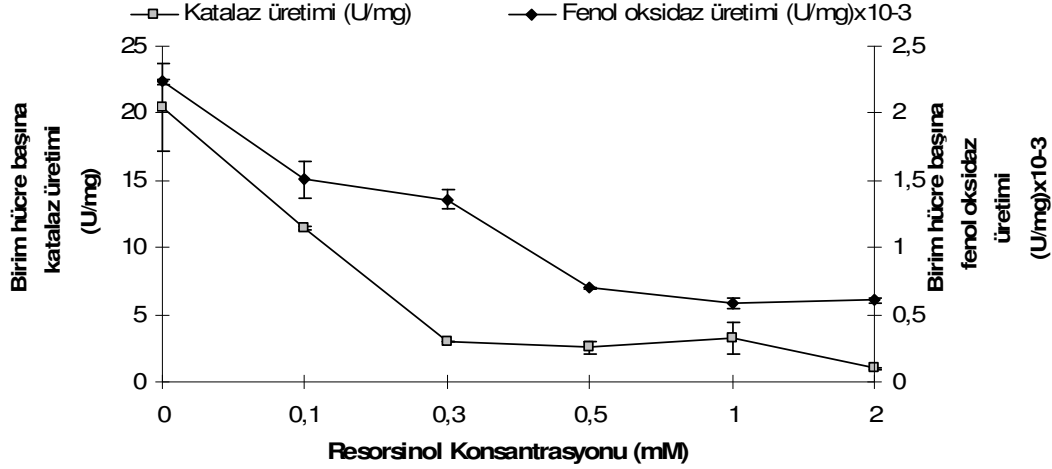
### Resorsinol



Şekil 7. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin resorsinol dozuna göre değişimi



Şekil 8. Resorsinol'ün farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri



**Şekil 9.** Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Kullanılan derişimlerde, resorsinol'ün mantar üzerine, katekol ve hidrokinonun tersine, herhangi bir antifungal/toksik etkisi tespit edilmemiştir. Hatta mantar büyümesi %41 oranında, istatistiksel olarak önemli derecede olumlu yönde etkilenmiştir. Buna karşılık, derişim arttıkça katalaz ve fenol oksidaz aktivite ve üretimlerinde belirgin derecede baskılanma görülmüştür (sırası ile %95 ve %75). Resorsinol'ün literatürde fenol oksidazları inhibe edebildiği belirtilmektedir. Ancak KATFO bir katalazdır ve diğer fenol oksidazlardan yapısal olarak önemli farklara sahiptir. Ayrıca, her iki aktivitede de önemli bir düşüş görülmesi, hatta katalazın daha fazla baskılanması bunun bir inhibisyon olma ihtimalini azaltmaktadır. Buna karşılık, ileride, saf enzimle resorsinol varlığında enzimin inhibisyonu çalışmaları yapılarak daha kesin bir yargıya varılabilir.

Bazı fenol oksidazların savunma amaçlı üretildiği bilinmektedir. Sonuçlarımıza göre, burada tam tersi bir durum söz konusu olabilir, yani, daha sağlıklı bir gelişme enzime olan gereksinimi azaltıyor olabilir. Termofilik mantarların ısı şokuna adapte olmuş mezofiliklerden türediği belirtilmektedir (Feofilova ve Tereshina 1999). Yüksek sıcaklıklar sürekli ortamda serbest radikal oluşumuna sebep olduğu için, termofilik mantarların, bu şartlara, sürekli antioksidan enzim ve kimyasalları üreterek dayanabildikleri de ifade edilmektedir (Feofilova ve Tereshina 1999). Bu durumda, ortama ilave edilen bir maddenin, antioksidan etki göstermesi halinde, mantarın antioksidan maddeleri üretme gereksinimi azalacağından dolayı, mevcut enerjisini büyümeye aktarabileceği ve antioksidan enzim ve kimyasallara daha az gereksinim duyabileceği iddia edilebilir. Bu durumda, resorsinol'ün, katekol ve hidrokinon'a oranla, *S. thermophilum* büyümesini önemli ölçüde olumlu etkileyerek, mantar

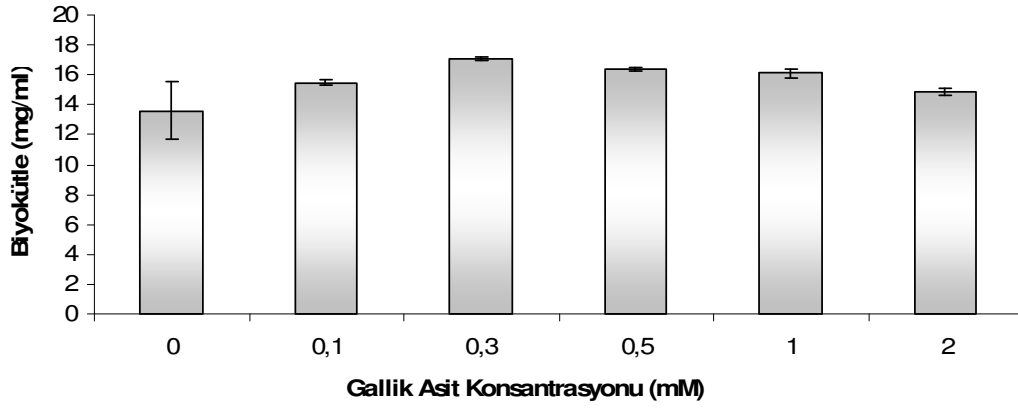


için daha etkili bir antioksidan olduğu iddia edilebilir. Tabii, bu olasılıkların deneysel verilerle test edilmesi gerekmektedir.

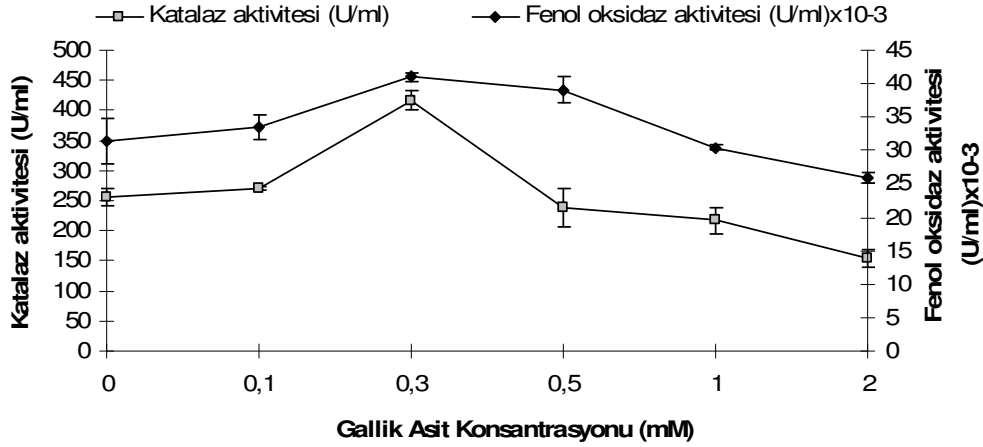
## Fenolik Asit Türevleri

### Hidroksibenzoik asit türevleri

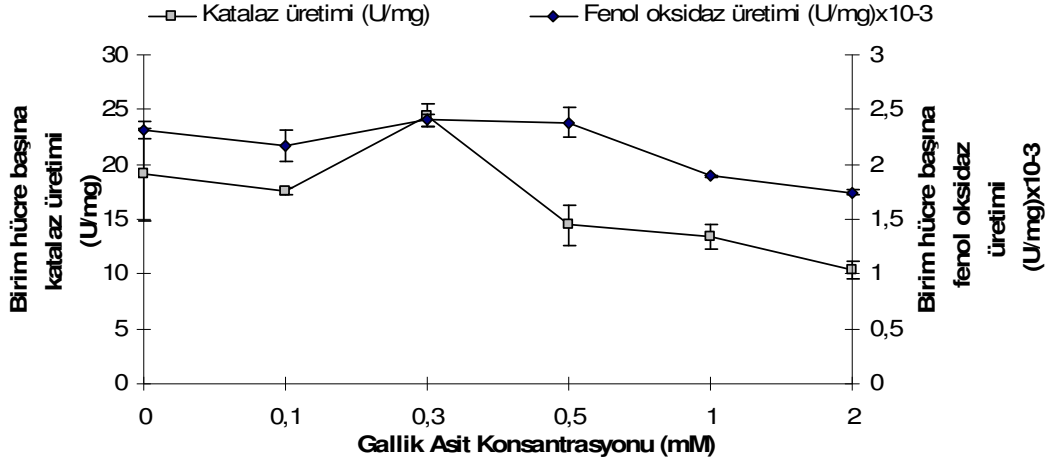
#### Gallik Asit



Şekil 10. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin gallik asit dozuna göre değişimi



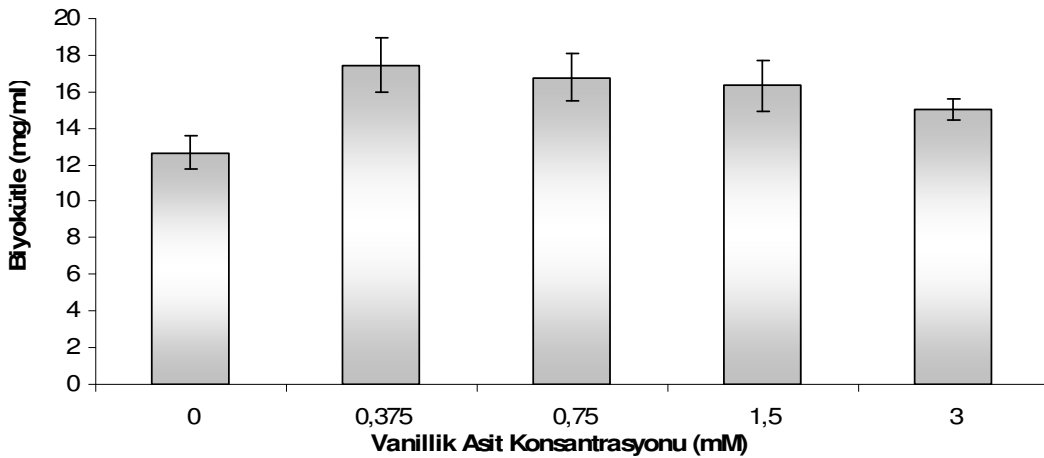
Şekil 11. Gallik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri



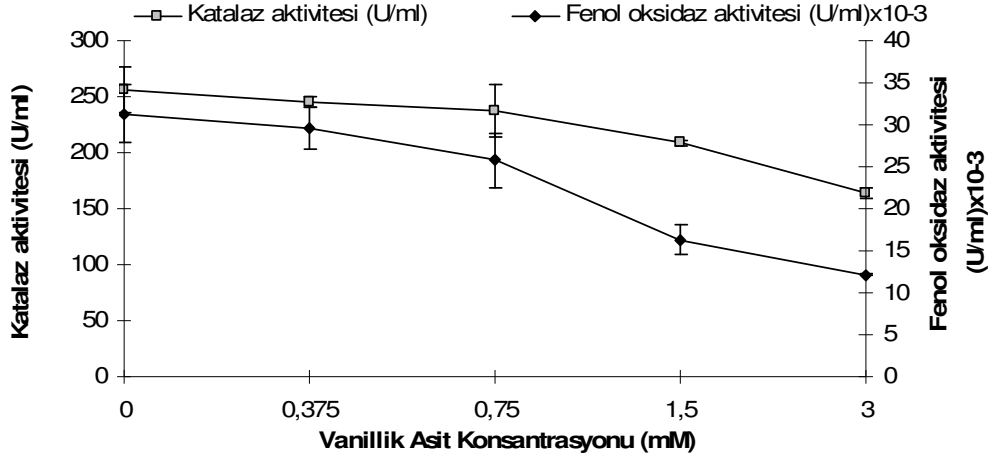
Şekil 12. Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Daha önce difenolik bileşiklerde olduğu gibi, gallik asitin (GA) ortamdaki derişimi 0.1 - 2 mM arasında olmuştur. Elde edilen bulgulara göre, gallik asitin bir antifungal etkisi görülmediği gibi, bilakis, *S. thermophilum*'un büyümesini olumlu yönde (%26) etkilediği görülmüştür. Bu etkisi resorsinolle benzerlik göstermektedir. GA, katalaz ve fenol oksidaz üretimini 0.3 mM a kadar önemli ölçüde etkilemezken, biyokütle başına düşen üretim 0.3 mM dan sonra belirgin bir düşüş göstermiştir. İstatistiksel olarak biyokütledeki artış ve KATFO'daki azalış önemli bulunmuştur. Bu bulgular da resorsinolle paralellik göstermektedir. Buna göre, gallik asitin de antioksidan etki gösterdiği söylenebilir.

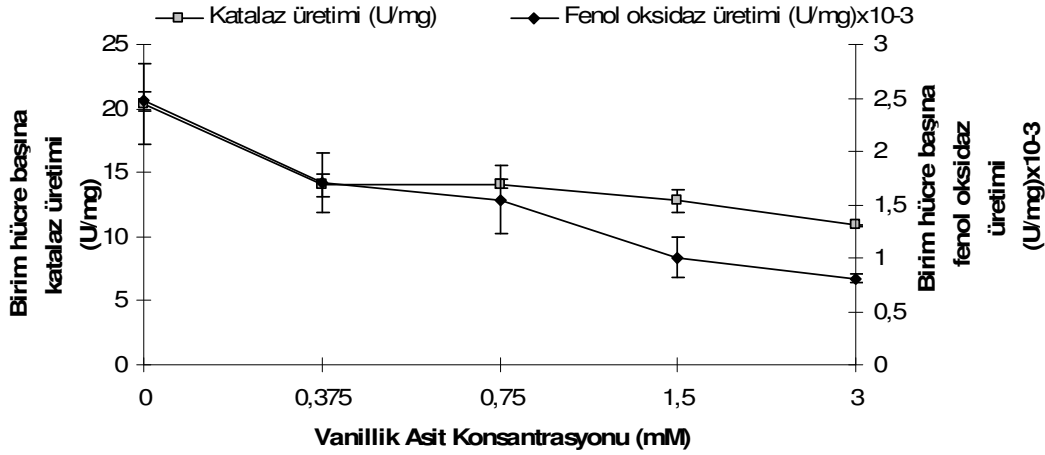
### Vanillik Asit



Şekil 13. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin vanillik asitin dozuna göre değişimi



Şekil 14. Vanillik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri

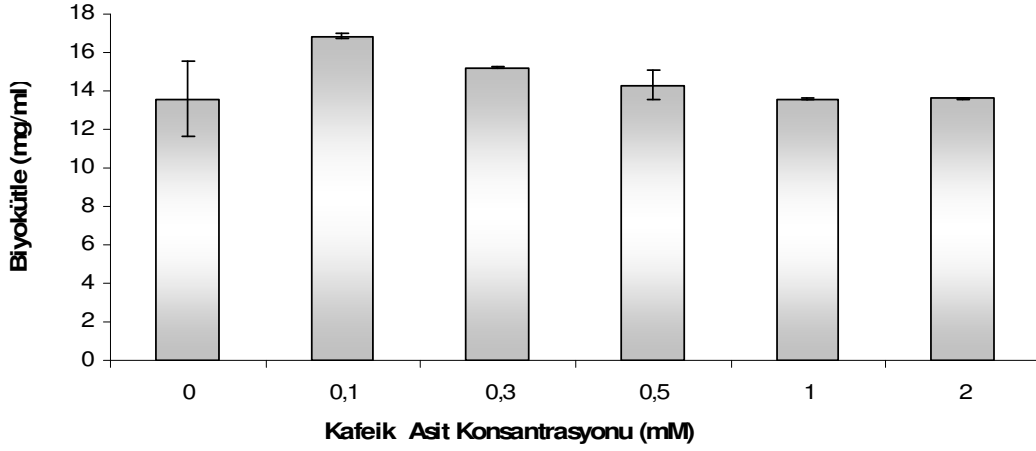


Şekil 15. Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

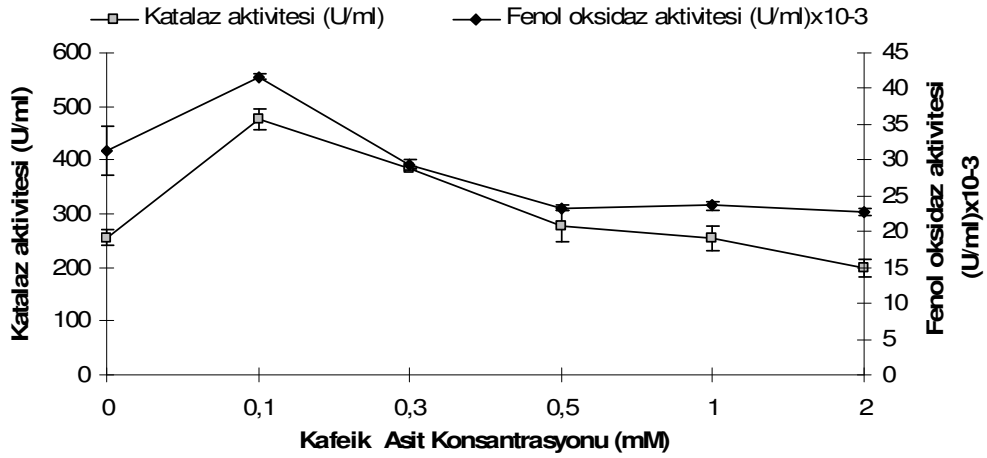
Vanillik asitin (VA) antifungal özelliğe sahip olmadığı, gallik asit ve resorsinole benzer şekilde, mantarın büyümesini olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Özellikle 0.375 mM derişimde VA varlığında biyokütlede önemli bir artış olmuştur. En yüksek (3mM) derişimde dahi biyokütle kontrole oranla daha yüksek olmuştur. Diğer yandan, VA derişiminin artışı ile katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde belirgin bir düşüş olduğu görülmektedir. KATFO üretiminde gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna göre, VA de gallik asit ve resorsinol gibi, kullanılan derişimlerde, antioksidan etki göstermiştir.

## Hidroksisinnamik asit türevleri

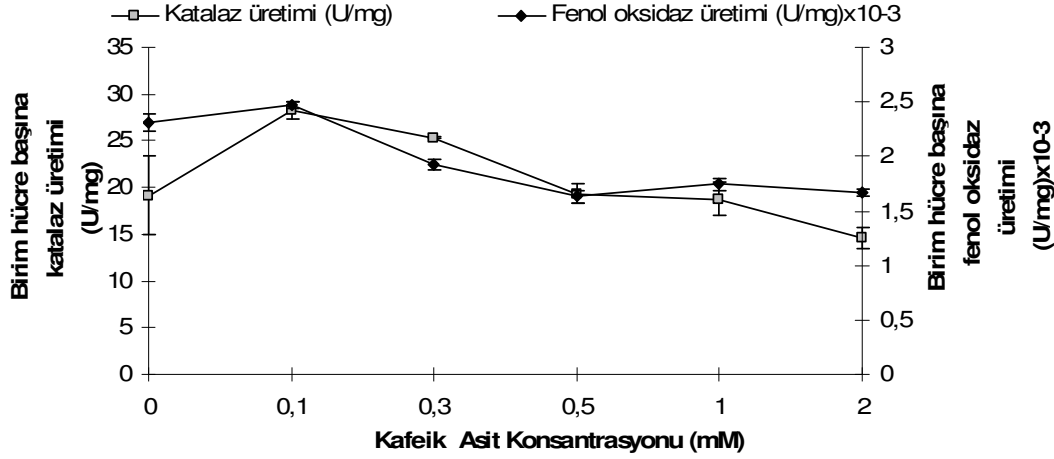
### Kafeik Asit



Şekil 16. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin kafeik asit dozuna göre değişimi



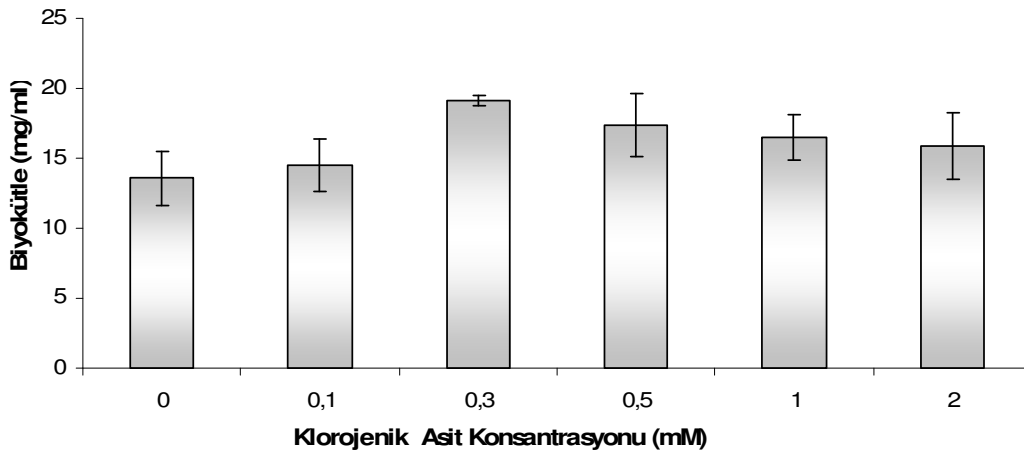
Şekil 17. Kafeik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri



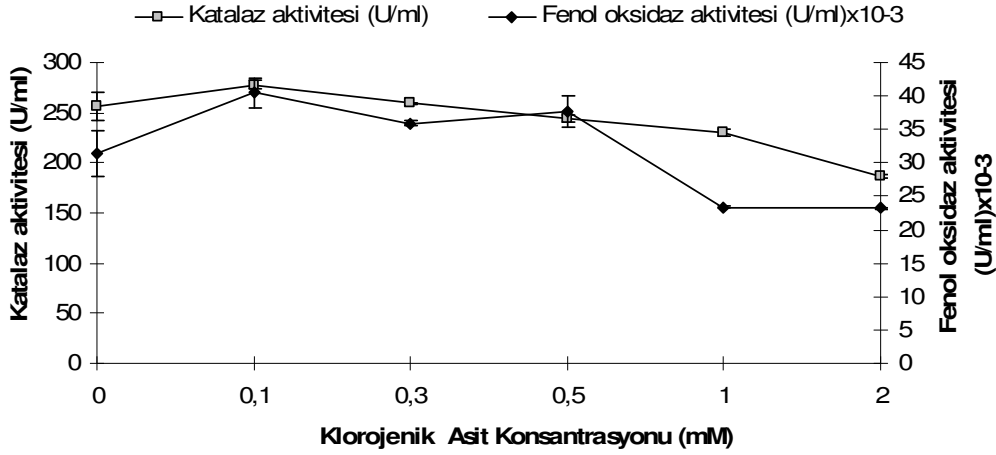
**Şekil 18.** Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Kafeik asit (KA) daha önce resorsinol, gallik asit ve kafeik asitte de gözleendiği gibi, mantar gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. Katalaz ve fenol oksidaz üretiminde ise başlangıçta hafif bir artışın ardından 0.1 mM ın üzerinde belirgin bir düşüş gözlenmektedir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre biyokütlede meydana gelen artış önemli bulunurken, fenol oksidaz aktivitesindeki artış (%7) ve azalış önemli bulunmamıştır. Buna karşılık, istatistiksel anlamda önemli olmamakla beraber, fenol oksidaz aktivitesinde kontrole oranla yaklaşık %28 lik bir azalma meydana gelmiştir. Buna göre, kafeik asitin de antioksidan etki gösterdiği ve, özellikle, gallik asite benzer bir eğilim ortaya koyduğu söylenebilir.

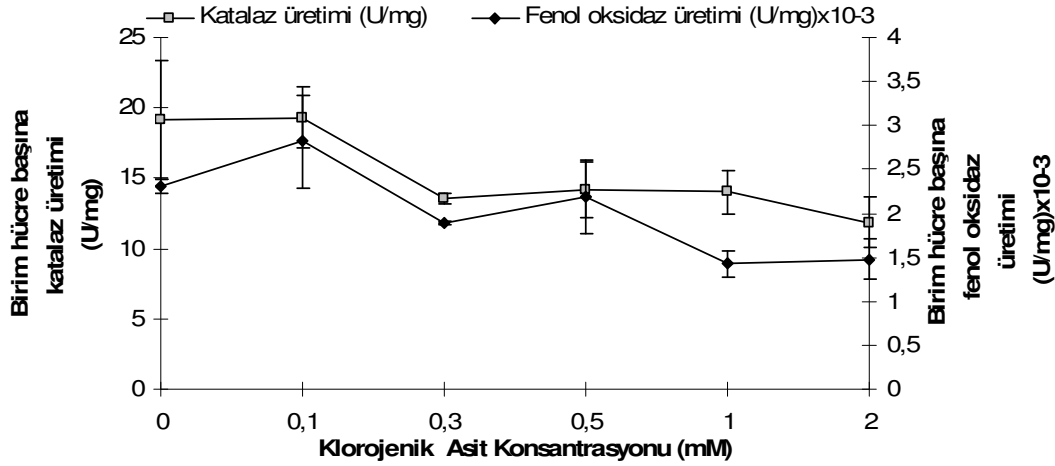
### Klorojenik Asit



**Şekil 19.** *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin klorojenik asit dozuna göre değişimi



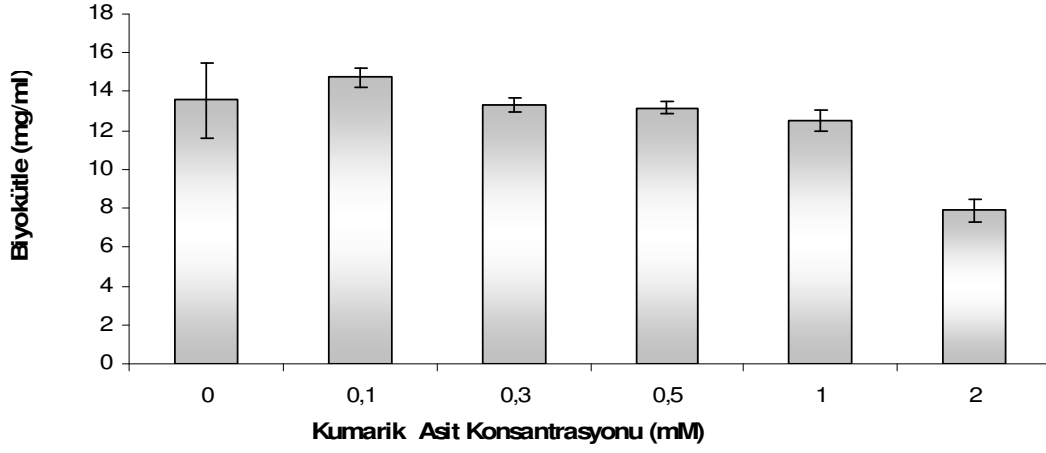
Şekil 20. Klorojenik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri



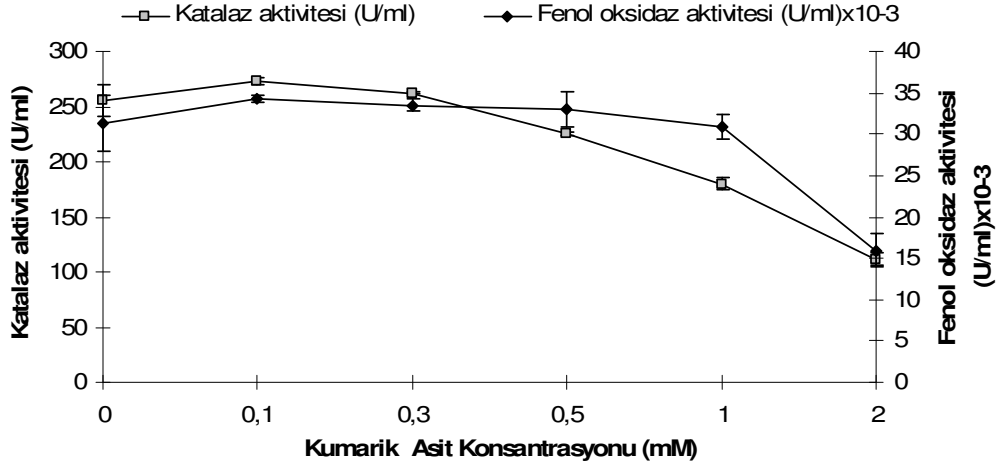
Şekil 21. Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Klorojenik asidin (KLA) mantar büyümesini olumlu yönde etkilediği Şekil 19'da görülmektedir. Diğer yandan, katalaz ve fenol oksidaz üretiminde özellikle 0,1 mM sonrasında düşüş görülmektedir. KLA varlığında meydana gelen biyokütle artışı istatistiksel olarak önemli bulunmuş, ancak KATFO üretimindeki artış ve azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Deneysel verilere göre, enzimdeki artış fenol oksidazda %22 ye ulaşırken, azalış %36 olarak belirlenmiştir. Buna göre, KLA'in etkisi daha önce tartışılan gallik asit ve kafeik asitin etkisine benzemektedir.

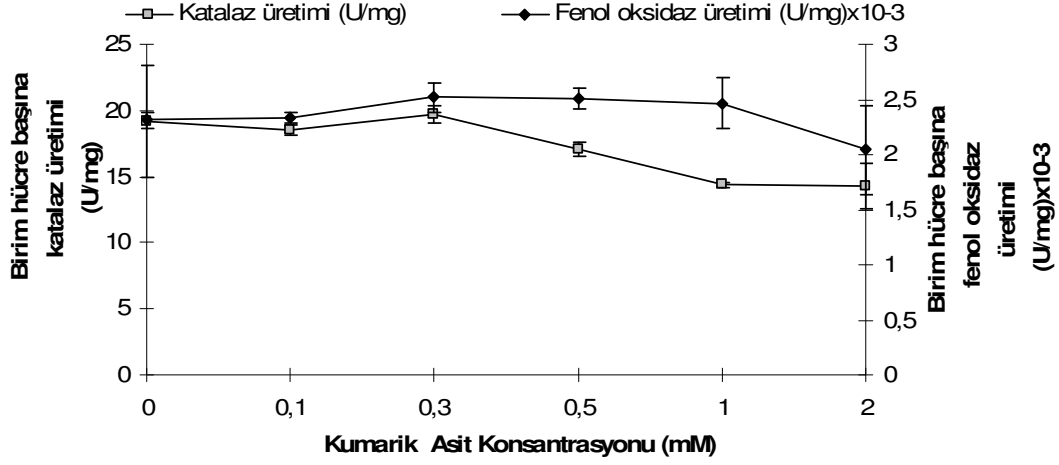
## Kumarik Asit



Şekil 22. *S. thermophilum*'un 5. gündeki biyokütlesinin kumarik asit dozuna göre değişimi



Şekil 23. Kumarik asitin farklı derişimlerinde tayin edilen katalaz/fenol oksidaz aktiviteleri



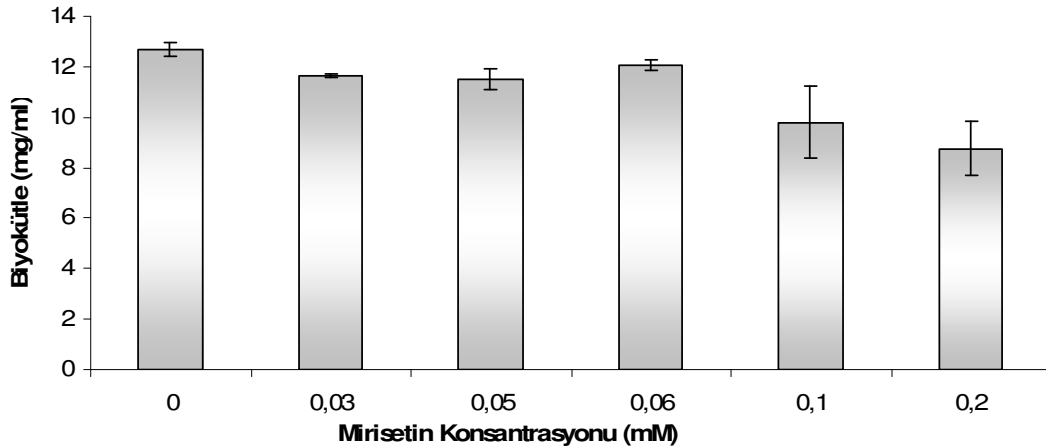
Şekil 24. Farklı derişimlerde tayin edilen KATFO üretimi

Kumarik asit (KUA) sadece 2 mM da olası toksik bir etki göstermiştir (Şekil 22). Bunun altındaki derişimler büyümeyi olumsuz etkilememiştir. Aynı şekilde, katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerin de de 2 mM da düşüş görülmektedir. Diğer yandan, bu düşüş, biyokütlerdeki düşüşe paralel olması bakımından, üretimdeki azalmaya yansımamıştır (Şekil 24).

## Flavonoidler

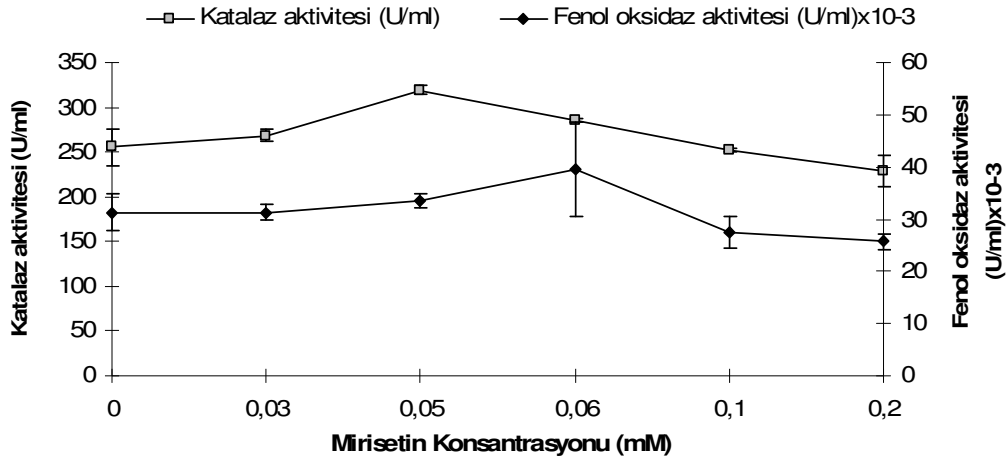
### Flavonoller

#### Mirisetin

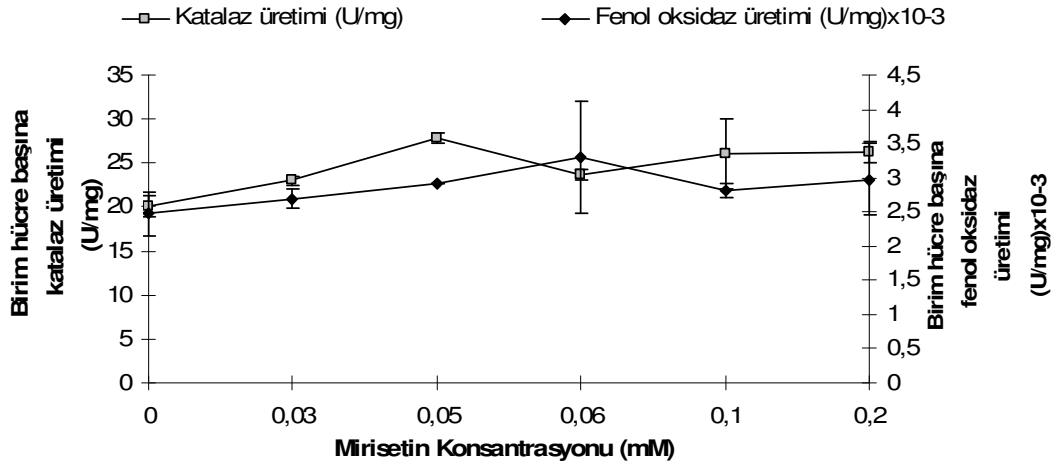


Şekil 25. Mirisetin varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim





Şekil 26. Mirisetin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

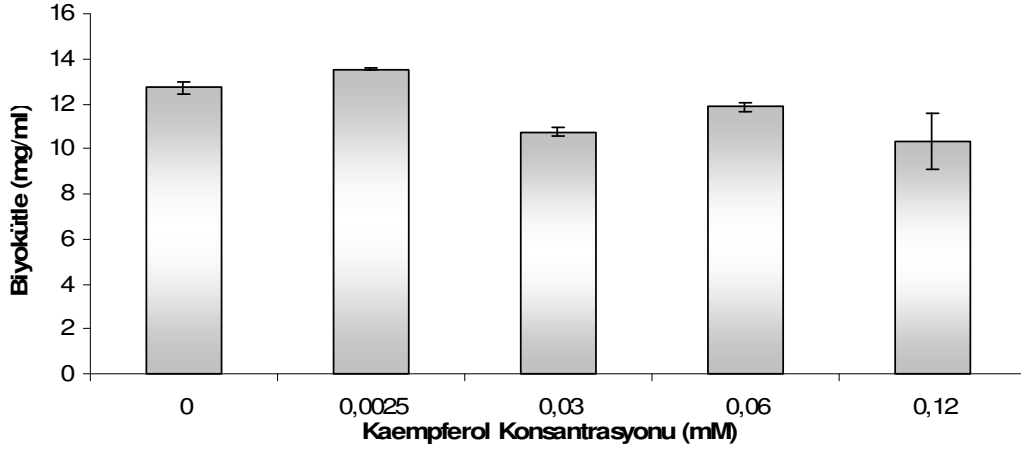


Şekil 27. Mirisetin varlığında birim biyokütle başına katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

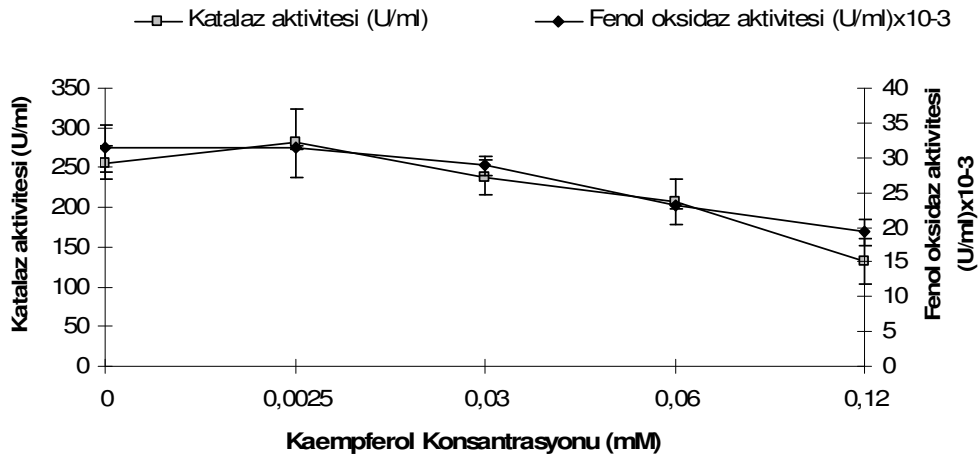
Şekil 25'de görüldüğü gibi mirisetin özellikle 0.06 mM derişimden sonra antifungal etki göstermiştir. Mantar büyümesindeki azalış (%36) önemli bulunmuştur. Diğer yandan, KATFO üretiminde artış görülmüş (KAT- %49, FO- %43) ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Mirisetin varlığında, hem katalaz hem de fenol oksidaz aktivitelerinde ulaşılan maksimum

değerler, tüm fenolik maddeler arasında ulaşılan en yüksek aktiviteler içinde yer almıştır. Buna göre, mirisetinin, hidrokinona benzer şekilde, antifungal etki gösterdiği ve enzim üretimini tetiklediği söylenebilir.

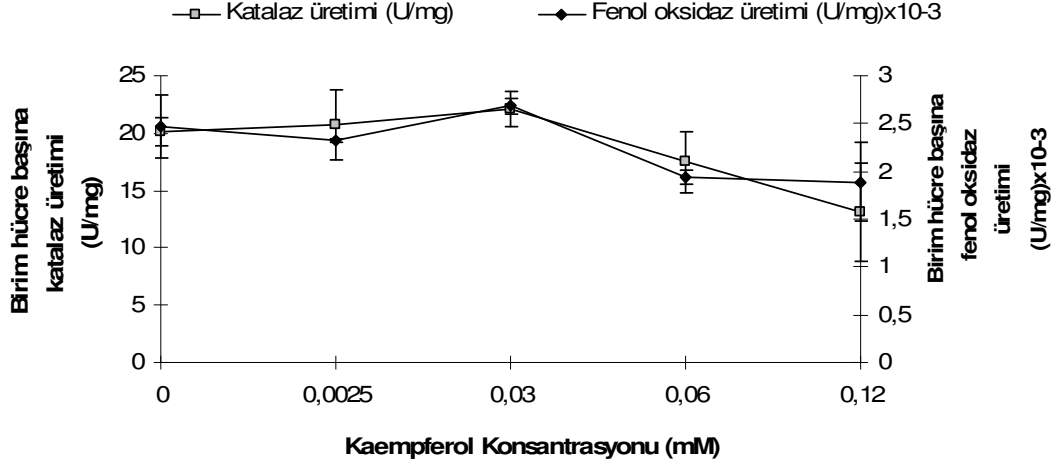
### Kaempferol



Şekil 28. Kaempferol varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim



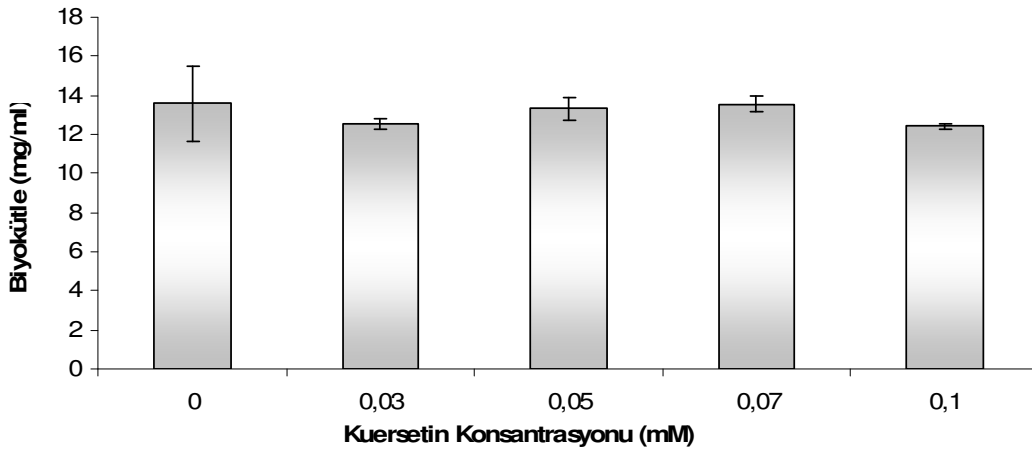
Şekil 29. Kaempferol varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



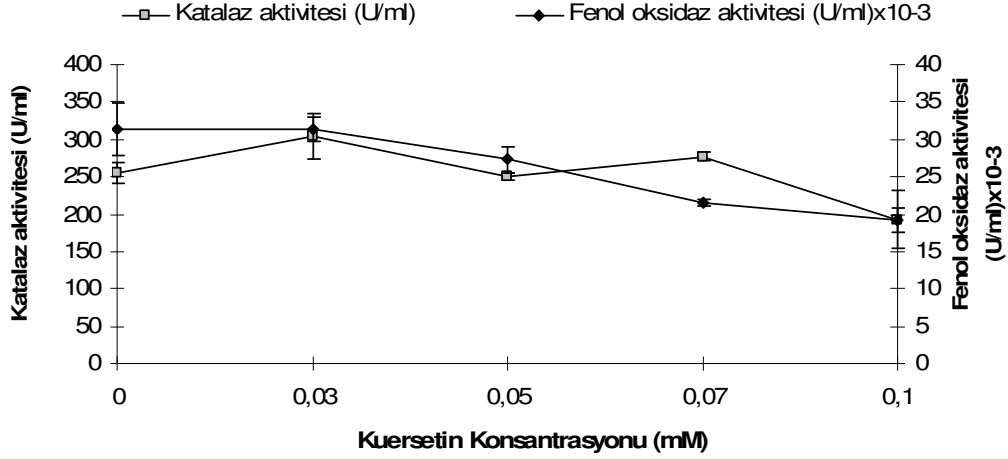
**Şekil 30.** Kaempferol varlığında birim kütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Kaempferol 0.12 mM derişimin üzerinde büyümeyi engellemiştir. Elde edilen sonuçlara göre, katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde önce artış ve antifungal özelliğın belirginleştiğı aşamalarda (>0.03 mM) bir azalış görülmüştür. Mirisetinden farklı olarak kaempferol'de görülen KATFO aktivitelerindeki artış önemli boyutta olmamış, azalış ise daha belirgin olmuştur. Bu da kaempferol'ün olası toksik etkisinden kaynaklanmış olabilir. Kaempferol'ün etkisi mirisetinden ziyade katekolü anımsatmıştır.

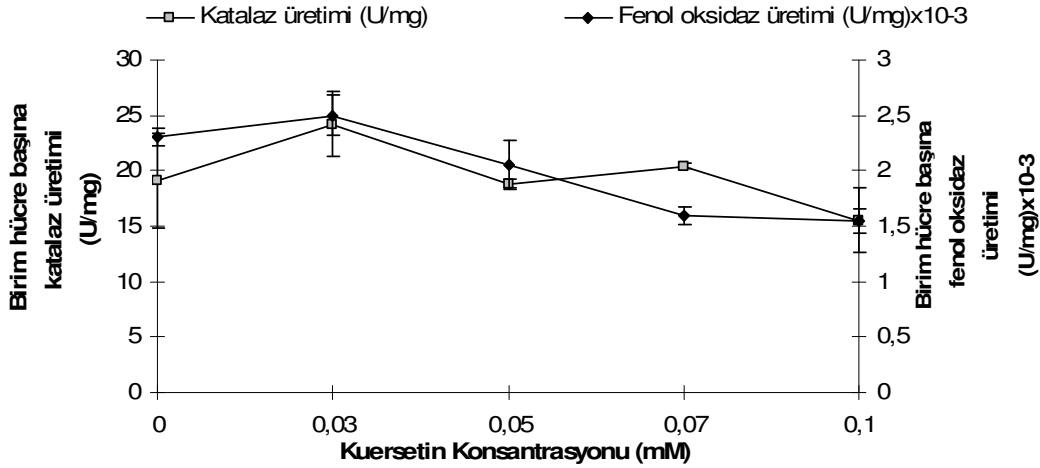
### Kuersetin



**Şekil 31.** Kuersetin varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değışim



**Şekil 32.** Kuersetin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



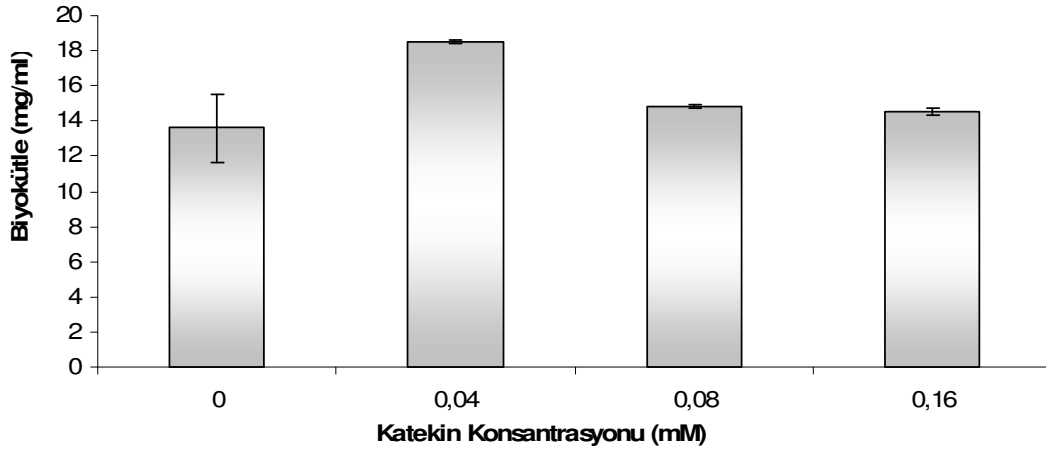
**Şekil 33.** Kuersetin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Kuersetinin *S. thermophilum*'un büyümesi ve KATFO aktiviteleri üzerine etkisi kaempferole benzerlik göstermiştir, yani KATFO'da ilk başta bir artış ve ardından (>0.03 mM) belirgin bir azalış meydana gelmiştir. Ancak, gerek biyokütledeki değişim, gerekse enzimdeki değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

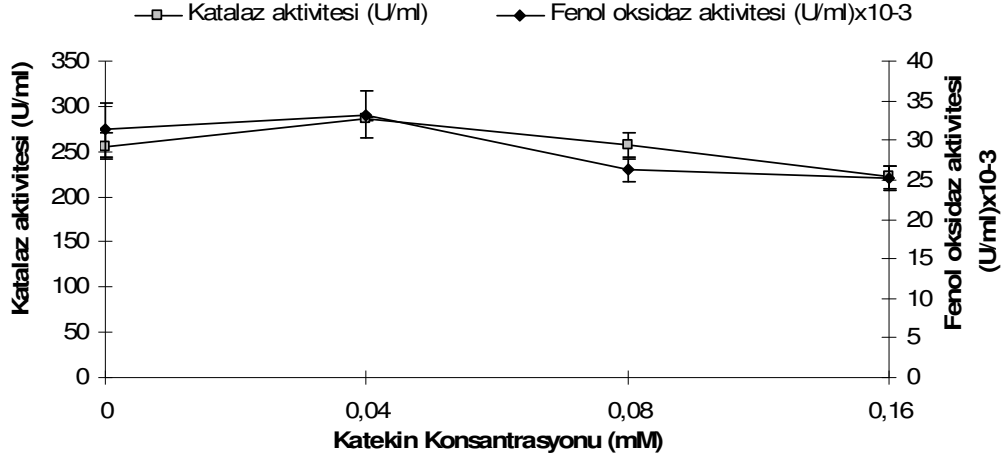
Kaempferol'den mirisetine doğru üçüncü halkadaki hidroksil sayısı 1'den 3'e çıkmaktadır (Tablo 1). Sonuçlara göre, hidroksil sayısı arttıkça antifungal etkide de artış olmaktadır. Enzimdeki artış ancak mirisetinde önemli olabilecek düzeylere ulaşmıştır. Kuersetinde, katekole benzer şekilde, 3. halkada bulunan *orto*-difenol yapısı nedeni ile katekol benzeri bir eğilim görülmüş olabilir. Aynı eğilim kaempfeolde de gözlenmiştir. Buna göre, düşük dozlarda mantar büyümesi olumsuz etkilenmezken görülen enzimdeki hafif artışın toksik etkiyi bertaraf ettiği ve yüksek dozlarda hem mantarın sağlığını iyice yitirdiği, hem de enzim üretiminin olumsuz etkilendiği görülmektedir. Mirisetinde ise, denenen dozlarda enzim üretiminde düşüş görülmemiştir.

## Flavanoller

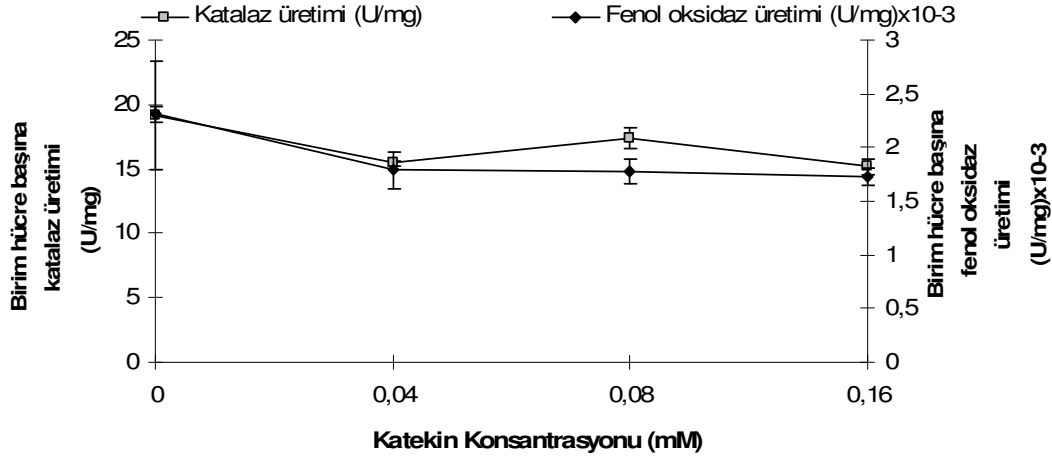
### Katekin



**Şekil 34.** Katekin varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim



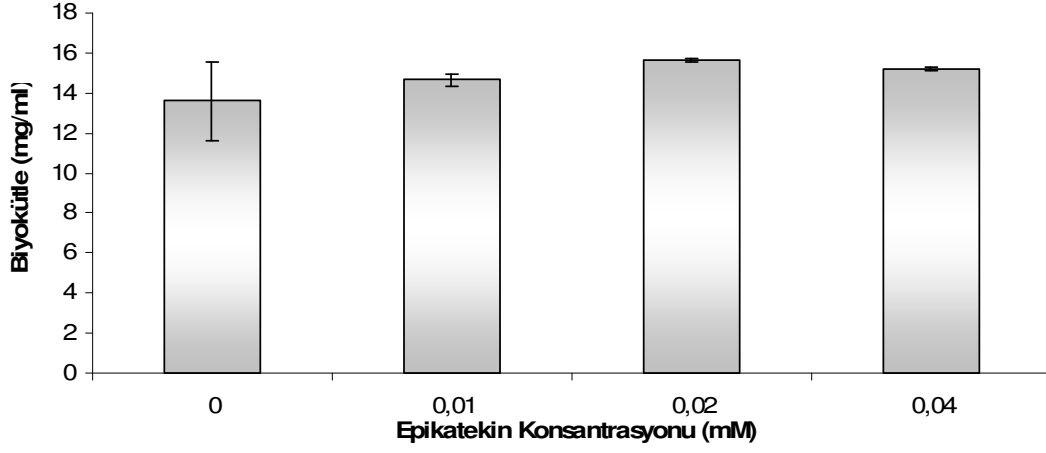
**Şekil 35.** Katekin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



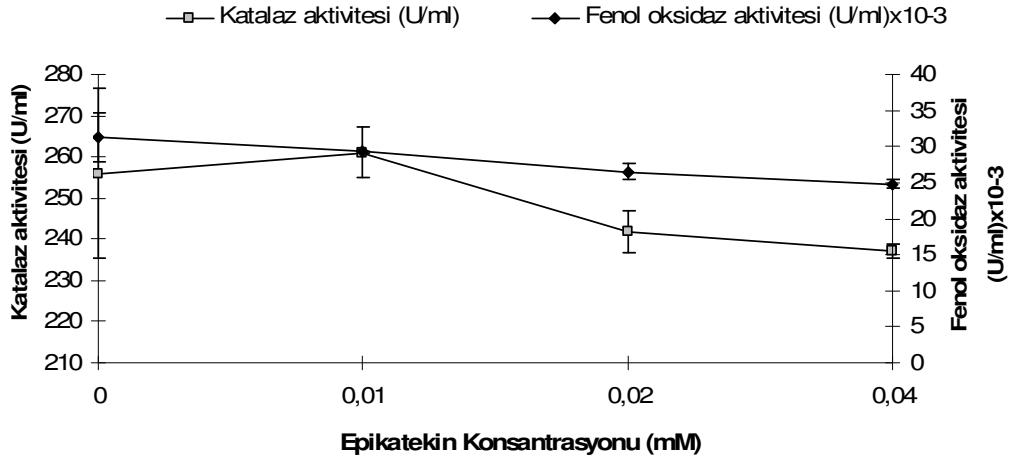
**Şekil 36.** Katekin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Katekin antifungal özellik göstermediği gibi bilakis denenen derişimlerde büyümeyi olumlu olarak etkilediği gözlenmiştir. Özellikle 0.04 mM derişimde bu artış belirgin olarak görülmektedir. Katalaz ve fenol oksidaz üretiminde önemli oranda bir değişiklik görülmemekle beraber, özellikle 0.04 mM derişimdeki KATFO üretimindeki düşüş dikkat çekicidir. Enzim aktivitesindeki %25 kadar düşüş istatistikî açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak, genel olarak, katekinde görülen eğilim, daha önce resorsinol, gallik asit, vanilik asit, klorojenik asit ve kafeik asitte de görülen, olası antioksidan etki şeklinde değerlendirilmiştir.

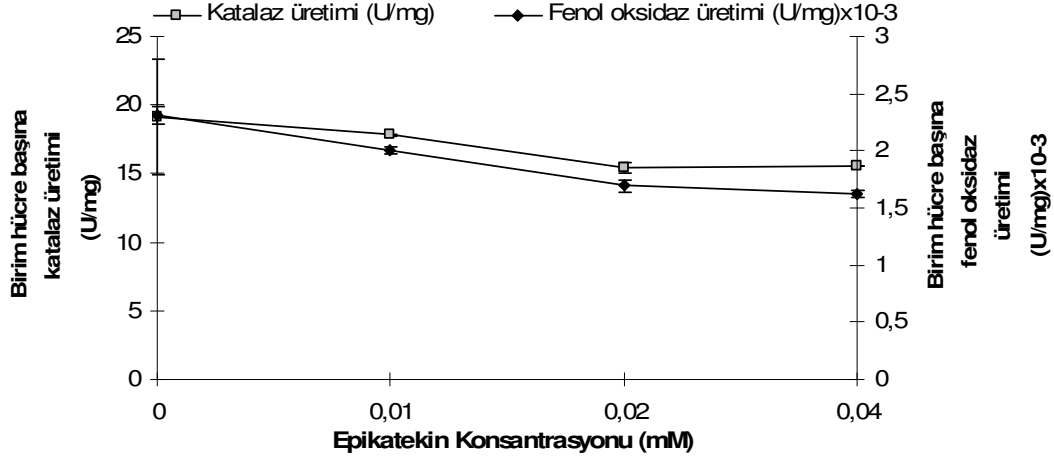
## Epikatekin



Şekil 37. Epikatekin varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim



Şekil 38. Epikatekin varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



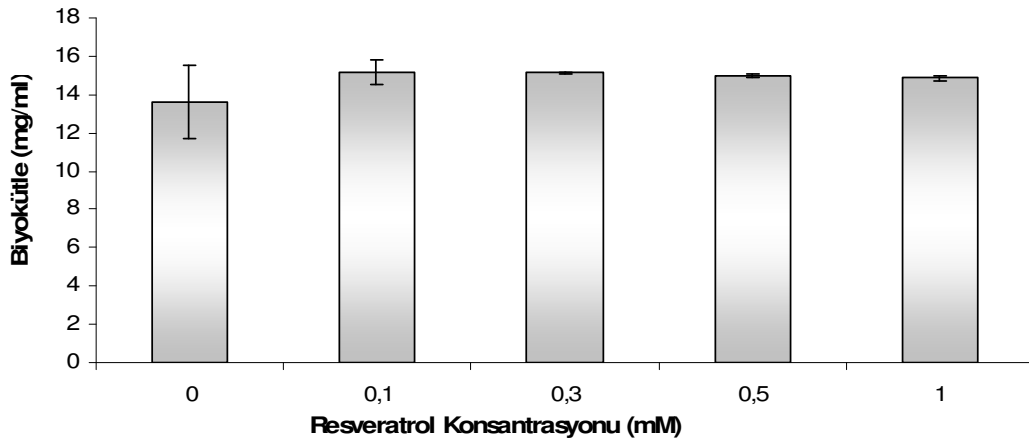
**Şekil 39.** Epikatekin varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Katekinde olduğu gibi, epikatekin de *S. thermophilum*'un büyümesini olumlu etkilemiştir. Katekinden farklı olarak epikatekin 0.01 mM dan 0.02 mM a kadar aşamalı bir artış göstermiş, katalaz ve fenol oksidaz üretiminde de aynı aşamalı azalış gözlenmiştir.

Katekin ve epikatekin özellikle çayda bulunan önemli antioksidanlardır. Bu maddelerin varlığında özellikle fenol oksidaz aktivitesinde görülen (%30) düşüş, önerilen 'antioksidan varlığında mevcut oksidatif stresin azalması ile KATFO üretiminin azalması' yönündeki yorumumuzu destekler niteliktedir.

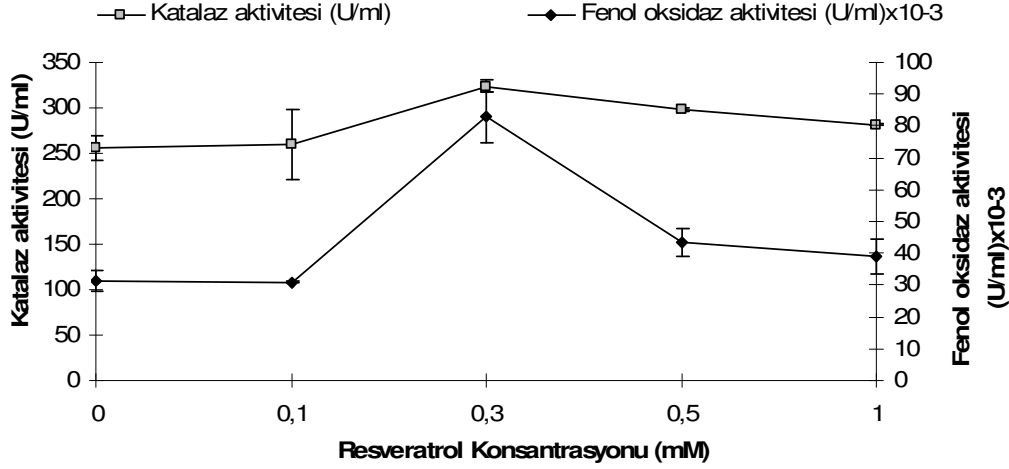
### Stilbenler

#### Resveratrol

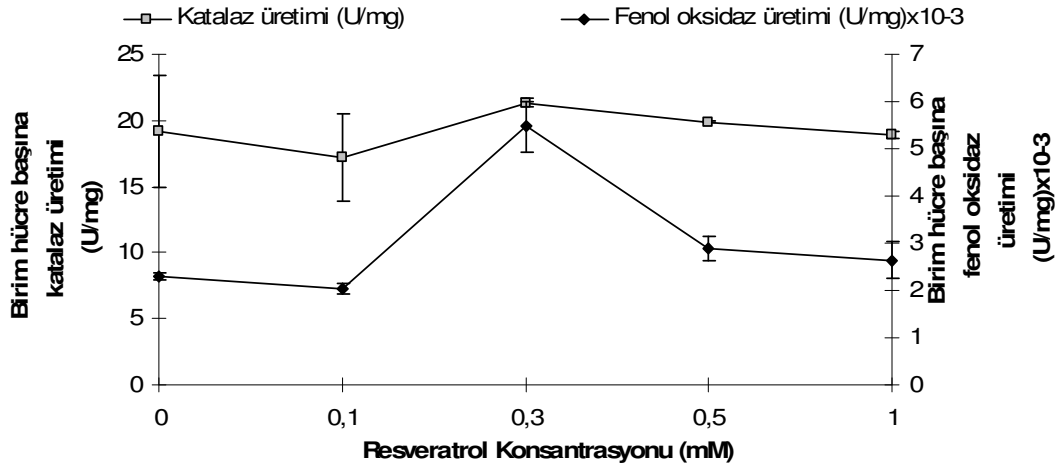


**Şekil 40.** Resveratrol varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim





**Şekil 41.** Resveratrol varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



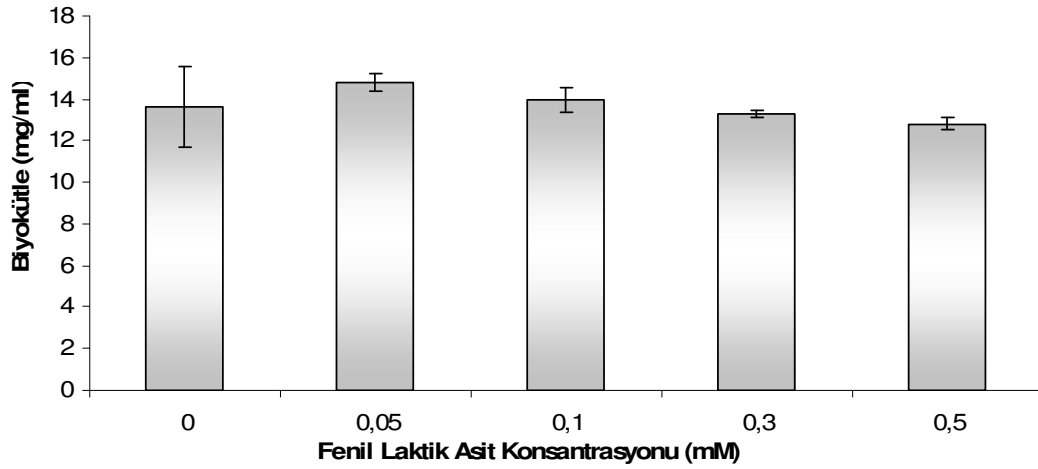
**Şekil 42.** Resveratrol varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Resveratrol katekin ve epikatekine benzer bir şekilde büyüme üzerine olumsuz bir etki göstermemiş hatta belli bir artış gözlenmiştir. KATFO aktivitelerine bakıldığında, 0,3 mM da özellikle fenol oksidaz aktivitesinde bir tetiklenme olduğu görülmektedir. Bu aktivite artışının

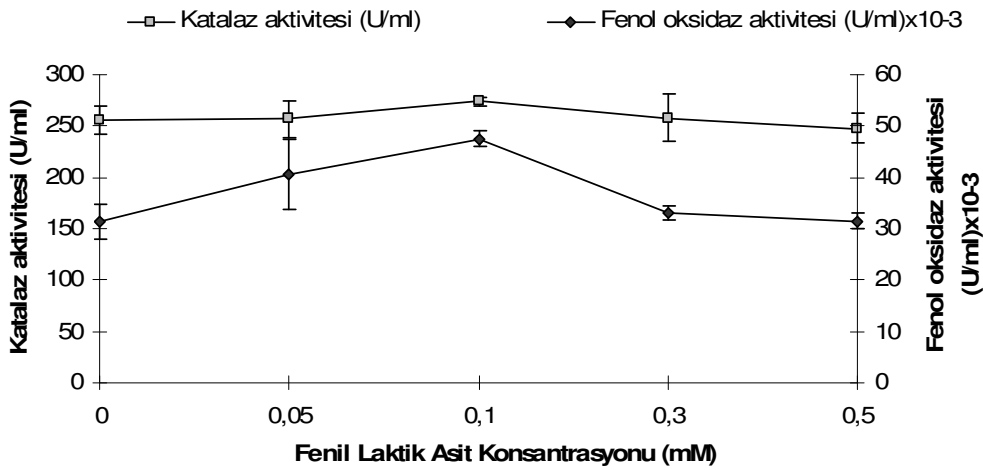
resveratrolün enzim üzerine bir etkisi mi yoksa ortama salgılanan yeni bir fenol oksidazdan mı kaynaklandığı henüz bilinmemektedir.

Resveratrol ömür uzatan molekül olarak ta bilinmektedir. Öncelikle mayada yapılan çalışmalar ve ardından daha gelişmiş canlılardan elde edilen bulgulara göre resveratrolün belli enzimleri (sirtuinler) etkileyerek DNA'nın stabilitesini artırması sebebi ile hücre ömrünü uzattığı belirlenmiştir [1]. Histon asetilasyonunu etkileyen sirtuinler DNA molekülünün histonlara daha güçlü sarılmasını sağlayarak DNA degradasyonunu azaltmaktadırlar. Bu şekilde genlerin ifadesi de etkilenmektedir, çünkü histona daha güçlü dolanma neticesinde gen ekspresyonu düşmektedir.

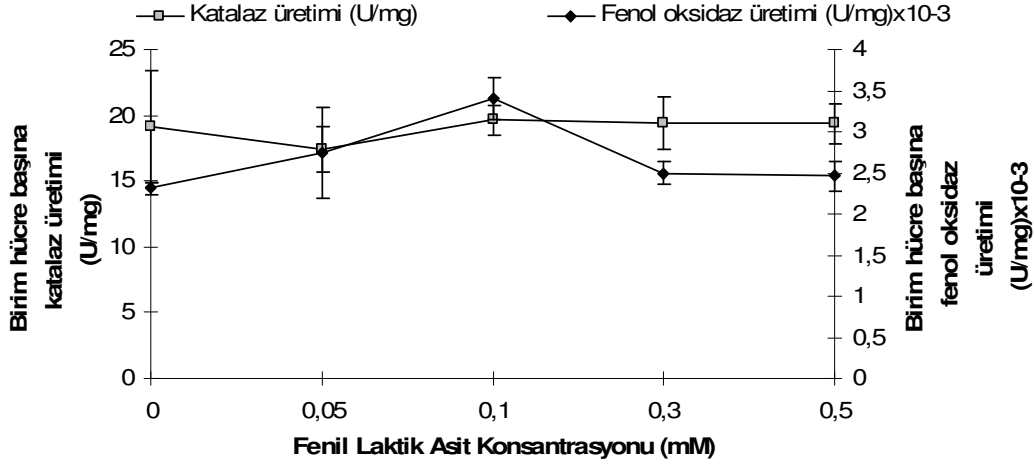
### Fenillaktik Asit



Şekil 43. Fenillaktik asit varlığında *S. thermophilum*'un biyokütlesindeki değişim



Şekil 44. Fenillaktik asit varlığında katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri



**Şekil 45.** Fenillaktik asit varlığında birim biyokütle başına düşen katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve antifungal bir madde olarak bilinen fenillaktik asit (FLA), seçilen derişimlerde *S. thermophilum*'un büyümesini olumsuz olarak etkilememiştir. Özellikle fenol oksidaz aktivitesinde meydana gelen artış ve takip eden azalış, daha önce flavonollerde görülen eğilimi anımsatmaktadır. Bu nedenle, antifungal etki gösteren maddelerin, denenen derişimlerde henüz belirgin bir antifungal etki ortaya koymasalar da, muhtemelen metabolizma üzerindeki benzer sinyal iletim rollerinden ötürü, KATFO üretiminde benzer bir trend ortaya koydukları söylenebilir.

Literatürde yer alan bilgilere göre FLA asidik pH larda etkili olan bir antifungal maddedir. Termofilik mantarlar genellikle ortamı alkali hale getirmektedir ve enzimlerinin de çoğu alkali ortamda daha aktif olmaktadır. Deneylerde ortam pH sına bakılmamıştır, ancak, daha önceki deneyimlerimizden yola çıkarak, ortamın asidik olmadığı rahatlıkla söylenebilir. Bu da FLA'nın antifungal etki göstermemesini açıklamaktadır. Ortamın asidik olmaması termofilik mantarlarda ortaya çıkan bir durumdur. Bu nedenle enzimlerinin çoğu nötral ve alkali pH da aktiftirler.

## Genel Değerlendirme

- KATFO enzimi fenolik maddelerin yokluğunda büyümeye paralel olarak belli miktarda üretilmektedir.
- Farklı fenolikler mantar büyümesi ve KATFO üretimi üzerinde farklı etkiler ortaya koymuştur
- En belirgin eğilimler: 1. doz artımı ile azalan büyüme 2. Doz artımı ile azalmayan hatta artabilen büyüme
- Doz artımı ile azalan büyümede iki farklı eğilim gözlenmiştir: 1a. Belli bir dozun üzerinde azalan büyüme, 1b. Doz artışı ile sürekli azalan büyüme
- Bu sınıflandırmaya göre 1. gruptaki fenolikler mirisetin, hidrokinon, katekol, kumarik asit, ve kaempferoldür. Bunlardan 1a'da olanlar, katekol, kumarik asit, ve kaempferol 1b'de olanlar ise mirisetin ve hidrokinon olmuştur.
- 1a grubunda olan fenolikler varlığında enzim aktiviteleri de büyümeye paralel artış ve azalışlar göstermiştir. Bu durumda, söz konusu fenolikler yüksek dozlarda toksik etki gösteriyor olabilir. Buna göre, toksik etki enzim üretimini tetiklememekte, bilakis azaltmaktadır.
- 1b grubunda olanlarda fenolik madde büyümeyi sürekli olumsuz etkilediği halde (antifungal), enzimin, özellikle düşük dozlarda tetiklendiği görülmektedir. Buna göre, fenolik maddelerin antifungal etki göstermesi halinde KATFO üretiminde artış olduğu söylenebilmektedir.
- Antifungal olduğu bilinen fenil laktik asidin seçilen derişimlerde *S. thermophilum*'un büyümesine olumsuz bir etkisine rastlanmamıştır.
- 2. grupta yer alan fenolik maddeler ise, resorsinol, gallik asit, vanillik asit, kafeik asit, klorojenik asit, kuersetin, katekin, epikatekin, ve resveratroidür.
- 2. grupta yer alan fenoliklerin tamamında enzim aktivitesi az ya da çok baskılanmıştır. Bu baskılanma derişime bağılı olarak değışmekle beraber, genel olarak ya belli bir dozun üzerinde veya sürekli olarak gerçekleşmiştir.
- En belirgin baskılanma resorsinol ve vanillik asitte görülmüştür.
- Buna göre, 2. grupta yer alan fenoliklerin antioksidan etkisi olduğu söylenebilir.
- Antioksidan etki görüldüğünde enzim üretimi belli dozların üzerinde veya sürekli bir şekilde baskılanmaktadır.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında yapılan kontrol deneylerinde (proje kapsamında olmadığından sonuçlar sunulmamıştır) KATFO aktivitelerinde yaklaşık %20 lik bir artış gözlenmiştir ve istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

## Ortam sıvısı ve saflaştırılmış KATFO varlığında çeşitli fenolik maddelerin oksidasyonu

KATFO, yöntemlerde belirtildiği şekilde saflaştırılmış, ayrıca, yine yöntemlerde belirtildiği şekilde, enzim içeren ortam sıvısı hazırlanmıştır. Saflaştırılan enzim ve ortam sıvıları farklı sübstratlarla reaksiyona alınmış ve TLC ve HPLC ile ürün oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Ayrıca renk değişimi ve çökelti oluşumu da gözlenmiştir.

Buna göre oksidasyon sonuçları olumlu (+) veya olumsuz (-) şeklinde Tablo 2'de sunulmaktadır.

**Tablo 2.** Fenolik maddelerin KATFO ile oksidasyonu

Fenolik Madde	Ortam sıvısı	Saf enzim
Katekol	+	+
Hidrokinon	+	+
Resorsinol	-	-
Gallik asit	+	-
Vanillik asit	-	-
Kafeik asit	+	+
Klorojenik asit	+	+
Kumarik asit	+	-
Kaempferol	-	-
Kuersetin	+	+
Mirisetin	-	-
Katekin	+	+
Epikatekin	-	-
Resveratrol	-	-
Fenillaktik asit	+	-

Elde edilen sonuçlara göre, saf enzim ve ortam sıvısı ile elde edilen sonuçlarda farklılık görülmüştür. Ortam sıvısı ile kontrole göre renk oluşumu ve çökeltme gibi faktörler de enzimin etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır, ancak, saf enzim varlığında bu fenoliklerin bazıları ürün vermemiştir. Ortam sıvısında medyatör (mediator) görevi gören bazı maddelerin bulunması ve oksidasyonu indirekt tetiklemesi mümkündür. Ayrıca ortam sıvısındaki, özellikle protein bazlı polimerlerin çökmeye neden olduğu da yapılan FTIR analizlerinde azot bağlarının görülmesi ile de tespit edilmiştir.

Sonuçlara göre, KATFO çok farklı yapılara sahip çok sayıda fenolik maddeyi okside edebilmektedir. Katekol gibi küçük yapıda olan sübstratlar yanısıra, klorojenik asit gibi polifenol yapısındaki daha büyük moleküller de okside olabilmektedir. Genel olarak, oksidasyonda, molekülün bir bölgesinde *orto*-difenol yapısının bulunmasının (katekol, kafeik asit, klorojenik asit, katekin, kuersetin) oksidasyonu teşvik ettiği görülmüştür. Okside olabilenler içinde bu yapıya sahip olmayan sadece hidrokinondur. KATFO, *o*- ve *p*-difenolü okside edebilirken *m*-difenolü (resorsinol) okside edememiştir. Resorsinol'un enzimi inhibe edip etmediği ise henüz bilinmemektedir. Epikatekin katekinin izomeridir. Epikatekinin okside olmaması, enzimin fenol oksidaz aktivitesinde stereospesifite olduğuna işaret etmektedir.

Antifungal/toksik etkisi görülen kaempferol, kumarik asit ve mirisetinin okside olamaması dikkat çekici bulunmuştur. Hidrokinonun ise daha önceki çalışmalarımızdan, çok az okside olabildiği bilinmektedir. Buna karşılık, katekol okside olabilmektedir ancak yine de belli bir dozun üzerinde büyümeyi olumsuz etkilemiştir.

Enzim üretiminde önemli derecede baskılanmaya neden olan resorsinol ve vanillik asit okside olmamıştır. Yukarıda da belirtildiği gibi, bu moleküllerin inhibitör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Büyümeyi olumsuz etkilemeyen, hatta olumlu etkileyebilen 2. grup fenoliklerin ise çoğunun (katekin, klorojenik asit, kafeik asit, kuersetin) okside olabildiği görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre, kesin çizgiler çizilememekle beraber, fenoliklerin okside olamamasının antifungal/toksik etki ile, fenoliklerin oksidasyonunun ise antioksidan etki ile ilişkilendirilebileceği söylenebilir. *Orto*-difenolik yapının bulunduğu flavonoidler ve fenolik asitler, bilindiği gibi, genel olarak antioksidan kapasitesi yüksek maddelerdir (Thasavi, 2009). Buna göre, KATFO'nun fenol oksidaz aktivitesinin bu etkiyi azaltmadığı, hatta bilakis artırıyor olabileceği düşünülebilir. Antifungal/toksik etkisi görülen maddelerin ise okside olması durumunda toksik etkinin azalıp azalmayacağı konusunda elde edilen verilerle şu anda yorum yapılamamaktadır. Kesin çizgilerin çizilememesi, olasılıkla, enzimin yapısal sınırlamaları ve fenolik madde ve mantar arasındaki kendine özgü etkileşimden kaynaklanmaktadır.

## Oksidasyon Ürünlerinin Tanımlanması

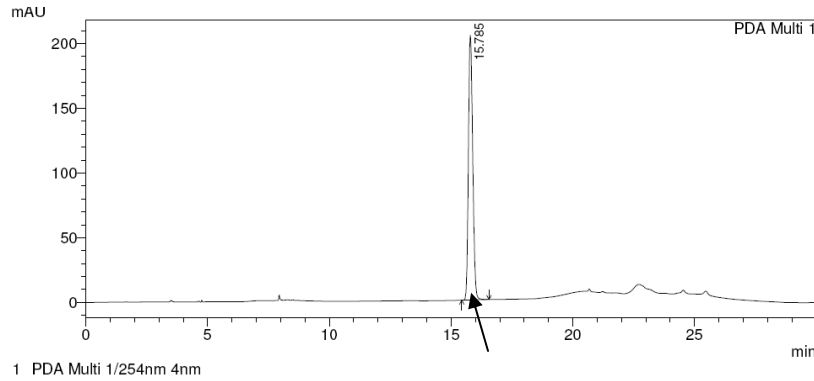
Proje önerisinde okside olabilen fenolikler içinden 5 tanesinin oksidasyon ürünlerinin karakterizasyon çalışmalarının yapılacağı belirtilmiştir. Buna göre seçilen 5 fenolik madde katekol, hidrokinon, kafeik asit, klorojenik asit ve katekin olmuştur.

### HPLC ve LC-MS Sonuçları

#### Katekol

1-10mM katekol monomerinin HPLC spektrumu:

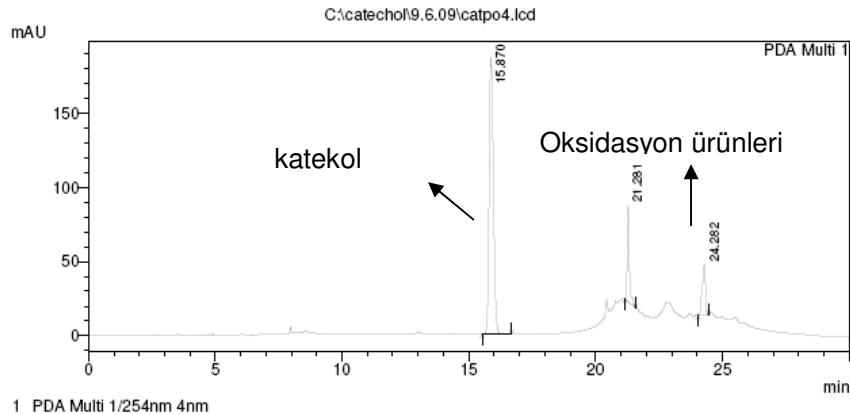
Standart olarak 10mM katekol monomerinin metanoldeki çözeltisi HPLC analizi için kullanılmış ve katekol monomerinin piki 15,7±0,1 dk.'da belirlenmiştir.



Pik	Alınma zamanı	Alan	Konsantrasyon
1	15.785	2521512	10mM

2-10mM katekol monomerinin KATFO ile oksidasyonu sonucu oluşan oksidasyon ürünlerinin HPLC spektrumu:

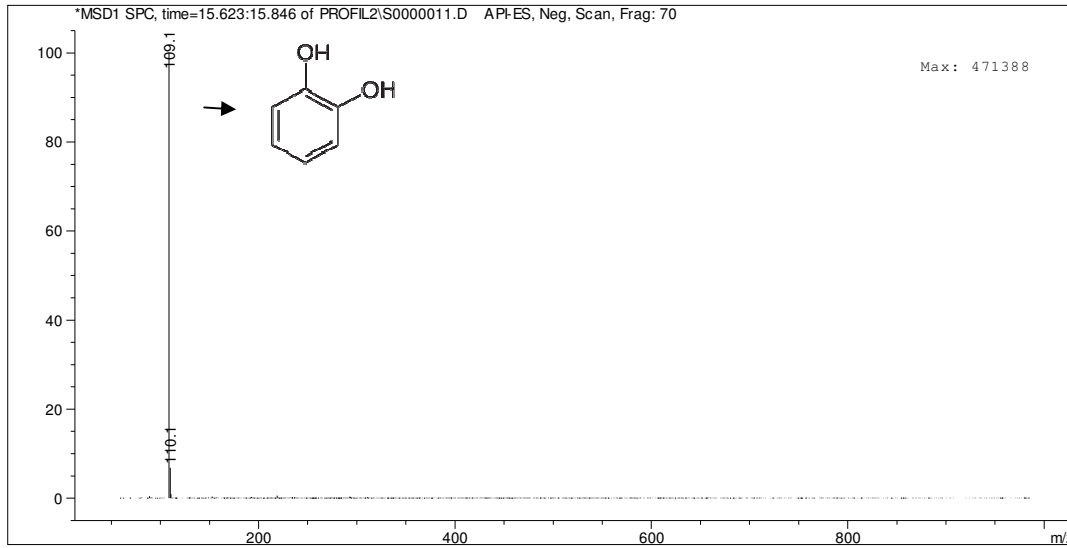
Oksidasyon analizinde metanolde çözünen katekol monomerine tampon çözelti ve KATFO eklenmiş ve 1 saat boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir.



Katekol ve oluşan oksidasyon ürünlerinin HPLC spektrumunda vermiş olduğu piklerin alıkonma zamanları ve konsantrasyona bağlı alanları:

Pik	Alıkonma zamanı	Alan
1	15.870	2192264
2	21.281	390464
3	24.284	314052

**Pik 1:** Alıkonma zamanı: 15.870

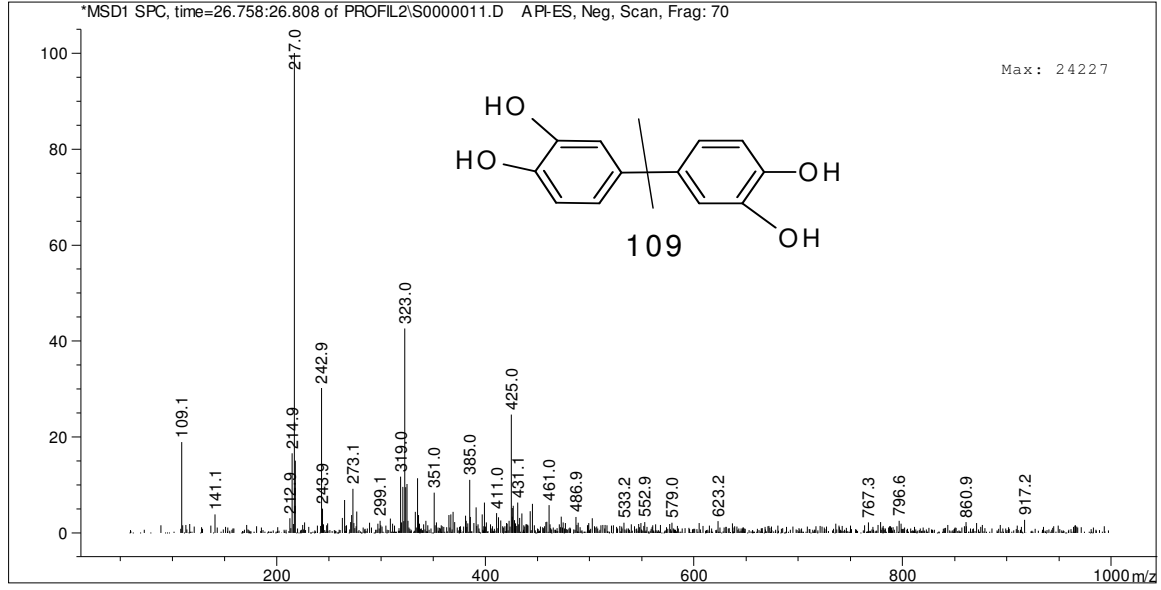


Alıkonma zamanı 15.870 olan pik için LC/MS-API-ESI sonucu

HPLC analizi sonucu alıkonma zamanı 15. 870 olan pikin kütle spektrometri analizi sonucunda moleküler ağırlığına bakılarak KATFO ile henüz reaksiyona girmemiş olan negatif iyonlaşmış katekol monomerine (m/z 109) ait olduğu belirlenmiştir. Buna göre 1 saatlik reaksiyonda katekolün tamamı ürüne dönüşmemekte ve oksidasyon reaksiyonu halen devam etmektedir.



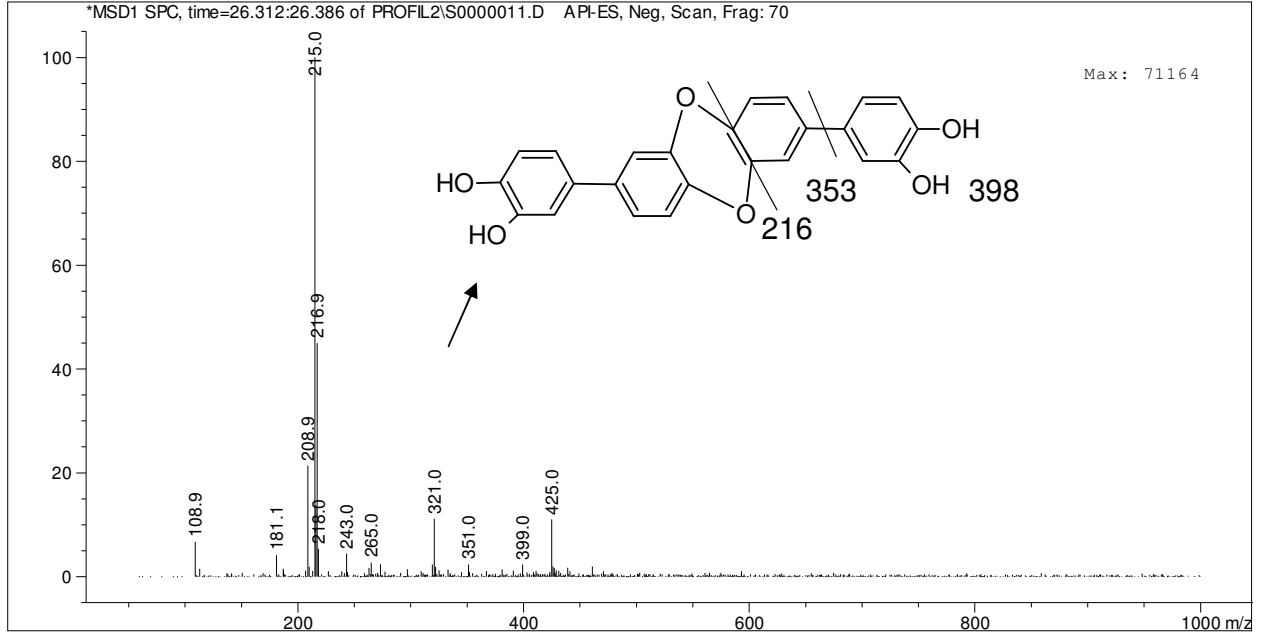
**Pik 2:** Alıkonma zamanı: 21.281



KATFO ile katekolün 1 saatlik reaksiyonu sonucu oluşan oksidasyon ürününün LC/MS-API-ESI analiz sonucu ve moleküler ağırlığı göz önüne alınarak ve literatürdeki bilgilere (Smejkalova, 2006) dayanılarak çizilmiş tahmini yapısı.

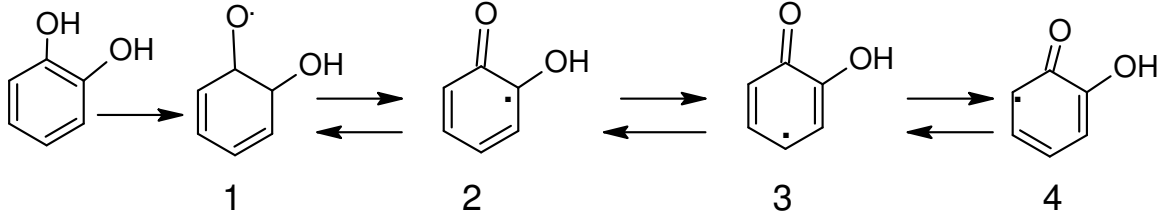
HPLC sonucu alıkonma zamanı 21.281 olan pikin LC/MS-API-ESI analizi sonucunda oluşan ürünün aslında oktamere (8-mer) bir yapıya sahip polimer olduğu ancak iyonizasyon işlemi sırasında parçalanarak kararlı bir ürün olan dimere dönüştüğü gözlenmiştir. Kütle spektrometri analizi sırasında meydana gelen çarpışmalar sonucu kimi örnekler negatif iyonlaşırken kimi örnekler hem negatif iyonlaşıp hem de parçalanabilirler. Burada ürün belirlenirken esas alınan temel (en kuvvetli) piktir ve kütle/ yük oranı (m/z) 217 dir ve katekolün C-C bağlanım yaptığını işaret etmektedir.

**Pik 3:** Alıkonma zamanı 24.284:

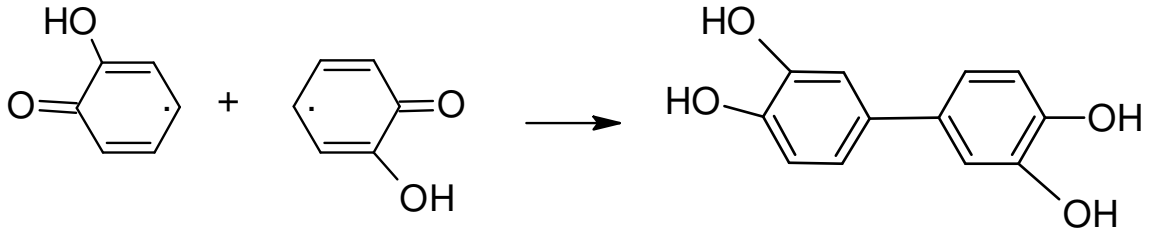


KATFO ile katekolün 1 saatlik reaksiyonu sonucu oluşan oksidasyon ürününün LC/MS-API-ESI analiz sonucu ve moleküler ağırlığı göz önüne alınarak ve literatürdeki bilgilere dayanılarak çizilmiş tahmini yapısı (Simejkalova, 2006)

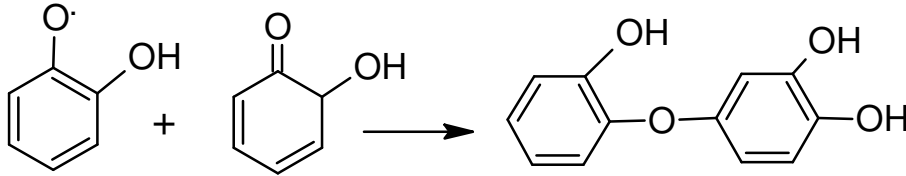
HPLC sonucu alıkonma zamanı 24.284 olan pikin LC/MS-API-ESI analizi sonucunda oluşan ürünün aslında nanomer (9-mer) bir yapıya sahip polimer olduğu ancak iyonizasyon işlemi sırasında parçalanarak kararlı bir ürün olan önce tetramere sonra da trimer ve dimere dönüştüğü gözlenmiştir. Bu spectrumda esas pik m/z 215 dir. Bunun yanı sıra analiz sonucu esas oluşan ürünün tetramer gibi daha yüksek moleküler ağırlıkta oligomerlerin de oluşabildiğini göstermektedir. Bu tetramerin m/z oranı 398 dir ve parçalanma ürünleri m/z 353 ve m/z 215 olan trimer ve dimer yapılarıdır.



katekolün oksidasyonu sırasında oluşan ürünler (rezonanslar)



katekolün C-O-C tip dimer oluşturmasını gösteren reaksiyon



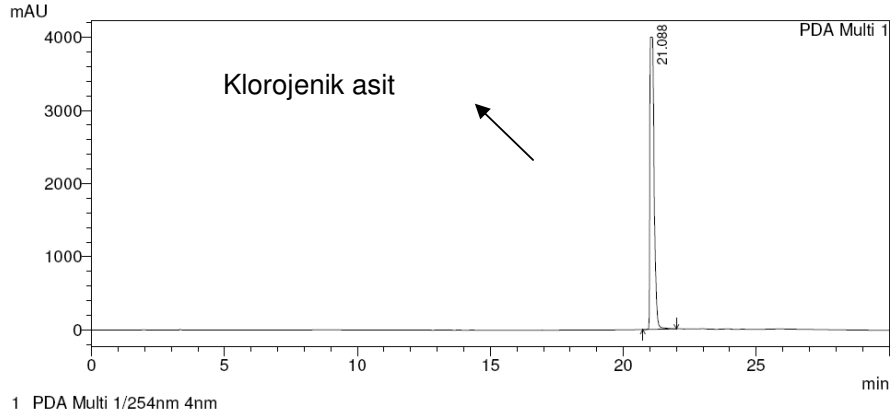
katekolün C-C tip dimer oluşturmasını gösteren reaksiyon

Literatürdeki bilgilere göre enzimlerdeki demir-porfirin yapı fenolik maddeleri serbest radikallere okside edebilmektedir. Bu serbest radikaller, yukarıda da gösterildiği gibi, değişik rezonanslar şeklinde olabilmektedir. (1+1), (1+2), (1+3), ve (1+4) birleşmesi C-O-C tip dimer oluşumuna yol açarken, (2+2), (2+3), (2+4), (3+3), (3+4), ve (4+4) birleşmesi C-C tip dimerleşmeye yol açabilir. Bu da oksidasyon ürünlerinde hem C-O-C hem de C-C tip bağın görülmesini açıklamaktadır.

## Klorojenik asit

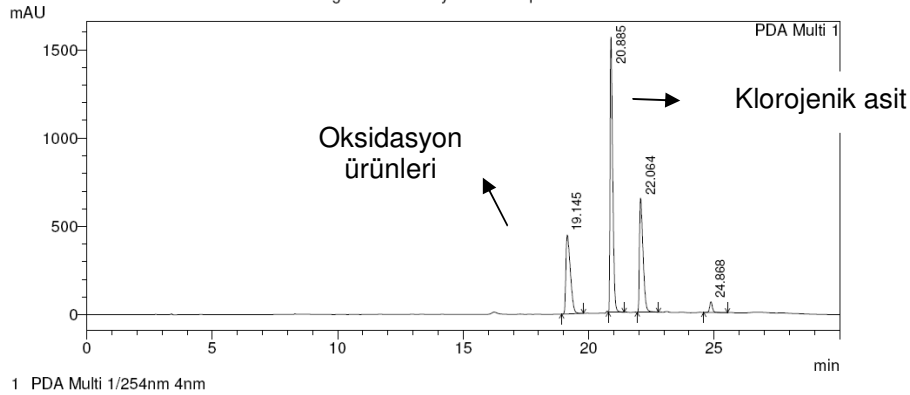
1-10mM klorojenik asit monomerinin HPLC spektrumu:

Standart olarak 10mM klorojenik asit metanolde çözünerek kullanılmıştır ve HPLC de yürütülmüştür. Klorojenik asit piki 21.08±0.1 dk.da belirlenmiştir.



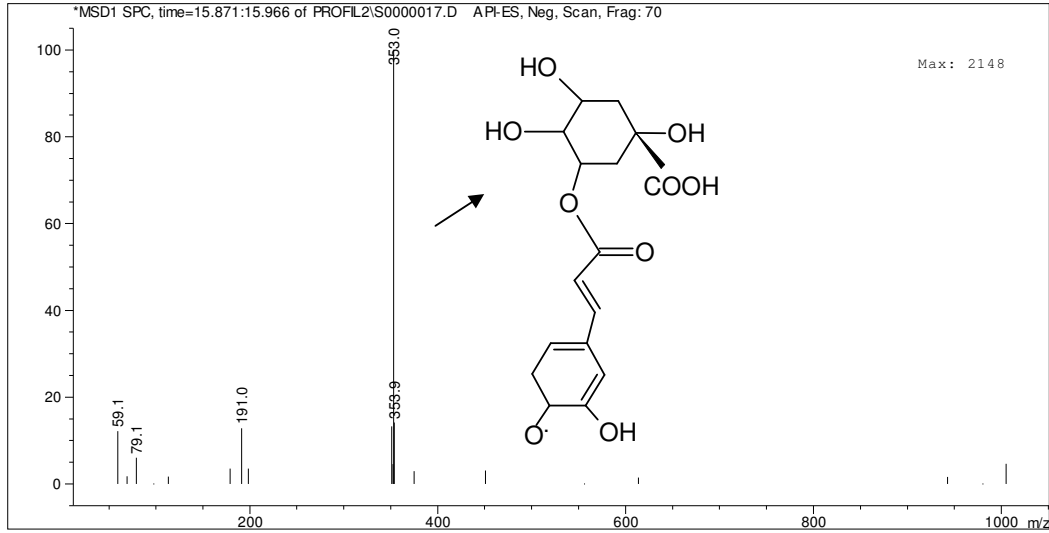
Pik	Alıkonma zamanı	Alan	Konsantrasyon
1	21.09	50676821	10mM

2-10mM klorojenik asit monomerinin KATFO ile 1 saat reaksiyonu sonrası oluşan ürünleri gösteren HPLC spektrumu:

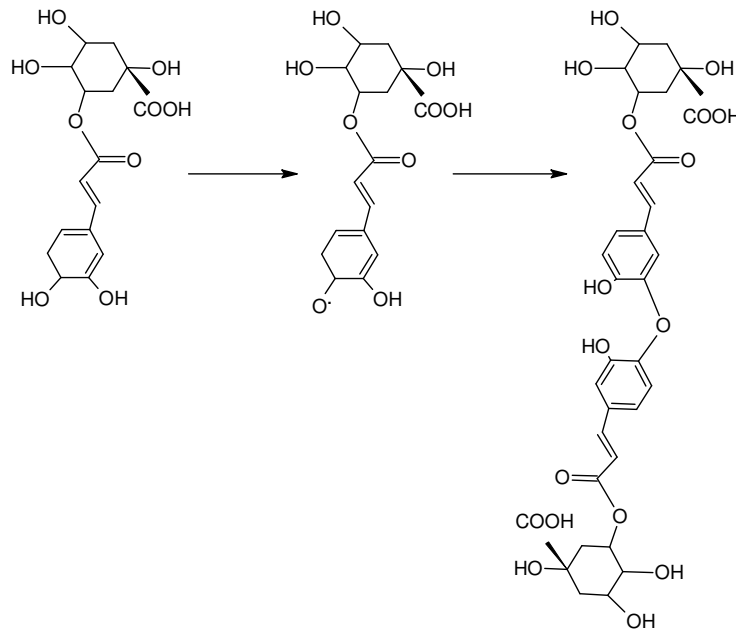


Pik	Alıkonma zamanı	Alan
1	19.145	5552491
2	20.885	11227355
3	22.064	6398285
4	24.869	477426

**Pik1:** Alıkonma zamanı: 19.145



KATFO ile reaksiyonu sonucu klorojenik asitin oluşturduğu kinonun LC/MS-APS-ESI analiz sonucu ve sonuca bağlı muhtemel yapısı

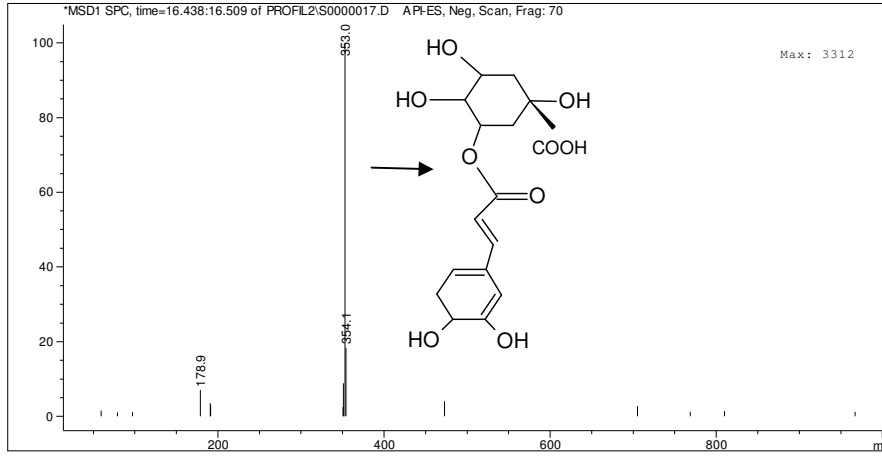


Literatürde kabul edilen klorojenik asitin dimer oluşumunda rol oynayan genel oksidasyon yolu

Alıkonma zamanı 19.145 olan pikin LC/MS-APS-ESI analizi sonucunda m/z 353 [M-H]<sup>-</sup> olduğu görülmüştür. Bu molekül muhtemel bir hidromonomer yapısına işaret etmektedir. LC/MS API-ESI analiz raporuna göre KATFO ile oksidasyonu sonucu klorojenik asit önce diğer fenoller gibi serbest radikallere dönüşmekte daha sonra da bu radikaller dimer oluşturmaktadır. Klorojenik asitin oluşturduğu radikal ve dimer yapıları, sonuçlara uygun olarak literatürdeki bilgilere dayanılarak çizilmiştir.

Alıkonma zamanı 20.885 olan temel pik bize reaksiyona girmemiş klorojenik asit monomerini göstermektedir (m/z 354).

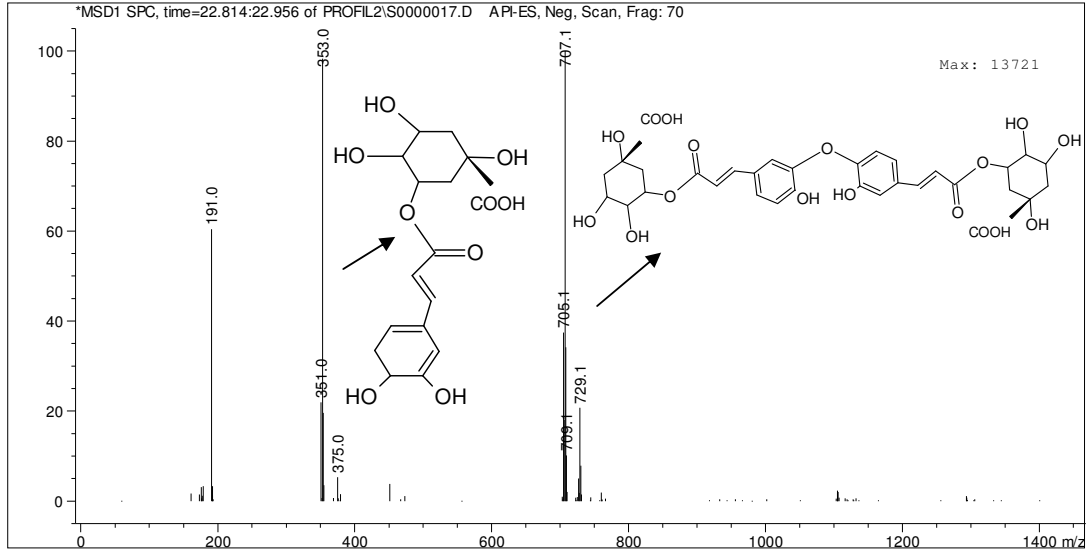
Pik 2: Alıkonma zamanı 20.885



Alıkonma zamanı 20.885 olan pikin MS sonucu ve klorojenik asitin yapısı

LC/MS analiz sonucuna göre pikin verdiği moleküler ağırlığına ve alıkonma zamanına bakılarak pikin oksidasyona uğramamış klorojenik asite ait olduğu görülmektedir.

**Pik3:**Alıkonma zamanı 22.064



Alıkonma zamanı 22.064 olan pike ait LC/MS-API-ESI sonucu

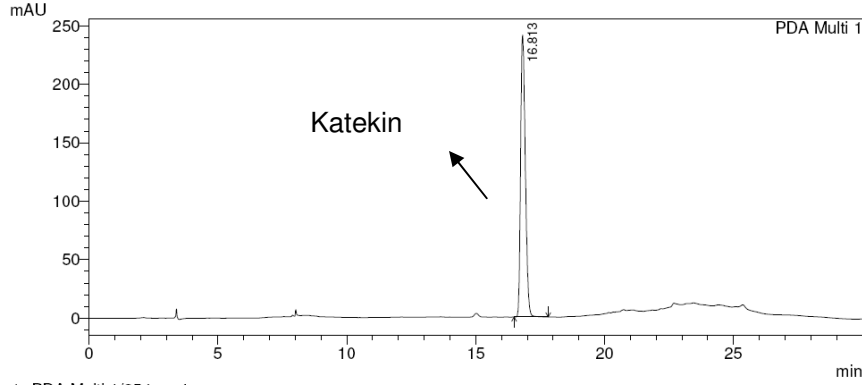
Alıkonma zamanı 22.064 olan esas pik klorojenik asitin dimer yapısı (m/z 707) oluşturduğunu, m/z 729  $[M-H+Na]^-$  ise iyonizasyon sırasında yapıya  $Na^+$  eklendiğini göstermektedir.

## Katekin

1-1-10mM katekin monomerinin HPLC spektrumu:

Standart olarak 10mM katekin metanoldeki çözeltisi kullanılmış ve HPLC de yürütülmüştür.

Katekin piki 16.9 ±0.1 dk.da belirlenmiştir.

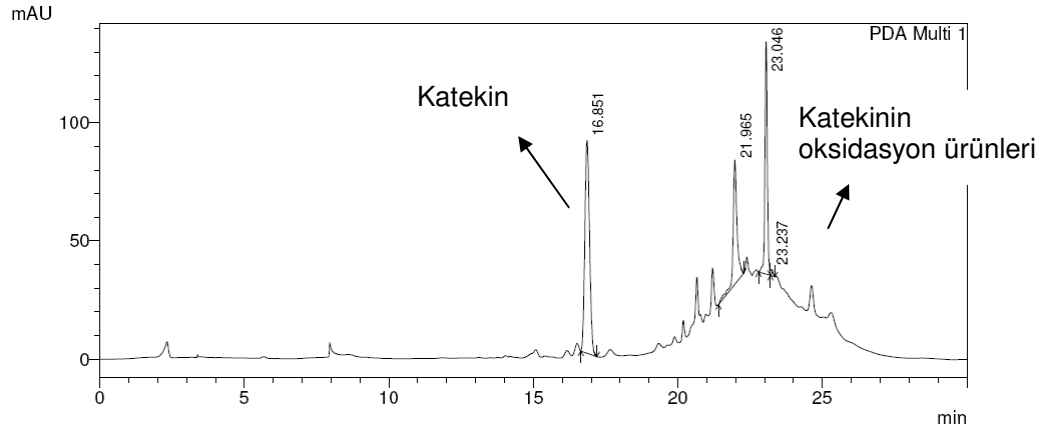


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Pik	Alıkonma zamanı	Alan	Konsantrasyon
1	16.813	3070323	10mM

2-10mM katekin monomerinin KATFO ile 1 saat reaksiyonu sonrası oluşan ürünleri gösteren

HPLC spektrumu:

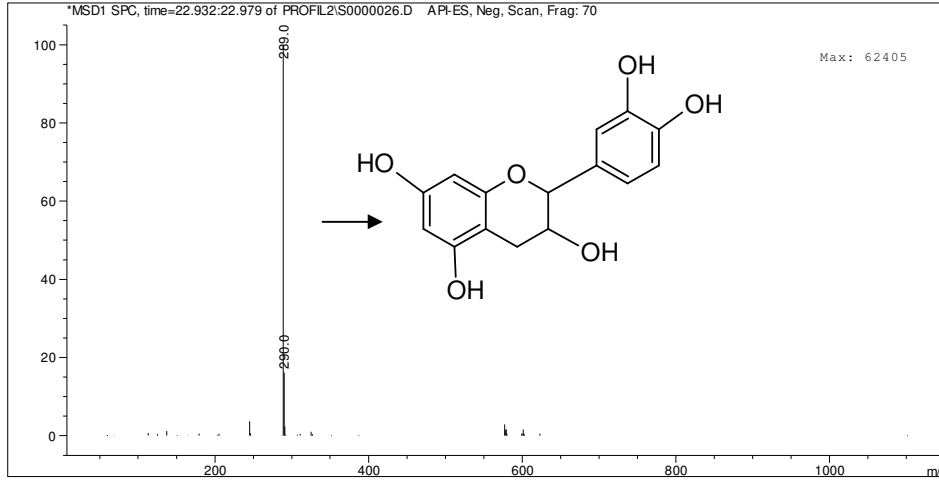


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Pik	Alıkonma zamanı	Alan
1	16.851	1017259
2	21.965	497336
3	23.046	576612
4	23.237	3760



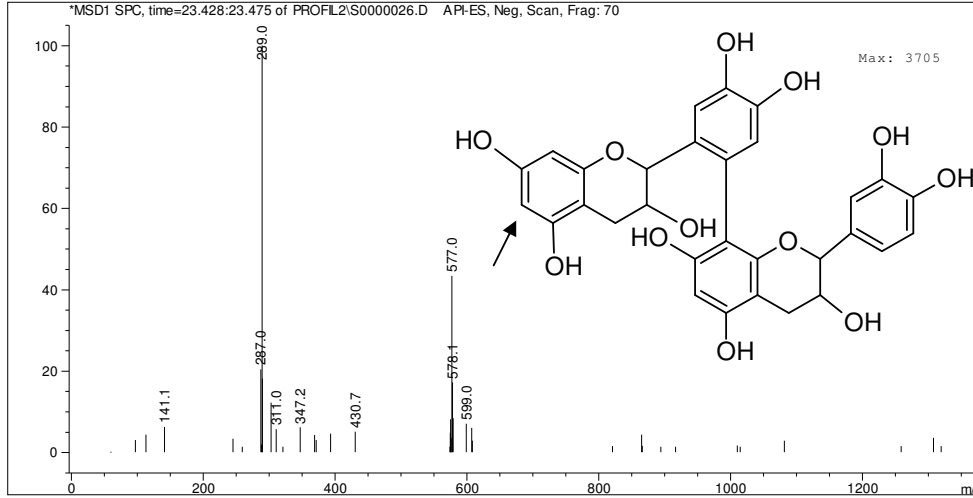
**Pik 1:** Alıkonma zamanı 16.85



Alıkonma zamanı 16.85 olan pikin LC/MS-API-ESI sonucu

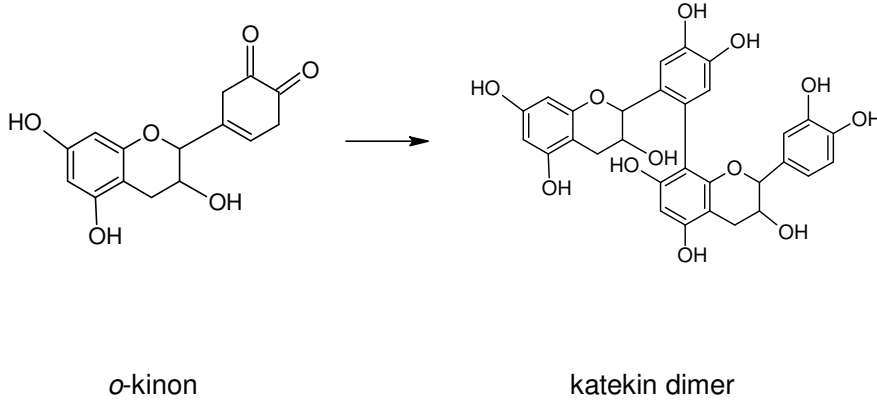
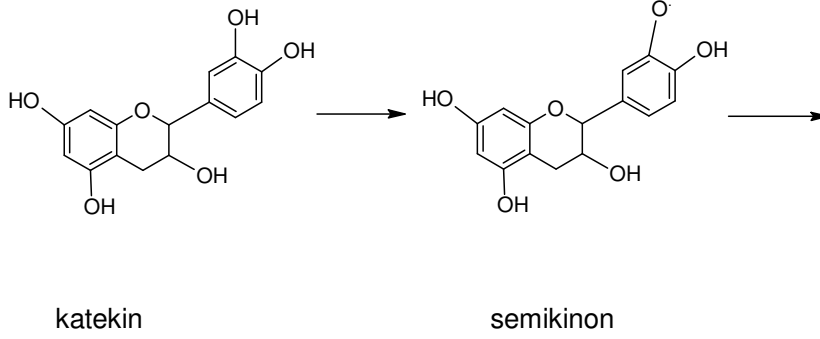
Alıkonma zamanı 16.85 deki pikin önce HPLC sonra da MS sonucuna bakılarak bu pikin oksidasyona henüz girmemiş katekine ait olduğu görülmektedir. Katekinin yapısı analiz sonucu üzerinde gösterilmiştir.

**Pik2:** Alıkonma zamanı 21.965

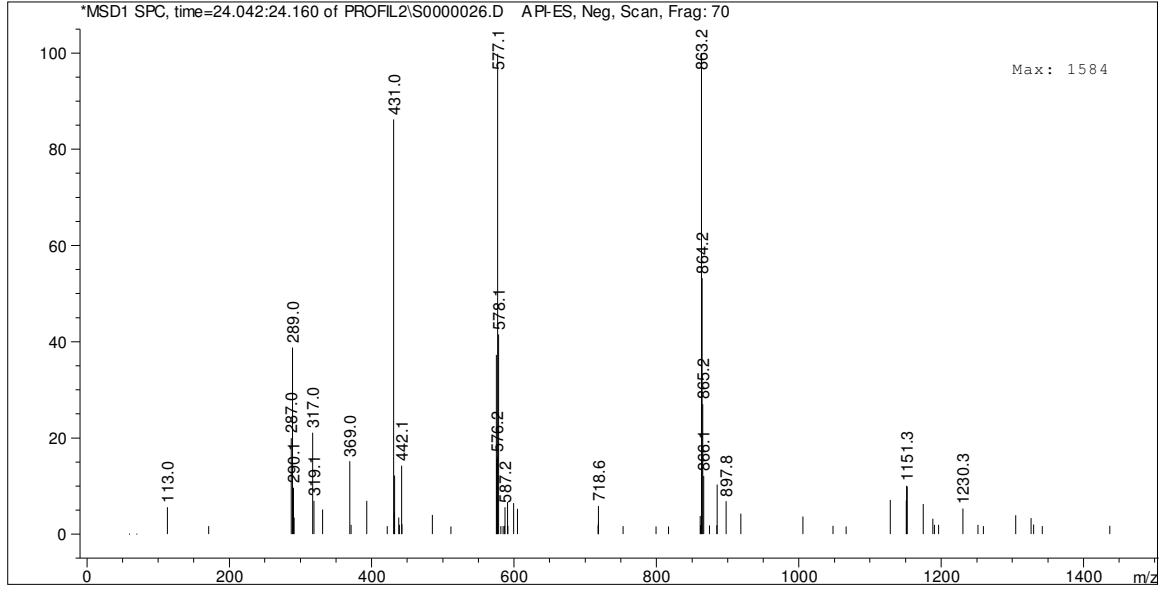


Katekinin KATFO ile 1 saatlik reaksiyonu sonucu oluşan oksidasyon ürününün LC/MS-API-ESI analiz sonucu ve moleküler ağırlığı göz önüne alınarak ve literatürdeki bilgilere dayanılarak çizilmiş tahmini yapısı.

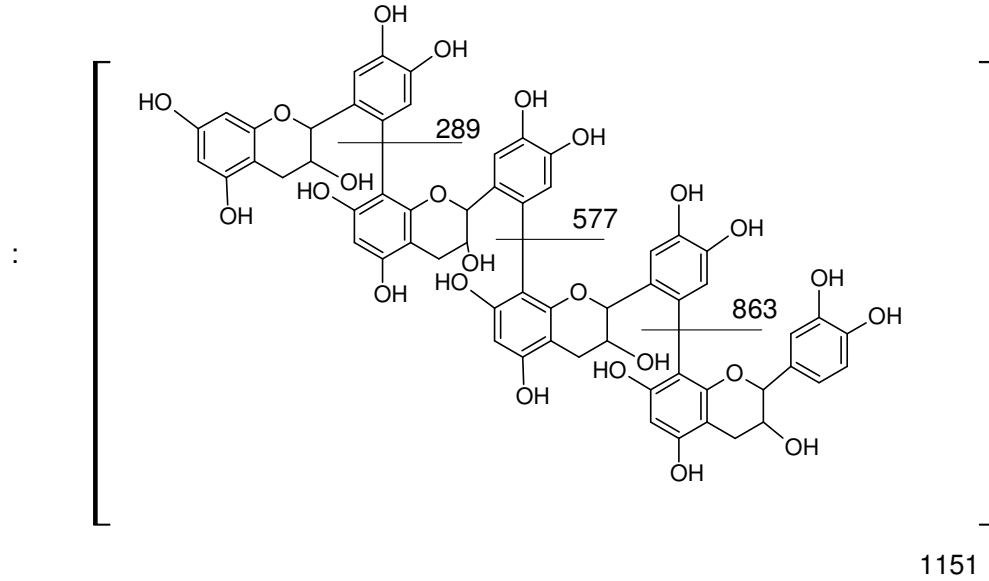
Alıkonma zamanı 21.965 olan ürünün analiz sonucunda katekinin dimeri (m/z 577) olduğu anlaşılmaktadır. Muhtemel yapısı analiz sonucu üzerinde gösterildiği üzere katekin monomerleri enzim ile okside olarak önce ara ürün olarak semi-kinon ve orto-kinona dönüşmekte sonra da dimer molekülü oluşturmaktadır.



**Pik 3:** Alıkonma zamanı: 23.046



Katekin molekülünün KATFO ile 1 saatlik reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin LC/MS-API-ESI analiz sonucu

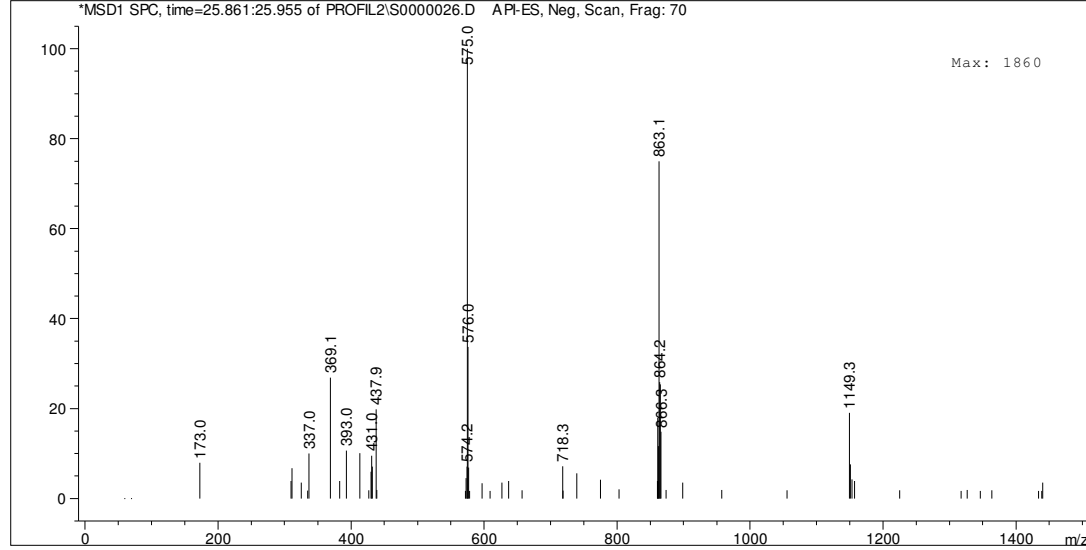


Katekin oksidasyon ürününün tahmini yapısı

KATFO ile oksidasyonu sonucu katekin molekülü önce serbest radikallere daha sonra da dimer ve oligomerleşerek tetramer yapılarına dönüşmekte ve reaksiyon süresi uzadıkça polimerleşmektedir. 1 saatlik reaksiyon sonucu ise indirgenmiş tetramer (m/z 1151) yapısı görülmektedir. Bu yapı kütle spektrometri analizi ile negatif iyonizasyon ile parçalanma

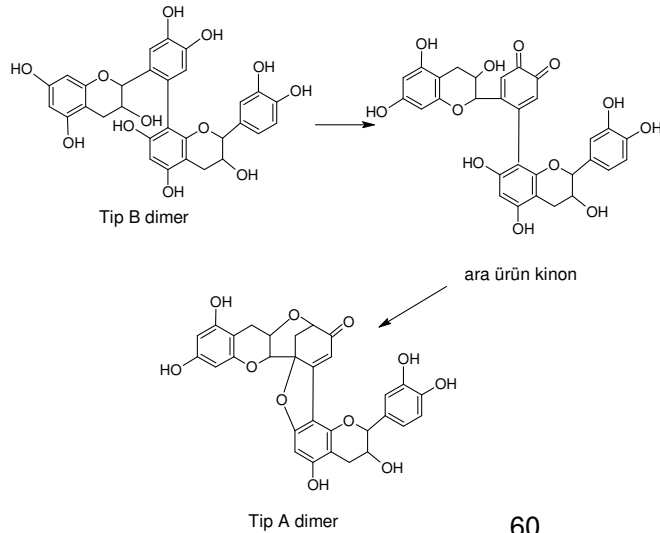
sırasında trimer (m/z 863), dimer (m/z 577) ve monomer (m/z 289) yapılarına parçalanmaktadır. H<sup>+</sup> kaybı bütün ürünlerde görülmektedir.

**Pik 4:** Alıkonma zamanı: 23.237



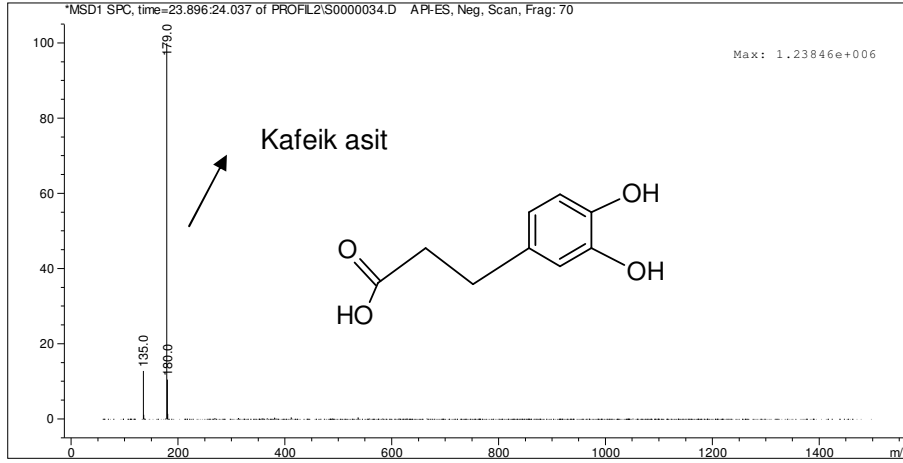
Diğer yandan, Tip B (hidrofilik katekin dimeri) enzim ile tekrar okside olarak hidrofobik Tip A katekin dimerine dönüşebilmektedir. Bir kere bu hidrofobik katekin dimeri oluştuştuktan sonra dimer yapısı enzim ile tekrar okside olarak *o*-kinon (m/z 574) olan bir ara bileşiğe dönüşmekte ve katekin monomeri ile birlikte indirgenmiş bir tetramer yapıya dönüşebilmektedir (m/z 864). Bu da bize katekinin aslında sadece tek tip bir ürün değil birden fazla tip dimer oluşturduğunu ve bu dimerler üzerinden oligomerleştiğini göstermektedir (Osman, 2006).

**Katekin Tip B ve Tip A dimerleri**





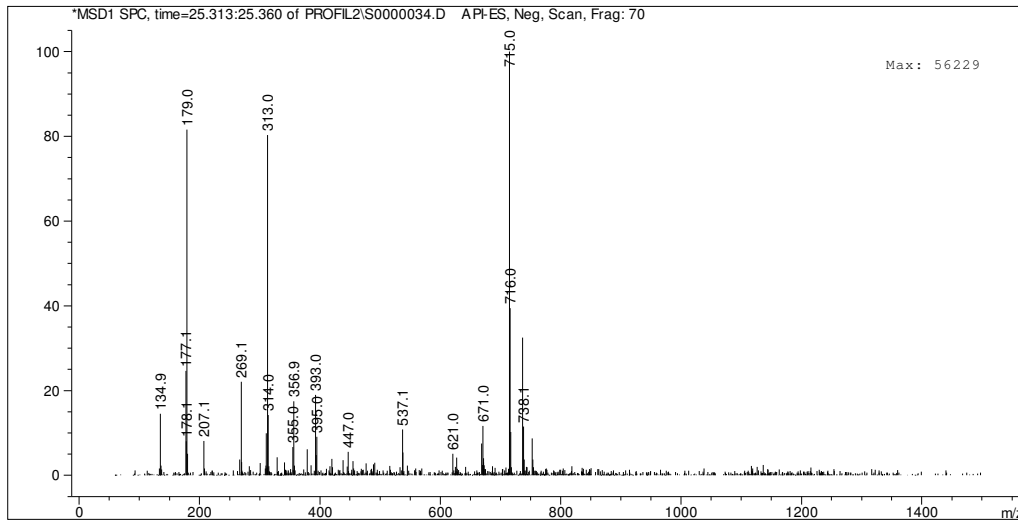
**Pik 1 : Alıkonma zamanı 23.847:**



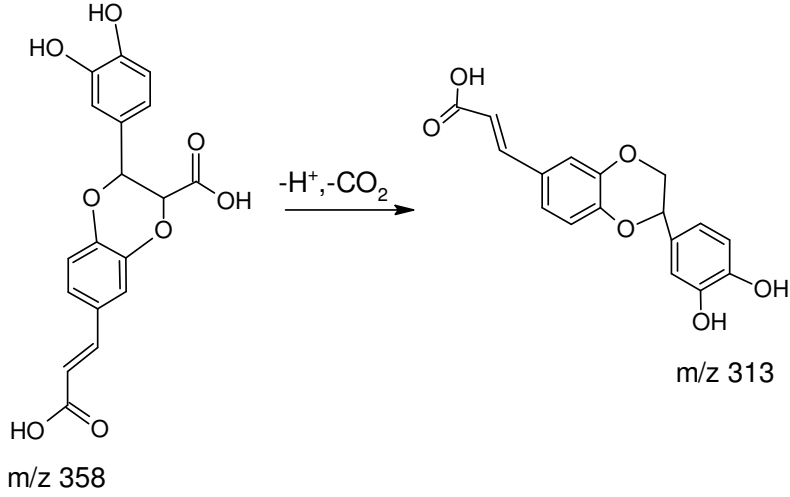
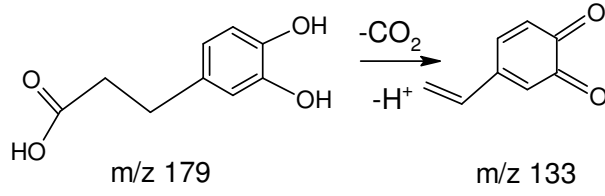
Alıkonma zamanı 23. 847 olan pikin LC/MS-API-ESI sonucu

Analiz sonucu m/z 179 ve alıkonma zamanı 23.847 olan pikin oksidasyon reaksiyonuna girmemiş kafeik asit monomerine ait olduğunu göstermektedir. Kafeik asitin yapısı analiz sonucu üzerinde gösterilmiştir.

**Pik 2: Alıkonma zamanı 24.705**



Katekin molekülünün KATFO ile 1 saatlik reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin LC/MS-API-ESI analiz sonucu

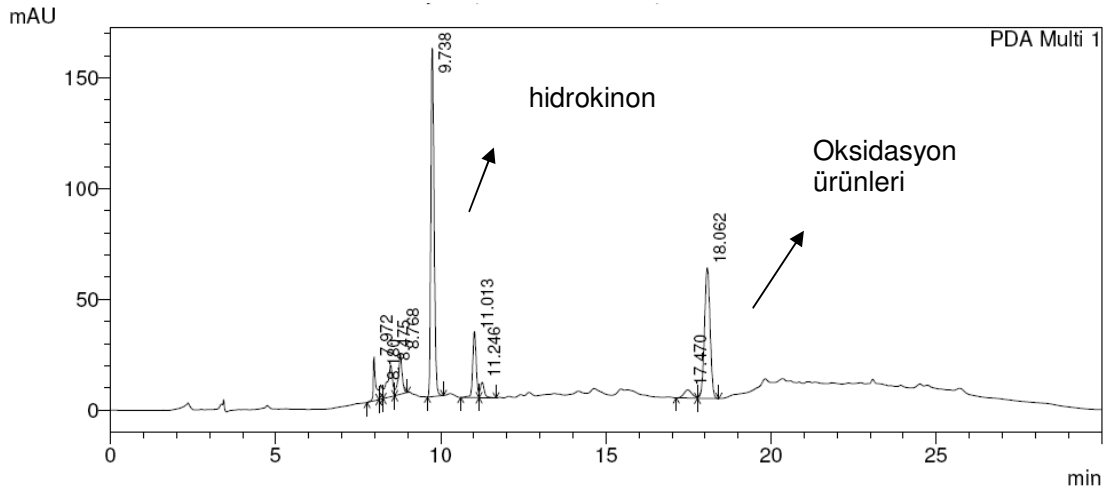
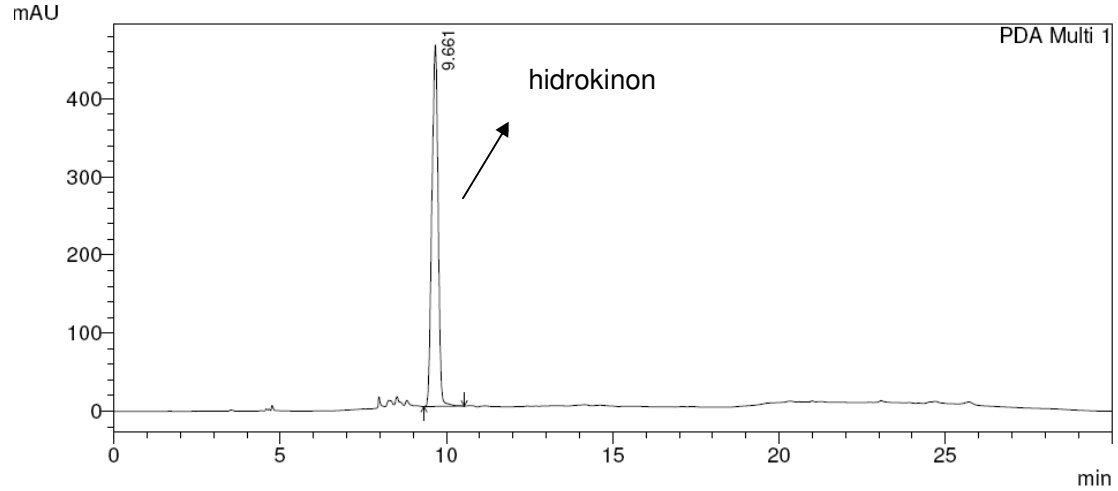


#### Kafeik asitin olası fragmentasyon ve dimer yapıları

Kütle spektrometri analizinde m/z 715 piki kafeik asit molekülünün KATFO ile 1 saatlik oksidasyonu sonucu oligomerleşmesi ile ortaya çıkan tetramer yapısını işaret etmektedir. Analiz sırasında hem negatif iyonlaşma, hem de parçalanma görünmektedir. Tetramerler pikinin yanı sıra temel pik olarak ayrıca hem dimer (m/z 358) hem de monomer (m/z:179) yapısı oluşturmaktadır. Kafeik asit dimerleri  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}^+$  kaybettiğinde m/z 313  $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]$  olan molekül ortaya çıkabilmektedir. Aynı şekilde m/z 179 olan pik kafeik asit monomerlerini göstermekte, monomerlerin aynı şekilde  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}^+$  kaybetmesiyle m/z 133 olan molekül oluşabilmektedir.

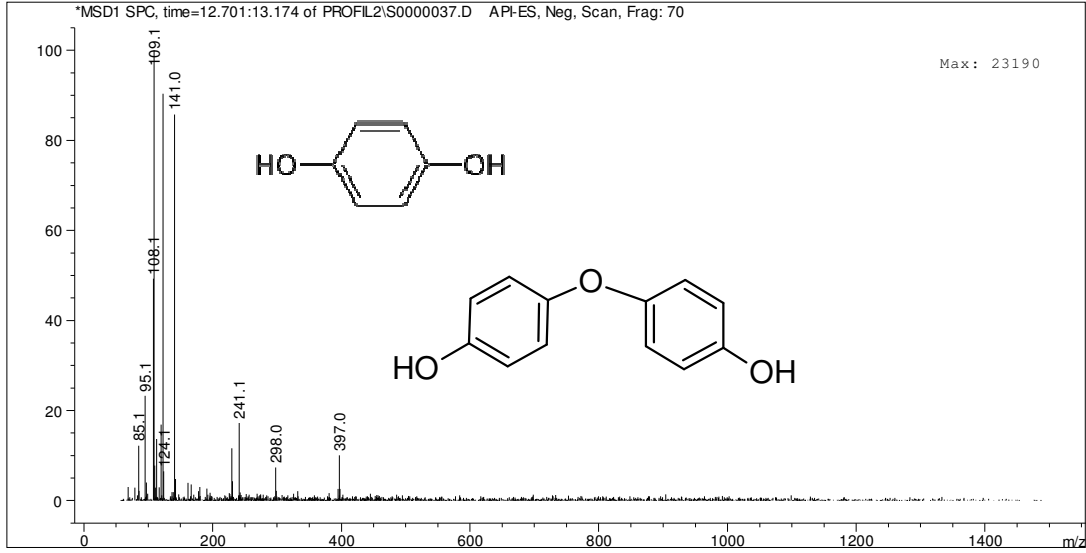
## Hidrokinon

Standart olarak 10mM hidrokinon metanoldeki çözeltisi kullanılmış ve HPLC de yürütülmüştür. Hidrokinon piki 9.6±0.1 dk.da belirlenmiştir.

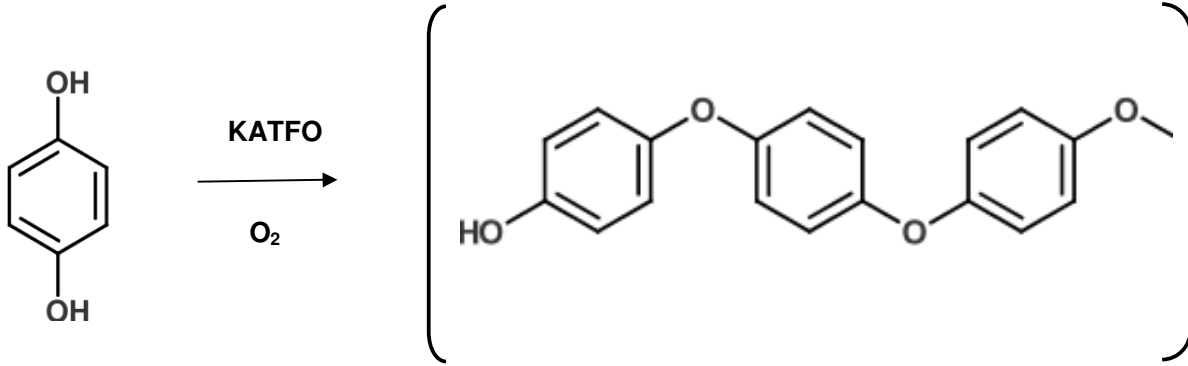


Pik	Alınma zamanı	Alan
1	9.661	1142717
2	11.013	195714
3	18.062	327024





m/z 241 M-H<sup>+</sup>+Na

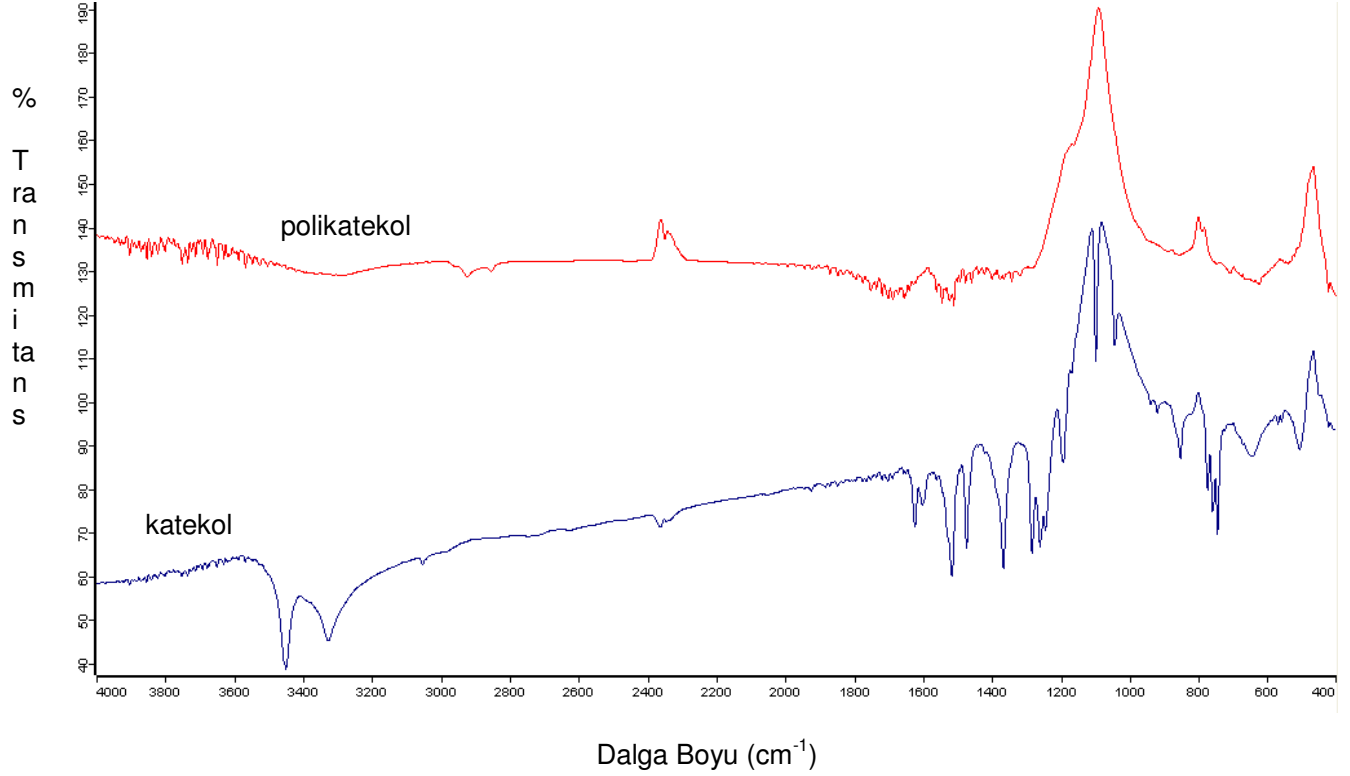


3. gelişme raporunda önerilen fenil eter bağı ile hidrokinonun polimerleşmesi son HPLC, LC-MS ve FT-IR verileri ile desteklenmektedir. Buna göre oluşan dimer yapısı ve olası polimerleşme ürünü yukarıda gösterilmektedir.

Hidrokinonun oksidasyonu ile oluşan kinon yapısı oldukça reaktif olup çok çabuk serbest radikallere dönüşebilmektedir ve katekolde de olduğu gibi rezonanslar oluşturabilmektedir. Bu serbest radikallerin birleşmesiyle de oluşan dimer yapıları ya C-O-C ya da C-C tip bağı gösterebilmektedir. Kütle spektumunda görülen esas pik m/z 109 olup hidrokinonu işaret etmektedir. Öte yandan m/z 241.1 muhtemel olarak dimer yapısına Na<sup>+</sup> eklenmesi sonucu oluşan bir moleküldür.

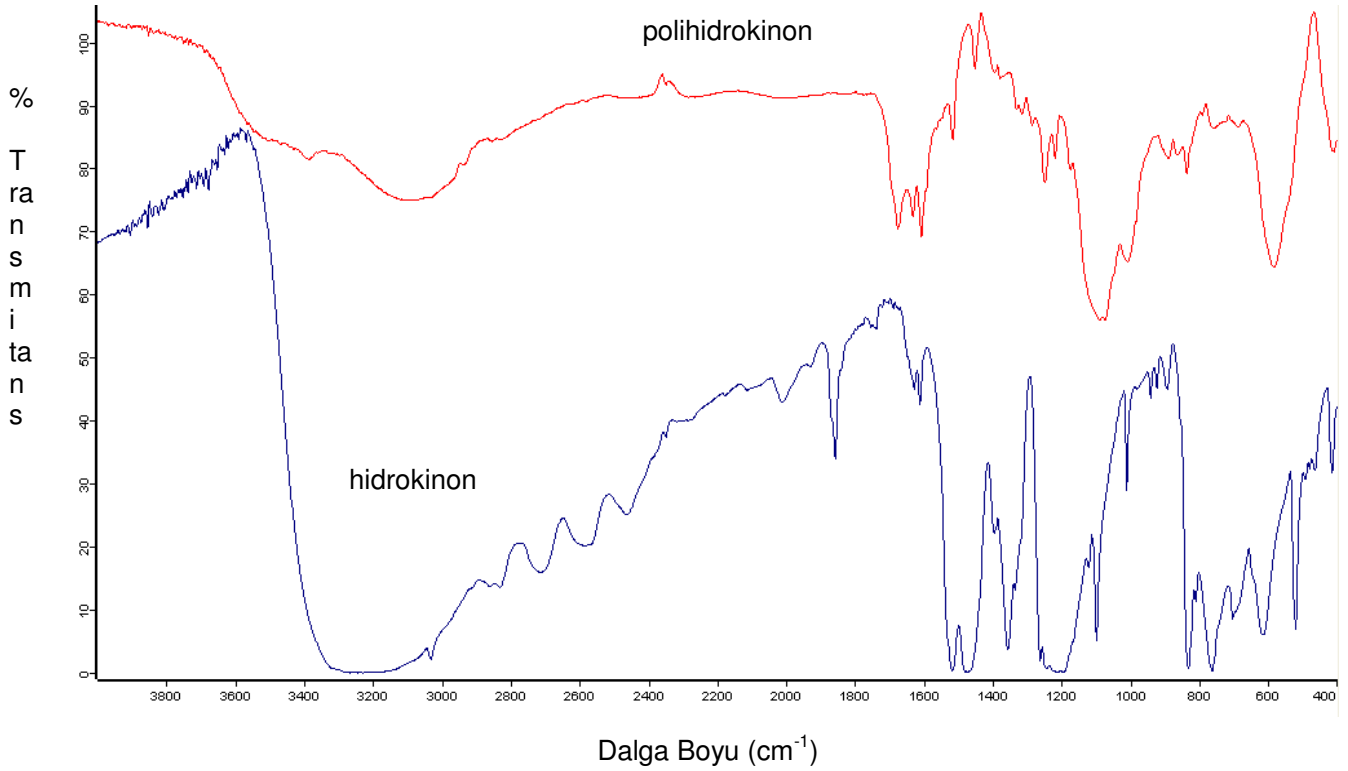
## FTIR Sonuçları

### Katekol



Katekolün kendi spektrumunda bulunup polimerde kaybolan, 3326 ve 3451 cm<sup>-1</sup>'e denk gelen belirgin iki tepe fenoliğe bağlı –OH'ların tipik görüntüsüdür. Polimerleşme gerçekleşirken hidroksillerin kaybolduğu böylece anlaşılmaktadır. Katekole özgü C-O bandını belirten tepeler ise 1281 ve 1250 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Benzer şekilde bu bağlar da polimerde bulunmamaktadır. 850 – 600 cm<sup>-1</sup> arası bulunan tepeler aromatik halkanın =C-H bağını simgelemektedir ve her iki yapıda da korunduğu sonuçlardan çıkarılabilir. Polimer oluşumuna has tepelerin genişleme (peak broadening) eğilimi ve fenil eter (C-O-C) bağına özgü 1260 ve 1050 cm<sup>-1</sup> tepeleri polimer yapısına dair ipuçları vermektedir.

## Hidrokinon



Hidrokinon spektrumunda ilk göze çarpan tepeler  $1210$  ve  $1355\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan fenol hidroksillerinin çift suret (duplicate) tepeleridir.  $1467$ ,  $1515$ ,  $1611$ ,  $1625\text{ cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkanlar benzen halkasının C=C bağlarını simgeler.  $3280\text{ cm}^{-1}$  olarak izlenebilen hidrokinonun kendisinde daha derin, polimerinde kayma (shift) ve yayvanlaşma (broadening) gösteren bağ -OH kayboluşunun tipik davranışıdır. Fenil eter (C-O-C) bağını en belirgin şekilde işaret eden hidrokinon spektrumunda bulunmayıp, polimerde ortaya çıkan bant  $1150\text{ cm}^{-1}$ 'de net bir şekilde gözlemlenmiştir.

Klorojenik asit, kafeik asit ve katekin için elde edilen FT-IR sonuçları Ek A'da sunulmaktadır. Buradan elde edilen sonuçlar da katekol ve hidrokinonda olduğu gibi fenil eter ve yeni C-C bağlarının oluşumunu desteklemektedir. Ancak FT-IR dan sonuç çıkarmak çok kolay olmamıştır. Yapının çözülmesinde en çok yararlanan teknik LC-MS olmuştur. Ancak, FT-IR ile elde edilen sonuçlar polimerleşmenin varlığını tartışmasız ortaya koymuştur. Ortam sıvısı kullanılarak gerçekleştirilen FT-IR analizlerinde ise azot bağları görülmüştür. Bu da, ortam sıvısı varlığında, oluşan fenolik polimerlerin protein bazlı maddelerle etkileşerek çökeldiğini düşündürmüştür. Gerçekten tannin gibi fenoliklerin proteinlerle kompleks

oluşturduğu bilinmektedir. Burada elde edilen sonuçlar bunu desteklemektedir. Ancak, ortam sıvısı ile elde edilen sonuçlar çok karmaşık ve yorumlanması zor olmuştur. Bu nedenle, yöntemlerde belirtilen yaklaşımlarla saf enzim ve substrat varlığında veri elde edilmiş ve buradan elde edilen FT-IR dataları daha anlamlı ve yorumlanabilir bulunmuştur.

## SONUÇLAR

*Scytalidium thermophilum*'un ürettiği çift aktiviteli katalaz - fenol oksidaz (KATFO) glukoz içeren ortamda, büyümeye paralel olarak, sürekli üretilmektedir.

Büyüme ortamına eklenen fenolik maddeler genel olarak iki etki göstermiştir. Bir grup fenolik antifungal/toksik etki göstererek doza artışı ile büyümeyi olumsuz etkilemiş diğer grup fenolikler ise artan doza karşın büyümede olumsuz etki göstermemiş hatta büyümenin arttığı gözlenmiştir.

Büyümeyi olumsuz etkileyen fenoliklerin (katekol, hidrokinon, kumarik asit, kaempferol, mirisetin) bazıları düşük dozlarda etkili olmamış ancak artan dozlarda olası toksik etki göstermiştir. Sadece hidrokinon ve mirisetin doza bağlı sürekli bir inhibisyona neden olmuş ve, bu nedenle, antifungal olarak nitelendirilmişlerdir.

Büyümeyi olumsuz etkileyen fenoliklerden hiç biri, hidrokinon hariç, KATFO tarafından okside olamamıştır. Hidrokinon ise çok yavaş okside olabilmektedir.

Büyümeyi olumsuz etkilemeyen veya olumlu etkileyen fenolikler (resorsinol, vanillik asit, gallik asit, kafeik asit, klorojenik asit, katekin, epikatekin, resveratrol, fenillaktik asit) genel olarak düşük dozlarda daha olumlu etki göstermiş, artan dozlarda ise kontrole göre büyümede düşüş görülmemiştir.

Özellikle resorsinol varlığında KATFO'da çok büyük miktarda baskılanma olmuştur. Bunu vanillik asit takip etmiştir. Diğer fenollerde daha az derecelerde baskılanma olmuştur. Resorsinol ve vanillik asitin KATFO üzerine inhibitör etkilerinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Resveratrol kendine özgü bir etki göstermiş ve özellikle fenol oksidaz aktivitesini 2.5 kat gibi büyük miktarda artırmıştır. Diğer fenollerin gösterdiği eğilim ise benzer bulunmuştur. Yani, düşük dozlarda KATFO baskılanmazken, artan dozlarla %20 ila %45 kadar enzim üretimi baskılanmıştır. Bu grupta yer alan ve orto-difenol yapısını içeren fenolik maddelerin tümünün KATFO tarafından okside olabildiği görülmüştür.

Epikatekin, katekinin izomeridir ve okside olmamıştır. Bu da KATFO'nun fenol oksidasyonunda stereospesifite gösterdiği olasılığını gündeme getirmiştir.

Gallik asitte KATFO ile oksidasyon ürünü görülmemekle beraber gallik asit oldukça güçlü bir şekilde otooksidasyon göstermiştir.

Katekol, hidrokinon, katekin, kafeik asit ve klorojenik asitte 1 saatlik bir reaksiyon sonundaki oksidasyon ürünlerinin karakterizasyonu için HPLC, LC-MS ve FT-IR uygulanmıştır.

Katekolde 9-mer ve 8-mer ve kararlı bir yapıya sahip dimer ve tetramer tespit edilmiştir. Dimer yapının ilk başta oluşan serbest radikal ile C-C bağı meydana getirerek oluştuğu, polimerleşmede ise hem yeni C-C bağlarının oluştuğu hem de C-O-C (fenil eter) bağının oluştuğu görülmüştür.

Hidrokinon katekol kadar güçlü okside olamamıştır. Elde edilen ürünlerde en kararlı yapı olarak dimer tespit edilmiştir. Dimer oluşumunda ve polimerleşmenin devamında fenil eter bağının önemli olduğu düşünülmektedir.

Katekinde yine dimer, ve olasılıkla dimerden oluşan tetramer gözlenmiştir. Burada, yine olasılıkla serbest radikal aracılığı ile C-C bağının oluştuğu düşünülmektedir. Ancak, açıkta kalan hidroksil grupları aracılığı ile polimerleşmenin sürdüğü de düşünülmektedir.

Klorojenik asitte en belirgin pikin dimer olduğu tespit edilmiştir. Katekol ve katekinde görülen yoğun polimerleşmeye klorojenik asitte rastlanmamıştır.

Kafeik asitte dimer ve tetramer yapıları görülmüştür. Tetramer yapının iyonlaşma ürünü olarak en kararlı ürünlerin dimer ve monomer olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, KATFO'nun oksidasyonu neticesinde fenolik maddelerden serbest radikaller oluşmakta, buradan C-C bağları ile polimerleşme gerçekleşmektedir, ve/veya kinon yapıları oluşarak buradan da C-O-C bağları ile polimerleşme olabilmektedir. Görülen en küçük ürün dimer, en büyük ürün ise nanomer olmuştur. Ancak, zamana karşı polimerleşmenin kimyasal olarak sürdüğü tahmin edilmektedir. Bu olasılık FT-IR verileri ile desteklenmektedir.

Fenolik maddelerden bu tür oligomer ve polimer oluşumunun fenollerin yapısını daha kararlı bir hale getirdiği ve fenolik maddelerin olası pro-oksidan/toksik etkisini azaltabileceği ya da engelleyebileceği düşünülmektedir. Büyüme ve enzim üretimi sırasında elde edilen sonuçlar bu iddiayı destekler niteliktedir.

## KAYNAKÇA

- ANDERSON D., Phillips B.J., Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1015-1025, (1999).
- CHELIKANI P., Fita I., Loewen P.C., Diversity of structures and properties among catalases, *CMLS*, 61, 192-208, (2003).
- COONEY D.G., Emerson R., *Thermophilic fungi*, ed: W.H. Freeman & Comp., San Fransisco, (1964).
- CUI T., Nakamura K., Tian S., Kayahara H., Tian Y.L., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2948-2956, (2006).
- ERÇİN, Ö., Cloning of the *Scytalidium thermophilum* Bifunctional Catalase / Phenol Oxidase Gene and Expression in *Aspergillus Sojæ*, (Mastır Tezi), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2008).
- FATTOUCH S., Caboni P., Coroneo V., Tuberoso C.I.G., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., Cabras P., *J. Agric. Food Chem.*, 55, 963-969, (2007).
- FIGUEIREDO A.R., Campos F., de Freitas V., Hogg T., Couto J.A., Effect of Phenolic Aldehydes and Flavonoids on Growth and Inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*, *Food Microbiology*, 25, 105-112, (2008).
- HAFIDI M., Amir S., Revel J.C., *Process Biochemistry*, 40, 2615-2622, (2005).
- HAKI G.D., Rakshit S.K., Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, *Bioresource Technology*, 89, 17-34, (2003).
- HE Y., Li J., Uyama H., Kobayashi S., Inoue Y., *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 39, 2898-2905, (2001).
- KOCABAS, D.S., Bakir, U., Phillips, S.E.V., McPherson, M.J., Ogel, Z.B., Purification, Characterization, and Identification of a Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 407-415, (2008).
- KOCABAS, D.S., Pearson, A.R., Phillips, S.E.V., Bakir, U., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Trinh, C., Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of a Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65: 486-488, (2009).
- KURAKOV A.V., Kupletskaya M.B., Skrynnikova E.V., Somova N.G., Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 59-64, (2001).

LAUGHTON M.J., Halliwell B., Evans P.J., Robin J., Hoult S., 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin, *Biochemical Pharmacology*, 38, 2859-2865, (1989).

MAYER A.M., Harel E., Polyphenol Oxidases in Plants, *Phytochemistry*, 18, 193-215, (1979).

MORISHITA T., Yamaguchi H., Degi K., *Plant Prod. Sci.*, 10, 99-104, (2007).

NIKFARDJAM M.S.P., Mark L., Avar P., Figler, M., Ohmacht R., *Food Chemistry*, 98, 453-462, (2006).

OSMAN A.M., Wong K.K.Y., Fernyhough A., The laccase/ ABTS system oxidizes (+) catechin to oligomeric products, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1272-1279, (2007).

SMEJKALOVA D., Piccolo A., Spiteller M., Oligomerization of Humic Phenolic Monomers by Oxidative Coupling under Biomimetic Catalysis, 40, 6955-6962, (2006).

ÖGEL Z.B., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir A.S., Production, Properties and Application to Biocatalysis of a Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase from Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 853-862, (2006).

RUBERTO G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C., Tommasi N.D., *Food Chemistry*, 100, 203-210, (2007).

SELASSIE C.D., DeSoyza T.V., Rosario M., Gao H., Hansch C., Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?, *Chemico- Biological Interactions*, 113, 175-190, (1998).

SHARMA H.S.S., Economic Importance of Thermophilous Fungi, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 1-10, (1989).

THAVASI V., Bettens R.P.A., Leong L.P., Temperature and Solvent Effects on Radical Scavenging Ability of Phenols, *Journal of Physical Chemistry A*, 113, 3068-3077, (2009).

TORELLI S., Belle C., Hamman S., Pierre J-L., Substrate Binding in Catechol Oxidase Activity : Biomimetic Approach, *Inorganic chemistry*, 41, 3983-3989, (2002).

VETRANO A.M., Heck D.E., Mariano T.M., Mishin V., Laskin D.L., Laskin J.D., Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase, *The Journal Of Biological Chemistry*, 280, 35372-35381, (2005).

WANG Y.C., Chuang Y.C., Ku Y.H., *Food Chemistry*, 102, 1163-1171, (2007).

WANG H., Tokusige Y., Shinoyama H., Fujii T., Urakami T., Purification and Characterization of a Thermostable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus auratiacus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, 169-173, (1998).

WHELAN T.J., Gray M.J., Slonecker P.J., Shalliker R.A., Wilson M.A., *Journal of Chromatography A*, 1097, 148-156, (2005).



WILLIAMS R.J., Spencer P.E.J., Rice-Evans C., Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity, *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838-849, (2004).

WON K., Kim Y.H., An E.S., Lee Y.S., Song B.K., *Biomacromolecules*, 5, 1-4, (2004).

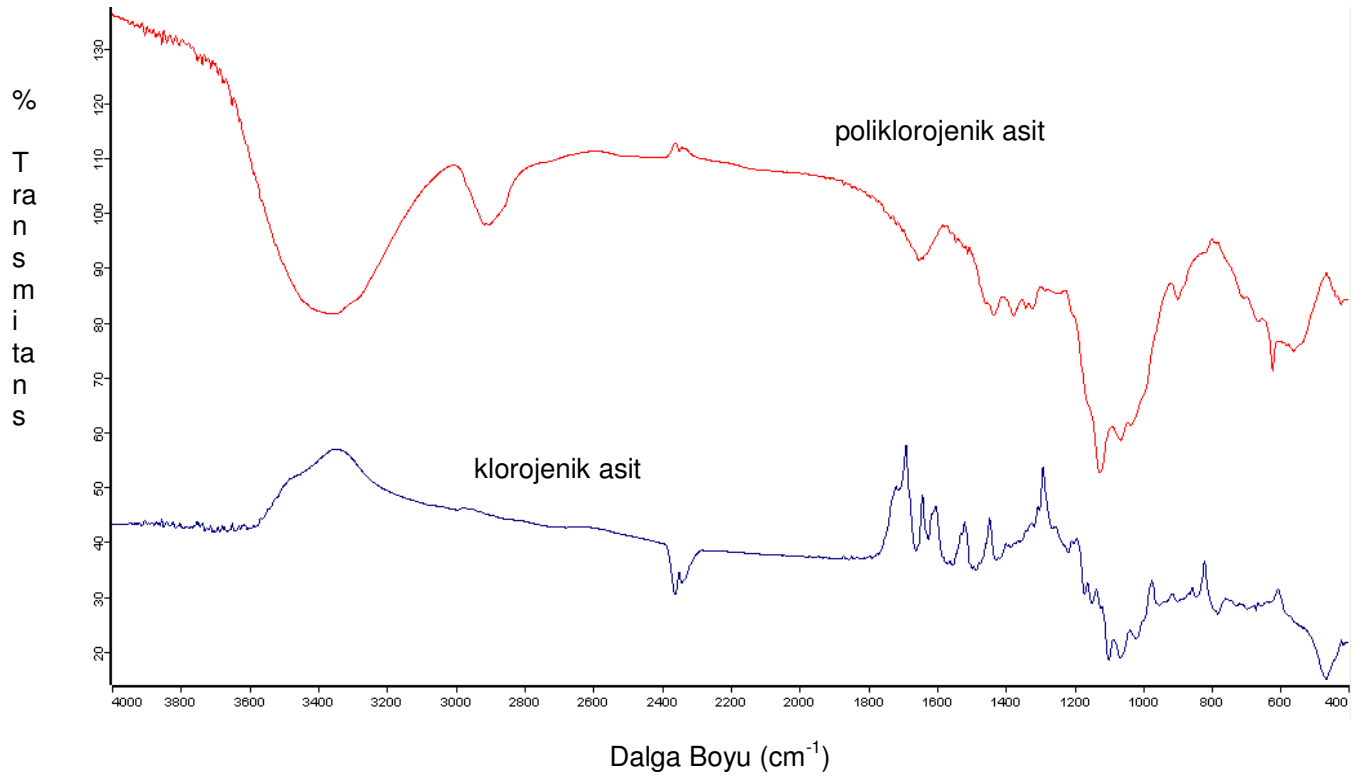
YÜZÜGÜLLÜ, Y., Functional and Structural Analysis of Catalase-Phenol Oxidase from *Scytalidium thermophilum*, (Doktora Tezi), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2010).

ZHU B., Li J., He Y., Yoshie N., Inoue Y., *Macromol. Biosci.*, 11, 684-693, (2003).

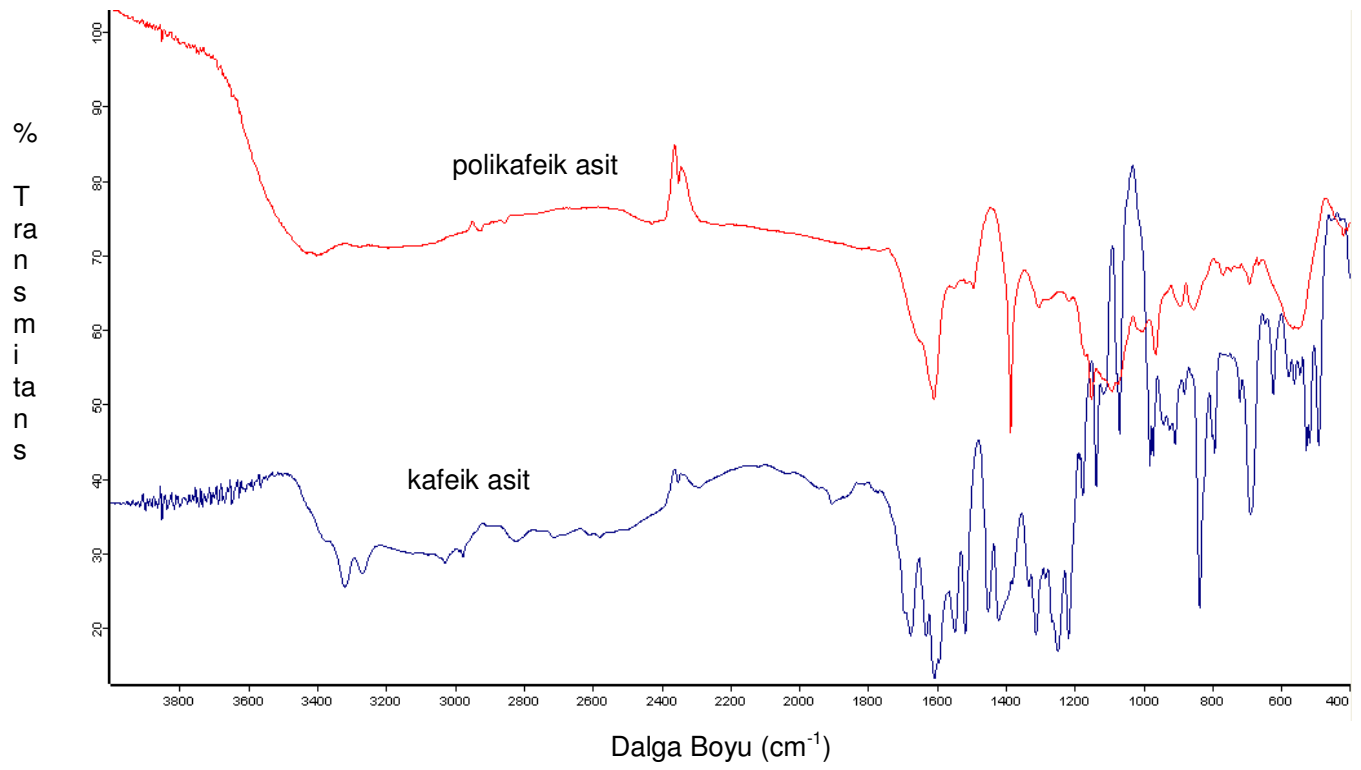
**EKLER**

**EK A**

## Klorojenik Asit



## Kafeik asit



## Katekin

