



Bu makaleye şu şekilde atıf yapılır: Demir, D. & Eken, C. (2024). Taze ve Kuru *Agaricus bisporus*'da Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Karşılaştırılması, *Mantar Dergisi*, 15(Özel sayı) 111-117.

Geliş(Received) :04.11.2024

Kabul(Accepted) :19.12.2024

Araştırma Makalesi

Doi: 10.30708/mantar.1579418

Taze ve Kuru *Agaricus bisporus*'da Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Karşılaştırılması

Dudu DEMİR^{1*}, Cafer EKEN²

*Sorumlu yazar: dududemir@isparta.edu.tr

¹İsparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, İsparta, Türkiye/ dududemir@isparta.edu.tr

²İsparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, İsparta, Türkiye/ cafereken@isparta.edu.tr

Öz: *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) İmbach, dünyada olduğu gibi ülkemizde de ticari olarak kültürü yapılan en önemli mantar türlerinden biridir. Polifenol oksidaz (PPO), meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltgeyen ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açan bir enzimdir. PPO enziminin katalizlediği enzimatik karama reaksiyonları ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir. Bu çalışmada, *A. bisporus*'un taze ve kuru halinin PPO enziminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Taze ve kuru *A. bisporus*'da mevcut olan PPO enzimlerinin ekstraksiyonu, saflaştırılması (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kolon kromatografisi) ve karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırmada afinite jeli olarak Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit kullanılmıştır. Saflaştırılan taze ve kuru *A. bisporus*'daki PPO aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. PPO enzim aktivitelerinin belirlenmesi için substrat olarak katekol kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *A. bisporus*'un taze ve kuru hallerinin PPO aktivitelerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırma, taze ve kuru *A. bisporus*'daki PPO enzimlerinin karşılaştırılması olarak incelendiği ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Afinite Kromatografisi, Karakterizasyon, *Agaricus bisporus*, Polifenol Oksidaz

Comparison of Polyphenol Oxidase Enzymes in Fresh and Dried *Agaricus bisporus*

Abstract: *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) İmbach is the most important mushroom species cultivated commercially in our country as well as in the world. The polyphenol oxidase (PPO) is an enzyme that catalyzes the oxidation of phenolic compounds commonly found in fruits and vegetables, oxidizes them to o-quinones, and leads to the formation of brown melanin pigments that cause browning as a result of their polymerization. Enzymatic browning reactions catalyzed by the PPO enzyme are undesirable because they reduce the taste, appearance, and nutritional value of the product. In this study, it was aimed to compare the PPO enzyme of fresh and dried *A. bisporus*. Extraction, purification (ammonium sulfate precipitation, dialysis, and affinity column chromatography), and characterization of PPO enzymes present in fresh and dry *A. bisporus* were performed. Sepharose 4B-L-tyrosine-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid was used as an affinity gel for purification. PPO activities in purified fresh and dried *A. bisporus* were evaluated using the



spectrophotometric method. Catechol was used as a substrate for the determination of PPO enzyme activities. As a result of the study, it was determined that the PPO activities of fresh and dried *A. bisporus* were different. This is the first comparative study on PPO enzymes in fresh and dried *A. bisporus*.

Keywords: Affinity Chromatography, Characterization, *Agaricus bisporus*, Polyphenol Oxidase

Giriş

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de ticari olarak kültürü yapılan en önemli mantar türü, kültür mantarı olarak bilinen *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach'dur (Sesli ve ark., 2020). Protein, karbonhidrat, doymamış yağ asitleri, diyet lifi, mineral maddeler ve vitaminler bakımından değerli bir gıda olan yenilebilir mantarlar, aynı zamanda eşsiz aroma ve lezzetleri ile tercih edilen bir besindir (Eren ve Pekşen, 2019). Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanında kaliteli ve ucuz olması nedeniyle potansiyel polifenol oksidaz enzimi (PPO) kaynağı olarak endüstrinin birçok alanında da kullanılmaktadır (Marusek ve ark., 2006). Polifenol oksidaz (PPO) enzimi bakır içeren ve oksidoredüktaz sınıfında yer alan bir metalo enzimdir (Friedman, 1997). Polifenol oksidazlar; katekolaz (EC 1.10.3.1), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve tirozinaz (EC 1.14.18.1) olmak üzere başlıca üç gruba ayrılır (Sheptovitsky ve Brudvig, 1996). PPO enzimi Schoenbein tarafından 1856 yılında ilk olarak yemeklik mantarlarda saptanmıştır (Whitaker, 1972). Daha sonra birçok sebze ve meyvede PPO enzimi belirlenip karakterize edilmiştir (Laurila ve ark., 1998). PPO enzimi mikroorganizmalarda, kabuklu deniz hayvanlarında, bazı hayvansal organlarda ve bitkiler âleminde bulunmaktadır. Ayrıca, bazı toprak türlerinde de bulunduğu bildirilmektedir (Sarkar ve ark., 1989; Mos'ko ve ark., 1992). Ayrıca PPO, bitkilerde dayanıklılığı teşvik eden savunma enzimlerindedir (Passardi ve ark., 2005; Prasannath, 2017). PPO'nun gıda endüstrisindeki önemi ise, enzimatik kararmaya sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Kararmadan sorumlu tutulan PPO enzimi, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır (Laurila ve ark., 1998). PPO enziminin katalizlediği enzimatik kararma reaksiyonları ürünün görünüm, tat ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir.

Şapkalı mantarlarda (Basidiomycota) PPO'lar, bu ürünlerin değerini düşüren hasat sonrası istenmeyen enzimatik kahverengileşmeye neden olması dolayısıyla çok sayıda ve detaylı araştırmalar yapılmıştır. Mantarlar arasında ise *A. bisporus*, PPO açısından en çok çalışılan türdür (Wichers ve ark., 1996; Seo ve ark., 2003; Şimşek

ve Yemenicioğlu, 2007; Gouzi ve ark., 2012; Wu ve ark., 2013; Zaidi ve ark., 2014; Kaur ve ark., 2022; Morgab ve ark., 2023).

Bu çalışmada, kültür mantarı *A. bisporus*'un taze ve kuru halinin PPO enziminin aktivitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bitki materyalinin toplanması

Çalışmada kullanılan *Agaricus bisporus* Isparta ilinde yerel bir marketten temin edilmiştir. Taze mantar hemen laboratuvara getirilmiş (tüm fiziksel hasarlardan kaçınarak) ve mantarın yarısı (50 g) PPO için taze olarak, diğer yarısı da (50 g) gölgede 2 hafta kurutulduktan sonra PPO için kullanılmıştır. Taze hali 50 g gelen mantar kurutulduktan sonra tartıldığında kuru hali yaklaşık olarak 5 g gelmiş ve saflaştırma işleminde bu miktar kullanılmıştır.

Enzimin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Ham PPO ekstraktının hazırlanması

PPO enzim ekstraksiyonunda Sarsenova ve ark. (2023) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla taze ve kurutulmuş mantar örnekleri sıvı azot ile havanda iyice ezilmiş (Şekil 1) ve daha sonra 0.87 g K₂HPO₄, %0.5 (w/v) PEG, 1 mmol/L askorbik asit ve %1 (v/v) Triton X-100 içeren 50 mL ekstraksiyon tamponu (100 mmol/L, pH 7) içerisinde 30 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılarak homojenize edilmiştir. Kullanılan ekstraksiyon tamponu taze olarak hazırlanmıştır. Ekstraksiyondan sonra karışım tülbentle süzülmüş ve ardından 4 °C'de 30 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 1. Mantar örneklerinin sıvı azot ile havanda ezilmesi
a) Taze mantar b) Kuru mantar

Enzimin saflaştırılması

Taze ve kuru mantar PPO enzimlerin saflaştırılması Arslan ve ark. (2004) tarafından kullanılan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Polifenol oksidaz enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit kolonu kullanılarak mantarın taze ve kuru halinden saflaştırılmıştır. Süpernatant %80 doygunlukta katı amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve çökelti 4 °C'de 15000 rpm'de 40 dakika santrifüj edilerek toplanmış, 5 mM (pH 6.30) fosfat tampon çözeltisinde yeniden çözülmüş ve aynı tampon çözeltisine karşı diyaliz edilmiştir. Bu çözelti, 50 mM (pH 5.0) fosfat tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş olan afinite kolonuna uygulanmıştır. Ayrıca bu tampon çözeltisi jeli yıkamak için de kullanılmıştır. PPO enzimi, 1 M NaCl içeren 0.05 mol/L fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ile 2 mL'lik Eppendorf tüplerine elüe edilmiştir.

PPO aktivitesinin belirlenmesi

Taze ve kuru mantar PPO aktivitesi, UV-Görünür spektrofotometre (Spectramax-Plus 384, Molecular Devices, LLC., San Jose, CA 95134, ABD) ile, bir dakika boyunca substrat olarak katekol kullanılarak 420 nm'de absorbans artışı ölçülerek belirlenmiştir (Arslan ve ark., 2004). Örnek küvet 0.13 mL 0.1 M substrat, 0.83 mL 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ve 0.04 mL enzim çözeltisi içerirken, kör ise sadece 1.0 mL substrat çözeltisi

içermiştir. Ölçümler üçer tekrarlı yapılmış ve bu değerlerin ortalaması alınmıştır. Bir birim PPO aktivitesi, absorbans değerinde 0.001 mL⁻¹dk⁻¹'lik bir değişikliğe neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Taze ve kuru mantar için ham ekstraktaki ve tüm saflaştırma aşamalarındaki protein miktarları, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Bradford (1976) tarafından açıklanan yöntemle göre 595 nm'de absorbans ölçülerek belirlenmiştir.

PPO'nun kinetik özellikleri

Taze ve kuru *A. bisporus* PPO için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve maksimum reaksiyon hızı (Vmax) değerleri, Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak pH 7'de ve 25 °C sıcaklıkta katekol için değişen substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir (Lineweaver ve Burk, 1934).

Bulgular

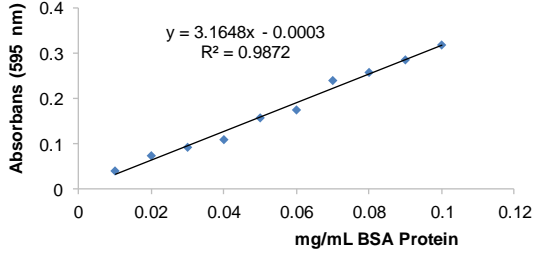
Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kolonu kullanılarak, PPO enzimi *A. bisporus*'un taze ve kuru halinden başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır (Tablo1 ve Tablo 2). Taze ve kuru mantar için ham ekstraktaki ve tüm saflaştırma aşamalarındaki protein miktarları Bradford yönteminden elde edilen grafiğe göre hesaplanmıştır (Şekil 2).

Tablo 1. Taze *Agaricus bisporus*'dan PPO'nun ekstraksiyonu ve saflaştırılması

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam aktivite	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	107	17301.67	1851278.33	23.3285	79356.98	
Amonyum Sülfat	12	10620.83	127450.00	15.6673	8134.76	0.10
Diyaliz	13	15355.00	199615.00	11.1400	17918.70	0.23
Afinite Kromatografisi	2	2315.00	4630.00	0.0047	990069.19	12.48

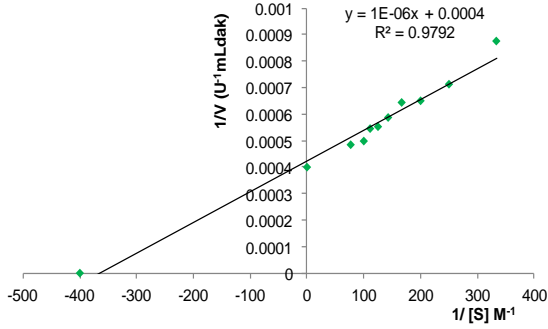
Tablo 2. Kuru *Agaricus bisporus*'dan PPO'nun ekstraksiyonu ve saflaştırılması

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam aktivite	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	83	18170.83	1508179.17	38.7882	38882.39	
Amonyum Sülfat	13	11900.00	154700.00	17.0469	9074.97	0.23
Diyaliz	13	9846.67	128006.67	11.9534	10708.84	0.28
Afinite Kromatografisi	2	16186.25	32372.50	0.0303	1069441.42	27.50

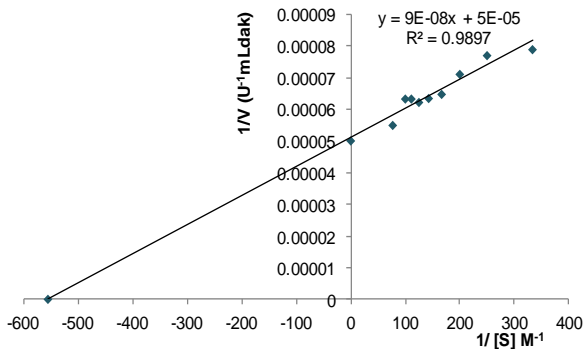


Şekil 2. Bradford yöntemiyle elde edilen protein standart grafiği

Agaricus bisporus'un taze ve kuru halinin PPO enzimlerinin maksimum reaksiyon hızı (V_{max}), Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve V_{max}/K_m değerleri, pH 7 ve 25 °C sıcaklık koşulları altında Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 3 ve Şekil 4) kullanılarak hesaplanmış ve değerler Tablo 3'de verilmiştir.



Şekil 3. Taze *Agaricus bisporus* PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. Kuru *Agaricus bisporus* PPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3. Taze ve kuru *Agaricus bisporus* PPO enziminin katekol substratı için belirlenen K_m ve V_{max} değerleri

	K_m (mM)	V_{max} (U/mLdak)	V_{max}/K_m
Taze <i>Agaricus bisporus</i> PPO	2.5	2500	1000
Kuru <i>Agaricus bisporus</i> PPO	1.8	20000	11111

Tartışma

Yaygın olarak kültür mantarı adıyla bilinen *Agaricus bisporus*, ülkemizde ve dünyada ticari olarak kültürü yapılan en önemli mantar türlerinden biridir. Hasat sonrası mantarlarda enzimatik kararmadan meydana gelen renk değişimi görülmektedir. Enzimatik kararmadan meydana gelen bu renk değişimleri diğer gıdalarda olduğu gibi mantarın görünümü açısından da çok önemlidir ve istenmemektedir. Enzimatik kararmaya sebep olan PPO enziminin mantarlarda da araştırılması bu açıdan önemlidir. Yapılan literatür araştırmasında PPO çok sayıda mantar türünden saflaştırılıp, karakterize edildiği tespit edilmiş fakat, aynı mantarın taze ve kurutulmuş halinden PPO enzimini tanımlayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, polifenol oksidaz enzimi taze ve kuru *A. bisporus*'dan Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografisi jeli ile sırasıyla 12.48 kat ve 27.50 kat saflaştırılmıştır. Aynı afinite kromatografi jeli kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda PPO enzimi, *Boletus erythropus* Pers.'tan 28.5 kat (Özel ve ark., 2010), *Macrolepiota gracilentia* (Krombh.) Wasser'dan 65.3 kat (Kolcuoğlu, 2012), *Lactarius piperatus* (L.) Pers.'tan 13.9 kat (Öz ve ark., 2013), *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair'dan 26.6 kat (Dedeoğlu ve Güler, 2009) ve kurutulmuş *Volvariella bombycina* (Schaeff.) Singer'dan 33.85 kat saflaştırılmıştır (Sarsenova ve ark., 2023).

Agaricus bisporus'un taze ve kuru halinin PPO enziminin katekol substratı için K_m değerleri sırası ile 2.5 mM ve 1.8 mM olarak bulunmuştur. Aynı mantar kurutulduğunda enzimin katekol substratına olan ilgisinin biraz daha arttığı görülmektedir. Substrat olarak katekol kullanılarak farklı mantar türlerinde PPO kinetiği üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir. Katekol substratı için *A. bisporus*'tan elde edilen PPO'nun K_m değerleri 0.67 mM (Wu ve ark., 2013), 0.71 mM (Kaur ve ark., 2022) ve 2.1 mM (Zhang ve Flurkey, 1997), *L. piperatus*'tan elde edilen PPO'nun K_m değeri 1 mM (Öz ve ark., 2013), kurutulmuş *V. bombycina*'dan elde edilen PPO'nun K_m değeri 1.67 mM olarak belirlenmiştir (Sarsenova ve ark., 2023). Bu çalışmada saptanan taze mantar PPO K_m değerinin aynı mantarın kuru halinin K_m değerinden ve diğer çalışmalarda (Wu ve ark., 2013; Kaur ve ark., 2022; Zhang ve Flurkey, 1997; Öz ve ark., 2013; Sarsenova ve ark., 2023) farklı mantar türlerinde tespit edilen K_m değerlerinden daha büyük olduğu ve enzimin katekol substratına olan ilgisinin daha küçük olduğu saptanmıştır. *Agaricus bisporus*'un kuru halinin PPO enziminin katekol substratı için K_m değeri Zhang ve Flurkey (1997) tarafından belirlenen değerden küçük yani enzimin katekol substratına olan ilgisinin daha büyük olduğu bulunurken, farklı mantar türlerinde yapılan çalışmalarda (Wu ve ark., 2013; Kaur ve ark., 2022; Öz ve ark., 2013)

bulunan Km değerlerinden ise büyük olduğu yani enzimin katekol substratına olan ilgisinin daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, bu çalışmadaki *A. bisporus*'un kuru halinin PPO enzimi ile kurutulmuş *V. bombycina*'dan elde edilen PPO enziminin katekol substratına karşı ilgileri birbirine yakın bulunmuştur (Sarsenova ve ark., 2023). PPO'nun Km değerlerindeki geniş aralık; kullanılan farklı test yöntemleri, farklı çeşitler, aynı çeşidin farklı kökenleri, tampon çözelti, besin kaynakları, enzim ekstraktının saflığı ve farklı ekstraksiyon pH değeri gibi farklı nedenlerden kaynaklanmış olabilir (Sarsenova ve ark., 2023).

Saflaştırma tablolarındaki ham ekstrakt aktivitelerine bakıldığında, mantarın kuru halinin PPO aktivitesinin (18170.83 U/mL'dak) taze halinin PPO aktivitesine (17301.67 U/mL'dak) göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ham ekstrakt aktiviteleri değerindeki farklılığın taze halinde sıvı azot ile havanda ezilirken meydana gelen PPO'dan kaynaklanan enzimatik kararmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mantarın kuru halinde ise sıvı azot ile havanda ezilirken PPO'dan kaynaklanan enzimatik kararma gerçekleşmemiş ve ham ekstrakttaki PPO enzimi aktivitesini korumuştur (Şekil 1). PPO enzimi afinite jeli ile saflaştırıldıktan sonra, taze ve kuru *A. bisporus* PPO için Vmax değerleri katekol için sırasıyla 2500 U/mL'dak ve 20000 U/mL'dak olarak belirlenmiştir. Mantarın kuru halinin PPO enziminin Vmax

değerinin tazeeye göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Wu ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *A. bisporus* PPO için Vmax değeri 3333 U/mL'dak olarak belirlenmiştir. Kurutulmuş *V. bombycina*'dan elde edilen PPO'nun Vmax değeri ise 833.33 U/mL'dak olarak belirlenmiştir (Sarsenova ve ark., 2023).

Bu çalışmada, ekstraksiyon tamponu, amonyum sülfat çökeltmesi, diyaliz ve afinite kolon kromatografisi kullanılarak, *A. bisporus*'un taze ve kuru hallerinden PPO başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Ayrıca, katekol substratının 25 °C sıcaklık ve pH 7 koşullarında Km ve Vmax kinetik değerleri de belirlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, taze ve kuru *A. bisporus*'daki PPO'nun saflaştırılması ve karakterizasyonunun karşılaştırılması üzerine ilk çalışmadır.

Yazar Katkıları

Tüm yazarlar eşit katkıya sahiptir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Etik Beyanı: Bu çalışmanın hazırlanma sürecinde bilimsel ve etik ilkelere uyulduğu ve yararlanılan tüm çalışmaların kaynakçada belirtildiği beyan olunur. (Dudu DEMİR, Cafer EKEN)

Kaynaklar

- Arslan, O., Erzen, M., Sinan, S. and Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chem.*, 88, 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.005>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Dedeoglu, N. and Guler, O.O. (2009). Differential *in vitro* inhibition of polyphenoloxidase from a wild edible mushroom *Lactarius salmonicolor*. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 24, 464–470.
- Eren, E. and Pekşen, A. (2016). Türkiye'de kültür mantarı üretimi ve teknolojik gelişmeler. *Mantar Dergisi*, 10 (özel sayı), 225-233.
- Friedman, M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Gouzi, H., Depagne, C. and Coradin, T. (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 500-506.
- Kaur, R., Sharma, S., Kaur, S. and Sodhi, H. (2022). Biochemical characterization with kinetic studies of melanogenic enzyme tyrosinase from white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 59, 718-725.
- Kolcuoğlu, Y. (2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochem.*, 47, 2449–2454.
- Laurila, E., Kervinen R. and Ahvenainen, R. (1998). The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News and Information*, 9 (4), 53-66.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658–666, doi:10.1021/ja01318a036.
- Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H. and Inlow, J. K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.*, 100 (1), 108-123.
- Morgab, M. A. H., Hussein, A. D. and Hadi, S.T. (2023). Extraction and purification of polyphenol oxidase from edible mushroom (*Agaricus bisporus*) and its use in the manufacture of pastries. *Food Research*, 7(4), 64-70.
- Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A. and Klenitskaya, I. A. (1992). Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus. *Eurasian Science*, 5, 60-65.
- Öz, F., Colak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N. and Sesli, E. (2013). Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *J. Food Biochem.*, 37, 36–44.
- Özel, A., Colak, A., Arslan, O. and Yildirim, M. (2010). Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chem.*, 119, 1044–1049.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. and Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
- Prasannath, K. (2017). Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, 11 (1), 38-48.
- Sarkar, J. M., Leonowicz, A. and Bollog, J. M. (1989). Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21 (2), 223-230.
- Sarsenova, A., Demir, D., Çağlayan, K., Abiyev, S., Darbayeva, T. and Eken, C. (2023). Purification and properties of polyphenol oxidase of dried *Volvariella bombycina*. *Biology*, 12, 53. <https://doi.org/10.3390/biology12010053>
- Seo, S.-Y., Sharma, V. K. and Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2837–2853.
- Sesli, E., Asan, A. ve Selçuk, F. (edlr.) Abacı Günyar, Ö., Akata, I., Akgül, H., Aktaş, S., Alkan, S., Allı, H., Aydoğdu, H., Berikten, D., Demirel, K., Demirel, R., Doğan, H.H., Erdoğan, M., Ergül, C.C., Eroğlu, G., Giray, G., Halikî Uztan, A., Kabaktepe, Ş., Kadaifçiler, D., Kalyoncu, F., Karaltı, İ., Kaşık, G., Kaya, A., Keleş, A., Kırbacı, S., Kıvanç, M., Ocak, İ., Ökten, S., Özkale, E., Öztürk, C., Sevindik, M., Şen, B., Şen, İ., Türkekul, İ., Ulukapı, M., Uzun, Ya., Uzun, Yu.,Yoltaş, A. (2020). *Türkiye Mantarları Listesi*. İstanbul: Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayınları.
- Sheptovitsky, Y.G. and Brudvig, G.W. (1996). Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry*, 35, 16255-16263.
- Şimsek, S. and Yemenicioğlu, A. (2007). Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochem.*, 42, 943–950.
- Whitaker, J.R. (1972). Principles of enzymology for the food sciences, *Marcel Dekker*. New York, Chapters. 22-24.

- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M. and Chapelon, C. G. J. (1996). Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 43, 333–337.
- Wu, J., Gao, J., Chen, H., Liu, X., Cheng, W., Ma, X. and Tong, P. (2013). Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus*. *Int. J. Food Prop.*, 16, 1483–1493.
- Zaidi, K. U., Ali, A. S. and Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzym. Res.*, 120739.
- Zhang, X. and Flurkey, W.H. (1997). Phenoloxidases in *Portabella* mushrooms. *J. Food Sci.*, 62, 97–100.